



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**ASOCIACION DE GENES PRO-INFLAMATORIOS CON LA PROGRESIÓN DE LA  
INFECCIÓN CAUSADA POR EL VIRUS DE INFLUENZA AH1N1 EN PACIENTES  
DEL CENTRO DE MÉXICO**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**GARCIA RAMIREZ ROMAN ALEJANDRO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN MANUEL MEJIA ARANGURE  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, IMSS  
COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
DR. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS, INER

**MÉXICO, D.F. ENERO, 2016.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 26 de octubre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **GARCÍA RAMÍREZ ROMÁN ALEJANDRO** con número de cuenta **301583284** con la tesis titulada **"ASOCIACIÓN DE GENES PRO-INFLAMATORIOS CON LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR EL VIRUS DE LA INFLUENZA AH1N1 EN PACIENTES DEL CENTRO DE MÉXICO"**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN MANUEL MEJÍA ARANGURÉ**:

Presidente: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL  
Vocal: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO  
Secretario: DR. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA  
Suplente: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO  
Suplente: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de enero de 2016

*M. del Coro Arizmendi Arriaga*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## AGRADECIMIENTOS:

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la formación académica brindada y todo el apoyo en la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca brindada durante los 4 años de desarrollo del proyecto., la cual contribuyo de forma vital en mis proyectos No. CVU/Becario: 293959/ 225328.

Este estudio fue apoyo por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) CONACyT- FOSIS SALUD2009-C02-126699 y por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) FIS/IMSS/PROT/ G13/1212.

Gracias al Dr. Mejia Aranguré por alentarme a seguir en esta carrera, que si bien fue difícil, me ayudo a aprender mucho más acerca de la vida y a fortalecer mi relación con Dios.

Gracias por llevarme a comprender que lo más importante está allá arriba y por llevarme a ser valiente y defender las bendiciones recibidas, a no conformarme, a ver más alto y a confiar en la fidelidad de Dios.

Un agradecimiento muy especial a los miembros del Comité Tutorial; Dra. Yolanda López y Dr. Ramcés Falfán-Valencia, que durante estos 4 años estuvieron al pendiente del proyecto. Los 2 proporcionaron apoyo invaluable al proyecto, y cada uno de ustedes fue pieza clave en la formación de mi perfil académico, profesional y moral. Muchas gracias.

## **Agradecimientos personales:**

*“ No perdáis, pues, vuestra confianza, que tiene gran galardón;  
Porque os es necesaria la paciencia, para que habiendo hecho la voluntad de  
Dios, obtengáis la promesa.  
Hebreos 10:35 - 36”*

Mucho que agradecer y poco espacio y palabras para expresarlo. Estos 4 años sin lugar a dudas han sido los años mas intensos que hasta ahora en mis 30 años he vivido. Estoy infinitamente agradecido con Dios por ponerme en esta carrera, porque EL es bueno, fiel y perfecto. Sus caminos son mas altos que los nuestros y recibir sus promesas en su tiempo, te da una vida llena de gozo y abundancia. Por un tiempo dude en entrar a este Posgrado y en especial al Doctorado en Ciencias Biológicas por sentirme incapaz para desempeñarme y lograr con éxito terminar los estudios. Y es por ello que agradezco a Migue Olvera, Jany Ramirez y Juan Manuel Mejia; así como mi Pao y mis padres por guiarme a confiar en Dios y a tomar la mejor decisión, que bendición tenerlos en cada paso de mi vida y sobretodo en encrucijadas tan complejas.

Desde el primer semestre, el panorama se complico y mi proyecto fue modificado completamente, agradezco a la Dra. Ostrosky y el Dr. Emilio Cordova A. su invaluable apoyo y consejo para llegar al nuevo proyecto... la influenza pandémica.

En esas fechas cuando se cerraban las opciones, agradezco la amistad y tenacidad de la Dra. Lupita Morales, la Dra Martha Pérez y el Dr. Ramcés Falfán por llegar justo a tiempo con los reactivos, las muestras y el núcleo básico que dieron fruto como resultados de este proyecto.

El laboratorio de HLA, del INER; se convirtió en un nuevo hogar y las bendiciones siguieron derramándose; gracias al Dr. Juan Reséndiz, la Dra. Gloria Pérez, el Químico Camarena , el M. en C. Enrique Ambrosio y todos los integrantes como Liz García, Areli Joaline, Aseneth, Luis, Gustavo Galicia, Manuel Costrillo, Susana Zoreque, Ana Juárez; que siempre estuvieron ahí para mí para alentarme, para hacerme reír, para compartirme de su comida o su sonda Taqman o por salvaguardar las muestras como si fueran su tesoro maspreciado; todo el proyecto llego a buen término en gran parte a todas sus sugeencias, aportaciones y donaciones. Que valiosos fueron chavos.

Y bueno que decir de la Dra. Ramírez Venegas, su colega el Dr. Sansores M. y todo su equipo de la Clínica de EPOC y tabaquismo; gracias por su apoyo en la recolección de datos, expedientes y variables; gracias a Diana Reyes, Lety Ochoa, Dra. Nora Bautista, Dra. Paulin, Dra. Angy Nolasco, Sandra Solano y los Dres. Hernandez, Flores y Velazquez- Uncal, todos siempre con la mejor actitud y dispuestos a apoyar este proyecto, sin ustedes no se hubieran logrado estos resultados.

El proyecto avanzaba y un tsunami de regalos caídos del cielo...llegaban. 2013 que año. Año en el que conviví demasiado con mi Nonno y aprendí a darme al 100 a él, año de candidatura; lo que siempre temí, año de tormentas intensas y año de Boda. Gracias Dios por mi ahora amada esposa Paola Alamilla Galicia. Gracias mi Maipu por tu paciencia, por tu misericordia , por tu creatividad y por tu gracia hacia mí, Desde el 23 de noviembre, cada instante sabe diferente a tu lado, cada nota y cada carácter de esta tesis , del artículo y del que he desarrollado... fue gracias a ti, mi nena. Gracias por alentarme a creer y por regalarme este versículo en este caluroso noviembre de 2015 cuando pensaba que el artículo de PLOS ONE, sería solo un sueño no logrado. Gracias por amarme tanto y por ser siempre tu, solo tu; la que mi alma siempre anheló. TE AMO MAS ALLA DEL ARCO-IRIS Y sin regreso.

Agradezco el apoyo al equipo del Dr. Mejía y en especial al Dr. Núñez, la M en C Marilu, la M en C Janet y el M en C Aldo Duarte. Gracias por sus sinceras oraciones y por sus consejos clave al concluir este trámite de titulación.

Dra Yolanda gracias por su exigencia, su carácter y su coraje.

Dr. Ramcés gracias por su paciencia, su tenacidad y por enseñarme tanto, no solo académicamente, sino moralmente. Gracias por su ejemplo y por todos sus grandes consejos, pero sobretodo por hacer de este un gran proyecto, por creer en el y por llevarme a presentarme en mi primer congreso nacional e internacional. Por creer en los alumnos siempre. Gracias a la Dra. Lulú Arriaga, la Dra. Leda Torres y la Dra. Castillo Rodal por su tiempo y sus grandes aportaciones a la tesis. Gracias a todo el equipo CRM.

Y no por ser los últimos, gracias a mi amada Familia. Que haría sin ustedes, gracias a mis primos y primas, mis tías Pily, Clau, Jany, Gil, Lalo, Lau y Ber; así como Héctor, Tere, Marisssa, Julieta y Benjamín por darme alojamiento, por ponerme en oración, por consentirme y pensar en mi; por estar al pendiente de mi, por amarme tanto y por hacerme reír en todo momento y por confiar en mi. Cuantas alegrías y cuanto gozo hemos compartido, los quiero mucho. Gracias abue Bertha y mi tía Maruca y Pina por su amor incondicional y por siempre recibirme en casa pero sobretodo por su fortaleza.

A mis amigos; Mayo, Liz, Nelly, Carito, Mario, Gualo, Jessy G, Manuel, Mariana, Lorenia, César, Edgar, Keta, Pepe Velazquez, Lety, Lupe, Diego, Bora, Manuel López, David Mijangos, Mau, Clau, Richi, Ana, Martín y familia, Rita y fam., en fin.....tantos y tantos que son parte integral de lo que soy y que me llevan a creer mas y a fortalecerme en la fé, gracias por estar a mi lado en todo este proceso y hacerlo más divertido y ligero.

Gracias a A.Shuni, por ser gran hermana, entenderme y conocerme tan bien, por estar siempre a mi lado

Y por último gracias a mi Padre y Madre por darme la vida, por amarme desde antes de que naciera y por ser ese soporte, ese pilar que nunca se quiebra. Gracias por ser tan comprensivos y llevarme a crecer y madurar, y acompañarme en cada proyecto que he emprendido. Los AMO.

Esta tesis, tiene un dedicatoria especial: A mi abuelo Gilberto Ramírez Pazaran y mi tía la Profa. Gloria Domínguez Pazaran. Hasta el último día de sus vidas estuvieron conmigo y sobretodo amaron mi ser y todo lo que conllevaba. Su fuerza, su templanza, su carácter en todo lo que hacían y su amor entregado a todos y cada uno de nosotros me llevan a luchar por mas, a amar más y a perdonar más. A reír más y a juzgar menos y a recordar que cuando partes de esta vida, lo único que dejas es un gran legado, una vida de impacto y la bendición de pertenecer a esta gran familia. En verdad.. que nos vamos a llevar?. Gracias a los dos los AMO y todos los días los recuerdo y los siento muy cerca.

## Índice

Índice de Figuras.....	i
Abreviaturas.....	ii
I. Resumen.....	1
II. Abstract.....	3
III. Introducción.....	5
IV. Objetivo.....	8
V. Antecedentes.....	9
5.1 Epidemiología.....	9
5.2. Características del virus.....	11
5.3. Fisiopatología de la Influenza.....	13
5.4 Vacunación y tratamientos.....	15
5.5. Sistema inmunológico innato y adaptativo: Respuesta al virus.....	16
5.6 Influenza e inflamación: Crossroads.....	24
5.7. La Tormenta de citocinas.....	26
5.8. Polimorfismos de un solo nucleótido y respuesta inflamatoria.....	31
5.9. SNPs y asociación con la infección por el virus de la influenza AH1N1.....	35
VI. Justificación.....	38
VII. Planteamiento del problema.....	39
VIII. Hipótesis.....	39
IX. Metodología.....	40
8.1. Declaraciones ética.....	40
8.2. Diagnostico.....	41
8.3. Población de estudio.....	41
8.4. Recolección de información y variables.....	43
8.5. Genotipificación de las variantes alélicas: SNPs.....	43
8.6. Cuantificación de citocinas.....	45
8.7. Análisis estadístico.....	45
X. Resultados.....	47
9.1. Características demográficas.....	47
9.2. Riesgo a la infección grave por A/ H1N1.....	50
9.3. Susceptibilidad a la enfermedad.....	51
9.4. Gravedad clínica.....	54
9.5. Susceptibilidad a mayor gravedad en la infección por A/H1N1.....	56
9.6. Análisis por alelos.....	60
9.7. Riesgo de mortalidad.....	63
9.8. Cuantificación de citocinas en suero.....	63
9.9. Análisis de haplotipos.....	65
XI. Discusión.....	67
XII. Conclusiones.....	75
XIII. Literatura citada.....	76
XIV. Anexos (artículo requisito).....	89

## Índice de figuras.

Fig. 1 Informe Semanal y anual generado en la página web de la Dirección General de Epidemiología (DGE) el Instituto de Diagnostico y Referencia (InDRE) de México.

Fig. 2. Estructura del virus de la influenza.

Fig. 3 Respuesta del sistema inmune innato ante la infección por el virus de influenza.

Fig. 4 Diagrama de flujo para la recolección y clasificación de muestras de pacientes del estudio.

Fig. 5 Concentración en suero de IL- 6, IL- 5 y GM- SCF en los grupos AHC, ILI y pH1N1.

Fig. 6 Haplotipo generado en Haploview *software* para 4 SNPs en el gen *TNF* en pacientes ILI.

## Abreviaturas.

AHC: Contactos asintomáticos sanos

AMB: Ventilación mecánica asistida

ARDS: Síndrome Respiratorio agudo

BMI: Índice de masa corporal

BUN: Nitrógeno ureico en sangre

CCL1: Quimiocina (motivo C-C) ligando 1

CDC: U.S. Centro de Control y prevención de enfermedades

CI: 95% Intervalo de Confianza

CPK: Creatinin Fosfocinasa

CRP: Proteína C reactiva

GLR: Tasa de letalidad global

HLA: Antígeno Leucocitario humano

ICU: Unidad de cuidados intensivos

IFN: Interferon

IL: Interleucina

ILI: Enfermedad similar a influenza

LDH: Lactato deshidrogenasa

LTA: Linfotoxina  $\alpha$

OR: Odds ratio

PaO<sub>2</sub>: Presión parcial de oxígeno en sangre

SNP: Polimorfismo de nucleótido sencillo

RT-PCR: PCR tiempo real

TNF: Factor de necrosis tumoral

WHO: Organización Mundial de la Salud (por sus siglas en inglés)

## Resumen

A mediados de abril de 2009 surge en México el virus de la influenza A (H1N1) pdm09 y se propaga rápidamente en todo el mundo. El mayor número de muertes por influenza A/H1N1 pdm09 se dieron en el centro del país, donde los sistemas de atención son mejores y más accesibles que en el resto de territorio; dada la existencia de adecuadas vías de transporte y hospitales donde pueden acudir los pacientes con mayor gravedad de la enfermedad; a pesar de lo anterior el número de casos fue similar en norte y sur. Los grupos más afectados fueron individuos entre 30-46 años y un alto porcentaje no tuvo comorbilidades que pudieran explicar formas más graves de la enfermedad.

La hipercitocinemia es el principal mecanismo inmunopatológico que contribuye a un curso clínico más severo en casos de influenza A/H1N1. La mayoría de los pacientes infectados por el virus de la influenza A/H1N1 pdm09 presentaron niveles sistémicos incrementados de proteínas pro-inflamatorias, entre ellas IL-6, IL-8, y TNF- $\alpha$ . Proponemos que existen SNPs en regiones promotoras de genes pro-inflamatorios asociados a la gravedad de la infección por el virus de la influenza A/H1N1 pdm09.

Métodos: Se incluyeron 145 pacientes con influenza A/H1N1 (pA/H1N1), 133 pacientes con enfermedad similar a influenza (ESI) y 360 contactos sanos asintomáticos intradomiciliarios (AHC). Se genotipificaron 11 SNPs en 6 genes: *TNF*, *LT*, *IL1B*, *IL6*, *CCL1* e *IL8* empleando PCR en tiempo real; el genotipo de comparación fue el ancestral. Los genotipos se correlacionaron con 27 variables clínicas de gravedad.

Resultados: El genotipo heterocigoto para el rs1818879 (GA) de IL6 muestra una asociación al riesgo a la infección severa por el virus de la influenza A/H1N1 ( $p=0.00000005$  OR=5.94, IC 95% 3.05-11.56), dos SNPs

en IL1B se encuentran asociados a un riesgo disminuido ante la infección; rs16944 AG y rs3136558 TC (OR= 0.52 y OR= 0.51, respectivamente). Por otro lado, se determinó la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad (pA/H1N1 vs. AHC); el genotipo heterocigoto (rs909253 TC) en LTA fue de riesgo (p= 0.003 OR= 1.9); algo similar ocurre con el genotipo CC (rs3136558) en IL1B (p=0.041 OR= 1.89). Adicionalmente se compararon los pacientes graves vs. moderados. El genotipo TNF-238 GA presentó un riesgo a la gravedad OR= 16.06 p= 0.007.

Conclusiones: El gen TNF rs361525 se asoció con la gravedad de la enfermedad, mientras que los SNPs en IL1B rs3136558 e IL6 rs1818879 se asocian a la susceptibilidad a la infección por el virus de influenza A/H1N1(pdm09).

## Abstract

Background: In mid-April 2009, the influenza A (H1N1) pdm09 virus emerged in Mexico and rapidly expanded worldwide. The greatest number of deaths from influenza A (H1N1) pdm09 occurred in the central region of the country, where healthcare systems are better than in the rest of the country and where access to health services is greater given the existence of better transport routes and hospitals providing care to patients with severe illnesses. The most affected groups were individuals aged between 30-46 years, and a high percentage had no comorbidities that could explain the most severe forms of the disease. Hypercytokinemia is the main immunopathological mechanism contributing to a more severe clinical course in influenza A (H1N1) virus infections. Most patients infected with the influenza A (H1N1) pdm09 virus had increased systemic levels of pro-inflammatory proteins, including interleukin IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ). We propose that there are single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in promoter regions of pro-inflammatory genes associated with the severity of influenza A (H1N1) pdm09 virus infection.

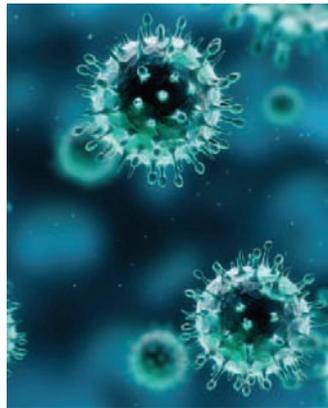
Methods: One hundred forty-five (145) patients with influenza A (H1N1) (pA/H1N1), 133 patients with influenza-like illness (ILI), and 360 asymptomatic healthy contacts (AHCs) were included. Eleven SNPs were genotyped in 6 genes (*TNF*, *LT*, *IL1B*, *IL6*, *CCL1*, and *IL8*) using real-time PCR; the ancestral genotype was used for comparison. Genotypes were correlated with 27 severity clinical variables.

Results: The IL6 rs1818879 (GA) heterozygous genotype shows an association with the risk of severe influenza A (H1N1) virus infection (odds ratio [OR] =5.94, 95% confidence interval [CI] 3.05-11.56), and two IL1B SNPs, rs16944 AG and rs3136558 TC, are

associated with decreased risk of infection (OR=0.52 and OR=0.51, respectively). Genetic susceptibility was determined (pA/H1N1 vs. AHC); the LTA rs909253 TC heterozygous genotype was at risk (OR=1.9), and a similar association occurred with the IL1B rs3136558 CC genotype (OR=1.89). Additionally, severely ill patients were compared with moderately ill patients. The TNF-238 GA genotype had a risk of disease severity (OR=16.06, p=0.007).

Conclusions: The TNF gene was associated with disease severity, whereas *IL1B* and *IL6* SNPs were associated with influenza A (H1N1 pdm09) virus infection susceptibility.

Keywords: Influenza A (H1N1); polymorphisms; IL6; IL1B; genetic susceptibility.



## Introducción

A pesar de la constante insistencia de parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para tomar las medidas precautorias en relación a una pandemia, basada en una gran cantidad de modelos epidemiológicos predictivos, a mediados de abril de 2009 surge en México el virus de la influenza A (H1N1) pdm09 y se propaga rápidamente en todo el mundo. A nivel mundial, la tasa de mortalidad es de aproximadamente 0.2-1.23%, en México fue cercana a 0.4% [1]. Durante el periodo de abril de 2009 a agosto de 2015 se produjeron en nuestro país 81,783 casos confirmados y 1,675 muertes debido a la infección por este virus [2].

El número de casos de influenza AH1N1 pdm09 en la zona norte y sur del país fue similar entre ellos, no obstante el mayor número de muertes se dieron en el centro del país, donde los sistemas de atención son mejores y más accesibles que en el resto de territorio; dada la existencia de adecuadas vías de transporte y hospitales donde pueden acudir los pacientes con mayor gravedad de la enfermedad; a pesar de lo anterior el número de casos fue similar en norte y sur [1]. Los grupos más afectados fueron individuos entre 30-46 años [3] y un alto porcentaje no tuvo comorbilidades que pudieran explicar formas más graves de la enfermedad.

Por medio de estudios experimentales y clínicos, se ha identificado que el mecanismo patogénico más importante en la infección es la desregulación inflamatoria sistémica que correlaciona con la severidad y progresión de la enfermedad [4,5]. La secreción de citocinas por las células infectadas es necesaria al inicio de la respuesta inmunológica para controlar la replicación del virus. Una de las características importantes que se presentan en la enfermedad es la hipercitocinemia (“tormenta de citocinas”) que contribuye a la

evolución más severa de la infección [3,6-7]. En pacientes con síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SIRA) causada por influenza AH1N1, se han reportado niveles plasmáticos elevados de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas hasta 10 días después de inicio de los síntomas. Diversos estudios evidenciaron que la mayoría de los pacientes infectados por el virus A/H1N1 pdm09 presentaron niveles incrementados de proteínas pro-inflamatorias como IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en suero [4-7]. Los genes que codifican para estas moléculas son polimórficos y ciertos alelos han sido asociados con la susceptibilidad a diferentes enfermedades, que cubren un amplio espectro de patologías, desde infecciosas hasta oncológicas, incluyendo pulmonares y sistémicas [8].

La variabilidad en la producción de citocinas entre individuos en parte está dada por factores genéticos, especialmente por la presencia de polimorfismos en regiones reguladoras importantes; como los promotores [9,10]. En particular los niveles elevados en suero de IL-1 $\beta$  e IL-6 han sido identificadas como marcadores de severidad en el daño pulmonar agudo durante la infección por el virus de la influenza A/H1N1 pdm09 [11], adicionalmente niveles elevados de IL-1 $\beta$ , se considera un buen biomarcador temprano de la gravedad y progresión de la inflamación pulmonar en pacientes que requieren ventilación mecánica y que no responden a los tratamientos antimicrobianos convencionales [4].

El extenso polimorfismo de estas moléculas estaría asociada con la alta tasa de mortalidad durante la pandemia de influenza AH1N1 en México, así como la prevalencia de la circulación del virus AH1N1 pdm09 en nuestro país. Según Borja *et al.* 2012 una cuarta oleada de influenza observada en México durante el periodo 2011-2012, no fue reportada en otros países. Por lo que estas diferencias se podrían explicar por patrones de susceptibilidad genética en mexicanos o fallas en la cobertura de vacunación [12]. En el presente estudio se incluyó un gran número de pacientes que fallecieron por la infección del

virus de la influenza A/H1N1 y tuvo como objetivo establecer la asociación entre polimorfismos de genes relacionados a inflamación (*TNF, IL6, IL8, IL1B, LTA, CCL1*) y la susceptibilidad a la enfermedad, la gravedad y la muerte por la infección causada por el virus de la influenza A/H1N1 en pacientes del Centro de México.

## Objetivo

Establecer si existe asociación entre los SNPs en genes relacionados a inflamación y la gravedad de la infección por influenza AH1N1pdm09.

Objetivos específicos.

- Conocer la frecuencia de los alelos, genotipos y haplotipos de *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *LTA* de riesgo en pacientes ILI, p AH1N1 y contactos asintomáticos sanos.
- Determinar la asociación entre el genotipo de los genes estudiados y la gravedad clínica de la enfermedad.
- Determinar haplotipos funcionales para los SNP estudiados.
- Cuantificar los niveles de citocinas en suero en pacientes ILI, p AH1N1 y contactos asintomáticos sanos.

## **Antecedentes**

### **Epidemiología**

Hasta la fecha el mundo ha experimentado 4 pandemias desde comienzos del siglo XX: La influenza española (H1N1) en 1918/19, la influenza asiática (H2N2) en 1957, la influenza de Hong Kong (H3N2) en 1968 y la influenza H1N1 en 2009. De los virus pandémicos anteriores, el virus de 1918 fue el más devastador, el cual causó hemorragias pulmonares aguda y edema [13]. Dado que los antibióticos no estaban disponibles en aquel entonces, la neumonía secundaria a bacterias fue la principal causa de muerte entre los infectados con el virus [14].

México experimentó una serie de tres oleadas pandémicas de influenza AH1N1 en la primavera, verano y otoño del 2009 [1,3,7]; seguido de una gran campaña de vacunación hacia finales de ese año. Estas tres oleadas estuvieron asociadas a un nivel elevado de mortalidad en relación a lo visto en otros países [15-17]. Debido a que una proporción significativa de la población se encontraba protegida hacia finales del 2012; ya sea por la exposición natural al virus o por la vacuna, se esperaba un cambio en el patrón de edades, que es típico de periodos post-pandémicos.

Sin duda, uno de los resultados más sorprendentes de los análisis epidemiológicos fue la ocurrencia de una cuarta oleada pandémica de influenza AH1N1 en México durante el periodo 2011-2012 (Fig.1); país que experimentó una excesiva mortalidad durante las pasadas oleadas en el 2009 [12]. Esta dinámica se observó desde el inicio de la pandemia hasta el verano del 2014.

El Reino Unido experimentó dos oleadas; una en primavera y otra en otoño de 2009, y una más grave en 2010-2011, que no fue vista en otros países europeos [18]. Estas diferencias

pueden ser explicadas por variaciones geográficas, inmunidad previa, estrategias de control, conectividad, salud pública y por ahora permanece como una llave para la investigación a futuro.

**Información hasta la semana epidemiológica 33 del 2014**

Tabla 1. Casos y defunciones por ETI/IRAG e Influenza, según año de ocurrencia, México 2012-2014

	Cierre 2012	Cierre 2013	% de cambio 2012-2013	Corte al 14/8/2013	Corte al 14/8/2014
<b>Información Diaria</b>					
• Casos de ETI/IRAG	43,129	36,130	-16.2	18,723	48,188
• Defunciones ETI/IRAG	1,218	1,381	13.4	540	2,549
• Casos de Influenza	8,204	4,517	-44.9	2,253	7,330
• Defunciones por influenza	322	334	3.7	61	764
Del total de casos y defunciones confirmadas a influenza:					
• Casos de A(H1N1)	6,090	1,840	-69.8	233	5,395
• Defunciones por A(H1N1)	266	253	-4.9	14	688

**América del Norte**

**Mexico**

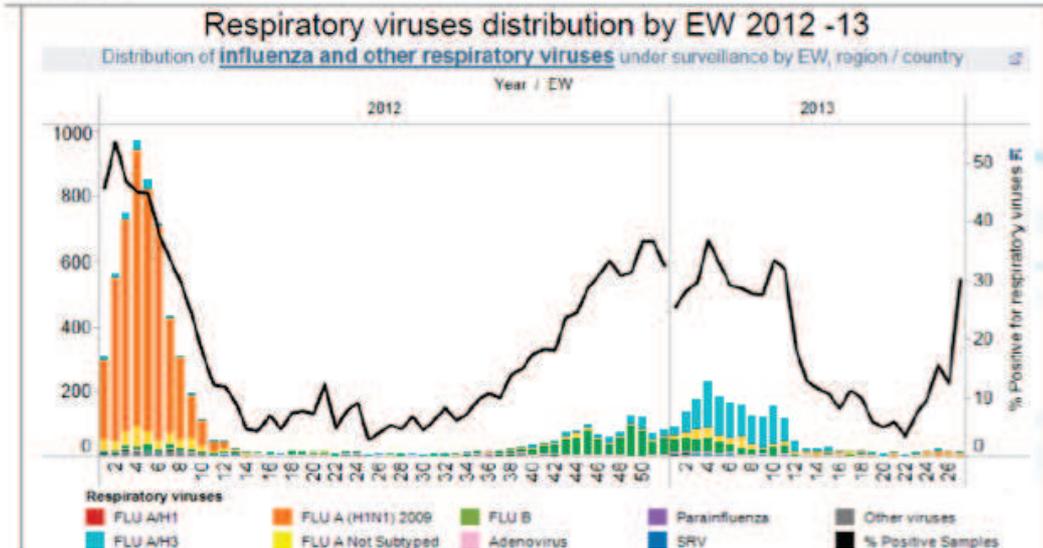


Figura 1a. Informe Semanal generado en la página web de la Dirección General de Epidemiología (DGE) el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) de México. En la primera imagen se observa el comparativo entre la presencia de casos en Enfermedad tipo Influenza (ETI) y los casos confirmados de influenza AH1N1, así mismo se observa la cifra de muertes hasta el mes de agosto de 2014.

Fig 1b. Comparación en el año 2012 y 2013 se ve un incremento considerable tanto en muertes como en casos confirmados. En la segunda imagen se despliegan los principales subtipos de influenza circulantes durante el periodo 2012-2013. Es de importancia observar cómo el subtipo Flu AH1N1 en color naranja es el que predomina más brevemente en el año 2012. Tomado de *epidemiologia.salud.gob.mx/dgae*

## **Características del virus**

El virus está compuesto de 1% ARN, 70 % proteína, 20 % lípidos y 8 % carbohidratos [19]. Estos virus son de RNA envueltos. Su genoma es único entre los virus, ya que es segmentado, esto contribuye a la capacidad de variabilidad. Los virus de influenza son pleomórficos, de 80 a 120 nm, de simetría helicoidal. El genoma de RNA es de polaridad negativa, de cadena sencilla, fragmentado, empaquetado por las nucleoproteínas [20]. La subdivisión en tipos A, B y C se basa en las diferencias antigénicas presentes en la nucleoproteína y la proteína de matriz.

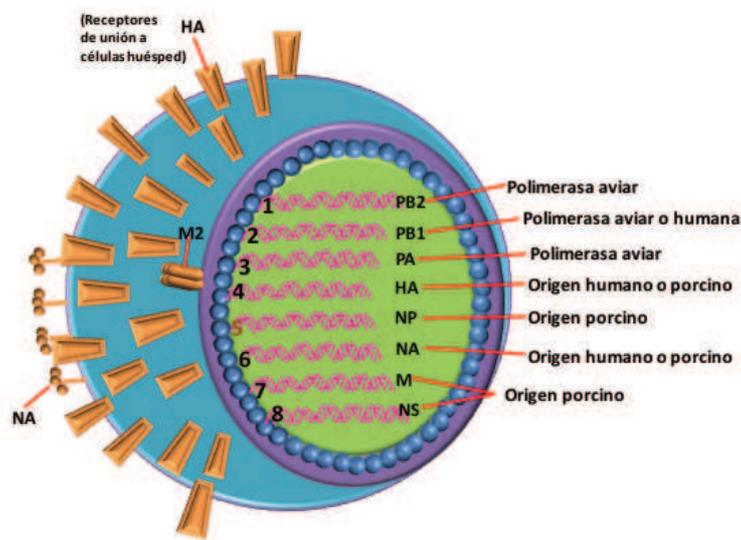
La envoltura viral deriva de la membrana plasmática celular del hospedero y presenta dos glicoproteínas importantes para el funcionamiento viral: la hemaglutinina o proteína H y la neuroaminidasa o proteína N [21,22]. Hoy en día se han identificado 16 subtipos de hemaglutinina y 9 de neuroaminidasa. Sólo los subtipos H1, H2, H3 y N1, N2 afectan con mayor frecuencia al hombre; los otros tipos son causantes de enfermedades zoonóticas.

Los virus de influenza A tienen preferencia por los receptores de ácido siálico como forma de unión a la célula que infectan. La hemaglutinina tiene como papel principal la unión a los receptores celulares presentes en glicolípidos o glicoproteínas presentes en residuos de ácido siálico o neuroaminídico unidos a la galactosa mediante enlaces alfa 2,6- galactósido, mientras que los virus de origen aviar tienen mayor afinidad por los receptores con enlaces alfa 2,3 –galactósido; lo cual está determinado por la afinidad al residuo aminoacídico en la posición 226 de la hemaglutinina [23].

La neuroaminidasa tiene como papel específico retirar los residuos de ácido siálico presentes en la superficie celular, para que la hemaglutinina del virus que emerge de la célula infectada no permanezca ligada a los receptores de ácido siálico y de esta manera el

virión pueda ser liberado de la célula [21,24]. La proteína M2 solo se encuentra en la membrana del virus de influenza A y sirve de bomba de protones durante el proceso de desnudamiento viral [18].

Los segmentos genómicos están formados por una cadena de ARN, una molécula de nucleoproteína por cada 27 nucleótidos y un complejo enzimático (ARN polimerasa) formado por tres proteínas: PB1, PB2 y PA [19-20] Fig.2.



**Figura 2. Estructura del virus de la influenza. Tomado y modificado de Yu *et al.* 2012**

En los últimos años las investigaciones se han enfocado en el empleo de la genética reversa para elucidar el papel de cada uno de las proteínas vitales en la patogenicidad del virus de la influenza. El espectro de la gravedad de la enfermedad causada por diversos virus de influenza A en humanos es extremadamente amplio, lo que indica que las condiciones del hospedero juegan un papel muy importante en el desarrollo de la patogénesis.

La infección por el virus de la influenza inicia en el tracto respiratorio y en la mayoría de los casos la infección es contenida en este órgano. El virus de la influenza entra al hospedero a través de la cavidad nasal u oral donde encuentra la primera barrera; el moco

que recubre al epitelio celular. Si el virus es exitoso para atravesar la capa mucosa, entonces se unirá e invadirá el epitelio celular respiratorio [25].

El primer paso para la infección es la replicación; que es la unión de las espículas de las hemaglutininas (HA) a regiones específicas del receptor de ácido siálico de la célula huésped; el receptor específico de especie. El virus ingresa a la célula por el mecanismo de endocitosis, forma una vesícula que luego es transferida a un endosoma. En este paso es importante la participación de la HA, que promueve la fusión de la cubierta viral con la membrana del endosoma, liberando la microcápside en el citoplasma.

A partir de ahí, el virus se puede expandir a las células del sistema inmunológico, como macrófagos y células dendríticas (DCs) en el tracto respiratorio [26,27].

### **Fisiopatología de la influenza**

La influenza es una enfermedad respiratoria, febril altamente contagiosa, que es provocada por uno de los tres virus de la familia Orthomixoviridae (A, B y C) [28].

Los principales tipos de virus en la población humana son la influenza A y B. Dos subtipos o linajes, de estos virus circulan actualmente entre la población: los subtipos de influenza A; AH1N1 y AH3N2 y los subtipos de de influenza B ; Yamagata y Victoria [29]. La infección por estos virus generalmente causa una enfermedad respiratoria auto-limitante, caracterizada por dolor de cabeza, ardor de garganta, dolor muscular, fatiga y fiebre súbita mayor a 38 grados. Generalmente estos síntomas mejoran después de algunos días, sin embargo, el virus de influenza pandémica AH1N1 es más patogénico que los virus de influenza estacional [30].

Mientras que el curso normal de la enfermedad dura aproximadamente una semana, la recuperación completa para llevar a cabo las actividades cotidianas, toma hasta 4 semanas. La infección por el virus de la influenza en los grupos de riesgo (individuos mayores de 65 años, niños menores de 12, embarazadas, pacientes obesos y pacientes con enfermedades concomitantes) pueden por lo general desarrollar mayores complicaciones, que incluye el síndrome respiratorio agudo, en algunos casos a la septicemia o falla múltiple orgánica [31-32]. La infección tiene una amplia gama de manifestaciones que varía desde los cuadros asintomáticos, los cuadros leves o las neumonías virales severas que progresan hasta la muerte del paciente. La manifestación clínica más frecuente es la fiebre mayor a 38 grados que ha sido reportada en un rango de 87-97 % de los casos [33]. **Tabla 1.**

**Tabla 1. Comparación de Síntomas de gravedad entre influenza y resfriado común.**

Síntomas	Resfriado común	Influenza
Fiebre	Es poco frecuente en adolescentes y adultos; en los niños puede llegar hasta los 39°C	Generalmente llega a 39°C, pero puede elevarse hasta los 40°C, dura de 3 a 4 días
Dolor de cabeza	Es raro que se presente	Aparece de manera brusca y es muy intenso
Dolores musculares	Leves a moderados	Generalmente muy intensos
Cansancio y debilidad	Leves a moderados	A menudo son intensos y pueden durar de 2 a 3 semanas
Postración	Nunca	Es de inicio brusco y muy intensa
Congestión Nasal	Es frecuente	Algunas veces aparece
Estornudos	Es frecuente	Algunas veces aparece
Ardor y/o dolor de garganta	A menudo	Algunas veces

**Tomado y modificado del Boletín Informativo emitido por el Centro de Información para decisiones en Salud Pública.**

Durante el proceso infeccioso el virus ejerce varios efectos en el hospedero que puede resumirse en las alteraciones del epitelio respiratorio, alteraciones en la función ciliar y

aumento en la expresión de receptores bacterianos [27]. La pérdida del revestimiento epitelial de las vías respiratorias altas o bajas es un factor que predispone a una mayor adherencia bacteriana [34] y a la complicación del cuadro clínico, caracterizado por la sobreinfección que se manifiesta con otitis media, sinusitis o neumonía [28-30]. Entre las bacterias más relacionadas a la infección secundaria se encuentran el *Pneumococcus* y el *Staphylococcus aureus*, lo que incrementa la mortalidad. La transmisión específica intra-especie de estos subtipos de virus, como H5N1 y la más reciente H7N9 hacia humanos está caracterizada por una tasa de mortalidad tan alta como del 60 %. [35]. En la reciente pandemia en México, la evolución clínica se caracterizó por neumonías graves con infiltrados nodulares, alveolares y en menor grado opacidades basales; estos cuadros rápidamente evolucionaron a síndromes de dificultad respiratoria junto con insuficiencia renal y daño multiorgánico en un 24 % de los casos [36].

### **Vacunación y tratamientos**

Las campañas de vacunación actuales, son las formas más exitosas de protección contra la enfermedad causada por virus estacionales. Sin embargo, aún existen retos importantes a vencer. Debido a los cambios genéticos (deriva génica), las vacunas protegen solamente contra cepas homólogas. Las vacunas disponibles requieren actualizarse, basado en la información de la antigenicidad de la cepa de influenza que está circulando entre los humanos [37]. La eficacia de la vacuna en poblaciones específicas, como las poblaciones inmunosuprimidas es baja. Una desventaja adicional es que no todos los individuos de los diferentes grupos de riesgo son vacunados cada año.

A nivel mundial, se han aprobado diferentes fármacos para el tratamiento de la influenza; entre ellos, los adamantanos, amantadina y rimantadina; así como los inhibidores de neuroaminidasas (NAIs), oseltamivir, zanamivir y peramivir. Los adamantanos no son usados frecuentemente en la clínica debido a su resistencia natural que han desarrollado a los virus de influenza A circulantes y a la carencia de efecto antiviral contra los virus de influenza B [38]. A pesar de que el uso de NAIs ha sido tema de debate, los protocolos clínicos han mostrado una resolución más temprana de los síntomas y la resolución de la infección del virus, cuando el tratamiento es iniciado durante las primeras horas de aparición de síntomas (48 horas posteriores a la aparición de síntomas máximo).

Los virus de RNA como HIV-, HCV e influenza, se caracterizan por altas tasas de mutación. Como consecuencia, el tratamiento con un único agente antiviral, generalmente resulta en una rápida selección de las variantes menos susceptibles. El tratamiento con múltiples antivirales de forma simultánea, o con fármacos con una alta barrera de resistencia, conlleva a una mejor recuperación y a una menor tasa de resistencia. Se han encontrado altas tasas de resistencia en individuos tratados con tiempos prolongados para la eliminación del virus, como poblaciones con un sistema inmunológico inmunocomprometido o inmaduro [39].

### **Sistema inmunológico innato y adaptativo: Respuesta ante el virus**

El mecanismo de defensa que es provisto por el sistema inmunológico innato es una barrera especializada en el que co-existen diferentes mucosas que combate la invasión de patógenos. El RNA viral presente en las células infectadas es reconocido como extraño por los diferentes Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), los cuáles secretan

interferones tipo I (IFNs), citocinas pro-inflamatorias, eicosanoides y quimiocinas. Los interferones tipo I; producidos por macrófagos, neumocitos, células dendríticas y células plasmocitoides dendríticas pDCs [40-42], estimulan la expresión de cientos de genes que colectivamente son llamados como genes estimuladores de IFN (ISGs) en las células vecinas, las cuáles inducen un estado antiviral. Las citocinas pro-inflamatorias y los eicosanoides dan lugar a una inflamación sistémica y local, lo cual da como resultado fiebre y anorexia e instruye al sistema adaptativo a responder al virus de la influenza.

El sistema inmunológico innato comprende un sistema de líneas celulares que codifican a diferentes receptores que inspeccionan los compartimentos intracelulares y extracelulares en búsqueda de señales de infección y de motivos microbianos altamente conservados, también denominados PAMPs. Los PAMPs se encuentran específicamente presentes en el patógeno o son generados durante la infección. Los receptores de patrones de reconocimiento (PRRs) se expresan por células de la línea frontal de defensa; como macrófagos, monocitos, células dendríticas y células epiteliales y no están clonalmente distribuidos [43]. Los PRRs pueden reconocer lipopolisacáridos (LPS), antígenos virales y genomas bacterianos/virales, llevando a la activación de vías de señalización intrínsecas y la producción de diversas citocinas [44]. La producción de estas citocinas conlleva la activación de leucocitos y eliminación de los agentes infecciosos [45].

Los receptores unidos a membrana Tipo Toll (TLRs) y las lectinas tipo -C son los PRRs encargados del censo del medio extracelular y los compartimentos endosomales; mientras que el citosol es escaneado por sensores de ácidos nucleicos intracelulares como las proteínas inducibles de interferón (AIMs) y los genes inducibles de interferón tipo I (RIG-1). La activación de estos receptores da como resultado la producción de citocinas

pro-inflamatorias y la respuesta antiviral dependiente de interferón tipo I, a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (46).

El genoma del virus de la influenza es reconocido por el sistema inmunológico innato por los miembros de tres clases distintas de PRRs (con sus respectivos ligandos) que reconoce ácidos nucleicos: los receptores tipo Toll TLR3 (doble cadena de RNA), TLR7 (ssRNA) y TLR8 (ssRNA), los genes inductores de ácido retinoico I (RIG-1) y los miembros de la familia de receptores tipo NOD (NRLP3). RIG-I y NRLP3 detectan a los virus presentes dentro del citosol de las células infectadas (reconocimiento intrínseco), mientras que TLR3 detecta a las virus de las células infectadas, y TLR7 (TLR8 en humanos) detecta el RNA viral que ha sido dirigido a los endosomas de las células centinelas (reconocimiento celular extrínseco) [47]. TLR3 reconoce dsRNA en endosomas. En virtud de que las células infectadas por el virus de la influenza no generan dsRNA, debido a la actividad de la helicasa celular de RNA UAP56 (también conocida como helicasa de spliceosoma DDX39B), es común que TLR3 reconozca estructuras de RNA no identificadas que están presentes en células infectadas muertas que han sido fagocitadas por el virus [48]. Las células epiteliales respiratorias humanas expresan constitutivamente TLR3, por lo que la activación de las mismas inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias posterior a la infección por el virus de influenza.

En las células dendríticas plasmáticas, el receptor TLR7 reconoce genomas de RNA de cadena sencilla contenido dentro del virión de influenza que son ingeridas dentro del endosoma [48,49]. Este tipo de reconocimiento no requiere de la replicación viral. La señalización de TLR7 a través de la vía del adaptador MYD88 de distintos endosomas da como resultado la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) o del factor regulador 7 de

IFN (IRF7), los cuáles son factores de transcripción responsables de la estimulación de la expresión de citocinas pro-inflamatorias e IFNs respectivamente. El TLR8 es expresado por los monocitos y los macrófagos, y la estimulación por sus ligando de ssRNA resulta en la producción de IL-12 pero no IFN $\alpha$  [48]. No obstante, la relevancia de TLR8 en la infección por el virus de la influenza, no es claro.

En general, los TLRs endosomales tienen distintos papeles en la infección por el virus de la influenza. El TLR3 reconoce células infectadas e induce un estado antiviral, pero con un efecto en detrimento del reclutamiento de células inflamatorias inductoras del daño, mientras que TLR7 induce la respuesta de IFN para bloquear la replicación viral y promover la respuesta de los anticuerpos [50].

Los receptores tipo dominios de oligomerización de nucleótidos (NLRs) son un tipo de PRR intracelulares particulares que reconocen PAMPs y las señales derivadas del hospedero (DAMPs). Los NLRs están compuestos de un dominio central conservado, el cual media la unión de nucleótidos y oligomerización, un dominio terminal –COOH rico en leucinas (LRR), el cual censa agonistas a NLRs y tiene un efecto autoinhibitorio en su ausencia [51] y una región amino terminal, necesaria para la interacción de proteína-proteína. La familia de NLR se compone de 22 miembros, en función de su amino terminal y se clasifican en 4 subfamilias: NLRA, NLRB, NLRC, NLRP. La activación de algunos NLRs lleva al ensamble del inflamosoma; plataforma de alto peso molecular que permite la activación de la caspasa-1, que es necesaria para la maduración proteolítica y la liberación de las citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , IL-18 como se muestra en la **Fig. 3** [25, 28, 42,50].

Por su parte, RIG-1 es crucial para la detección viral y para la producción de IFN I en las células epiteliales infectadas, las células dendríticas y los macrófagos alveolares [47].

Dentro del citosol de las células infectadas por el virus de la influenza, RIG-1 reconoce el ssRNA viral trifosfato 5', que es generado posterior a la replicación viral [45, 48-51]. El ssRNA genómico intacto contiene 5'trifosfato y segmentos genómicos más cortos, así como partículas que contienen 5'trifosfato, que han sido identificadas como ligandos de RIG-1 en las células infectadas por el virus. Posterior al reconocimiento del RNA viral, el dominio de helicasa de RIG-I se une a l ATP, el cual facilita los cambios conformacionales que permiten que se una el dominio de reclutamiento de caspasa a la proteína de señalización antiviral mitocondrial adaptadora de señalización (MAVS).

Dado que el virus de la influenza se replica dentro del núcleo, la naturaleza y la localización precisa del RNA que es detectado por RIG-1 permanece a la fecha como un misterio. La señalización de MAVS resulta en la producción de citocinas pro-inflamatorias río abajo de la activación de NF-KB y en la producción de IFN tipo I e ISGs vía la activación de IRF3 [52]. NLRPs forma el complejo multiproteico inflamosoma que consiste de un NRLP (u otro PRRs), del adaptador ASC y la pro-caspasa 1. La activación del inflamosoma resulta en el procesamiento autocatalítico de la pro-caspasa 1 en su forma activa, la cual corta posteriormente la pro-IL1B y la pro-IL-18 y las convierte en IL-1B e IL-18, respectivamente, de forma que pueden ser secretadas.

NLRP3 es expresado por células como los monocitos, las células dendríticas, los neutrófilos y los macrófagos, así como algunas células del epitelio humano bronquial [53]. Dos señales son necesarias para activar la producción de citocinas por parte del inflamosoma. La primera señalización activa la transcripción y traducción de los genes que codifican para pro-IL1B, pro-IL18 y NRLP3, que es mediado por TLR el receptor de IL-1 (IL1-R) y la señalización del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). La señal

segunda inducida por el daño al hospedero que resulta en la activación y el corte de la caspasa1 y la secreción de la forma madura de IL-1B e IL-18.

Se ha demostrado que el ssRNA del virus de influenza es suficiente para activar la liberación de IL-1B [54]. El flujo de protones a través del canal iónico de matriz 2 (M2) en la red trans- Golgi dispara la activación de NRLP3, la formación del inflamosoma y el corte de pro-IL-1B y pro-IL—18 [55]. El flujo de protones a través de los canales iónicos M2 neutraliza el pH ácido del trans-Golgi para prevenir la activación de la HA a su forma fusogénica, y esta actividad de alguna forma dispara la activación del inflamosoma NRLP3. En los macrófagos, el virus de la influenza induce la activación de NRLP3 lo que genera un cambio en el potencial de membrana y la mitofusina 2, que asociadas con NRPL3 forman el complejo de inflamosoma. En virtud de lo anterior, la mitocondria tiene un papel central en la activación de NRLP3 en las células infectadas por el virus de la influenza [56].

Los estudios genéticos en ratones han demostrado un papel específico para cada uno de los genes estimuladores de interferón (ISGs); entre los que se encuentran la proteína MX, la proteína transmembrana inductora de interferón (IFITM) y PKR, que limitan la infección por el virus y su expansión.

La proteína MX se encuentra entre los primeros genes ISG identificados que restringen la infección. En ratones, la proteína MX1 se encuentra expresada en el núcleo y es un potente bloqueador de la infección; mientras que en MX2 se encuentra presente en el citosol y no presenta actividad anti-viral. Los humanos expresan las proteínas MX; MXA y MXB, cuando son estimulados con IFNs. La proteína MXA es citosólica y tiene una potente actividad antiviral en contra del virus de la influenza A, así como otros virus [57-59]. En contraste, la proteína MXB está presente en la cara citoplasmática del poro nuclear y recientemente se ha visto que inhibe la infección por HIV-1, pero no para la infección por

influenza [60-61]. Aún falta mucho por dilucidar en cuanto la funcionalidad de MX1 y MX2.

Las proteínas IFITM restringen la replicación de una gran cantidad de virus, incluyendo el de la influenza A, a través del bloqueo de la fusión de la membrana celular del hospedero con la del virus, con la posterior unión del virus y su endocitosis. Los ratones deficientes de IFITM3 son más susceptibles a la infección por el virus de la influenza [62-63]. IFITM3 se encuentra expresado constitutivamente en las células epiteliales del sistema respiratorio, en los macrófagos y en las células endoteliales. La familia sintasa oligoadenilato 2'-5' y la ribonucleasa L (RNAasa L) actúan en conjunto para degradar el RNA viral en el citosol [64].

Las quimiocinas que son producidas en el sitio de la infección reclutan células del sistema inmunológico adicionales, que incluye neutrófilos, monocitos y células natural killers (NK) a las vías aéreas. Las células epiteliales infectadas son los blancos de las células NK, las cuáles median la liberación del virus. En conjunto con los macrófagos alveolares, las células fagocíticas infectadas por los macrófagos reclutados, provee un importante mecanismo de destrucción del virus y un puente entre el sistema innato y el adaptativo.

El sistema inmune adaptativo no es de activación inmediata, ya que requiere de algunos días; la finalidad de la inmunidad adaptativa es eliminar el virus y generar una respuesta de memoria contra futuras infecciones por el mismo virus para poderlo detectar y eliminar más rápidamente.

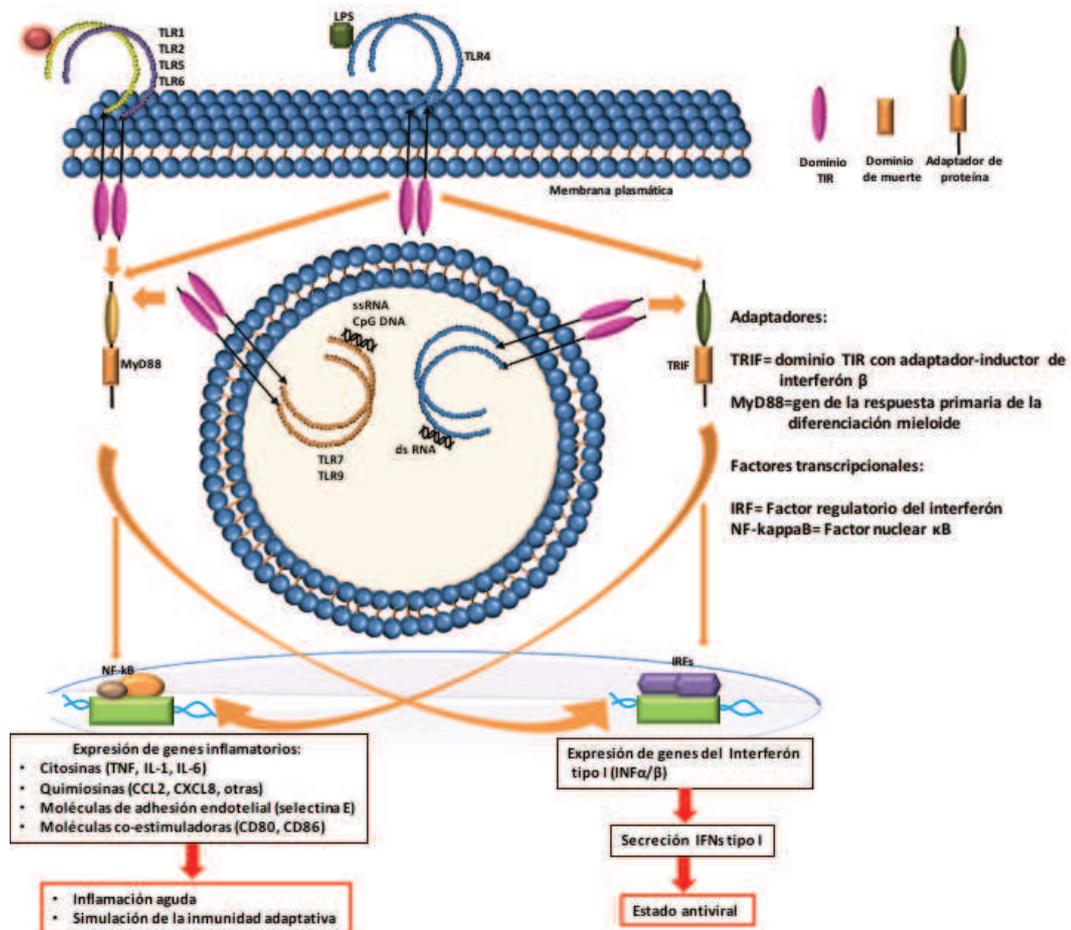


Figura. 3 Respuesta del sistema inmune innato ante la infección por el virus de influenza. Tomado y modificado de Iwasaki A., *et al.*, 2014

La respuesta del sistema inmune adaptativo a la infección por el virus de influenza A (IAV) es un proceso complejo e integrado, en el cuál intervienen un amplio espectro de estirpes celulares en defensa del hospedero. Posterior a la infección, las células dendríticas migran desde el pulmón hacia los nódulos linfáticos (dLNs) donde llevan a cabo la activación y la diferenciación de las células T CD8+ [65-67]. Las células T CD8+ efectoras específicas para IAV migran al pulmón [68] donde reciben señales adicionales desde las células dendríticas residentes en esta área con el fin de eliminar las células del epitelio infectado en una forma Fas, perforina o TRAIL dependiente [69-70]. Las células T CD4+ específicas a IAV también contribuyen en la respuesta inmunológica primaria. Además del papel que

tienen en la generación de la respuesta T dependiente de células B, las células T CD4<sup>+</sup> llegan a ser células Th1 productoras de IFN- $\gamma$  y células efectoras citotóxicas que de esta forma migran al pulmón y ayudan a la resolución de la infección [71-72]. Los anticuerpos secretados por las células B participan en la protección y resolución contra la infección primaria por IAV [69-71]. En particular, las células B han mostrado producir de forma natural anticuerpos capaces de reaccionar contra IAV así como neutralizar anticuerpos IgM generados en una forma independiente de células T posterior al reto [73].

Mientras que las células T CD8<sup>+</sup>, las células T CD4<sup>+</sup> y las B1 cooperan para eliminar la infección IAV desde la vía aérea, la activación de células B dependiente de células T es determinante en el desarrollo de una protección a largo plazo de una re-infección.

De forma puntual, la presencia sostenida de altos niveles de anticuerpos capaces de neutralizar al virus son importantes en esta protección. Esto se pudo apreciar en la reciente pandemia de H1N1pdm09, en la que los individuos de la tercera edad fueron protegidos por los anticuerpos generados décadas anteriores a través de la exposición a virus parecidos al H1N1 [74-75]. Los altos títulos de alta afinidad por anticuerpos son resultado de células formadoras de anticuerpos de larga vida (AFCs) y de células de memoria B que son inducidos durante la respuesta de células B dirigida por células T. De hecho, diversos estudios han demostrado la presencia de células AFCs y de memoria B específicas para IAV en humanos [76] y ratones [77].

### **Influenza e inflamación: Crossroads.**

La inflamación es una respuesta adaptativa a condiciones ajenas (infecciones o daño a tejidos); resultado de la búsqueda de restauración de la homeostasis [78]. La sincronización

entre la inmunidad innata y adaptativa en contra de patógenos es indispensable en organismos mayores, incluyendo a los humanos. En particular, el sistema innato juega un papel importante en la infección primaria con diferentes virus y bacterias [79].

El rubor tumor calor dolor y pérdida de la función son los marcadores de inflamación aguda. Cuando se localicen en la piel u otros tejidos estas respuestas incrementan el flujo sanguíneo y permite a los leucocitos celulares y las proteínas plasmáticas alcanzar sitios extravasculares al daño incrementa las temperaturas locales y genera dolor advirtiéndolo así al hospedero de una respuesta local [80]. Los mecanismos de reparación compensatorios son iniciados inmediatamente después de que inicia la inflamación y esto en muchos casos complementa el proceso de reparación tisular y la función orgánica.

En el pulmón infectado por el virus de la influenza A, se genera una respuesta pro-inflamatoria que a veces es suficiente para destruir al virus agresor, restablecer y reparar el daño. En ocasiones, la inflamación tisular es brusca y desmedida con liberación explosiva de varias citocinas, produciéndose daños locales y a distancia que pueden terminar con la vida de la persona infectada [81].

Cabe resaltar, que la inducción aberrante y el desequilibrio de estas citocinas pro-inflamatorias, por ejemplo, IL-1B, IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF) pueden inducir un síndrome de respuesta inflamatoria [82,83]. Estas citocinas pueden estar asociadas con la fisiopatología de la inflamación y la remodelación de las vías aéreas post-infección.

La liberación de citocinas pro-inflamatorias durante la infección de influenza desarrolla un proceso inflamatorio en el tracto respiratorio tanto superior como inferior con una pérdida de células ciliadas, además de áreas hiperémicas o hemorrágicas en las membranas hialinas., lo que conlleva a una hiperreactividad bronquial, obstrucción de las vías aéreas y,

por tanto, una disminución en la capacidad de difusión de gases. Durante este proceso inflamatorio llegan al sitio de la infección; a través de un efecto quimiotáctico, mayor número de neutrófilos y células mononucleares; este infiltrado celular tiene como finalidad la destrucción del virus y de las células infectadas, por lo que al activarse liberan al medio el contenido de sus gránulos incrementando la concentración de citocinas y quimiocinas, así como de factores preformados que incrementan la permeabilidad vascular. La inflamación asociada con las citocinas inicia en un sitio local y se esparce a través del cuerpo vía la circulación sistémica [84].

### **La Tormenta de Citocinas.**

Las citocinas son un grupo diverso de pequeñas proteínas que son secretadas por células con el propósito de llevar a cabo la señalización y la comunicación intercelular. Algunas citocinas tienen actividad autocrina, paracrina o endocrina, a través de receptores que generan una gran diversidad de respuestas, dependiendo de la citocinas y el blanco celular; entre algunas de las funciones de las citocinas se encuentran el control de la proliferación celular, la diferenciación y la regulación de la angiogénesis, así como la respuesta inmunológica e inflamatoria.

Las citocinas conllevan a una comunicación contexto-dependiente con el cuerpo. Si la interacción que conlleva a la producción de citocinas es desestabilizada, se da como resultado una hipercitocinemia o “tormenta de citocinas”, lo que da como resultado una inflamación descontrolada dentro de los tejidos y órganos claves [85]. La tormenta de citocinas ha sido implicada en la gripe española de 1918, la aparición del SARS en 2003, y la primera influenza aviaria por el virus H5N1 en 1997 [85,90].

Sin duda, una de las principales diferencias respecto a otras cepas de influenza en cuanto a la respuesta inmunológica, es la hipercitocinemia presentada en un gran número de pacientes AH1N1 y con ello una desregulación en concentración de citocinas inflamatorias dando una respuesta inflamatoria aguda exacerbada. La producción de citocinas puede ser de manera autocrina o paracrina y tiene como finalidad la atracción de células efectoras como neutrófilos, monocitos y células dendríticas. Las células hospederas envían señales a los linfocitos CD4+ y otros leucocitos a través de la producción de citocinas para su reclutamiento en el tejido pulmonar. Se ha observado que dentro de las principales citocinas liberadas se encuentran la IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL12, IL15, IL-18, IFN- $\gamma$  y proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP-1) así como proteínas de fase aguda en el pulmón [81,91].

Durante la infección por el virus de la influenza AH1N1, diversos estudios clínicos y experimentales han identificado inflamación sistémica desregulada como un mecanismo patogénico importante que correlaciona con la severidad y progresión de la enfermedad. En los artículos desarrollados por los grupos de To y Bermejo se observaron niveles de citocinas (IL-6, IL-8, IL-10, IL-1R) en suero incrementados 3 veces en pacientes con influenza AH1N1 ventilados mecánicamente, respecto a los pacientes que no requirieron dicha intervención [15,35]. Asimismo y apoyando estos artículos, el grupo de Zuñiga encontraron niveles de IL-6, IL-1R, IFN- $\gamma$ , CCL2 incrementados de 2-3 veces más en pacientes con influenza respecto a los contactos intradomiciliarios no relacionados biológicamente [16]. Finalmente Hagau *et al.* 2011 demostró un incremento similar de las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en pacientes con influenza grave, respecto a los de enfermedad moderada [17]. En el artículo de Critical Care de Bermejo et al., describieron una hipercitocinemia de Th1 y Th17 como una marca primaria en la respuesta del huésped

a la infección grave por la variante de la influenza pandémica H1N1. Por lo general, la infección por H1N1 es de naturaleza auto-limitante, pero algunos casos desarrollan síntomas más graves que requieren hospitalización. La respuesta inmunológica del huésped juega un papel crucial en la recuperación posterior a la infección. Bermejo-Martín *et al.* analizaron la respuesta inmunológica innata y adaptativa en pacientes infectados por el virus de la influenza AH1N1; graves y moderados, a través del análisis de 29 citocinas y quimiocinas, así como la actividad inhibitoria de la hemaglutinación. Mientras que la infección con el virus AH1N1 induce una respuesta inmune innata, tanto en los casos severos como moderados, la infección grave está caracterizada por la secreción temprana de citocinas Th17 y Th1. Los pacientes hospitalizados despliegan niveles sistémicos más elevados de mediadores que estimulan a las Th17 (IL-8, IL-9, IL-17, IL-6) y la respuesta de Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-15, IL-12) [15].

Adicionalmente encontraron niveles elevados de IL-6 e IL-12, posterior a la infección grave por AH1N1. Estas citocinas son conocidas por regular la respuesta antiviral y la pro-inflamatoria. Estos autores también encontraron una relación inversa de las IL-6 e IL-8 con la presión de oxígeno arterial en los pacientes graves. De forma muy interesante, estudios previos ya han reportado altos niveles de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas en casos graves de coronavirus e infecciones respiratorias por virus sinciciales.

A la fecha, muchos de los estudios se han enfocado en medir directamente algunas citocinas y quimiocinas en sangre periférica, pero no han podido responder el contexto completo de la llamada cascada inmunológica durante el proceso infeccioso por patógenos; así como los cambios rápidos en el ambiente inmunológico en los tejidos. La inflamación asociada a la tormenta de citocinas inicia en un sitio local y se extiende a través del cuerpo a través de la circulación sistémica. Cuando se localiza en la piel u otros tejidos, se

incrementa el flujo sanguíneo, permitiendo a los leucocitos y las proteínas del plasma alcanzar sitios extravasculares de la lesión, incrementado la temperatura local, alertando al huésped.

La tormenta de citocinas es ejemplificada de mejor manera por las infecciones pulmonares severas, en donde la inflamación local se esparce a la circulación sistémica, dando origen a una sepsis sistémica; definida por una hipotensión persistente, hipotermia, leucocitosis o leucopenia y generalmente trombocitopenia [86]. Las infecciones virales, bacterianas y fúngicas causan este síndrome y es difícil diferenciar los agentes etiológicos. Además de las infecciones pulmonares, la tormenta de citocinas es una consecuencia de otras infecciones severas.

Los estudios a nivel mundial con pacientes han mostrado que la sepsis severa debida a infecciones pulmonares despliega ciertos perfiles de citocinas presentes en plasma o suero. La respuesta aguda de citocinas como TNF e IL-1B y las citocinas quimiotácticas IL-8 y MCP-1 aparecen en los primeros minutos u horas de la infección, seguidas por un incremento sostenido de la IL-6. La citocina anti-inflamatoria IL-10 aparece un poco después, mientras que el cuerpo intenta controlar la respuesta inflamatoria aguda. La producción sistémica de IL-10 posterior al establecimiento de la tormenta de citocinas es un marcador de la respuesta antiinflamatoria que ha sido denominada “inmunoparálisis”, que se asocia a una baja de la función de neutrófilos y monolitos en la circulación sistémica [87-89]. Esta regulación a la baja de la inflamación sistémica debería ser conceptualmente benéfica en el control de la tormenta inicial de citocinas, respuesta de la infección viral [92]. Sin embargo, se ha demostrado que los pacientes que sobreviven a la tormenta, mueren subsecuentemente al no recuperarse de la inmunoparálisis. La intensidad de la

respuesta inflamatoria se ve reflejada en el balance entre citocinas pro-inflamatorias y sus receptores o inhibidores.

La concentración de IL-6 en sangre periférica ha sido empleada para determinar la intensidad o la respuesta sistémica de pacientes con sepsis, debido a que la producción de IL-6 es estimulada por TNF e IL-1B, proveyendo una señal integral de estas dos respuestas tempranas [93].

El TNF es una citocina del sistema inmunológico innato. Los principales blancos celulares y efectos biológicos incluye la activación de células endoteliales, activación de neutrófilos, fiebre, síntesis en el hígado de proteínas en fase aguda, catabolismo de grasas, así como la apoptosis en muchos tipos celulares [94]. El TNF- $\alpha$  se encuentra significativamente más alto en los casos de influenza A (H1N1) respecto a los casos moderados, lo cual coincide con los resultados reportados por To *et al.*, y Bermejo-Martin *et al.* [15,35]. De la misma manera, las citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 juegan un papel crucial en la protección contra la influenza; participa en la elevación de la temperatura corporal y se ha propuesto que esta citocina llega al sistema nervioso central induciendo de manera local la producción de prostaglandinas (E2.8) La infección por el virus de la influenza activa la producción de IL-1B e IL-18 en macrófagos alveolares humanos, y es responsable de la inmunopatología aguda del pulmón y son necesarias para la supervivencia de modelos murinos posterior a la infección por el virus de la influenza [87]. Tanto las vías de señalización de TNF como de la IL-1 son reguladas por NF- $\kappa$ B, a su vez, existen diversos sitios de unión para NF- $\kappa$ B en el promotor de CXCL10. Esto explica cómo la inhibición de ambas vías, disminuye ligeramente la cantidad de CXCL10 en los macrófagos alveolares infectados. Se propone que la focalización a corto plazo de los factores parácrinos críticos,

es benéfico para el control de la excesiva inflamación y filtración de células en el daño agudo pulmonar durante la infección pandémica [92]. Una respuesta defectuosa en la producción de citocinas, fue observada posterior al estímulo de las células mononucleares con fitohemaglutinina y con *S. pneumoniae* e involucra una producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , entre el panel de citocinas esperadas. La infección por H1N1, estuvo acompañada por alteraciones de la respuesta del sistema inmune adaptativo. Se observó un decremento en los linfocitos B y CD4 y un incremento de las células T reguladoras [95].

Uno de los grandes retos a nivel clínico en relación a la tormenta de citocinas es saber por qué algunos individuos parecieran particularmente más sensibles respecto a otros más “resistentes”, por ello ha surgido polémica e interés en identificar mecanismos genéticos subyacentes [94]. Estudios recientes en patrones de expresión génica mostraron cambios en las vías de señalización y las redes celulares, dando como resultado diferentes posibles escenarios; hacia la resolución de la infección o consecuencias que llevan a un desenlace fatal.

### **Polimorfismos de un solo nucleótido y respuesta inflamatoria.**

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) es la forma más simple de la variación del ADN entre los individuos. Estos cambios simples pueden ser de tipo de transición o transversión y se producen en todo el genoma humano a una frecuencia de aproximadamente uno por cada 100-300 nucleótidos [96]. Ellos pueden ser responsables de la diversidad entre los individuos, la evolución del genoma, los rasgos familiares más comunes, tales como el pelo rizado, las diferencias interindividuales en la respuesta a los fármacos y las enfermedades complejas y comunes como la diabetes, la obesidad, la hipertensión y los trastornos psiquiátricos. Los SNPs pueden cambiar los ácidos

codificados (no-sinónimos) o pueden ser silenciosas (sinónimo) o simplemente se producen en las regiones no codificantes.

A pesar de que las mutaciones silenciosas no afectan la secuencia de aminoácidos, estas sí pueden influenciar la expresión de las proteínas en una amplia variedad de mecanismos: Pueden alterar el splicing de mRNA, la estabilidad del mRNA y los niveles de transcripción génica. Se puede influir en la actividad del promotor (expresión génica), el ARN mensajero (ARNm) conformación (estabilidad), y la localización subcelular de los ARNm y / o proteínas y por lo tanto puede producir enfermedad. Los polimorfismos que se encuentran dentro de las regiones regulatorias 5' y 3' o intrones tienen efectos sobre la transcripción, dado que pueden alterar la estructura de los sitios de unión de los factores de transcripción dentro de las regiones promotoras o la estructura de los enhancers o silenciadores o en otros sitios regulatorios. Muchos de los polimorfismos reportados en citocinas se encuentran en regiones regulatorias [97,98].

La expresión del mRNA de las citocinas depende de los sitios de unión a factores de transcripción dentro de su promotor, por ello la mayor parte de expresión de citocinas se da como resultado de la transducción de señales desde la membrana plasmática a través de moléculas adaptadoras y cinasas para la activación de factores transcripcionales como NFκB y NF-IL6, factores reguladores de IFN (IRF), transductores de señales y activadores de la transducción (STATS) AP1, entre otros. Muchas citocinas y quimiocinas contienen sitios de unión para NFκ-β en sus promotores; la expresión de IL6 e IL8 requieren la unión tanto de NFκ-β como NF-IL6 a los elementos de respuesta a sus promotores. Esto implica que la expresión de citocinas es un evento transitorio iniciado en respuesta a estímulos. La IL1β y la IL8 trabajan a la par, la primera es un potente estimulador del funcionamiento de neutrófilos y macrófagos y puede también incrementar la adhesión de leucocitos al

endotelio vascular. Esto es necesario para el reclutamiento de neutrófilos/macrófagos al tracto respiratorio, mientras que la IL8 promueve además la unión estable al endotelio vascular y activación de neutrófilos. El resultado es la secreción e inducción de citocinas pro-inflamatorias [99].

Dentro de las razones por las que se han estudiado los SNP en citocinas se encuentran: aumentar la comprensión de la etiología y patología de las enfermedades humanas, identificar biomarcadores potenciales de susceptibilidad, gravedad y desarrollo clínico, identificar marcadores para pacientes que responden vs. No responden a ciertos tratamientos clínicos, identificar blancos terapéuticos, determinar nuevas estrategias para prevenir la enfermedad o mejorar las estrategias de prevención como la vacunación [100].

La identificación de numerosas variaciones en genes y el análisis de sus efectos pueden conducir a una mejor comprensión de su impacto sobre la función génica y la salud de un individuo. Este conocimiento mejorado puede proporcionar un punto de partida para el desarrollo de nuevos marcadores de SNP, útiles para pruebas médicas y una terapia individualizada para el tratamiento de los trastornos más comunes. Diversos autores han demostrado una asociación entre los SNPs y algunas enfermedades infecciosas.

El TNF y la linfotoxina, son citocinas pro-inflamatorias pleiotrópicas críticas en la regulación de la inflamación. Las variaciones genéticas en las regiones promotoras de TNF han sido asociadas con una gama de enfermedades autoinmunes, infecciosas y oncológicas [101-104]. Un estudio reportó que las mujeres que presentaban el genotipo A del TNF-238 (rs361525) presentaron un riesgo elevado de cáncer de mama comparado con el genotipo GG (OR 1.18, 95% CI 1.04- 1.35) [105]. Asimismo, el grupo de García-Trejo et al., 2011 mostró un posible efecto protector a desarrollar la sintomatología del dengue en pacientes mexicanos con el alelo TNF-a -238 A, respecto a los controles [106]. De forma similar,

Mira *et al.* encontró asociaciones positivas entre el alelo TNF-308A y mayor falla multiorgánica, choque séptico y la mortalidad [107]. Un grupo de China demostró en 2010 que el alelo TNF-a -308 A, se asociaba a mayor riesgo de desarrollo de cirrosis hepática en mujeres con infecciones previas por el virus de la hepatitis B, mientras que en hombres infectados por el mismo virus se consideraba factor de riesgo para desarrollar hepatocarcinoma celular confiriendo una mayor gravedad en estos pacientes al exponerse al virus [108]. Otros grupos han encontrado asociación entre los polimorfismos en el promotor de TNF y el riesgo a desarrollar infecciones hepáticas e incluso lepra; en este último estudio los resultados no fueron significativos, sin embargo, se estableció una posible asociación de los polimorfismos TNF -376, -238 y -308 con el riesgo de desarrollar lepra en población brasileña [109].

Por su parte, un polimorfismo en la IL1 $\beta$  (rs16944) fue asociado con un incremento en el riesgo a padecer gastritis crónica y úlceras gástricas asociadas a *Helicobacter pylori* en una población del sureste de México [110].

Se ha reportado que el alelo T en la región +3953 del gen IL1B está asociado a un incremento en la producción de la citocina [111]. Por otro lado, el alelo G en la posición -176 del promotor de IL-6 conllevó a un incremento en la producción de dicha citocina [112]; este mismo incremento se observó en varios estudios en el alelo A del gen TNF en la región -308 del promotor [113,114].

El análisis genético de citocinas en enfermedades humanas se ha basado tradicionalmente en estudios de asociación caso-control, en los cuáles las frecuencias de alelos específicos de grupos de pacientes y sus controles sanos son comparados y las diferencias son sometidas a análisis estadísticos. La asociación es por lo general expresada como un riesgo relativo (OR) de que un individuo desarrollará la enfermedad si porta dicho alelo de riesgo.

## **SNPs y asociación con la infección por el virus de la influenza AH1N1**

En el 2009 la OMS determinó como una prioridad el desarrollo de investigaciones que permitieran identificar el papel de factores genéticos del hospedero asociados a susceptibilidad a desarrollar cuadros clínicos más graves de la influenza [115].

No obstante, hasta el 26 de junio de 2011 únicamente se podía encontrar en la literatura médica científica (Pubmed) un artículo relacionado a la susceptibilidad genética al virus de la influenza en humanos, según lo mostrado por Horby *et al.*, este grupo llevó a cabo una búsqueda sistemática para conjuntar la evidencia del papel de la carga genética del hospedero en la susceptibilidad a la influenza; el artículo referenciado por esta revisión fue el de Zúñiga *et al.*, 2011, el cuál en conjunto con sus colaboradores presentaron un estudio de casos y controles con 91 pacientes graves para influenza A (H1N1) pdm09 y 98 controles expuestos intradomiciliarios asintomáticos; emplearon un microarreglo comercial que incluye 28,368 SNPs en regiones asociadas con síndromes cardiovasculares, metabólicos e inflamatorios (Human CVD Genotyping Beadchip); solo cuatro “SNP” (polimorfismos de un solo nucleótido) resultaron ser estadísticamente significativos ( $p < 0.0001$ ). Tres de los SNPs se encontraron en regiones intragénicas: Uno en el gen que codifica para el receptor Fc (FCGR2A), otro en el gen de unión a complemento (C1QBP); y finalmente en un gen codificante para una proteína que regula la entrada de la proteína A al núcleo (RPAIN). Este fue uno de los primeros estudios que marcó la pauta para que se comenzaran a dilucidar posibles asociaciones genéticas al desarrollo de cuadros más graves de influenza particularmente en mexicanos [116]. Sin embargo, el tamaño de la muestra empleado fue pequeño, dando lugar a la posibilidad de encontrar falsos positivos.

Tanto la infección por H1N1 de 1918, como la reciente pandemia del 2009, se caracterizaron por altas tasa de mortalidad entre el grupo de adultos jóvenes, relativamente sanos, que no desarrollaron cuadros previos de influenza estacional. Durante la más reciente pandemia diversos reportes describieron casos de pacientes graves confirmados para H1N1, tanto en Canadá como en estados Unidos, lo cuales tenían una edad media de entre 23 y 27 años de edad. En Canadá, 30-48 % de las infecciones se presentaron en personas con comorbilidades, como diabetes, cardiopatías y enfermedades inmunosupresoras, así como enfermedades del corazón y obesidad. El embarazo también fue un factor de riesgo en pacientes entre los 20-39 años [115-117].

Las tasas de hospitalización y mortalidad dadas por la infección por el virus de influenza AH1N1pdm09 fueron más bajas en la población de la tercera edad respecto a la influenza estacional y más altas en la población infantil y adulta; así mismo fue más alta en Hispanos, Afroamericanos, pobladores de las Islas del Pacífico y poblaciones americanas/Nativas de Alaska en comparación con la población Europea o descendiente caucásica. Los primeros estudios revelaron que la vacunación estacional fue inefectiva debido a la baja presentación cruzada en los anticuerpos de respuesta [115].

Ninguno de estos estudios determino el factor causal que llevo a una mayor mortalidad en los grupos de alto riesgo previamente descritos. Es claro que existe una gran cantidad de factores de riesgo que se deben considerar ante las altas tasas de complicaciones por esta enfermedad, como factores socioeconómicos como la baja oportunidad de ingresos a los servicios hospitalarios, el retraso en la visita a los servicios de salud, la pobreza y el hacinamiento en los hogares. Algunos de los factores listados anteriormente se han asociado a cierto grado de disfunción del sistema inmunológico. La variación genética en genes relacionados con la inmunidad que conlleva a la ganancia o pérdida de función

contribuye a los cambios observados en la susceptibilidad a la influenza pH1N1 y su severidad.

Cuando una nueva cepa de influenza aparece, la respuesta de anticuerpos pre-existentes presentes en glicoproteínas de superficie, tiende a ser inefectiva. En estos casos, los mecanismos de protección cruzada asumen un papel dominante y es por eso que no es de sorprender que una disfunción del sistema inmunológico causada por polimorfismos genéticos pueda conducir a una respuesta deficiente y por lo general a un desenlace fatal. La influenza pandémica AH1N1 ofrece una oportunidad única para estudiar los factores genéticos relacionados a la susceptibilidad a desarrollar una mayor gravedad de la enfermedad, evitando en menor grado con la historia de infecciones previas y la diversidad de patógenos como los presentes en la influenza estacional.

Dado que la cantidad de estudios publicados en relación a la gravedad de la infección por AH1N1 y los polimorfismos de nucleótido sencillo hasta el 2011 eran relativamente escasos, nos dimos a la tarea de dilucidar nuevos SNPs que estuvieran asociados con el cuadro clínico grave.

## **Justificación.**

Por medio de estudios experimentales y clínicos, se ha identificado que el mecanismo patogénico más importante en la infección por influenza es la desregulación inflamatoria sistémica que correlaciona con la severidad y progresión de la enfermedad. La secreción de citocinas por las células infectadas es necesaria para el inicio de la respuesta inmunológica que controla la replicación del virus, adicionalmente, la presencia de mecanismos inmunopatológicos como la hipercitocinemia o (“tormenta de citocinas”), generalmente se considera que contribuye a la evolución más severa de la infección). En pacientes con síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SIRA) causada por influenza A H1N1, se han reportado niveles plasmáticos elevados de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas hasta 10 días después de inicio de los síntomas, entre estas se encuentran el TNF- $\beta$ , INF- $\gamma$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-9, IL-12 IL-15 e IL-17 [116-118]. Los genes que codifican para estas moléculas son polimórficos y ciertos alelos han sido asociados con la susceptibilidad a diferentes enfermedades, que cubren un amplio espectro de patologías, desde infecciosas hasta oncológicas, incluyendo pulmonares y sistémicas. El papel de los polimorfismos genéticos de estas citocinas en la gravedad de la enfermedad no es del todo claro, nosotros proponemos que factores genéticos del huésped pueden influir en la naturaleza y la intensidad de la respuesta inmune inflamatoria.

La diversidad de polimorfismos de estas moléculas permitiría asociar éstos, con la alta tasa de mortalidad durante la pandemia de influenza A H1N1 en México, por lo que el objetivo de este trabajo será analizar si los polimorfismos presentes en los genes relacionados a la inflamación se asocian con la gravedad clínica en pacientes mexicanos con influenza A H1N1.

## **Planteamiento del problema.**

El profundizar en el estudio de los polimorfismos de *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *LTA* en pacientes infectados por el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 ayudará a entender si estos genes influyen en el comportamiento clínico severo causado por la infección por el virus de la influenza.

## **Hipótesis.**

La susceptibilidad a la infección por el virus de AH1N1pdm9 en mexicanos, así como una mayor gravedad se asocia con los SNPs presentes en las citocinas pro-inflamatorias; *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *LTA*.

## **Metodología.**

Estudio de casos y controles, ambispectivo realizado de abril de 2009 a marzo de 2012 empleando muestras de hisopado nasofaríngeo de 278 pacientes hospitalizados con un cuadro clínico de enfermedad similar a influenza.

## **Declaraciones Éticas**

Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética y Ciencia en Investigación, con número de protocolo B05-10 autorizado en el INER (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas) y por el Comité Institucional Review Board No. 13CI 09015 213 en el IMSS (Instituto Mexicano de Seguridad Social) autorizado por la COFEPRIS/SSA.

Un médico capacitado y responsable informó a la paciente sobre el posible diagnóstico de la enfermedad tipo influenza (ILI). Todos los participantes fueron invitados a participar de forma voluntaria por un investigador entrenado y bajo un consentimiento informado firmado antes de su captación. Todos los pacientes recibieron atención médica, incluso si decidieron no participar en el protocolo de investigación. Los formularios de consentimiento firmados y las cartas de ética aprobadas por los respectivos Comités se documentaron en el Laboratorio HLA, INER. Los datos fueron obtenidos a través del uso de registros clínicos de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-168-SSA1-1998. La investigación clínica fue llevada a cabo de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki. Los Comités de ética anteriormente mencionados homologaron nuestro procedimiento de almacenamiento de datos.

## **Diagnóstico**

Todos los pacientes fueron sometidos a la prueba QuickVue Influenza A+B test (Quidel, San Diego, CA, USA). Asimismo, se colectó sangre periférica de pacientes y contactos sanos intradomiciliarios asintomáticos (AHC); las prácticas anteriores se apegaron a los lineamientos y recomendaciones dictaminadas por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Posteriormente se desarrolló la prueba RespiFinder y se determinó la presencia específica de virus de influenza A/H1N1.

## **Población de estudio**

Todos los sujetos incluidos en el estudio fueron evaluados de acuerdo a un cuestionario clínico, que contenía preguntas sobre la vacunación antigripal. El período de inclusión fue de mayo 2009-marzo 2012, por lo que los temas examinados durante el estudio pertenecen a tres oleadas diferentes de influenza en México.

Doscientos setenta y ocho sujetos con síntomas y signos clínicos de influenza fueron matriculados, de los cuales 145 fueron positivos y 133 fueron negativos para la infección por influenza A (H1N1); Se consideró que los pacientes negativos a influenza presentaban una enfermedad tipo influenza (ILI). A su ingreso al hospital, todas las sospechas de los pacientes fueron tratados con oseltamivir.

En nuestro estudio, la mayoría de los pacientes buscaron atención médica 3-4 días después de los síntomas clínicos desarrollados. Todos los datos clínicos se obtuvieron de forma retrospectiva; no obstante, las muestras de sangre y muestras nasofaríngeas se recogieron en el paciente hospitalizado durante las primeras 24 horas. Respecto al grupo de contactos

sanos asintomáticos (AHC); se reclutaron 360 sujetos, contactos intrafamiliares biológicamente no relacionados, que eran asintomáticos y convivieron con los pacientes ILI o H1N1 de manera continua, incluso antes y durante el ingreso hospitalario. Ninguno de los AHC refirió síntomas clínicos y mucho menos fue hospitalizado por infección por el virus de la influenza (Figura 4). Estos individuos se sometieron a la determinación de los títulos de anti-A (H1N1) de anticuerpos para determinar la exposición al virus (relación > 1:16). Se realizó el ensayo de Inhibición (HI) de hemaglutinación utilizando muestras de sangre periférica para cada sujeto de acuerdo con Julkunen I, 1985 [118]. Todos los sujetos incluidos en este grupo tenían un valor de título HI mayor que 1:16 diluciones que indican contacto directo con el virus. Todos los sujetos p/AH1N eran menores de 60 años de edad para evitar cualquier caso de anticuerpos de reacción cruzada de la infección H1N1 / 1918-19 en los grupos de mayor edad [119]. Como esta cohorte no se controló progresivamente de la dinámica de la lucha contra A H1N1 / 09 título de anticuerpos en el tiempo, no estamos mostrando los resultados.

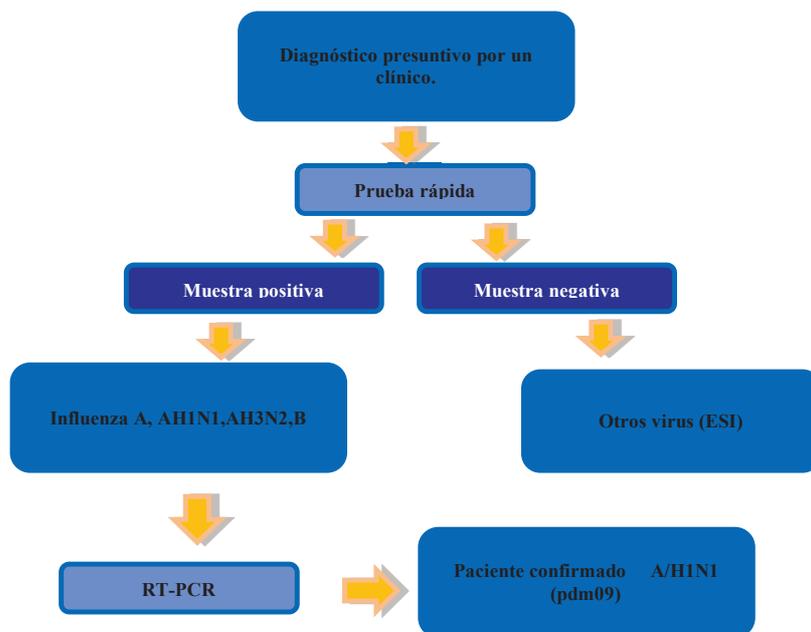


Figura 4. Diagrama de flujo para la recolección y clasificación de muestras de pacientes del estudio.

## **Recolección de la información y variables**

La información colectada fue de carácter demográfico y adicionalmente se consideraron datos de laboratorio, historia clínica y tratamiento farmacológico. La información se obtuvo a través del uso del expediente clínico de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-168-SSA1-1998, se incluyeron datos referentes a edad, género, consumo de tabaco, índice de masa corporal (BMI), enfermedades mórbidas (pulmonar, hepática, renal, cardíaca, neurológica, diabetes mellitus, hipertensión, asma y cáncer). Los síntomas evaluados fueron: fiebre, tos, rinorrea, disnea, congestión nasal, dolor torácico, cefalea, diarrea y vómito; el inicio de la terapia antiviral fue evaluado en relación a los días de sintomatología previa. Los parámetros de laboratorio incluidos fueron: leucocitos, DHL, CPK, BUN, gases arteriales ( $\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$  = enfermedad severa). La neumonía fue verificada por hallazgos radiológicos. Se identificaron todos los pacientes ingresados a la UCI y los que requirieron ventilación mecánica asistida (VMA).

## **Genotipificación de las variantes alélicas (SNPs)**

Las muestras de ADN fueron genotipificadas para rs361525 TNF, rs1800629, rs1800750; rs909253 LTA; Rs16944 IL1B, rs3136558, rs2227307; IL6 rs1818879, rs2069840, rs2066992; y los polimorfismos rs2282691 CCL1 utilizando sondas comerciales Taqman (Applied Biosystems, CA, USA). Los datos genéticos de los SNPs se describen en la Tabla 2. Los polimorfismos se caracterizaron por PCR tiempo real a través de discriminación alélica empleando un Real-Time PCR System 7300. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 50 ° C durante 2 min, 95 ° C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a

95 ° C durante 15 s y un ciclo final a 60°C durante 1 min. El ADN fue ajustado a una concentración de 15 ng/ ul.

**Tabla 2. Información genética de cada SNP estudiado**

Gen	SNP	Localización			Alelos	
		Cr †	Gene ‡	Región	Cambio	Ancestral
	rs361525	31651080	4752	(-238) Promotor	G/A	G
<i>TNF</i>	rs1800629	31651010	4682	(-308) Promotor	G/A	G
	rs1800750	31542963	4614	(-376) Promotor	G/A	G
<i>LT</i>	rs909253	31540313	5438	(+252) Intron	T/C	T
<i>IL1B</i>	rs16944	113594867	4490	(-511) Promotor	G/A	A
	rs3136558	113591275	8082	Intron1	T/C	T
	rs1818879	22772727	10962	3'UTR	G/A	G
<i>IL6</i>	rs2069840	22768572	6807	Intron	C/G	C
	rs2066992	22768249	6484	Intron	G/T	G
<i>CCL1</i>	rs2282691	32688309	---	Intron	T/A	T
<i>IL8</i>	rs2227307	74606669	5447	(+396) Intron	T/G	T

**Fuente:** La información fue obtenida a partir de la base ncbi.nih.gov. Abreviaciones: Cr Cromosoma. El software Haploview versión 4.2 se utilizó para determinar la existencia de haplotipos en IL6, genes IL1B y TNF que estaban asociados tanto con el riesgo de infección viral H1N1 como con una mayor gravedad clínica.

Se empleó el software Haploview versión 4.2 para determinar la existencia de haplotipos en los genes *IL6*, *IL1B* y *TNF* asociados tanto de riesgo para la infección por el virus de A/H1N1, así como a mayor gravedad clínica.

### **Cuantificación de citocinas**

Se colectaron muestras de suero al ingreso en el hospital de los pacientes con ILI o diagnóstico de sospecha de Enfermedad Similar a Influenza, así como de los contactos asintomáticos sanos. El suero resultante se utilizó para la determinación de 10 citocinas (GM-CSF, TNF-alfa, IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-5, e IL-4) las cuales se midieron con Luminex 100 (Luminex Corporation, Austin, TX, EE.UU.), utilizando un kit de multiplex y de acuerdo con las instrucciones del fabricante de Cytokine Human Plex Panel (Novex, Lifetechnologies, CA, USA).

### **Análisis estadístico**

Para determinar el riesgo a la infección sintomática por influenza A/H1N1, se compararon los tres grupos de participantes: 1) pacientes positivos al virus de influenza A/H1N1 (pA/H1N1) hospitalizados; 2) pacientes con características clínicas compatibles con neumonía por influenza (enfermedad similar a influenza, ILI) pero negativos al virus de la influenza A/H1N1; y 3) contactos sanos, asintomáticos (AHC), intradomiciliarios, no relacionados biológicamente ni entre ellos ni con los pacientes.

Para determinar la participación de variantes genéticas en el riesgo a la infección por el virus de la influenza A/H1N1, así como la susceptibilidad a la enfermedad se compararon

las frecuencias de genotipos y las frecuencias alélicas de los SNPs analizados entre el grupo de pacientes positivos al virus de la influenza A(H1N1)pdm09 y el grupo AHC.

Para evaluar la asociación entre los diferentes polimorfismos y la gravedad de la influenza, se comparó la frecuencia de alelos y genotipos analizados entre los pacientes hospitalizados que requirieron ingreso a la unidad de cuidados intensivos y los que no lo requirieron.

Además, se incluyó el análisis de parámetros clínicos, comparando el porcentaje de sujetos en cada grupo con variables de gravedad; los cortes considerados para cada parámetro clínico fueron determinados de acuerdo a estándares internacionales de la siguiente manera: plaquetas  $<150,000/\text{mm}^3$ , glucosa  $>119 \text{ mg/dL}$ , CPK  $>240 \text{ U/L}$ , LDH  $>1200 \text{ U/L}$ , AST  $>63 \text{ U/L}$ , ALT  $>41 \text{ U/L}$ , Creatinina  $>1.5 \text{ mg/dL}$ , BUN  $>20 \text{ mg/dL}$ , linfocitos  $<1 \times 10^3/\text{L}$ . Por otro lado, se realizó regresión logística en busca de correlacionar dichos cortes de gravedad con los polimorfismos en estudio.

Adicionalmente se investigó la asociación entre los genotipos y el riesgo a la mortalidad por el virus A/H1N1 pdm09; para ello se realizó regresión logística exclusivamente entre grupo pA/H1N1 considerando las defunciones como parámetro de comparación.

Las diferencias entre las proporciones de los grupos fueron analizadas mediante Chi cuadrada. Las diferencias entre los parámetros clínicos, variables continuas y cada polimorfismo con la prueba de U Mann Whitney. El genotipo de referencia para cada uno de los polimorfismos fue el ancestral. Se calculó la razón de momios (OR) con intervalo de confianza (CI) del 95%. El OR fue ajustado por edad y severidad de la enfermedad en el modelo de regresión logística. Los softwares empleados fueron el SPSS 21 (Chicago, IL.) y Epi-Info 7.0 (CDC, GA, USA).

Para el análisis de citocinas, los sujetos fueron estratificados en tres grupos: 18 pacientes con A (H1N1), 15 pacientes con ILI, y 21 controles sanos asintomáticos (AHC). La

estadística descriptiva consideró medias, desviaciones estándar y rangos intercuartiles para las variables continuas de distribuciones normales y no normales. La prueba exacta de Fisher y la prueba de chi-cuadrado se utilizaron para las variables categóricas. La prueba de Mann-Whitney para las variables no paramétricas. Se utilizó la prueba de Wilcoxon (prueba no paramétrica) para comparar dos grupos apareados. La asociación entre variables no paramétricas se determinó mediante el coeficiente de correlación de Spearman (r). Cualquier valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Se empleó GraphPad Prism versión 5.03 del software para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.).

## **Resultados**

### **Características demográficas**

Nuestro estudio consideró tres grupos de comparación: pacientes con influenza A/H1N1 confirmada (pA/H1N1), sujetos con enfermedad similar a influenza (ESI) y contactos sanos asintomáticos (AHC) intradomiciliarios. La distribución por género en los grupos de pacientes fue similar, las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas.

Los pacientes pA/H1N1 fueron ligeramente más jóvenes ( $42 \pm 14$  años) que aquellos ILI ( $45 \pm 15$  años,  $p=0.068$ ). Sin embargo, este dato no fue significativo. Tabla3

**Tabla 3. Características demográficas y clínicas de los pacientes al ingreso al hospital (INER).**

Variable	pAH1N1 (n=145)	ILI (n=133)	p
Sexo (M/F,%)	64.75/35.25	64.95/35.05	
Edad (años)	42±14	45±15	
Talla (cm)	164 (155-170)	165 (153-171)	
Peso (kg)	81±24	78±20	
IMC	30±7	28±5	0.0062
FC	90 (76-110)	92 (79-106)	
FR	24 (20-28)	22 (20-25)	0.0363
FA	101 (76-127)	88 (73-135)	
PaO <sub>2</sub>	51 (42-62)	54 (48-68)	0.024
PaCO <sub>2</sub>	30 (27-33)	30 (28-35)	
Variables clínicas			
Leucocitos	7 (5-10)	9 (6-12)	0.0005
Neutrófilos	8 (5-63)	10 (7-67)	
Plaquetas	175 (135-241)	221 (156-267)	0.0067
Glucosa	123 (103-157)	107 (95-128)	0.0005
BUN	14 (10-19)	13 (9-18)	
Urea	29 (20-41)	28 (19-40)	
Creatinina	0.87 (0.67-1.05)	0.79 (0.62-1.03)	
CPK	245 (112-522)	149 (77-320)	0.0047
LDH	657 (417-1.069)	379 (213-655)	<0.001
AST	56 (33-87)	38 (25-63)	0.001
ALT	41 (27-75)	36 (22-58)	0.0185

**Diferencias clínicas entre los pacientes p AH1N1 y ILI Datos demográficos, records clínicos, complicaciones y principales co-morbilidades en ambos grupos de comparación en el periodo 2009-2012. La FC, FR, FA, Pa02 y PsCO2, así como las demás variables clínicas están representadas como medianas y rangos intercuartiles; el resto de las variables demográficas se presentan como medias+-**

desviación estándar empleando la t-student. Abreviaciones: p AH1N1: paciente con influenza AHN1, ILI paciente con enfermedad similar a sin influenza, IMC: índice de masa corporal, FR: frecuencias cardiaca, FR: frecuencia respiratoria, UCI: Unidad de cuidados intensivos, MV: ventilación mecánica, ARDS: Síndrome Agudo respiratorio, PaO2: Presión de oxígeno, PaCo2: Presión de dióxido de carbono, S/N: si/no.

Adicionalmente se evaluó la presencia de comorbilidades; entre las que destacan diabetes, hipertensión, asma y EPOC; interesantemente en el grupo pA/H1N1 se presentó en mayor proporción la diabetes respecto a ILI (12.5% vs. 5.21% respectivamente, p=0.03). No hubo diferencias estadísticamente significativas con el resto de comorbilidades estudiadas.

Los pacientes con influenza A/H1N1 confirmada, mostraron consistentemente mayor alteración de los parámetros clínicos que influyen en la evolución a mayor gravedad; incluyendo el desarrollo de SIRA, la necesidad de ventilación mecánica y finalmente la muerte (Tabla 4).

**Tabla 4. Principales co-morbilidades de los pacientes al ingreso al INER.**

Variable	pAH1N1 (n=145)	ILI (n=133)	p
<b>Comorbilidades</b>			
Diabetes (S/N, %)	12.5/87.5	5.21/94.79	
Hipertensión (S/N, %)	16.79/83.21	17.71/82.29	
Asma (S/N, %)	8.76/91.24	14.58/85.42	
EPOC (S/N, %)	1.47/98.53	3.13/96.88	
<b>Complicaciones</b>			
UCI %(S/N)	52.99/47.01	16.84/83.16	<0.001

MV %(S/N)	46.72/53.28	17.71/82.29	<0.001
SIRA %(S/N)	46.72/53.28	17.71/82.29	<0.001
Neumonía %(S/N)	90.37/9.63	73.96/26.04	0.001
Muerte %(S/N)	31 (22.46)	4 (4.21)	<0.001

---

Datos demográficos, records clínicos, complicaciones y principales co-morbilidades en ambos grupos de comparación en el periodo 2009-2012. La FC, FR, FA, PaO<sub>2</sub> y PsCO<sub>2</sub>, así como las demás variables clínicas están representadas como medianas y rangos intercuartiles; el resto de las variables demográficas se presentan como medias+/- desviación estándar empleando la t-student. Abreviaciones: pAH1N1: paciente con influenza AHN1, ILI paciente con enfermedad similar a influenza, IMC: índice de masa corporal, FR: frecuencias cardiaca, FR: frecuencia respiratoria, UCI: Unidad de cuidados intensivos, MV: ventilación mecánica, ARDS: Síndrome Agudo respiratorio, PaO<sub>2</sub>: Presión de oxígeno, PaCo<sub>2</sub>: Presión de dióxido de carbono, S/N: sí/no.

### **Riesgo a la infección grave por A/H1N1**

Para determinar la susceptibilidad genética a contraer la infección por el virus de la influenza A/H1N1, se compararon los genotipos de los distintos SNPs en ambos grupos de pacientes (pA/H1N1 y ILI).

Se identificaron genotipos asociados a la infección por el virus de la influenza A/H1N1. El genotipo heterocigoto para el rs1818879 (GA) de *IL6* muestra asociación al riesgo ( $p=5 \times 10^{-8}$ , OR=5.94, IC 95% 3.05-11.56). Dos SNPs en *IL1B*, se encuentran asociados a un riesgo disminuido ante la infección; rs16944 AG ( $p=0.043$ , OR= 0.52 IC 95% 0.28-0.97) respecto al genotipo homocigoto al alelo ancestral (AA) y rs3136558 TC ( $p=0.017$ , OR=0.51, IC 0.29-0.88) (Tabla 5).

### **Susceptibilidad a la enfermedad**

Por otro lado, se comparó al grupo de pA/H1N1 respecto a los AHC; observamos que el genotipo heterocigoto (rs909253 TC) en *LTA* fue de riesgo ( $p=0.003$ , OR=1.9, IC 95% 1.25-2.87) a susceptibilidad a la enfermedad; algo similar ocurre con el genotipo CC (rs3136558) en *IL1B* ( $p=0.041$ , OR=1.89 IC 95% 1.02-3.51). Por el contrario, el genotipo rs2066992 GT en *IL6* se considera de protección ( $p=0.002$ , OR=0.53 IC 95% 0.35-0.80) respecto a los individuos que portaban el genotipo homocigoto con el alelo ancestral. (Tabla 5).

**Tabla 5. Frecuencias de genotipos y su asociación con la susceptibilidad y el riesgo a la infección severa por influenza AH1N1 pandémica.**

Gen/SNP	Genotipo	pAH1N1	ILI	AHC	pAH1N1 vs. AHC			pAH1N1 vs. ILI		
		FG (%)	FG (%)	FG (%)	p	OR	95% CI	p	OR	95% IC
<i>TNF</i>										
rs361525	GG	88.9	88.6	88.5						
	GA	9.7	9.8	10.1						
	AA	3.4	1.5	1.4						
rs1800629	GG	93.1	92.4	92.6						
	GA	6.9	4.6	7.1						

	AA	0	3.1	0.3			
rs1800750	GG	95.8	95.5	96.9			
	GA	4.2	1.5	3.1			
	AA	0	3	0			
<b><i>IL1B</i></b>							
rs16944	AA	34.3	31.8	31.4			
	AG	46.2	33.3	4.4			
	GG	19.6	34.8	24.6	4.3E-02	0.52	0.28-0.97
rs3136558	TT	36.2	23.8	32.6			
	TC	44.9	58.5	58.5	1.7E-02	0.50	0.29-0.88
	CC	18.8	17.7	8.9	4.10E-02	1.89	1.02-3.51
<b><i>IL6</i></b>							
rs18181879	GG	22.1	45.1	22.5			
	GA	47.9	16.4	46.8	5.0E-08	5.94	3.05-11.56

	AA	30	38.5	30.7			
rs2069840	CC	50.7	41.7	46.5			
	CG	40.3	47	45.6			
	GG	9	11.4	7.9			
rs2066992	GG	65.5	59.8	50.1			
	GT	34.5	39.4	49.6	2.0E-03	0.53	0.35-0.80
	TT	0	08	03			

***CCL1***

rs2282691	TT	39	32.5	33.1			
	TA	39	39.7	40.1			
	AA	22	27.8	26.7			

***IL8***

rs2227307	TT	38.9	4.7	42.3			
	TG	43.9	40.9	46.5			
	GG	11.8	12.1	11.2			

***LTA***

rs909253	GG	40.7	40.2	54.3			
	GA	48.3	50	34	3.0E-03	1.9	1.25-2.87
	AA	11	9.8	11.7			

Asociaciones estimadas entre los genotipos para determinar el riesgo a la influenza AH1N1 severa (p AH1N1vs. ILI) y la susceptibilidad a la enfermedad (p AH1N vs. AHC). Se muestran únicamente los datos significativos. Abreviaturas: p AH1N1: paciente con influenza AH1N1, ILI: paciente con enfermedad similar a influenza, AHC: contacto asintomático sano, FG: frecuencia génica, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

### **Gravedad clínica**

Cinco parámetros de la gravedad de la infección, entre los que se consideraban; ventilación mecánica, la admisión a la UCI, la presencia de síndrome de estrés respiratorio agudo, neumonía desarrollo y desenlace fatal. En el análisis de las variables de gravedad se corroboró que estas *per se* presentan valores significativos asociados con la gravedad de la enfermedad (tabla 6), interesantemente se encontró asociación entre valores de linfopenia <1000 e hiperglicemia >119 mg/dL con los genotipos GG en los rs16944 y rs1818879 en *IL1B* e *IL6* respectivamente; adicionalmente el rs16944 genotipo GG se asoció a trombocitopenia y el uso de VMA al

rs1818879 genotipo GG (tabla 7).

**Tabla 6. Diferencias en los parámetros clínicos de severidad entre los pacientes con influenza p AH1N1 vs ILI.**

Variable	pH1N1 (%)	ILI (%)	p
Plaquetas	121 (100)	88 (100)	0.009
<150,000/mm <sup>3</sup>	40 (33.06)	15 (17.05)	-
Glucosa	116 (100)	80 (100)	<0.01
>119 mg/dL	67 (57.76)	25 (31.25)	-
CPK	116 (100)	79 (100)	0.021
>240 U/L	59 (50.86)	27 (34.18)	-
DHL	120 (100)	87 (100)	0.035
>1200 U/L	22 (18.33)	7 (8.05)	-
AST	121 (100)	79 (100)	0.009
>63 U/L	51 (42.15)	19 (24.05)	-

**Comparación de variables de gravedad entre los porcentajes de sujetos en cada grupo. pH1N1: paciente con influenza AHN1, ILI paciente con enfermedad similar a influenza. Los valores de corte considerados para cada variable clínica fueron determinados de acuerdo a estándares internacionales empleando la X2. Abreviaturas: OR odds ratio, IC: intervalo de confianza.**

**Tabla 7. Genotipos asociados con variables clínicas de gravedad en pacientes con influenza A (H1N1) pdm09**

Gravedad clínica	p	OR	95% IC
<i>IL6</i> rs1818879 GG			
Glucosa >119 mg/dL	0.0035	4.8	1.48-15.57
Linfocitos <1x 10 <sup>3</sup> L	0.0003	3.1	1.59-16.18
Ventilación mecánica	0.0004	4.8	1.29-18.24
<i>IL1B</i> rs16944 GG			
Glucosa >119 mg/dL	0.0068	3.1	1.02-9.49
Linfocitos <1x 10 <sup>3</sup> L	0.0118	2.3	1.13-4.51
Plaquetas <150,000 mm <sup>3</sup>	0.0063	8.3	1.77-39.43

Comparación de variables de gravedad entre los porcentajes de sujetos en cada grupo. pAH1N1: paciente con influenza A/H1N1, ILI paciente con enfermedad similar a influenza. Los valores de corte considerados para cada variable clínica fueron determinados de acuerdo a estándares internacionales empleando la X2. Abreviaturas: OR odds ratio, IC: intervalo de confianza. La regresión logística fue empleada para correlacionar los cortes de severidad con los 11 polimorfismos estudiados. Únicamente se presentan los datos significativos. Abreviaturas: OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

### **Susceptibilidad a mayor gravedad en la infección por A/H1N1**

Para determinar la susceptibilidad a mayor gravedad de la enfermedad en relación a los SNPs presentes en los genes pro-inflamatorios, se llevó a cabo el cálculo de chi cuadrada a través del programa Epi Info, así como Epi Data; se compararon dos subgrupos: los pacientes con influenza A/H1N1 que ingresaron a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y aquéllos que no requirieron ingresar a dicha unidad y por lo tanto tampoco requirieron VMA. De los 11 SNPs estudiados, el SNP rs361525 en *TNF* se asoció con mayor gravedad de la enfermedad, determinado por el ingreso a la UCI. (p=0.007, OR=16.06) Tabla 8

**Tabla 8. Susceptibilidad a mayor gravedad de la enfermedad por AH1N1.**

Gen/SNP	Genotipo	UCI	NO UCI	P	OR	IC 95%
		FG (%)	FG (%)			
<b><i>TNF</i></b>						
rs361525	GG	54 (83.07)	51 (100)			
	GA	8(12.30)	0	0.007	16.06	(1.53-285.45)
	AA	3(4.61)	0	0.36	6.16	(0.59-131.21)
rs1800629	GG	62(95.38)	49(96.07)			
	GA	3(4.61)	2(3.92)	0.76	1.10	(0.23-5.10)
	AA	0	0	---	----	-----
rs1800750	GG	61(93.84)	49(96.07)			
	GA	3(4.61)	1(1.96)	0.79	2.41	(0.24-23.97)
	AA	1(1.53)	1(1.96)	0.57	0.80	(0.049-13.17)
<b><i>IL1B</i></b>						
rs16944	AA	25(39.06)	17(33.33)			
	AG	26(40.62)	27(52.94)	0.42	0.65	(0.28-1.48)
	GG	13(20.31)	7 (13.72)	0.89	1.26	(0.41-3.81)
rs3136558	TT	21(31.34)	18(36.73)			
	TC	31(46.26)	22(44.89)	0.81	1.20	(0.52-2.77)
	CC	15 (22.38)	9(18.36)	0.68	1.42	(0.50-4.03)

**IL6**

rs18181879	GG	14(21.53)	10(20.83)			
	GA	30(46.15)	24(50)	0.98	0.89	(0.33-2.36)
	AA	21(32.30)	14(29.16)	0.88	1.07	(0.37-3.08)
rs2069840	CC	30(46.87)	26(50.98)			
	CG	28(43.75)	20(39.21)	0.77	1.21	(0.55-2.64)
	GG	6(9.37)	5(9.80)	0.78	1.04	(0.28-3.80)
rs2066992	GG	44(70.96)	31(60.78)			
	GT	18(29.03)	20(39.21)	0.34	0.63	(0.29-1.38)
	TT	0	0	--	-----	----

**CCL1**

rs2282691	TT	21(38.88)	23(50)			
	TA	28(51.85)	14(30.43)	0.086	2.19	(0.91-5.24)
	AA	15(27.77)	9(19.56)	0.36	1.82	(0.66-5.04)

**IL8**

rs2227307	TT	26(40.62)	20(39.21)			
	TG	32(50)	23(45.01)	0.97	1.07	(0.48-2.36)
	GG	6(9.37)	8(15.68)	0.55	0.57	(0.17-1.93))

*LTA*

rs909253	GG	29(44.61)	22(43.3)			
	GA	28(43.07)	23(45.09)	1.00	0.92	(0.42-2.01)
	AA	8(12.30)	6(11.76)	0.77	1.01	(0.30-3.34)

---

**Asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la severidad de la influenza** Los genotipos analizados y las frecuencias alélicas fueron comparadas entre los pacientes hospitalizados que requirieron ingreso a la Unidad de Cuidados Intensivos y aquéllos que no lo requirieron. Abreviaturas: OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, FG: frecuencia génica. pAH1N1: paciente con influenza AHN1, ILI paciente con enfermedad similar a influenza

### Análisis por alelos

En *LTA* rs909253 se encontró que el alelo A es un factor de riesgo en el desarrollo de la enfermedad (pA/H1N1 vs. AHC: p=0.049, OR 1.34 IC 95% 1.01-1.88), mientras que en *IL6* el rs2066992 alelo T es un factor protector (pA/H1N1 vs. AHC: p=0.007, OR=0.62 IC 95% 0.43-0.88). Adicionalmente en *IL1B*, el rs16944 alelo G resultó ser un factor de protección para desarrollar la infección severa por el virus de la influenza pA/H1N1 (pA/H1N1 vs. ESI: p=0.048, OR=0.70 IC 95% 0.50-0.98). (Tabla 9)

Tabla 9. Frecuencias alélicas y su asociación con la susceptibilidad y el riesgo a la infección grave por influenza A (H1N1).

Gen/SNP	Alelo	pAH1N1	ILI	AHC	pAH1N1 vs. AHC			pAH1N1 vs. ILI		
		FA (%)	FA (%)	FA (%)	p	OR	95% IC	p	OR	95% ic
<i>TNF</i>										
rs361525	G	91.7	93.7	93.5						
	A	8.3	6.1	6.7						
rs1800629	G	96.5	94.6	96.2						
	A	3.4	5.3	3.8						
rs1800750	G	97.9	98.5	98.5						
	A	2.1	1.5	1.5						

**IL1B**

rs16944	A	57.3	48.5	53.3	4.80E-02	0.7	0.50-0.98
	G	42.6	51.5	46.6			
rs3136558	T	58.7	53.1	61.8			
	C	41.3	46.9	38.2			

**IL6**

rs18181879	G	46.1	53.3	45.9	7.00E-03	0.62	0.43-0.88
	A	53.9	46.7	54.1			
rs2069840	C	70.8	65.1	69.3			
	G	29.2	34.9	30.7			
rs2066992	G	82.7	79.5	74.9			
	T	17.3	20.5	25.1			

**CCL1**

rs2282691	T	58.5	52.4	53.2			
	A	41.5	47.6	46.8			

**IL8**

rs2227307	T	63.5	67.4	65.5			
	G	36.5	32.6	34.5			
<b>LTA</b>							
rs909253	G	64.8	65.1	71.3	4.90E-02	1.34	1.01-1.80
	A	35.2	34.8	28.7			

---

**Asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la severidad de la influenza** Los genotipos analizados y las frecuencias alélicas fueron comparadas entre los pacientes hospitalizados que requirieron ingreso a la Unidad de Cuidados Intensivos y aquéllos que no lo requirieron.:  
**Abreviaturas: OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, FG: frecuencia génica, pAH1N1: paciente con influenza AHN1, ILI paciente con enfermedad similar a influenz**

## **Riesgo de mortalidad**

De los pacientes positivos al virus de la influenza A/H1N1 31 murieron, mientras que en aquellos ILI hubo 4 decesos. Ninguno de los polimorfismos/genotipos se asoció directamente con la mortalidad. Adicionalmente buscamos demostrar si existía algún riesgo adicional a la mortalidad asociado a la presencia de comorbilidades; únicamente el genotipo GG del rs2069869 en *IL6* se asoció con el riesgo de mortalidad en pacientes con diabetes en el grupo pA/H1N1 ( $p=0.011$ , OR = 40.8 IC 95 % 2.31- 720.24).

## **Cuantificación de citocinas en suero**

Determinamos los niveles de diversas citoquinas pro-inflamatorias en muestras de suero. Puesto que la concentración de citocinas mostró variación interindividual significativa, exhibimos la cuantificación en un gráfico de caja como se muestra en la figura 3. Las concentraciones de citocinas estaban en el rango de 5 a 80 pg / ml. En el caso de los pacientes pAH1N1, las concentraciones de todas las citocinas eran más altas que en los otros grupos de estudio. Particularmente, IL5 muestra un aumento de la concentración en pacientes pAH1N1 vs pacientes ILI o AHC. Las comparaciones entre los tres grupos fueron efectuadas mediante el uso de ANOVA para comparaciones múltiples. Todas las comparaciones fueron estadísticamente significativa a  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , para la corrección de Tukey consideramos  $p < 0,03$ . Para IL6, en comparaciones múltiples modelo de ANOVA se mostró un marginal  $p = 0,03$

En comparación con los pacientes ILI, los pacientes pH1N1 graves mostraron un aumento marcado en la producción de suero de IL-5 ( $p < 0,001$ ) e IL-6 ( $p = 0,007$ ), respectivamente, y la producción similar de GM-CSF ( $p = 0,967$ ). No encontramos diferencia

estadísticamente significativa con el resto de los analitos evaluados. Estos resultados muestran que los pacientes p (H1N1) secretan concentraciones de suero de IL-6 e IL-5 más altos que los pacientes ILI lo que sugiere un mecanismo particular de la fisiopatología de la infección por influenza p (H1N1).

Aunque los niveles de IL-6 de los sueros de pacientes pAH1N1 fueron más altos que los de los controles sanos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 5).

Por último, se analizó la correlación entre los niveles de citocinas y parámetros clínicos graves; incluyendo la obesidad y la cantidad de leucocitos. La concentración media de IL-5 en los pacientes obesos ILI fue de 3,08 vs 3,07 para obesos pAH1N1. De forma inversa, los pacientes pAH1N1 no obesos mostraron un aumento de 9 veces en la media; respecto a los pacientes ILI no obesos con una diferencia significativa (29.93 vs. 3.03) ( $p < 0,01$ ). La concentración de IL-6 en los pacientes obesos ILI fue 10.58 vs. 32.30 para pacientes pAH1N1 obesos. Los pacientes pAH1N1 no obesos mostraron un aumento; 49.17 vs. 19.41 en pacientes ILI no obesos, sin embargo, no hubo diferencia significativa ( $p = 0.28$ ).

El análisis de Pearson no mostró ninguna diferencia significativa entre IMC e IL-5, IL-6 o concentraciones de leucocitos y recuento de IL-5, IL-6 en el grupo pAH1N1.

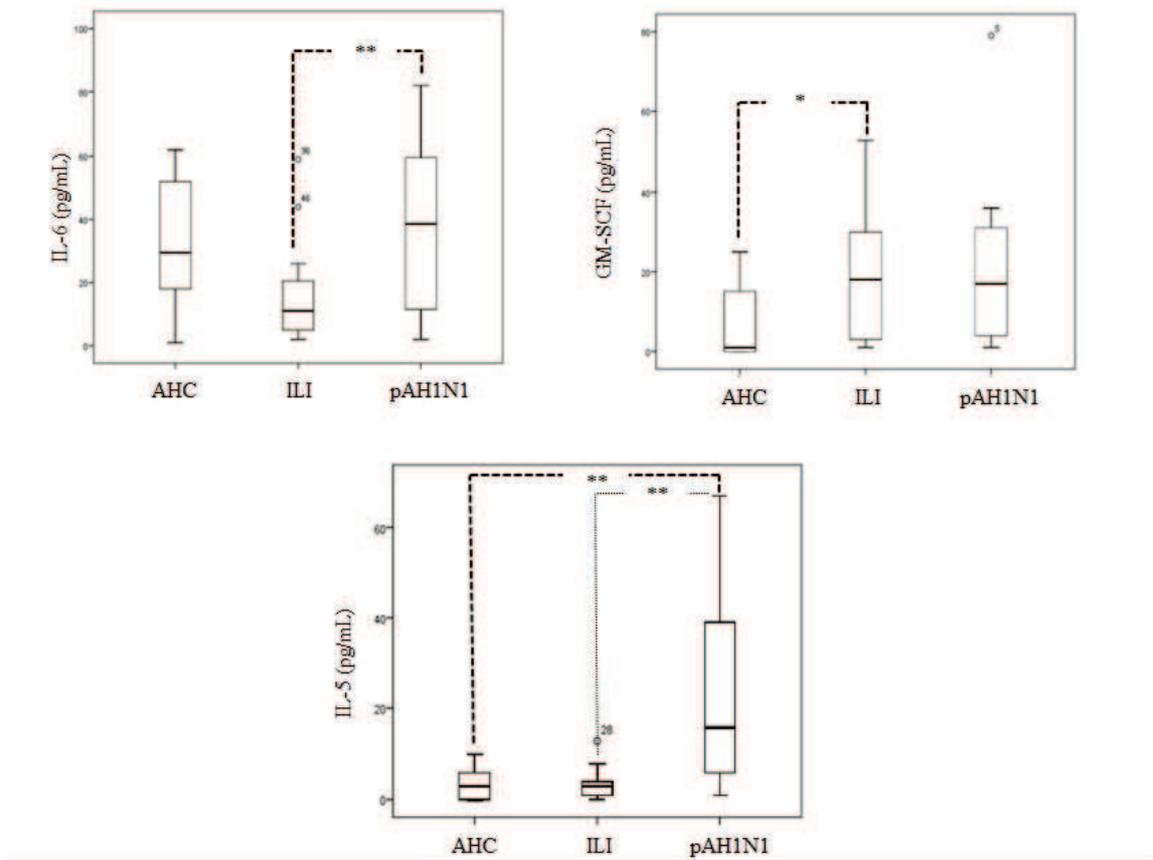


Figura 5. Concentración en suero de IL- 6, IL- 5 y GM- SCF en los grupos AHC, ILI y pAH1N1. Las cajas representan el cuartil 25-75, los bigotes representan a las filas de los valores, la línea media dentro de la caja es la mediana y los valores fuera de las filas, representados como círculos son datos extremos. Los valores de p (\*\* y \* Representar < 0,001 y < 0,05 respectivamente).

### Análisis de Haplotipos.

Se realizó el estudio de haplotipos para determinar la asociación de estos con la gravedad de la enfermedad. El análisis incluyó los genes: *IL6*, *TNF* e *IL1B*; con sus respectivos SNPs estudiados y mostrados en la Tabla 1, considerando tanto el grupo pAH1N1 vs. ILI y de forma individual para cada grupo. Al comparar ambos grupos de pacientes no se formaron haplotipos, únicamente de forma independiente en los grupos de pacientes (ILI o pAH1N1). En la figura 6 se muestra el haplotipo formado por los SNPs en el gen *TNF* localizado en el cromosoma 6 para los pacientes con ILI, estos haplotipos no se encuentran en alto

desequilibrio de ligamiento ( $r^2=0.75$ ), no obstante, el valor fue cercano al mínimo requerido (0.80). Los polimorfismos evaluados en los genes de *TNF* e *IL6* cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

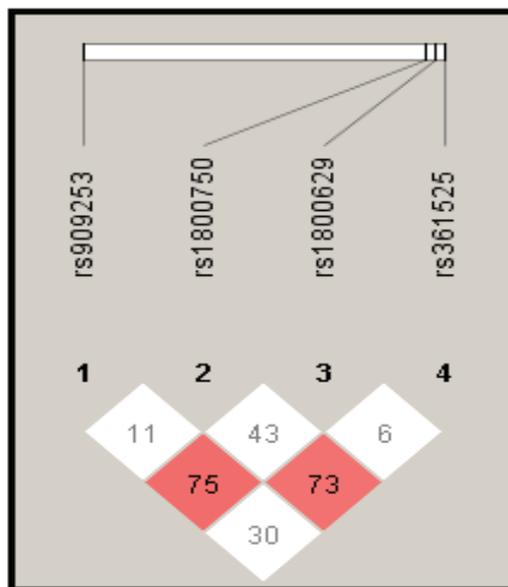


Fig. 6 Haplotype generado en Haploview *software* para 4 SNPs en el gen *TNF* en pacientes ILI.

## Discusión

Adicionalmente a los hallazgos previamente descritos, en este segundo estudio de polimorfismos en genes de citocinas pro-inflamatorias, nuestro grupo encontró factores genéticos asociados a la susceptibilidad a la influenza A/H1N1.

Se genotipificaron 11 SNPs en seis genes; tres en *TNF*, tres en *IL6*, dos en *IL1B*, uno en *LTA*, uno en *IL8* y uno en *CCL1*; lo que nos permitió realizar estudios de haplotipos, específicamente para el riesgo a la infección por influenza A/H1N1 y la gravedad de esta. Se incrementó la cantidad de sujetos en los tres grupos de estudio, alcanzando un total de 640 participantes, que incluyeron las tres oleadas más importantes de los brotes epidémicos de influenza en México, incluido el periodo pandémico (abril-junio de 2009).

A finales de 2012 reportamos algunos genotipos en *TNF* (rs361525 AA, rs1800750 AA) y *LTA* (rs909253 AG) asociados a la susceptibilidad a la infección por el virus de influenza A/H1N1 pdm09; donde adicionalmente, *LTA* rs909253 GA mostró una tendencia con la mortalidad por dicha enfermedad ( $p=0.06$ ,  $OR=3.13$ ) [2]. Recientemente se han reportado asociaciones para los genes *IL1A* e *IL1B* [102] e *IL10* [104]; mientras que el incremento en la frecuencia alélica de *TNF*-238A, -308G, *IL10* -592C e *IL10*-1082A se ha relacionado con mayor gravedad de la enfermedad [101-103].

En nuestro estudio; la gravedad de los pacientes con influenza A/H1N1 fue mayor que en el grupo ILI (47% vs 18% requirió intubación,  $p<0.001$ , respectivamente); además 22% de los pacientes A/H1N1 falleció en comparación al 4% de los ILI ( $p<0.001$ ). De forma interesante dos SNPs, uno en *IL1B* (rs16944) y otro en *IL6* (rs1818879) estuvieron asociados con variables clínicas de gravedad al comparar los pacientes A/H1N1 vs. ILI.

Este estudio confirma nuestro hallazgo previo; el genotipo GA en *LTA* rs909253 como un factor de riesgo a la susceptibilidad a presentar la enfermedad secundaria al contacto con el virus A/H1N1 pdm09 ( $p < 0.01$ , OR=1.90), de forma interesante el alelo menor (A) se consideró de riesgo en este mismo grupo de comparación (A/H1N1 pdm09 vs. AHC). Adicionalmente el genotipo CC de la *IL6* rs3136558 también se asocia como riesgo a la infección (OR=1.89); contrario a lo que sucede con el genotipo GT del rs2066992 en el mismo gen, que se asocia a un riesgo disminuido (OR=0.53, IC 95% 0.35-0.80).

De manera complementaria, se llevó a cabo el análisis de asociación con respecto al riesgo de infección severa por influenza A/H1N1; tanto los SNPs en *IL1B* como en *IL6* presentaron asociaciones significativas, en particular el rs16944 que se encuentra en la región promotora del gen. En concordancia con lo reportado en artículos previos, el genotipo GA en el promotor de *TNF-238*, presentó un riesgo a una mayor gravedad de la enfermedad en pacientes que ingresaron a UCI respecto aquéllos que únicamente requirieron hospitalización [101,103,120]. A pesar de no haber asociación con el genotipo del alelo menor homocigoto para *TNF-238*, podemos apreciar que la presencia del alelo A en el genotipo heterocigoto en pacientes graves por influenza A/H1N1 potenció el riesgo a la gravedad.

Específicamente, tanto *LTA* como *TNF* son consideradas como citocinas inflamatorias con relevancia biológica en las diversas funciones de la respuesta inmunológica. Diferentes autores han demostrado que los SNPs presentes en estos genes están relacionadas a mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades infecciosas [113,121]. Se sabe que la región de poliadenilación de *LTA* y el sitio de inicio de transcripción de *TNF* se encuentran muy cercanas una de otra (~ 1.2 Kb) en el clúster de *TNF* de la región de HLA clase III, por lo que resulta complejo el obtener asociaciones de SNPs en esta región [21]. Actualmente se

da prioridad a los estudios de haplotipos para genes candidatos de la respuesta inmunológica en lugar de análisis de SNPs individuales, dado que la región HLA clase III alberga genes altamente polimórficos, en especial por el control multigénico que se presenta en respuesta a las enfermedades infecciosas, como la influenza. Para ello, nuestro grupo de trabajo, elaboró un estudio de haplotipos en pacientes A/H1N1e ILI; sin embargo, únicamente en este último grupo se identificó un haplotipo entre *LTA* y *TNF*, no obstante estos no se encontraron en alto desequilibrio de ligamiento ( $r^2=0.75$ ). Consideramos que el ampliar la *n* o considerar otros genes candidato ayudará a mejorar esta aproximación. Dado que la producción de citocinas es influenciada por SNPs en la región promotora de estos genes [122], proponemos que aquellos individuos portadores de alelos asociados exhiben un aumento en la producción de citocinas y con ello desarrollar cuadros clínicos más graves de la enfermedad.

El papel inflamatorio de la IL-6 e IL-1 $\beta$  ha sido ampliamente reportado en diversos padecimientos, como la meningitis, lesiones de cabeza y el Síndrome Respiratorio Agudo (SIRA) [123,124]. Estudios previos han reportado la correlación entre la sobre-expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6 y algunos hallazgos clínicos y radiológicos, como la neumonía y el SIRA, tanto en niños con influenza estacional como en modelos murinos [125,126]. Las citocinas pro-inflamatorias TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 juegan un papel crucial en la inflamación, infección y respuesta al estrés por diferentes tipos de infecciones. Muchos de los efectos sistémicos de la fase aguda se deben a la acción combinada de estas citocinas [27].

En particular, estas últimas dos citocinas han sido identificadas como marcadores de severidad en el daño pulmonar agudo durante la infección por el virus de la influenza A/H1N1 pdm09 [124]; y en el caso de la IL-1 $\beta$  se le ha propuesto como un buen marcador temprano de severidad y progresión de la inflamación pulmonar en pacientes que requieren

ventilación mecánica y que no responden a los tratamientos de antibióticos convencionales [4]. En el estudio de *Chiaretti et al. 2013*, se provee evidencia de que la infección por el virus de la influenza A/H1N1 pdm09 induce una temprana y significativa sobre-regulación de IL-1 $\beta$  e IL-6 en plasma, sugiriendo que estas citocinas son responsables de diferentes reacciones moleculares que conllevan a inflamación de las vías aéreas y mayor severidad de la enfermedad [124]. De manera similar, estas citocinas estuvieron sobre-expresadas en mayor cantidad en suero de pacientes graves respecto a los moderados o sus contactos intradomiciliarios asintomáticos y esta sobreexpresión correlacionó con algunas manifestaciones clínicas y un mayor tiempo de hospitalización. [3,5,7,15,16,17].

El incremento en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias hacia el tejido pulmonar permite una mayor permeabilidad en las venas y aumenta en el reclutamiento de células fagocíticas y de la apoptosis en células epiteliales pulmonares; así como la liberación de enzimas derivadas de neutrófilos, como la mieloperoxidasa y la elastasa, responsables de la severidad del daño agudo pulmonar, lo que lleva finalmente a la síntesis de fibroblastos y colágeno [127, 128]. De forma local, la IL-1 $\beta$  tiene un papel fundamental en la quimiotaxis de neutrófilos, mediada principalmente por dos quimiocinas; MIP-2 y la citocina quimioatrayente-de monocitos 1 (MCP-1), ambas reguladas por IL-1 [127,128].

Por su parte, la IL-6 tiene un papel fundamental en las respuestas de fase aguda durante los procesos infecciosos y es inducida por lo general en conjunto con otras citocinas pro-inflamatorias, como TNF- e IL-1 durante situaciones de alarma para el sistema inmunológico [131].

Como ya se ha mencionado, TNF, IL-1B e IL-6 juegan un papel fundamental en la inflamación, infección y respuesta al estrés causada por diferentes tipos de infección. Muchos de los efectos sistémicos de la fase aguda están determinados por la acción

combinada de estas citocinas [127]. En particular, IL-1B e IL-6 han sido considerados como marcadores de severidad en el daño agudo en la infección por influenza AHN1[124]; en específico IL-1B ha sido propuesta como molécula candidata de marcador severo en la progresión de la inflamación pulmonar y requerimiento de ventilación mecánica en los pacientes [4]. En el 2013, *Chiaretti et al.*, presentaron evidencia de que el virus de la influenza AH1N1 inducía una respuesta temprana y una sobre-regulación de IL-1B e IL-6 en plasma, lo que sugiere que estas citocinas son responsables de diversas reacciones moleculares que conllevan a la inflamación de las vías aéreas e incrementan la severidad de la enfermedad [11]. Por su parte, la IL-6 juega un papel crucial en la fase de respuesta aguda y es inducida en conjunto con otras citocinas pro-inflamatorias, como TNF-  $\alpha$  e IL-1B, durante los procesos de alarma inmunológica [33]. De forma similar, éstas citocinas están sobreexpresadas en altas concentraciones en suero en pacientes con AH1N1 severo en comparación con aquellos que presentaban una moderada enfermedad. Diferentes grupos en el mundo han reportado un incremento en los niveles de citocinas pro-inflamatorias asociadas con parámetros clínicos de gravedad, incluyendo la obesidad [132,133]. Encontramos que la IL-6 presentaba un incremento en pacientes AH1N1 obesos vs. Pacientes ILI obesos (32.3 vs. 10.5 pg/mL) sin una diferencia estadísticamente significativa. De forma contraria, los pacientes no obesos del grupo AH1N1 mostraron un incremento en 9 veces en lo que concierne a los niveles de IL-5. A pesar del incremento observado en ambos grupos de pacientes obesos, es importante recalcar que el grupo de pacientes no obesos con un cuadro clínico severo de influenza AH1N1 desplegaban niveles considerablemente mayores de estas citocinas en comparación con los pacientes ILI o los contactos asintomáticos sanos. No hubo diferencias significativas en cuanto a la cuenta leucocitaria o los niveles de IL-5, IL-6 o TNF al comparar pacientes AH1N1 vs. ILI.

Si bien, nuestro objetivo de estudio estuvo enfocado a las citocinas pro-inflamatorias, es claro que las citocinas anti-inflamatorias como IL-1R, IL-10, IL-11, IL-13, IL-4 e IFN  $\gamma$  también se encuentran desreguladas; como otros autores ya lo han reportado previamente [134,135]. De hecho demostraron un incremento significativo tanto IL-6 como IL-10 en pacientes con influenza AH1N1grave; las cuales actúan de forma orquestada vía JAK-STAT para defender al organismo de la infección. En estos artículos se observó que el aumento persistente en la cantidad de las citocinas anti-inflamatorias, en particular IL-10 en sinergia con IL-6, conllevó a un ambiente inmunosupresor que permitió la persistencia del virus. Estos resultados son parte de la consecuencia de una desregulación en el perfil de expresión de citocinas y la pauta para recordar que si bien, en un proceso infeccioso como lo es la influenza esperamos un “switch” o balance, la presencia de la “tormenta de citocinas” conlleva a este desbalance y a la pérdida de la resolución de la infección, desembocando en casos fatales.

Los niveles de citocinas se ven afectados a lo largo del tiempo, como se ha publicado en diferentes reportes. No obstante, nuestro grupo de trabajo únicamente buscó las asociaciones de los SNPs con la susceptibilidad a la infección o la gravedad de la enfermedad, por lo que no investigamos el efecto del oseltamivir en los niveles de dichas citocinas. Resulta importante considerar como se ven afectados los niveles de citocinas a través del tiempo, ya que las mediciones con las que contaríamos serían de forma transversal; por su parte, los datos clínicos con los que contamos fueron tomados al ingreso del paciente al Instituto; considerar mediciones en diferentes tiempos ayudaría a enriquecer nuestra investigación. El posible efecto del oseltamivir en los pacientes tratados modificaría los niveles de expresión de citocinas; pero no afectaría la presencia de ciertos

SNPs asociados a la gravedad presente en los contactos o los propios pacientes. La media de días en que se les administró el oseltamivir a partir del establecimiento de los síntomas fue de 5 días [136]. Dadas las condiciones anteriores, las asociaciones fueron analizadas por el cuadro clínico grave independientemente de la regulación inmunológica determinada por el antiviral, y esto fue reforzado ya que los pacientes fueron sometidos a las mismas dosis y comenzaron al mismo tiempo el tratamiento. Por otro lado, la captación de muestras se llevó a cabo únicamente en la zona centro del país; donde se presentó una mayor mortalidad; por lo anterior, consideramos que el ampliar el área de muestreo a lo largo de otras regiones geográficas nos permitiría identificar claramente las zonas con mayor “vulnerabilidad genética” para poder afrontar futuros desafíos más severos de cualquier subtipo de influenza potencialmente letal.

A la luz de nuestros resultados se puede visualizar, que muchos pacientes que no se encuentran en los grupos de edad de mayor riesgo de muerte o que no presentan comorbilidades asociadas a mayor riesgo de muerte por influenza, pueden poseer características genéticas que los hacen más susceptibles a desarrollar influenza y a presentar una enfermedad más grave por la infección. Esto resalta la necesidad de asumir que cualquier paciente puede presentar etapas graves de la enfermedad, influido por su bagaje genético. Por lo que las estrategias de prevención para prevenir la mortalidad por influenza deben implicar un esquema de vacunación universal, ya que en algunos países sólo se da prioridad para ser vacunados a los grupos de mayor riesgo. Esto es respaldado por el hecho de que el grupo de contactos asintomáticos sanos se encuentra en el mismo grupo etario y por lo tanto presenta las mismas características en lo que se refiere a la vacunación. Nuestros resultados no cambiarían ni serían afectados por el estatus de vacunación.

Nuestras observaciones ponen en relieve la importancia de considerar que cualquier paciente ILI puede evolucionar a estadios más severos, influenciado por su componente genético. Por ello las estrategias de prevención de mortalidad por influenza, deberían considerar la vacunación universal.

## Conclusiones

Los genes *IL6*, *IL1B* y *LTA* están asociados con los datos clínicos de gravedad de la influenza A/H1N1. Existen SNPs en *IL6* (rs1818879) que están asociados a la susceptibilidad a desarrollar influenza A/H1N1; mientras que SNPs en *LTA* (rs909253) e *IL1B* (rs3136558) están asociados con la presentación sintomática de la infección. El SNP rs361525 en *TNF* (-238) estuvo asociado con una presentación más grave de la enfermedad. Sólo el rs2069869 en el gen *IL6* se asoció con la mortalidad por influenza A/H1N1 en presencia de diabetes. Los niveles de IL - 6 se incrementaron en los pacientes obesos , tanto pAH1N1 como ILI en comparación con AHC, incluso de forma más incrementada que los niveles de un paciente obeso exclusivamente . Sorprendentemente los pacientes no obesos pAH1N1 presentan niveles mucho más altos incluso que aquéllos que presentaron obesidad. La Influenza A (H1N1) y su gravedad se determina por las características genéticas del individuo, sobre todo en los genes que regulan la inflamación.

## Literatura citada.

1. Echevarría-Zuno S, Mejía-Aranguré JM, Mar-Obeso AJ, Grajales-Muñiz C, Robles-Pérez E, González León M. *et al.* Infection and death from influenza A H1N1 virus in Mexico: a retrospective analysis. *Lancet.* 2009; 374(9707): 2072-2079.
2. [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/intd\\_informacion.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/intd_informacion.html)
3. Morales-García G, Falfán-Valencia R, García-Ramírez RA, Camarena Á, Ramírez-Venegas A, Castillejos López M. *et al.* Pandemic influenza A/H1N1 virus infection and TNF, LTA, IL1B, IL6, IL8, and CCL polymorphisms in Mexican population: a case-control study. *BMC Infect Dis.* 2012; 12: 299.
4. Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest.* 1995; 108(5): 1303-1314.
5. Lee N, Chan PK, Wong CK, Wong KT, Choi KW, Joynt GM, *et al.* Viral clearance and inflammatory response patterns in adults hospitalized for pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus pneumonia. *Antivir Ther.* 2011;16:237–247.
6. Estella, A. Cytokine levels in bronchoalveolar lavage and serum in 3 patients with 2009 Influenza A(H1N1)v severe pneumonia. *J Infect Dev Ctries* (2011) 5(7): 540-543. PMID: 21795823
7. Yu X, Zhang X, Zhao B, Wang J, Zhu Z, Teng Z *et al.* Intensive cytokine induction in pandemic H1N1 influenza virus infection accompanied by robust production of IL-10 and IL-6. *PLoS ONE.* 2011 6(12): e28680.
8. Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun.* 2006 Jun;7(4):269-76. Epub 2006 Apr 27.
9. Pociot F, Molvig J, Wogensén L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 396–402.
10. Bidwell JL, Wood NAP, Morse HR, Olomolaiye OO, Laundry GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments, 1998. *Eur J Immunogenet* 1998; 25: 83–266.

11. Chiaretti A, Pulitano S, Conti G *et al.* Interleukin and neurotrophin up-regulation correlates with severity of H1N1 infection in children: a case-control study. *Int J Infect Dis*, 2013; 17(12): e1186-1193.
12. Borja-Aburto VH, Chowell G, Viboud C, Simonsen L, Miller MA, Grajales Muñiz C. *et al.* Epidemiological characterization of a fourth wave of pandemic A/H1N1 influenza in Mexico, winter 2011-2012: age shift and severity. *Arch Med Res*. 2012; 43(7): 563-570.
13. Taubenberger JK, Reid AH, Janczewski TA, Fanning TG. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356:1829–1839.
14. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: Implications for pandemic influenza preparedness. *Journal of Infectious Diseases*. 2008; 198:962–970.
15. Bermejo-Martin JF, Martin-Loeches I, Rello J, Antón A, Almansa R, Xu L. *et al.* Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2010; 14(5): R167.
16. Zúñiga J, Torres M, Romo J, Torres D, Jiménez L, Ramírez G. *et al.* Inflammatory profiles in severe pneumonia associated with the pandemic influenza A/H1N1 virus isolated in Mexico City. *Autoimmunity*. 2011; 44(7): 562-570.
17. Hagau A., Slavcovici A, Gongnanau DN, Oltean S, Dirzu DS, Brezozski ES *et al.* Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. *Crit Care*. 2010;14(6): R203.
18. Chowell G, Echevarría-Zuno S,\* Cecile Viboud,† Lone Simonsen,‡ Grajales Muñiz C, Rascón Pacheco *et al.* \* Recrudescence wave of pandemic A/H1N1 influenza in Mexico, winter 2011-2012: Age shift and severity. *PLOS CURRENTS*. 2012 February 24
19. Palese P, Shaw MI. Orthomyxoviridae: the virus and their replication. En: Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology*. Wolters Kluwer Lippincott-Williams and Wilkins. Fifth edition. New York. 2007;1647-1689
20. Soto Vega I. Influenza ¿Por qué algunos mueren?. *Elementos* No. 75, Vol. 16, Septiembre - Noviembre, 2009, Página 53

21. Palese P, Shaw MI. Orthomyxoviridae: the virus and their replication. En: Knipe DM, Howley PM (eds). Fields Virology. Wolters Kluwer Lippincot-Williams and Wilkins. Fifth edition. New York. 2007;1647-1689
22. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxovirus. En: Knipe DM, Howley PM (eds). Fields Virology. Wolters Kluwer Lippincot-Williams and Wilkins, New York. Fifth edition. 2007; 1691-1740.
23. Sawada T, Hashimoto T, Nakano H, Suzuki T, Ishida H, Kiso M. Why does avian influenza A virus hemagglutinin bind to avian receptor stronger than to human receptor? Ab initio fragment molecular orbital studies. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006;351:40-43
24. Vargas MA, Influenza AH1N1 de origen porcino: Métodos diagnósticos, 2010. Revista de la facultad de Medicina, Bogotá.
25. Pérez-Padilla R, Palomar-Lever A, Salas-Hernández J, Vázquez-García C, Influenza por el nuevo virus AH1N1-Un Panorama Integral, graphimedica, 2010
26. Biología del virus: familia Orthomyxoviridae Cp 2. 27-28 pp, Biology of Viruses (2006) [Online]
27. Sanders CJ, Doherty PC, Thomas PG. Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. Cell Tissue Res. 2011 Jan;343(1):13-21. doi: 10.1007/s00441-010-1043-z. Epub 2010 Sep 17. Review.
28. Orraca-Castillo O, González-Valdés L, Casanova-Moreno M, Guerra-del-Valle D, Sanabria-Negrín J. Inmunopatología de la influenza A H1N1 / Immunology of the Influenza A H1N1 infection. Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río [online].
29. Sawada T, Hashimoto T, Nakano H, Suzuki T, Ishida H, Kiso M. Why does avian influenza A virus hemagglutinin bind to avian receptor stronger than to human receptor? Ab initio fragment molecular orbital studies. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006;351:40-43.
30. Glezen WP, Couch RB. Influenza viruses. En: Evans AS, Kaslow RA. Viral infections of humans: epidemiology and control. New York. Fourth Edition. Plenum medical book company. 1997: 473-505.
31. Hayden FG, Palese P. Influenza virus. En: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. Clinical Virology. Washington DC. Tercera edición. ASM Press, 2009: 891- 920.

32. Naffakh N, Van der Werf S. Orthomyxoviridae. En Huruau JM, Agut H, Nicolas JC, Peigue-Lafeuille H. *Traité de Virologie Médicale*. Paris. Estem. 2003: 439- 457.
33. WHO. Human infection with influenza A (H1N1) virus: clinical observations from Mexico and other affected countries. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009; 84: 185-89. <http://www.who.int/wer>.
34. Zambon M, Potter CW. Influenza. En: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P.(eds). *Principles and practice in Clinical Virology*. Wiley-Blackwell. 2009; 373-408.
35. To KK, Chan JF, Chen H, Li L, Yuen KY. The emergence of influenza A H7r\I9 in human beings 16 years after influenza A H5N1: a tale ottwo cities. *Lancet Infect O;s*. 2013;13(9):809-821
- 36.Fraaij PL, HeikkinenT Seasonal influenza:the burden of disease in children. *Vaccine*. 2011;29(43):7524-7528
37. Whitley BJ, Boucher CA, Lina B, *et al*. Global assessment of resistance to neuraminidase inhibitors, 2008-2011: The Influenza Resistance Information Study (IRIS). *Clin Infect Dis*. 2013;56(9):1197-1205.
38. World Health Organization. WHO guidelines on the use of vaccines and antivirals during influenza pandemics: WHO/CDS/CSR/ RMD/2004.8. 2004 [cited 2007 Feb 12]. Availablefrom[http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_CSR\\_RMD\\_2004\\_8/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_RMD_2004_8/en/index.html)
39. Muthurl SG, Myles PR, Venkatesan S, Leonardl-Bee J, Nguyen-Van-Tam JS. Impact of neuraminidase inhibitor treatment on outcomes of public health importance during the 2009-2010 influenza A(HINI) pandemic: a systematic review and meta-analysis in hospitalized patients. *J Infect Dis*. 2013;207(4):553-563.
40. Hogner, K. *et al*. Macrophage-expressed IFN- $\beta$  contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia. *PLoS Pathog*. 9, e1003188 (2013).
41. Kallfass, C., Lienenklaus, S., Weiss, S. & Staeheli, P. Visualizing the beta interferon response in mice during infection with influenza A viruses expressing or lacking nonstructural protein 1. *J. Virol*. 87, 6925–6930 (2013).
42. Jewell, N. A. *et al*. Differential type I interferon induction by respiratory syncytial virus and influenza a virus in vivo. *J. Virol*. 81, 9790–9800 (2007).
43. Blander, J. M. & Sander, L. E. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nature Rev. Immunol*. 12, 215–225 (2012).

44. Barbalat, R., Ewald, S. E., Mouchess, M. L., and Barton, G. M. (2011). Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 185–214. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101340
45. Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30, 16–34. doi: 10.3109/08830185.2010.529976
46. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 140: 821–832, 2010.
47. Janeway, C. A. Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54, 1–13 (1989).
48. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev. Immunol.* 1, 135–145 (2001).
49. Pang, I. K. & Iwasaki, A. Control of antiviral immunity by pattern recognition and the microbiome. *Immunol. Rev.* 245, 209–226 (2012).
50. Ablasser, A. *et al.* Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes. *J. Immunol.* 182, 6824–6833 (2009).
51. Dagenais M, Skeldon A, Saleh M. The inflammasome: in memory of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death Differ* 19: 5–12, 2012.
52. Onomoto, K. *et al.* Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS ONE* 7, e43031 (2012). This study demonstrates that the stress granules that form in infected cells serve as a hub for viral RNA accumulation and RIG-I signalling.
53. Pang, I. K., Ichinohe, T. & Iwasaki, A. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8<sup>+</sup> T cell responses to influenza A virus. *J. Immunol.* 191, 246–253 (2013).
54. Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 229–265 (2009).
55. Guarda, G. *et al.* Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J. Immunol.* 186, 2529–2534 (2011).
56. Pothlichet, J. *et al.* Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/ NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells. *PLoS Pathog.* 9, e1003256 (2013).
57. Zurcher, T., Pavlovic, J. & Staeheli, P. Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology* 187, 796–800 (1992).

58. Hefti, H. P. *et al.* Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La Crosse virus and other lethal viral infections. *J. Virol.* 73, 6984–6991 (1999).
59. Turan, K. *et al.* Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res.* 32, 643–652 (2004).
60. Liu, Z. *et al.* The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection. *Cell Host Microbe* 14, 398–410 (2013).
61. Brass, A. L. *et al.* The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139, 1243–1254 (2009).
62. Bailey, C. C., Huang, I. C., Kam, C. & Farzan, M. Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice. *PLoS Pathog.* 8, e1002909 (2012).
63. Everitt, A. R. *et al.* IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature* 484, 519–523 (2012).
64. Silverman, R. H. Viral encounters with 2',5'- oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J. Virol.* 81, 12720–12729 (2007)
65. Brown DM, Kamperschroer C, Dilzer AM, Roberts DM, Swain SL. IL-2 and antigen dose differentially regulate perforin- and FasL-mediated cytolytic activity in antigen specific CD4+ T cells. *Cell Immunol.* 2009; 257:69–79.
66. Strutt TM, McKinstry KK, Dibble JP, Winchell C, Kuang Y, Curtis JD, Huston G, Dutton RW, Swain SL. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat Med.* 2010; 16:558–564.
67. Kedzierska K, Stambas J, Jenkins MR, Keating R, Turner SJ, Doherty PC. Location rather than CD62L phenotype is critical in the early establishment of influenza-specific CD8+ T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:9782–9787.
68. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999; 401:708–712.
69. Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, Von Andrian UH, Ahmed R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol.* 2003; 4:225–234.
70. Kedzierska K, La Gruta NL, Turner SJ, Doherty PC. Establishment and recall of CD8+

T cell memory in a model of localized transient infection. *Immunol Rev.* 2006; 211:133–145.

71. Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, Schambach F, Intlekofer AM, Banerjee A, Longworth SA, Vinup KE, Mrass P, Oliaro J, Killeen N, Orange JS, Russell SM, Weninger W, Reiner SL. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science.* 2007; 315:1687–1691.

72. Berkhoff EG, de Wit E, Geelhoed-Mieras MM, Boon AC, Symons J, Fouchier RA, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Functional constraints of influenza A virus epitopes limit escape from cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 2005; 79:11239–11246. [PubMed: 16103176]

73. Gog J, Rimmelzwaan G, Osterhaus A, Grenfell B. Population dynamics of rapid fixation in cytotoxic T lymphocyte escape mutants of influenza A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:11143–11147.

74. Bednarek MA, Sauma SY, Gammon MC, Porter G, Tamhankar S, Williamson AR, Zweerink HJ. The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol.* 1991; 147:4047–4053.

75. Gotch F, McMichael A, Rothbard J. Recognition of influenza A matrix protein by HLA-A2- restricted cytotoxic T lymphocytes. Use of analogues to orientate the matrix peptide in the HLA- A2 binding site. *J Exp Med.* 1988; 168:2045–2057.

76. Stewart-Jones GB, McMichael AJ, Bell JI, Stuart DI, Jones EY. A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition. *Nat Immunol.* 2003; 4:657–663.

77. Price GE, Ou R, Jiang H, Huang L, Moskophidis D. Viral escape by selection of cytotoxic T cell- resistant variants in influenza A virus pneumonia. *J Exp Med.* 2000; 191:1853–1867.

78. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular immunology* 5th. ed. 2003.

79. Valkenburg SA, Rutigliano JA, Ellebedy AH, Doherty PC, Thomas PG, Kedzierska K. Immunity to seasonal and pandemic influenza A viruses. *Microbes Infect.* 2011 May;13(5):489-501. doi: 10.1016/j.micinf.2011.01.007

80. Tisoncik JR<sup>1</sup>, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012 Mar;76(1):16-32. doi: 10.1128/MMBR.05015-11.

81. Carrada-Bravo T. Avances recientes en el diagnóstico, epidemiología, y prevención de

la influenza. Revisión crítica. *Rev Mex Patol Clin* 2010; 57: 4-53

82. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85(1):9-18.

83. Xu, P. B., Lou, J. S., Ren, Y., Miao, C. H., and Deng, X. M. (2012). Gene expression profiling reveals the defining features of monocytes from septic patients with compensatory anti-inflammatory response syndrome. *J. Infect.* 65, 380–391. doi: 10.1016/j.jinf.2012.08.001

84. Kimura H, Yoshizumi M, Ishii H, Oishi K, Ryo A. Cytokine production and signaling pathways in respiratory virus infection. *Front Microbiol.* 2013 Sep 17;4:276. doi: 10.3389/fmicb.2013.00276.

85. Tisoncik JR<sup>1</sup>, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012 Mar;76(1):16-32. doi: 10.1128/MMBR.05015-11.

86. Kimura H, Yoshizumi M, Ishii H, Oishi K, Ryo A. Cytokine production and signaling pathways in respiratory virus infection. *Front Microbiol.* 2013 Sep 17;4:276. doi: 10.3389/fmicb.2013.00276.

87. Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885–891.

88. Docke WD, *et al.* 1997. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat. Med.* 3:678 – 681.

89. Fowler AA, Fisher BJ, Centor RM, Carchman RA. 1984. Development of the adult respiratory distress syndrome: progressive alteration of neutrophil chemotactic and secretory processes. *Am. J. Pathol.* 116:427– 435.

90. Suntharalingam G, *et al.* 2006. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.* 355:1018 – 1028

91. Yamaya, M. (2012). Virus infection-induced bronchial asthma exacerbation. *Pulm. Med.* 2012, 834826. doi: 10.1155/2012/834826

92. Koetzler, R., Zaheer, R. S., Wiehler, S., Holden, N. S., Giembycz, M. A., and Proud, D. (2009). Nitric oxide inhibits human rhinovirus-induced transcriptional activation of CXCL10 in airway epithelial cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 201–208. doi: 10.1016/j.jaci.2008.09.041

93. Chiaretti A, Genovese O, Aloe L, Antonelli A, Piastra M, Polidori G *et al.* Interleukin

1beta and interleukin 6 relationship with paediatric head trauma severity and outcome. *Childs Nerv Syst* .2005; 21(3): 185-193

94. Wurfel MM. 2008. Genetic insights into sepsis: what have we learned and how will it help? *Curr. Pharm. Des.* 14:1900–1911.

95. Strutt TM, McKinstry KK, Dibble JP, Winchell C, Kuang Y, Curtis JD, Huston G, Dutton RW, Swain SL. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat Med.* 2010; 16:558–564.

96. Ramírez-Bello J<sup>1</sup>, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases. *Gac Med Mex.* 2013 Mar-Apr;149(2):220-8.

97. Bidwell JL, Wood NAP, Morse HR, Olomolaiye OO, Laundry GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments, 1998. *Eur J Immunogenet* 1998; 25: 83–266.

98. Bidwell JL, Wood NAP, Morse HR, Olomolaiye OO, Keen LJ, Laundry GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement 1. *Eur J Immunogenet* 1999; 26: 135–223.

99. Iwasaki A., Pillai PS. Innate Immunity to influenza virus infection. *Nature Reviews*, 2014 May;14(5):315-28. doi: 10.1038/nri3665. Review.

100. Hollegaard MV<sup>1</sup>, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun.* 2006 Jun;7(4):269-76. Epub 2006 Apr 27.

109. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 396–402.

101. Knight JC, Kwiatkowski D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999; 111(4): 290-298.

102. Romanova, E. N. and A. V. Govorin. TNF-alpha, IL-10, and eNOS gene polymorphisms in patients with influenza A/H1N1 complicated by pneumonia. *Ter Arkh.* 2013; 85(3): 58-62.

103. Antonopoulou A, Baziaka F, Tsaganos T, Raftogiannis M, Koutoukas P, Spyridaki A. *et al.* Role of tumor necrosis factor gene single nucleotide polymorphisms in the natural course of 2009 influenza A H1N1 virus infection. *Int J Infect Dis.* 2012. 16(3): e204-208.

104. Martínez-Ocaña J, Olivo-Díaz A, Salazar-Domínguez T, Reyes-Gordillo J, Tapia-Aquino C, Martínez Hernández F. *et al.* Plasma cytokine levels and cytokine gene polymorphisms in Mexican patients during the influenza pandemic A(H1N1)pdm09. *J Clin Virol.* 2013; 58(1): 108-113.
105. Azmy IA, Balasubramanian SP, Wilson AG, Stephenson TJ, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. *Breast Cancer Res.* 2004;6(4):R395-400. Epub 2004 May 24.
106. García-Trejo AR<sup>1</sup>, Falcón-Lezama JA, Juárez-Palma L, Granados J, Zúñiga-Ramos J, Rangel H, Barquera R, Vargas-Alarcón G, Ramos C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever. *Acta Trop.* 2011 Oct-Nov;120(1-2):67-71. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.06.002. Epub 2011 Jun 12.
107. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riché F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA.* 1999 Aug 11;282(6):561-8.
108. Wang B, Wang J, Zheng Y, Zhou S, Zheng J, Wang F, Ma X, Zeng Z; HBV Study Consortium. A study of TNF-alpha-238 and -308 polymorphisms with different outcomes of persistent hepatitis B virus infection in China. *Pathology.* 2010 Dec;42(7):674-80.
109. Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis.* 2002 Dec 1;186(11):1687-91. Epub 2002 Nov 11
110. Martínez-Carrillo DN, Garza-González E, Betancourt-Linares R, Mónico-Manzano T, Antúnez-Rivera C, Román-Román A, Flores-Alfaro E, Illades-Aguiar B, Fernández-Tilapa G. Association of IL1B -511C/-31T haplotype and Helicobacter pylori vacA genotypes with gastric ulcer and chronic gastritis. *BMC Gastroenterol.* 2010 Oct 27;10:126.
111. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI Cytokine gene polymorphism in human disease J Bidwell et al 13 polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 396–402.
112. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL 10 gene and further characterization of the 5'flank- ing sequence. *Immunogenetics* 1997; 46: 120–128.

113. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195–3199.
114. Galbraith GM, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol* 1998; 69: 428–433.
115. Horby P, Nguyen NY, Dunstan SJ, Baillie JK. The role of host genetics in susceptibility to influenza: a systematic review. *PLoS One*. 2012;7(3):e33180. doi: 10.1371/journal.pone.0033180.
116. Zúñiga J, Buendía-Roldán I, Zhao Y, Jiménez L, Torres D, Romo J, Ramírez G, Cruz A, Vargas-Alarcon G, Sheu CC, Chen F, Su L, Tager AM, Pardo A, Selman M, Christiani DC. Genetic variants associated with severe pneumonia in A/H1N1 influenza infection. *Eur Respir J*. 2012 Mar;39(3):604-10. doi: 10.1183/09031936.00020611. Epub 2011 Jul 7
117. Zhang L, Katz JM, Gwinn M, Dowling NF, Khoury MJ. Systems-based candidate genes for human response to influenza infection. *Infect Genet Evol*. 2009 Dec;9(6):1148-57. doi: 10.1016/j.meegid.2009.07.006. Epub 2009 Jul 30.
118. Julkunen I, Pyhälä R, Hovi T. Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B virus infections. Purified hemagglutinin in subtype-specific diagnosis. *J Virol Methods*; 1985. 10:75-84.
119. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M. *et al*. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*. 2009; 460:1021-5.
120. Immunokinetics in severe pneumonia due to influenza virus and bacteria coinfection in mice. *Eur Respir J*. 2004; 24(1): 143-149.
121. Lanás A, García-González MA, Santolaria S, Crusius JB, Serrano MT, Benito R *et al*. TNF and LTA gene polymorphisms reveal different risk in gastric and duodenal ulcer patients. *Genes Immun*. 2001; 2(8): 415-421.
122. Sinha S, Mishra SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK *et al*. Indian Genome Variation Consortium, Venkatesh V, Habib S. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcγRIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. *Malar J*. 20 7: 13.

123. Wu CL, Lee YL, Chang KM, Chang GC, King SL, Chiang CD *et al.* Bronchoalveolar interleukin-1 beta: a marker of bacterial burden in mechanically ventilated patients with community-acquired pneumonia. *Crit Care Med* . 2003; 31(3): 812-817.
124. Paquette SG, Banner D, Zhao Z, Fang Y, Huang SS, *et al.* (2012) Interleukin-6 is a potential biomarker for severe pandemic H1N1 influenza A infection. *PLoS ONE* 7(6): e38214
125. Seki M1, Yanagihara K., Higashiyama Y *et al.* Immunokinetics in severe pneumonia due to influenza virus and bacteria coinfection in mice. *Eur Respir J*, 2004; 24(1): 143-149.
126. Broekhuizen R, Grimble RF, Howell WM, Shale DJ, Creutzberg EC, Wouters EF *et al.* Pulmonary cachexia, systemic inflammatory profile, and the interleukin 1beta -511 single nucleotide polymorphism. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82(5): 1059-1064.
127. Sladkova, T. and F. Kostolansky . The role of cytokines in the immune response to influenza A virus infection. *Acta Virol*, 2006; 50(3): 151-162
128. Carolyn E. Patterson. Perspectives on Lung Endothelial Barrier Function. (Advances in molecular & Cell Biology). Elsevier Science. 2004
129. S. C. Ducrocq, P. G. Meyer, G. A. Orliaguet *et al.*, Epidemiology and early predictive factors of mortality and outcome in children with traumatic severe brain injury: experience of a French pediatric trauma center, *Pediatric Critical Care Medicine*, 2006; vol. 7, no. 5, pp. 461–467.
130. Sato M, Hosoya M., Wright PF. Differences in serum cytokine levels between influenza virus A and B infections in children. *Cytokine*, 2009; 47(1): 65-68.
131. Xing Z, Gauldie J, Cox G *et al.* IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*, 1998; 101(2): 311-320.
132. Matsushita K, Yatsuya H, Tamakoshi K, Wada K, Otsuka R ,Takefuji S, *et al.* Comparison of Circulating Adiponectin and Proinflammatory Markers Regarding Their Association With Metabolic Syndrome in Japanese Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(4):871-6.
133. Nishida M, Moriyama T, Sugita Y, Yamauchi-Takihara K. Abdominal obesity exhibits distinct effect on inflammatory and anti-inflammatory proteins in apparently healthy Japanese men. *Cardiovasc Diabetol*. 2007; 6: 27.

134. Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quiñones-Falconi F, Bautista E *et al.* Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med.* .2009; (7):680-9.
135. Gómez-Gómez A, Magaña-Aquino M, Garcia-Sepúlveda C, Ochoa-Pérez UR, Falcón-Escobedo R, Comas Garcia A *et al.* Severe pneumonia associated with pandemic (H1N1) 2009 outbreak, San Luis Potosí, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(1):27-34.
136. Higuera Iglesias, Kudo K., Manabe T., Corcho BA, Corrales A, Alfaro Ramos L *et al.* Reducing Occurrence and Severity of Pneumonia Due to Pandemic H1N1 2009 by Early Oseltamivir Administration: A Retrospective Study in Mexico. *PLoS One.* 2011; 6(7):e21838.

## **Anexo. (Artículo requisito)**

RESEARCH ARTICLE

# TNF, IL6, and IL1B Polymorphisms Are Associated with Severe Influenza A (H1N1) Virus Infection in the Mexican Population

Román Alejandro García-Ramírez<sup>1,2,3</sup>, Alejandra Ramírez-Venegas<sup>4</sup>, Roger Quintana-Carrillo<sup>4</sup>, Ángel Eduardo Camarena<sup>3</sup>, Ramcés Falfán-Valencia<sup>3\*</sup>, Juan Manuel Mejía-Aranguré<sup>1\*</sup>

**1** Coordination of Health Research, Mexican Institute of Social Security (IMSS), Av. Cuauhtémoc 330, 06720, Mexico, D. F., México, **2** Graduate Program in Biological Sciences, National Autonomous University of Mexico (UNAM), México, D. F., 04360, México, **3** HLA Laboratory, National Institute of Respiratory Diseases, Ismael Cosío Villegas, México, D. F., 14080, México, **4** Research Department on Smoking and COPD, National Institute of Respiratory Diseases, Ismael Cosío Villegas, Mexico, D. F., 14080, México

\* [rfalfanv@iner.gob.mx](mailto:rfalfanv@iner.gob.mx); [dcb\\_rfalfanv@hotmail.com](mailto:dcb_rfalfanv@hotmail.com) (RFV); [juan.mejiaa@imss.gob.mx](mailto:juan.mejiaa@imss.gob.mx) (JMMA)



 OPEN ACCESS

**Citation:** García-Ramírez RA, Ramírez-Venegas A, Quintana-Carrillo R, Camarena AE, Falfán-Valencia R, Mejía-Aranguré JM (2015) *TNF, IL6, and IL1B* Polymorphisms Are Associated with Severe Influenza A (H1N1) Virus Infection in the Mexican Population. PLoS ONE 10(12): e0144832. doi:10.1371/journal.pone.0144832

**Editor:** Juan C. de la Torre, The Scripps Research Institute, UNITED STATES

**Received:** September 2, 2015

**Accepted:** October 26, 2015

**Published:** December 14, 2015

**Copyright:** © 2015 García-Ramírez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within paper and its supporting information files.

**Funding:** This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM) for RAGR. RA García-Ramírez acknowledges the academic support provided by the National Council of Science and Technology (CONACYT) and Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. The authors thank the Coordinación de Investigación en Salud of the IMSS for covering the translation and publishing

## Abstract

### Background

Hypercytokinemia is the main immunopathological mechanism contributing to a more severe clinical course in influenza A (H1N1) virus infections. Most patients infected with the influenza A (H1N1) pdm09 virus had increased systemic levels of pro-inflammatory cytokines; including interleukin IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α). We propose that single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter regions of pro-inflammatory genes are associated with the severity of influenza A (H1N1) pdm09 virus infection.

### Methods

145 patients with influenza A (H1N1) (pA/H1N1), 133 patients with influenza-like illness (ILI), and 360 asymptomatic healthy contacts (AHCs) were included. Eleven SNPs were genotyped in six genes (*TNF, LT, IL1B, IL6, CCL1, and IL8*) using real-time PCR; the ancestral genotype was used for comparison. Genotypes were correlated with 27 clinical severity variables. Ten cytokines (GM-CSF, TNF-α, IL-2, IL-1β, IL-6, IL-8, IFN-γ, IL-10, IL-5, and IL-4) were measured on a Luminex 100.

### Results

The *IL6* rs1818879 (GA) heterozygous genotype was associated with severe influenza A (H1N1) virus infection (odds ratio [OR] = 5.94, 95% confidence interval [CI] 3.05–11.56), and two *IL1B* SNPs, rs16944 AG and rs3136558 TC, were associated with a decreased risk of infection (OR = 0.52 and OR = 0.51, respectively). Genetic susceptibility was determined (pA/H1N1 vs. AHC): the *LTA* rs909253 TC heterozygous genotype conferred greater risk (OR = 1.9), and a similar association was observed with the *IL1B* rs3136558 CC genotype (OR = 1.89). Additionally, severely ill patients were compared with moderately ill patients.

costs. This study was funded by the Mexican Institute of Social Security, Grants FIS/IMSS/PROT/G13/1212 and CONACyT-FOSIS SALUD2009-C02-126699.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

**Abbreviations:** AHC, Asymptomatic healthy contacts; AMV, Assisted mechanical ventilation; ARDS, Acute respiratory distress syndrome; BMI, Body mass index; BUN, Blood urea nitrogen; CCL1, Chemokine (C-C motif) ligand 1; CDC, U.S. Centers for Disease Control and Prevention; CI, 95% confidence interval; CPK, Creatine phosphokinase; CRP, C-reactive protein; GLR, Global lethal rate; HLA, Human leukocyte antigen; ICU, Intensive care unit; IFN, Interferon; IL, Interleukin; ILI, Influenza-like illness; LDH, Lactate dehydrogenase; LTA, Lymphotoxin  $\alpha$ ; OR, Odds ratio; PaO<sub>2</sub>, Partial pressure of oxygen in arterial blood; SNP, Single nucleotide polymorphism; RT-PCR, Real-time PCR; TNF, Tumor necrosis factor; WHO, World Health Organization.

The *TNF*-238 GA genotype was associated with an increased risk of disease severity (OR = 16.06,  $p = 0.007$ ). Compared with ILIs, patients with severe pA/H1N1 infections exhibited increased serum IL-5 ( $p < 0.001$ ) and IL-6 ( $p = 0.007$ ) levels.

## Conclusions

The *TNF* gene was associated with disease severity, whereas *IL1B* and *IL6* SNPs were associated with influenza A (H1N1) virus infection.

## Introduction

In mid-April 2009, the influenza A (H1N1) pdm09 virus emerged in Mexico and rapidly expanded across the globe. Worldwide, the mortality rate was approximately 0.2–1.23%; in Mexico, mortality was close to 0.4% [1]. The greatest number of deaths from influenza A (H1N1) pdm09 occurred in the central region of the country where healthcare systems are better than in the rest of the country and where access to healthcare services is greater because of better transportation routes and the presence of hospitals that provide care to patients with severe illnesses. However, the numbers of cases were similar in the northern and southern regions of the country [1]. The most affected groups were individuals aged 30–46 years [2], and a high percentage had no comorbidities that could explain the most severe forms of the disease.

Hypercytokinemia ("cytokine storm") is the main immunopathological mechanism underlying a more severe clinical course in cases of seasonal influenza and is the ultimate cause of death [3]. Most patients infected with the influenza A (H1N1) pdm09 virus have increased serum levels of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [4–7]. In particular, elevated IL-1 $\beta$  and IL-6 serum levels have been identified as markers of severity in acute lung injury during infection by the influenza A (H1N1) pdm09 virus, specifically among patients who do not respond to conventional antiviral treatments [8, 9]. Multiple cytokines are associated with the pathophysiology of inflammation and lung remodeling. Several reports from around the world have shown the presence of an imbalance of pro-inflammatory cytokine responses in severe H1N1 pneumonia [10, 11]; however, little is known about why these differences occur.

Cytokine production varies among individuals due in part to genetic factors and, particularly, the presence of polymorphisms in important regulatory regions such as promoters [12, 13]. In this study, the differential expression of cytokines among individuals with influenza pA/H1N1, those who developed a clinical picture similar to influenza but were not positive for the pandemic virus, and AHCs was examined.

In a previous study performed by our team, several single-nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the risk of influenza infection, including *CCL1* rs2282692, *LTA* rs909253, and *TNF* 1800750, were identified in a population in Mexico City. [2] Other groups have reported associations between SNPs in pro-inflammatory cytokines and disease severity [14–16].

According to *Borja et al. 2012*, the fourth-wave pattern of influenza A (H1N1) observed in Mexico during the 2011–2012 season was not reported in other countries. These differences may be explained by vaccination coverage or genetic susceptibility in the Mexican population [17]. In this study, we included a greater number of patients from the fourth wave of virus infection and aimed to establish the association between polymorphisms in inflammation-

related genes (*TNF*, *IL6*, *IL8*, *IL1B*, *LTA*, *CCL1*) and disease development, severity and death from influenza A (H1N1) virus infection in patients from the central region of Mexico.

## Materials and Methods

This case-control, ambispective study was performed from April 2009 to March 2012 using nasopharyngeal swab samples from 278 patients hospitalized with clinical symptoms of influenza-like illness.

## Ethics Statements

This study was reviewed and approved by both the Bioethics Committee and Science Committee in Research, with protocol number B05-10 at INER (National Institute of Respiratory Diseases Ismael Cosío Villegas) and Institutional Review Board No. 13CI 09015 213 at IMSS (Mexican Institute of Social Security) authorized by COFEPRIS/SSA.

A trained and responsible physician informed the patient about a possible diagnosis of influenza-like illness (ILI). All participants were invited to participate voluntarily by a trained researcher and gave signed informed consent prior their enrollment. All patients received medical care even if they chose not to participate in the research protocol. The signed consent forms and ethics committee approval letters are documented at HLA Laboratory INER. Data were obtained using clinical records according to the Mexican Official Standard NOM-168-SSA1-1998. A clinical investigation was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The ethics committees described above approved our data recording procedures.

## Diagnosis

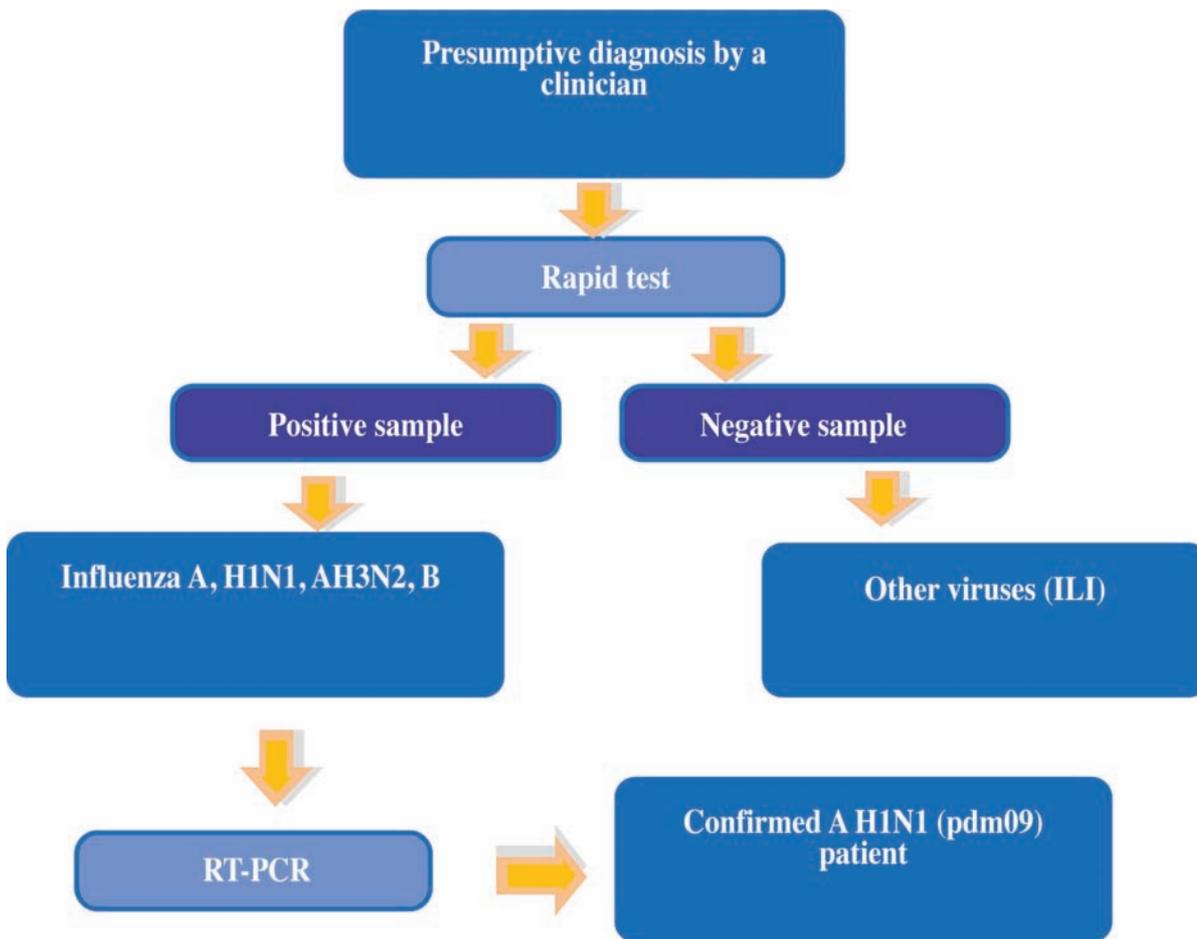
All patients underwent the QuickVue Influenza A + B test (*Quidel, San Diego, CA, USA*). Additionally, peripheral blood from patients and asymptomatic healthy contacts (AHC) was collected; these interventions adhered to the guidelines and recommendations of the Centers for Disease Control and Prevention of the United States (CDC) and the World Health Organization (WHO). Subsequently, the RespiFinder assay was administered, and the presence of influenza A (H1N1) virus was confirmed.

## Population

All subjects included in our study were evaluated according to a clinical questionnaire, which contained questions regarding influenza vaccination. The inclusion period was from May 2009 to March 2012, so the subjects examined during the study belonged to three different waves of influenza in Mexico.

A total of 278 subjects with clinical symptoms and signs of influenza were enrolled, of which 145 were positive and 133 were negative for influenza A (H1N1) infection; the influenza-negative patients were deemed to have ILI. On admission to the hospital, all patients with suspected influenza were treated with oseltamivir.

In this study, most patients sought medical attention 3–4 days after the onset of symptoms. All clinical data were collected retrospectively; nonetheless, blood samples and nasopharyngeal swabs were collected at the hospital during the first 24 hours after admission. In the group of AHCs, 360 biologically unrelated, intra-household contacts were enrolled who were asymptomatic and in close, continuous contact with ILI or H1N1 patients before and during admission to the hospital ([Fig 1](#)). None of the AHCs developed symptoms or was hospitalized for influenza virus infection. Peripheral blood from these individuals was tested for anti-A (H1N1)



**Fig 1. Flowchart for the collection and classification of patient samples in the study.** The blood samples were collected from suspected influenza inpatients at INER from 2009–2012. Abbreviations: ILI: influenza-like illness; RT-PCR: real-time PCR.

doi:10.1371/journal.pone.0144832.g001

antibody titers by hemagglutination inhibition assay according to the method described by Julkunen I, 1985 [18] to determine exposure to the virus. All subjects included in this group had HI titers greater than 1:16, indicating direct contact with the virus. All pA/H1N1 subjects were less than 60 years of age, precluding any cases of cross-reactive antibodies, which are prevalent in older age groups due to H1N1/1918-1919 infection [19]. Because this cohort was not progressively monitored for the dynamics of anti-A H1N1/09 antibody titers over time, these results are not shown.

### Data Collection and Variables

The study protocol was explained to all participants, and authorization was obtained with an informed consent form. The information collected included demographic data as well as laboratory data, medical histories, and drug treatment records.

### Genotyping of Allelic Variants (SNPs)

DNA samples were genotyped for *TNF* rs361525, rs1800629, and rs1800750; *LTA* rs909253; *IL1B* rs16944, rs3136558, and rs2227307; *IL6* rs1818879, rs2069840, and rs2066992; and *CCL1*

rs2282691 polymorphisms using commercial TaqMan assays (Applied Biosystems, CA, USA). The genetic data for the SNPs are described in [S1 Table](#). The polymorphisms were characterized by real-time PCR allelic discrimination on a 7300 Real-Time PCR System using 15 ng of DNA. The amplification conditions were as follows: 50°C for 2 min and 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

Haploview version 4.2 was used to determine the presence of haplotypes in *IL6*, *IL1B* and *TNF* genes associated with the risk of both H1N1 viral infection and greater clinical severity.

## Cytokine Quantification

Serum samples were taken from patients with ILI or a suspected ILI diagnosis upon hospital admission. The enrolled patients and the healthy volunteers gave whole blood, which was allowed to clot for 30 minutes at 37°C and was stored thereafter at -70°C until use. The resulting serum was used for cytokine measurement. Ten cytokines (GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-5, and IL-4) were measured on a Luminex 100 (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) using a multiplex cytokine kit as well as the Cytokine Human 10-Plex Panel (Novex, Life Technologies, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions.

## Statistical Analysis

Differences between the group proportions were analyzed using the chi-square test. Differences between clinical parameters, continuous variables, and each polymorphism were analyzed using the Mann-Whitney U test. The ancestral genotype was used as a reference for each polymorphism. Odds ratios (ORs) were calculated with 95% confidence intervals (CIs). The ORs were adjusted for age and disease severity in the logistic regression model. SPSS 21 (Chicago, IL, USA) and Epi-Info 7.0 (CDC, GA, USA) were used for these analyses.

For cytokine analysis, the subjects were stratified into three groups: 18 patients with A (H1N1) influenza, 15 patients with ILI, and 21 AHCs. Descriptive statistics included means and standard deviations or medians and interquartile ranges for continuous variables with normal and non-normal distributions, respectively. The Fisher exact test and the chi-square test were used for categorical variables. The Mann-Whitney U test was used for nonparametric variables. The nonparametric Wilcoxon test was used to compare two paired groups. The association between nonparametric variables was determined using the Spearman correlation coefficient ( $r$ ). Any value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. GraphPad Prism version 5.03 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used for these analyses.

## Results

### Demographic Characteristics

This study compared three groups: patients with confirmed influenza A (H1N1) (pA/H1N1), subjects with influenza-like illness (ILI), and AHCs. Gender distributions were similar in the three groups of patients, and differences between the groups were not significant. Patients in the pA/H1N1 group were slightly younger ( $42 \pm 14$  years) than those in the ILI group ( $45 \pm 15$  years,  $p = 0.068$ ). In addition, the presence of comorbidities was assessed, including diabetes, hypertension, asthma, and chronic obstructive pulmonary disease (COPD); interestingly, in the pA/H1N1 group, there was a higher rate of diabetes than in the ILI group (12.5% vs. 5.21%, respectively;  $p = 0.03$ ). There were no statistically significant differences for the other comorbidities studied ([Table 1](#)).

**Table 1. Characteristics of the patients at hospital admission.**

Variable	pA/H1N1 (n = 145)	ILI (n = 133)	p
Sex (M/F, %)	64.75/35.25	64.95/35.05	
Age (years)	42±14	45±15	
Height (cm)	164 (155–170)	165 (153–171)	
Weight (kg)	81±24	78±20	
BMI	30±7	28±5	0.0062
HR	90 (76–110)	92 (79–106)	
RR	24 (20–28)	22 (20–25)	0.0363
FA	101 (76–127)	88 (73–135)	
PaO <sub>2</sub>	51 (42–62)	54 (48–68)	0.024
PaCO <sub>2</sub>	30 (27–33)	30 (28–35)	
Clinical variables			
Leukocytes	7 (5–10)	9 (6–12)	0.0005
Neutrophils	8 (5–63)	10 (7–67)	
Platelets	175 (135–241)	221 (156–267)	0.0067
Glucose	123 (103–157)	107 (95–128)	0.0005
BUN	14 (10–19)	13 (9–18)	
Urea	29 (20–41)	28 (19–40)	
Creatinine	0.87 (0.67–1.05)	0.79 (0.62–1.03)	
CPK	245 (112–522)	149 (77–320)	0.0047
LDH	657 (417–1.069)	379 (213–655)	<0.001
AST	56 (33–87)	38 (25–63)	0.001
ALT	41 (27–75)	36 (22–58)	0.0185
Comorbidities			
Diabetes (Y/N, %)	12.5/87.5	5.21/94.79	
Hypertension (Y/N, %)	16.79/83.21	17.71/82.29	
Asthma (Y/N, %)	8.76/91.24	14.58/85.42	
COPD (Y/N, %)	1.47/98.53	3.13/96.88	
Complications			
ICU % (Y/N)	52.99/47.01	16.84/83.16	<0.001
AMV % (Y/N)	46.72/53.28	17.71/82.29	<0.001
ARDS % (Y/N)	46.72/53.28	17.71/82.29	<0.001
Pneumonia % (Y/N)	90.37/9.63	73.96/26.04	0.001
Death % (Y/N)	31 (22.46)	4 (4.21)	<0.001

Clinical differences among pA/H1N1 vs. ILI. Demographics, clinical records, complications, and major comorbidities in both comparison groups: pA/H1N1 vs. ILI inpatients from 2009–2012 influenza waves. HR, RR, FA, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> and clinical variables are presented as medians and interquartile ranges; other demographic variables are presented as the mean ± standard deviation, and p-values were derived using Student's t test. Comorbidities and complications are expressed as percentages. Abbreviations: pA/H1N1: patients with influenza A (H1N1); ILI: patients with influenza-like illness; BMI: body mass index; HR: heart rate; RR: respiratory rate; ICU: intensive care unit. AMV: mechanical ventilation; ARDS: acute respiratory distress syndrome; PaO<sub>2</sub>: oxygen partial pressure; PaCO<sub>2</sub>: carbon dioxide partial pressure; Y/N: yes/no.

doi:10.1371/journal.pone.0144832.t001

Patients with confirmed influenza A (H1N1) consistently showed a greater disruption of clinical parameters influencing evolution toward greater disease severity (Table 2).

**Table 2. Differences in clinical parameters of severity among patients with confirmed influenza pA/H1N1 vs. ILI.**

Variable	pA/H1N1 (%)	ILI (%)	p
Platelets	121 (100)	88 (100)	0.009
<150,000/mm <sup>3</sup>	40 (33.06)	15 (17.05)	-
Glucose	116 (100)	80 (100)	<0.01
>119 mg/dL	67 (57.76)	25 (31.25)	-
CPK	116 (100)	79 (100)	0.021
>240 U/L	59 (50.86)	27 (34.18)	-
LDH	120 (100)	87 (100)	0.035
>1200 U/L	22 (18.33)	7 (8.05)	-
AST	121 (100)	79 (100)	0.009
>63 U/L	51 (42.15)	19 (24.05)	-

Clinical parameters comparing the percentage of subjects in each group with severity variables; cutoffs for each clinical parameter were determined according to international standards. N (%). chi-square test. Abbreviations: OR: odds ratio; CI: confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0144832.t002

### Risk of Severe Influenza A (H1N1) Infection

To determine the risk of severe influenza A (H1N1) virus infection, the genotypes of individual SNPs were compared in both groups of patients (pA/H1N1 and ILI).

Genotypes associated with influenza A (H1N1) virus infection were identified. The *IL6* rs1818879 (GA) heterozygous genotype showed a risk association with viral infection ( $p < 0.001$ ; OR = 5.94, 95% CI: 3.05–11.56). Two *IL1B* SNPs were associated with a decreased risk of infection: rs16944 AG (OR = 0.52, 95% CI: 0.28–0.97) and rs3136558 TC (OR = 0.50, 95% CI: 0.29–0.88) (Table 3).

### Disease Susceptibility

When the pA/H1N1 group was compared with the AHC group, we observed that the *LTA* rs909253 TC heterozygous genotype showed a risk association with disease susceptibility ( $p = 0.003$ ; OR = 1.9, 95% CI: 1.25–2.87); a similar association occurred with the *IL1B* rs3136558 CC genotype ( $p = 0.041$ ; OR = 1.89, 95% CI: 1.02–3.51). In contrast, the *IL6* rs2066992 GT genotype was protective ( $p = 0.002$ ; OR = 0.53, 95% CI: 0.35–0.80) for individuals carrying the homozygous genotype for the ancestral allele (Table 3).

### Susceptibility to Greater Severity of A (H1N1) Infection

To determine the susceptibility to greater disease severity in relation to the SNPs present in pro-inflammatory genes, two subgroups were compared: patients admitted to the ICU and those who did not enter the unit and therefore did not require AMV; including both pA/H1N1 patients and ILI patients (53% vs. 17%). Of the 11 SNPs studied, the *TNF* rs361525 SNP was associated with greater disease severity ( $p = 0.007$ ; OR = 16.06) (S3 Table).

### Allele Analysis

With respect to *LTA* rs909253, allele A is a risk factor for disease development (pA/H1N1 vs. AHC:  $p = 0.049$ ; OR 1.34, 95% CI: 1.01–1.80), whereas the *IL6* rs2066992 T allele is a protective factor (pA/H1N1 vs. AHC:  $p = 0.007$ ; OR = 0.62, 95% CI: 0.43–0.98). In addition, the *IL1B*

**Table 3. Genotype frequencies and associations with susceptibility and risk of severe influenza A (H1N1) infection.**

Gene/SNP	Location Region	Genotype	pA/H1N1	ILI	AHC	pA/H1N1 vs. AHC			pA/H1N1 vs. ILI		
			GF (%)	GF (%)	GF (%)	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI
<b>TNF</b>											
rs361525	-238 (Promoter)	GG	88.9	88.6	88.5						
		GA	9.7	9.8	10.1						
		AA	3.4	1.5	1.4						
rs1800629	-308 (Promoter)	GG	93.1	92.4	92.6						
		GA	6.9	4.6	7.1						
		AA	0	3.1	0.3						
rs1800750	-376 (Promoter)	GG	95.8	95.5	96.9						
		GA	4.2	1.5	3.1						
		AA	0	3	0						
<b>IL1B</b>											
rs16944	-511 (Promoter)	AA	34.3	31.8	31.4						
		AG	46.2	33.3	4.4						
		GG	19.6	34.8	24.6				4.3E-02	0.52	0.28–0.97
rs3136558	Intronic	TT	36.2	23.8	32.6						
		TC	44.9	58.5	58.5				1.7E-02	0.50	0.29–0.88
		CC	18.8	17.7	8.9	4.10E-02	1.89	1.02–3.51			
<b>IL6</b>											
rs18181879	3' UTR	GG	22.1	45.1	22.5						
		GA	47.9	16.4	46.8				5.0E-08	5.94	3.05–11.56
		AA	30	38.5	30.7						
rs2069840	Intronic	CC	50.7	41.7	46.5						
		CG	40.3	47	45.6						
		GG	9	11.4	7.9						
rs2066992	Intronic	GG	65.5	59.8	50.1						
		GT	34.5	39.4	49.6	2.0E-03	0.53	0.35–0.80			
		TT	0	08	03						
<b>CCL1</b>											
rs2282691	Intronic	TT	39	32.5	33.1						
		TA	39	39.7	40.1						
		AA	22	27.8	26.7						
<b>IL8</b>											
rs2227307	+396 (Intronic)	TT	38.9	4.7	42.3						
		TG	43.9	40.9	46.5						
		GG	11.8	12.1	11.2						
<b>LTA</b>											
rs909253	+252 (Intronic)	GG	40.7	40.2	54.3						
		GA	48.3	50	34	3.0E-03	1.9	1.25–2.87			
		AA	11	9.8	11.7						

Estimated associations among genotypes to determine the risk of severe influenza A(H1N1) infection (pA/H1N1 vs. ILI) and disease susceptibility (pA/H1N1 vs. AHC). Only statistically significant data are shown. Abbreviations: pA/H1N1: patients with influenza A (H1N1); ILI: patients with influenza-like illness; AHC: asymptomatic healthy contacts; GF: genotype frequency; UTR: untranslated region; OR: odds ratio; CI: confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0144832.t003

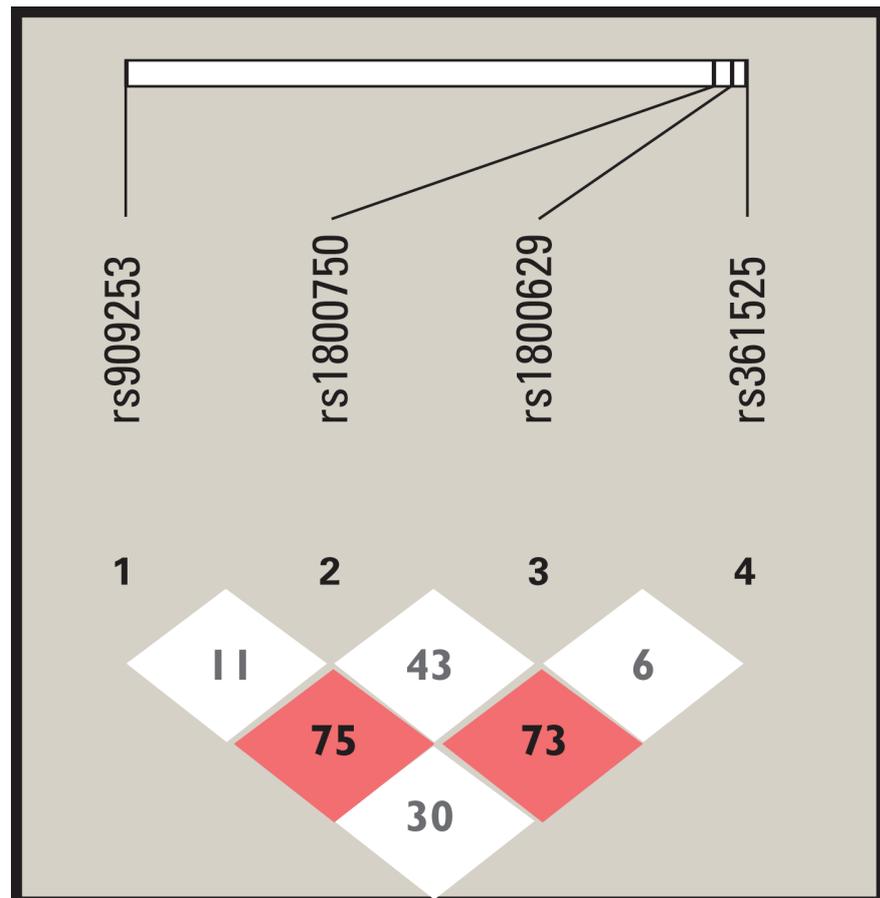
rs16944 G allele is protective against the development of severe influenza A (H1N1) virus infection (pA/H1N1 vs. ILI: p = 0.048; OR = 0.70, 95% CI: 0.50–0.98) (S2 Table).

### Mortality

Thirty-one patients positive for influenza A (H1N1) virus died, whereas four patients with ILI died. None of the polymorphisms/genotypes were directly associated with mortality. We also aimed to demonstrate whether there was any additional risk besides mortality associated with the presence of comorbidities; only the *IL6* rs2069869 GG genotype was associated with mortality risk in patients with diabetes in the pA/H1N1 group ( $p = 0.011$ ; OR = 40.8, 95% CI: 2.31–720.24). Only statistically significant data are shown.

### Haplotypes

The haplotype study was conducted to determine their associations with disease severity. The analysis included the *IL6*, *TNF*, and *IL1B* genes with their respective SNPs and considered both the pA/H1N1 group vs. the ILI group and each group individually. When comparing the two groups of patients, haplotypes were not formed, only independent alleles, in groups of patients (ILI or pA/H1N1). Fig 2 shows the haplotypes consisting of the *TNF* SNPs located on chromosome 6 in the patients with ILI; these haplotypes are not in high linkage disequilibrium ( $r^2 = 0.75$ ), although the value was close to the minimum required (0.80). Polymorphisms evaluated in the *TNF* and *IL6* genes met Hardy-Weinberg equilibrium (Fig 2).



**Fig 2. Haplotype for TNF gene at Chr 6 in ILI patients.** Linkage disequilibrium between the four single nucleotide polymorphisms identified at chromosome 6 in the TNF gene (generated for the ILI patients in Haploview 4.2).

doi:10.1371/journal.pone.0144832.g002

**Table 4. Genotypes associated with clinical severity variables in patients with influenza A (H1N1) pdm09.**

Clinical severity	p	OR	95% CI
<i>IL6</i> rs1818879 GG			
Glucose >119 mg/dL	0.0035	4.8	1.48–15.57
Lymphocytes <1 x 10 <sup>3</sup> /L	0.0003	3.1	1.59–16.18
Mechanical ventilation	0.0004	4.8	1.29–18.24
<i>IL1B</i> rs16944 GG			
Glucose >119 mg/dL	0.0068	3.1	1.02–9.49
Lymphocytes <1 x 10 <sup>3</sup> /L	0.0118	2.3	1.13–4.51
Platelets <150,000/ mm <sup>3</sup>	0.0063	8.3	1.77–39.43

Logistic regression was performed to correlate these severity cutoffs with the 11 polymorphisms studied. Only statistically significant data are shown. Abbreviations: OR: odds ratio; CI: confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0144832.t004

### Clinical Severity

Five parameters of infection severity were considered: mechanical ventilation, admission to ICU, presence of Acute Respiratory Distress Syndrome, development of pneumonia, and fatal outcome.

The analysis of severity variables confirmed that these variables *per se* are significantly associated with disease severity (Table 3). Interestingly, associations were identified between the values for lymphocytes <1,000 and glucose >119 mg/dL with the rs16944 and rs1818879 GG genotypes in *IL1B* and *IL6*, respectively. Additionally, the rs16944 GG genotype was associated with thrombocytopenia and the rs1818879 GG genotype with the use of AMV (Table 4).

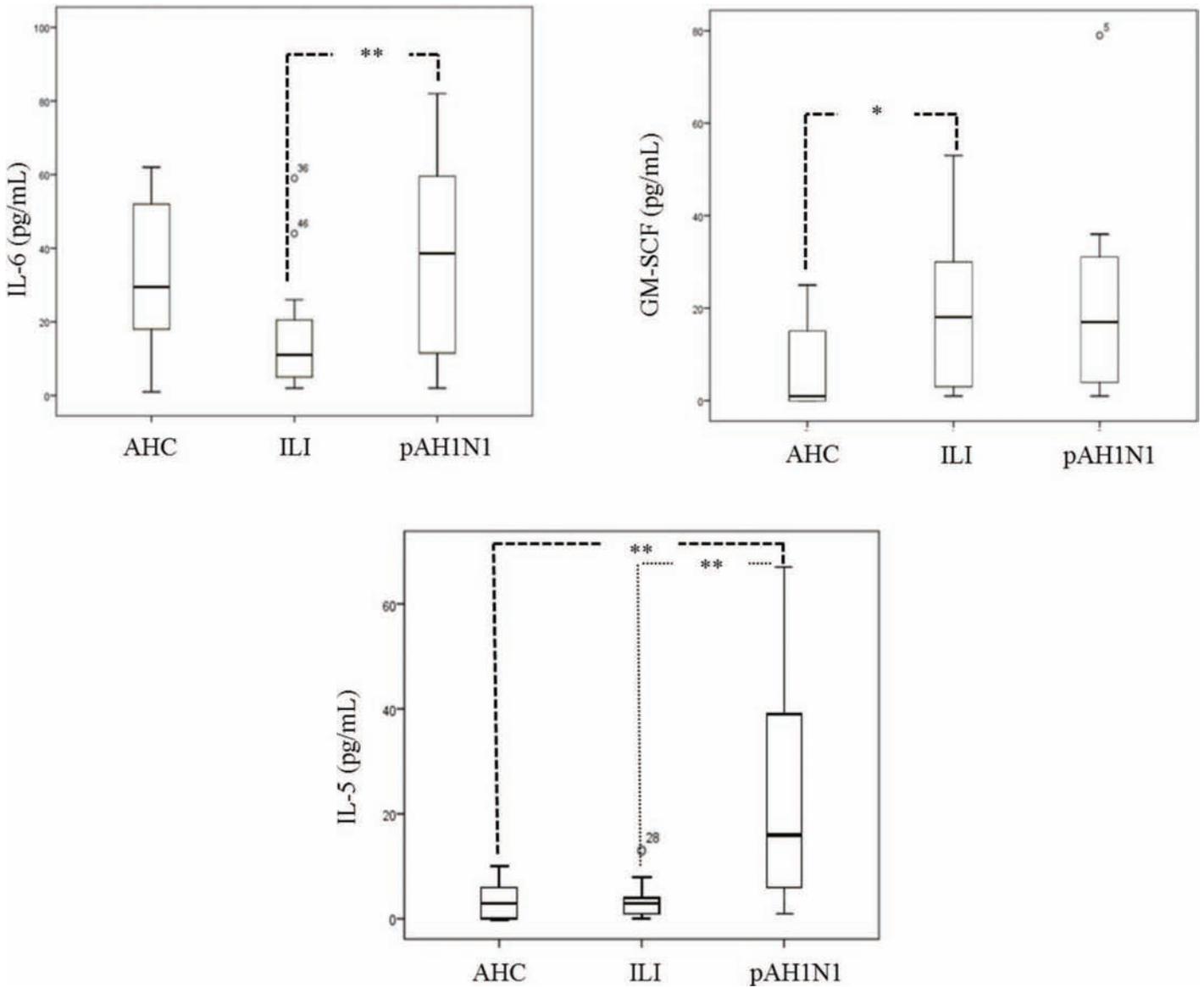
### Serum Cytokine Expression

We determined the levels of ten diverse pro-inflammatory cytokines in serum samples. Because the cytokine concentrations showed significant inter-individual variation, we represented the quantification in a box plot in Fig 3. The concentrations of cytokines were in the range of 5–80 pg/mL. In the case of pA/H1N1 patients, the concentrations of all cytokine were higher than in the other study groups. In particular, IL5 showed increased concentrations in pA/H1N1 patients vs. ILI patients or AHCs. The three groups were compared using one-way ANOVA for multiple comparisons. All comparisons were considered statically significant at  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ ; for Tukey corrections,  $p < 0.03$  was considered significant. For IL6, the multiple comparisons ANOVA model produced a marginal  $p = 0.03$ .

Compared with ILI patients, severe pA/H1N1 patients exhibited markedly increased levels of serum IL-5 ( $p < 0.001$ ) and IL-6 ( $p = 0.007$ ) and similar levels of GM-CSF ( $p = 0.967$ ). We found no statistically significant differences for the remaining seven analytes evaluated. These results show that severe pA/H1N1 patients secrete higher levels of serum IL-6 and IL-5 than do ILI patients, suggesting a particular mechanism of pathophysiology in pA/H1N1 infection.

Although the levels of serum IL-6 in pA/H1N1 patients were higher than those of healthy controls, no statistically significant differences were observed (Fig 3).

Finally, we examined the correlation between cytokine levels and severe clinical parameters, including obesity and leukocyte counts. The median IL-5 concentrations for obese ILI patients and for obese pA/H1N1 patients were 3.08 and 3.07, respectively. In contrast, compared with non-obese ILI patients, non-obese pA/H1N1 patients showed a 9-fold increase: median of 3.03 vs. median of 29.93 ( $p < 0.01$ ), respectively. Concentrations of IL-6 in obese ILI patients and in



**Fig 3. Concentrations of IL-6, IL-5, and GM-SCF in pAH1N1, ILI patients and AHC at admission.** Box and whisker plots of cytokine levels in sera from the AHC, ILI, and pAH1N1 groups. Boxes represent the 25–75 quartile, the whiskers represent the range of values, the middle line inside the box is the median, and the outlier values are represented as circles outside the boxes. The p-values (\*\* and \* representing <0.001 and <0.05, respectively) were calculated by one-way ANOVA and are presented above the graphs.

doi:10.1371/journal.pone.0144832.g003

obese pA/H1N1 patients were 10.58 and 32.30, respectively. Compared with non-obese ILI patients, non-obese pA/H1N1 patients showed an increase: 19.41 vs. 49.17; however there was no significant difference ( $p = 0.28$ ).

Pearson’s analysis showed no significant difference between BMI and IL-5 and IL-6 concentrations or leukocyte counts and IL-5 and IL-6 in the pA/H1N1 group.

## Discussion

In addition to the findings previously described, in this second study of polymorphisms in pro-inflammatory cytokine genes, our group identified genetic factors associated with susceptibility to influenza A (H1N1). In late 2012, we reported that some genotypes in *TNF* and *LTA* are associated with susceptibility to infection with the influenza A (H1N1) pdm09 virus. Interestingly, two SNPs, one in *IL1B* (rs16944) and one in *IL6* (rs1818879), were associated with clinical severity when comparing influenza A (H1N1) patients with ILI patients.

This study confirms our previous finding that the *LTA* rs909253 GA genotype is a risk factor for susceptibility to developing secondary disease after contact with the influenza A (H1N1) pdm09 virus; interestingly, the minor allele (A) was associated with risk in this same comparison group (pA/H1N1 vs. AHC).

To complement these observations, an association analysis was conducted regarding the risk of severe influenza A (H1N1) infection; both *IL1B* and *IL6* SNPs showed significant associations, particularly rs16944, which is located in the promoter region of the gene. In agreement with what has been reported previously, the GA genotype in the *TNF*-238 (rs361525) promoter presented a risk for greater disease severity in patients who were admitted to the ICU compared with those who only required hospitalization [2, 15, 20]. Despite having no association with the minor allele homozygous genotype for *TNF*-238, we may observe that the presence of allele A in the heterozygous genotype in severe influenza A (H1N1) patients increased the risk of severity.

Associations have recently been reported for the *IL1A*, *IL1B* [21] and *IL10* [16] genes, whereas increases in the allelic frequencies of *TNF*-238A (rs361525) and *TNF*-308G (rs1800629), *IL10*-592C, and *IL10*-1082A have been associated with increased disease severity [14–16].

Both *LTA* and *TNF* are considered biologically relevant inflammatory cytokines with various functions in the immune response. Several authors have shown that SNPs present in these genes are associated with increased susceptibility for developing infectious diseases [22–24]. The polyadenylation region in *LTA* and the *TNF* transcription start sites are in close proximity in the *TNF* cluster of the HLA class III region; therefore, it is difficult to obtain associations of SNPs in this region [25]. Currently, priority is given to studies of haplotypes for candidate immune response genes, especially for multigenic control in response to infectious diseases such as influenza. Therefore, we conducted a study of haplotypes in influenza A (H1N1) and ILI patients; however, a haplotype between *LTA* and *TNF* was only identified in the latter group, and high linkage disequilibrium was not observed ( $r^2 = 0.75$ ). We believe that expanding the  $n$  or considering other candidate genes could improve this approach. Because cytokine production is influenced by SNPs in the promoter regions of these genes [26], we propose that individuals carrying associated alleles may exhibit increased cytokine production and may thus develop more severe disease.

Previous studies have reported a correlation between IL-1 $\beta$  and IL-6 overexpression and some clinical, radiological and immunological findings, such as pneumonia and ARDS, in both children with seasonal influenza and murine models [27–29]. TNF, IL-1 $\beta$  and IL-6 pro-inflammatory cytokines play crucial roles in inflammation, infection, and responses to stress caused by different types of infections. Many of the systemic effects of the acute phase are due to the combined actions of these cytokines [30]. In particular, IL-1 $\beta$  and IL-6 have been identified as markers of severity in acute lung injury during influenza A (H1N1) virus infection [31]; IL-1 $\beta$  in particular has been proposed as a good early marker of the severity and progression of lung inflammation in mechanically ventilated patients [9]. In a 2013 study by *Chiaretti et al.*, influenza A (H1N1) virus infection was shown to induce the early and significant up-regulation of

IL-1 $\beta$  and IL-6 in plasma, suggesting that these cytokines are responsible for different molecular reactions that lead to inflammation of the airway and increased disease severity [32]. In turn, IL-6 plays a critical role in the acute phase response during infectious processes and is usually induced with other pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , during immune system alarms [33]. Similarly, these cytokines are overexpressed at higher serum levels in severe patients compared with patients with moderate disease [4–7]. Strikingly, in our study, compared with obese pA/H1N1 patients, non-obese patients showed significantly higher IL-5 and IL-6 levels; furthermore, pA/H1N1 patients exhibited lower leukocyte counts. Several groups worldwide have reported that increased levels of pro-inflammatory cytokines are associated with clinical severity parameters, including obesity [34,35]. We found that IL-6 levels were higher in pAHN1 obese patients than in ILI obese patients (32.3 vs. 10.5 pg/mL), with no significant differences. In contrast, non-obese patients in the pA/H1N1 group showed a 9-fold increase in IL-5 levels. Despite the increase observed in both obese patient groups, it is important to note that compared with ILI patients and AHCs, non-obese patients with severe clinical pictures of H1N1 influenza have increased IL-5 levels. There were no significant differences for leukocyte counts and cytokine levels in pA/H1N1 and ILI patients.

According to published reports, cytokine levels are affected over time [10, 36]. Nevertheless, our study only examined associations between SNPs and susceptibility to infection and disease severity; we did not investigate how oseltamivir affects cytokine levels over time. Oseltamivir treatment may modify the expression of cytokines, but that does not affect the association between certain SNPs and disease severity among patients and AHCs. The median number of days from the onset of symptoms to oseltamivir administration was 5.0, although 92% of study patients were administered oseltamivir within 1 day after admission [37]. Therefore, associations were analyzed by the severe clinical picture regardless of immune regulation by the antiviral, which was reinforced by the fact that the patients were subjected to the same doses and began treatment similarly. One major limitation of this study was that samples were only collected in the central region of the country where mortality was higher; therefore, we believe that expanding the sampling area to other geographical regions would enable us to clearly identify areas with greater "genetic vulnerability" to be able to overcome future challenges of potentially lethal subtypes of influenza.

Concerning age at presentation, our results indicate that many patients who are not in the age groups at greatest risk of death or who have no comorbidities associated with an increased risk of death from influenza may have genetic characteristics that make them more susceptible to developing influenza and presenting with greater disease severity. With respect to the population of 2010 and 2012 and in accordance with what has been reported by other authors [38–40], approximately 95% of our study population had not previously received an influenza vaccine due to the vaccination guidelines suggested by the Ministry of Health prior to 2013. In addition to this intricate scenario, many patients are reluctant to receive vaccines due to mistrust of the vaccine or infection with H1N1 [41]. In this way and based on our exclusion criteria, >90% of our study population was excluded from the risk group. We reasoned that associations with the severity of influenza A (H1N1) virus infections would be determined more by genetic variables than an immune response to the influenza vaccine. This view is supported by the fact that the group of AHCs is in the same age group and therefore has the same vaccination characteristics. Therefore, it is unlikely that our results would be modified by vaccination status.

## Conclusions

Our observations highlight the need to take into account that any patient may progress to severe disease because of the influence of their genetic background. Therefore, influenza

mortality prevention strategies should consider universal vaccination. The *TNF* rs361525 GA genotype is associated with greater disease severity. SNPs in *IL6* are associated with susceptibility to developing influenza A (H1N1) infection. In addition, the *IL6* rs2069869 GG is associated with mortality from influenza A (H1N1) infection in the presence of diabetes. IL-6 levels are increased in both obese pA/H1N1 and ILI patients compared with AHCs, but greater than an obese patient alone. Strikingly, non-obese pA/H1N1 patients presented much higher IL-6 levels than did obese patients. Influenza A (H1N1) virus infection and its severity are determined by the genetic characteristics of the individual, especially among genes that regulate inflammation.

## Supporting Information

**S1 Table. Genetic information to identify each of the SNPs studied.**  
(PDF)

**S2 Table. Allele frequencies and associations with susceptibility and risk of severe influenza A (H1N1) infection.**  
(PDF)

**S3 Table. Association between different polymorphisms and influenza severity.**  
(PDF)

## Acknowledgments

This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM) for RAGR. RA García-Ramírez acknowledges the academic support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. The authors thank the Coordinación de Investigación en Salud of the IMSS for covering the translation and publishing costs. This study was funded by the Mexican Institute of Social Security, Grants FIS/IMSS/PROT/G13/1212 and CONACyT-FOSIS SALUD2009-C02-126699.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RAGR JMMA RFV. Performed the experiments: RAGR RFV. Analyzed the data: RQC ARV JMMA. Contributed reagents/materials/analysis tools: ARV AEC. Wrote the paper: RAGR RFV.

## References

1. Echevarría-Zuno S, Mejía-Arangur JM, Mar-Obeso AJ, Grajales-Muñiz C, Robles-Pérez E, González León M. et al. Infection and death from influenza A H1N1 virus in Mexico: a retrospective analysis. *Lancet*. 2009; 374(9707): 2072–2079. doi: [10.1016/S0140-6736\(09\)61638-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61638-X) PMID: [19913290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19913290/)
2. Morales-García G, Falfán-Valencia R, García-Ramírez RA, Camarena Á, Ramirez-Venegas A, Castillejos López M. et al. Pandemic influenza A/H1N1 virus infection and TNF, LTA, IL1B, IL6, IL8, and CCL polymorphisms in Mexican population: a case-control study. *BMC Infect Dis*. 2012; 12: 299. doi: [10.1186/1471-2334-12-299](https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-299) PMID: [23148654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23148654/)
3. Yu X, Zhang X, Zhao B, Wang J, Zhu Z, Teng Z et al. Intensive cytokine induction in pandemic H1N1 influenza virus infection accompanied by robust production of IL-10 and IL-6. *PLoS ONE*. 2011 6(12): e28680. doi: [10.1371/journal.pone.0028680](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028680) PMID: [22174866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22174866/)
4. Bermejo-Martin JF, Martin-Loeches I, Rello J, Antón A, Almansa R, Xu L. et al. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2010; 14(5): R167. doi: [10.1186/cc9259](https://doi.org/10.1186/cc9259) PMID: [20840779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20840779/)

5. Zúñiga J, Torres M, Romo J, Torres D, Jiménez L, Ramírez G. et al. Inflammatory profiles in severe pneumonia associated with the pandemic influenza A/H1N1 virus isolated in Mexico City. *Autoimmunity*. 2011; 44(7): 562–570. doi: [10.3109/08916934.2011.592885](https://doi.org/10.3109/08916934.2011.592885) PMID: [21838592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21838592/)
6. Hagau A., Slavcovici A, Gongnanu DN, Oltean S, Dirzu DS, Brezozski ES et al. Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. *Crit Care*. 2010; 14(6): R203. doi: [10.1186/cc9324](https://doi.org/10.1186/cc9324) PMID: [21062445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21062445/)
7. Chiaretti A, Pulitano S, Conti G, Barone G, Buonsenso D, et al. Interleukin and neurotrophin up-regulation correlates with severity of H1N1 infection in children: a case-control study. *Int J Infect Dis*. 2013; 17(12): e1186–1193. doi: [10.1016/j.ijid.2013.07.006](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.07.006) PMID: [24094526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24094526/)
8. Estella A. Cytokine levels in bronchoalveolar lavage and serum in 3 patients with 2009 Influenza A (H1N1)v severe pneumonia. *J Infect Dev Ctries*. 2011; 5(7): 540–543. PMID: [21795823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21795823/).
9. Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest*. 1995; 108(5): 1303–1314. PMID: [7587434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7587434/)
10. Lee N, Chan PK, Wong CK, Wong KT, Choi KW, Joynt GM, et al. Viral clearance and inflammatory response patterns in adults hospitalized for pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus pneumonia. *Antivir Ther*. 2011; 16:237–247. doi: [10.3851/IMP1722](https://doi.org/10.3851/IMP1722) PMID: [21447873](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21447873/)
11. To KK, Hung IF, Li IW, Lee KL, Koo CK, Yan WW, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. *Clin Infect Dis*. 2010; 50:850–859. doi: [10.1086/650581](https://doi.org/10.1086/650581) PMID: [20136415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20136415/)
12. Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol*. 1995; 99(2): 303–310. PMID: [7851026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7851026/)
13. Knight JC, Kwiatkowski D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999; 111(4): 290–298. PMID: [10417736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10417736/)
14. Romanova E. N. and Govorin A. V. TNF-alpha, IL-10, and eNOS gene polymorphisms in patients with influenza A/H1N1 complicated by pneumonia. *Ter Arkh*. 2013; 85(3): 58–62. PMID: [23720844](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23720844/)
15. Antonopoulou A, Baziaka F, Tsaganos T, Raftogiannis M, Koutoukas P, Spyridaki A. et al. Role of tumor necrosis factor gene single nucleotide polymorphisms in the natural course of 2009 influenza A H1N1 virus infection. *Int J Infect Dis*. 2012. 16(3): e204–208. doi: [10.1016/j.ijid.2011.11.012](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.11.012) PMID: [22269998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22269998/)
16. Martínez-Ocaña J, Olivo-Díaz A, Salazar-Domínguez T, Reyes-Gordillo J, Tapia-Aquino C, Martínez Hernández F. et al. Plasma cytokine levels and cytokine gene polymorphisms in Mexican patients during the influenza pandemic A(H1N1)pdm09. *J Clin Virol*. 2013; 58(1): 108–113. doi: [10.1016/j.jcv.2013.05.013](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.05.013) PMID: [23809475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23809475/)
17. Borja-Aburto VH, Chowell G, Viboud C, Simonsen L, Miller MA, Grajales Muñiz C. et al. Epidemiological characterization of a fourth wave of pandemic A/H1N1 influenza in Mexico, winter 2011–2012: age shift and severity. *Arch Med Res*. 2012; 43(7): 563–570. doi: [10.1016/j.arcmed.2012.09.005](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.09.005) PMID: [23079035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23079035/)
18. Julkunen I, Pyhälä R, Hovi T. Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B virus infections. Purified hemagglutinin in subtype-specific diagnosis. *J Virol Methods*; 1985. 10:75–84. PMID: [3882733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3882733/)
19. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M. et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*. 2009; 460:1021–5. doi: [10.1038/nature08260](https://doi.org/10.1038/nature08260) PMID: [19672242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19672242/)
20. Sinha S, Mishara SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK et al. Indian Genome Variation Consortium, Venkatesh V, Habib S. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcγRIIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. *Malar J*. 20 7: 13.
21. Liu Y, Li S, Zhang G, Nie G, Meng Z, Mao D et al. Genetic variants in IL1A and IL1B contribute to the susceptibility to 2009 pandemic H1N1 influenza A virus. *BMC Immunol*. 2013. 14: 37. doi: [10.1186/1471-2172-14-37](https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-37) PMID: [23927441](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23927441/)
22. Lanás A, García-González MA, Santolaria S, Crusius JB, Serrano MT, Benito R et al. TNF and LTA gene polymorphisms reveal different risk in gastric and duodenal ulcer patients. *Genes Immun*. 2001; 2(8): 415–421. PMID: [11781708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11781708/)
23. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94(7): 3195–3199. PMID: [9096369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9096369/)

24. Kerr JR, McCoy M, Burke B, Matthey DL, Pravica V, Hutchinson IV. Cytokine gene polymorphisms associated with symptomatic parvovirus B19 infection. *J Clin Pathol*. 2003; 56(10): 725–727. PMID: [14514772](#)
25. Atan D, Heissigerova J, Kuffová L Tumor necrosis factor polymorphisms associated with tumor necrosis factor production influence the risk of idiopathic intermediate uveitis. *Mol Vis*. 2013; 19: 184–195. PMID: [23378732](#)
26. Broekhuizen R, Grimble RF, Howell WM, Shale DJ, Creutzberg EC, Wouters EF et al. Pulmonary cachexia, systemic inflammatory profile, and the interleukin 1beta -511 single nucleotide polymorphism. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82(5): 1059–1064. PMID: [16280439](#)
27. Chiaretti A, Genovese O, Aloe L, Antonelli A, Piastra M, Poldori G et al. Interleukin 1beta and interleukin 6 relationship with paediatric head trauma severity and outcome. *Childs Nerv Syst*. 2005; 21(3): 185–193; discussion 194. PMID: [15455248](#)
28. Wu CL, Lee YL, Chang KM, Chang GC, King SL, Chiang CD et al. Bronchoalveolar interleukin-1 beta: a marker of bacterial burden in mechanically ventilated patients with community-acquired pneumonia. *Crit Care Med*. 2003; 31(3): 812–817. PMID: [12626989](#)
29. Paich HA, Sheridan PA, Handy J, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, Hudgens MG, et al. Overweight and obese adult humans have a defective cellular immune response to pandemic H1N1 influenza A virus. *Obesity (Silver Spring)*. 2013; 21(11):2377–86.
30. Belfer I, Buzas B, Hipp H, Dean M, Evans C, Lorincz I. et al. Haplotype structure of inflammatory cytokines genes (IL1B, IL6 and TNF/LTA) in US Caucasians and African Americans. *Genes Immun*. 2004; 5(6): 505–512. Sato M, Hosoya M., Wright PF Differences in serum cytokine levels between influenza virus A and B infections in children. *Cytokine*. 2009; 47(1): 65–68. PMID: [15306845](#)
31. Paquette SG, Banner D, Zhao Z, Fang Y, Huang SS, León AJ et al. Interleukin-6 is a potential biomarker for severe pandemic H1N1 influenza A infection. *PLoS ONE*. 2012; 7(6): e38214. Seki M, Yanagihara K., Higashiyama Y, Fukuda Y, Kaneko Y, Ohno H. et al. Immunokinetics in severe pneumonia due to influenza virus and bacteria coinfection in mice. *Eur Respir J*. 2004; 24(1): 143–149. doi: [10.1371/journal.pone.0038214](#) PMID: [22679491](#)
32. Chiaretti A, Pulitano S, Barone G, Ferrara P, Romano V, Capozzi D et al. IL-1 beta and IL-6 upregulation in children with H1N1 influenza virus infection. *Mediators Inflamm*. 2013; 495848. doi: [10.1155/2013/495848](#) PMID: [23737648](#)
33. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*. 1998; 101(2): 311–320. PMID: [9435302](#)
34. Matsushita K, Yatsuya H, Tamakoshi K, Wada K, Otsuka R, Takefuji S, et al. Comparison of Circulating Adiponectin and Proinflammatory Markers Regarding Their Association With Metabolic Syndrome in Japanese Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(4):871–6. PMID: [16456090](#)
35. Nishida M, Moriyama T, Sugita Y, Yamauchi-Takahara K. Abdominal obesity exhibits distinct effect on inflammatory and anti-inflammatory proteins in apparently healthy Japanese men. *Cardiovasc Diabetol*. 2007; 6: 27. PMID: [17903275](#)
36. Yu X., Zhang X., Zhao B., Wang J., Zhu Z, Teng Z et al. Intensive Cytokine induction in Pandemic H1N1 Influenza Virus Infection Accompanied by Robust Production of IL-10 and IL-6. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28680. doi: [10.1371/journal.pone.0028680](#) PMID: [22174866](#)
37. Higuera Iglesias, Kudo K., Manabe T., Corcho BA, Corrales A, Alfaro Ramos L et al. Reducing Occurrence and Severity of Pneumonia Due to Pandemic H1N1 2009 by Early Oseltamivir Administration: A Retrospective Study in Mexico. *PLoS One*. 2011; 6(7):e21838. doi: [10.1371/journal.pone.0021838](#) PMID: [21760915](#)
38. Gómez-Gómez A, Magaña-Aquino M, Garcia-Sepúlveda C, Ochoa-Pérez UR, Falcón-Escobedo R, Comas Garcia A et al. Severe pneumonia associated with pandemic (H1N1) 2009 outbreak, San Luis Potosí, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16(1):27–34. doi: [10.3201/eid1601.090941](#) PMID: [20031039](#)
39. Chowell G, Echevarría-Zuno S, Viboud C, Simonsen L, Grajales Muñoz C, Rascón Pacheco et al. Recrudescence wave of pandemic A/H1N1 influenza in Mexico, winter 2011–2012: Age shift and severity. Version 2. *PLoS Curr*. 2012; 4:RRN1306. PMID: [22485199](#)
40. Dávila J, Chowell G, Borja-Aburto VH, Viboud C, Grajales Muñoz C, Miller M. Substantial Morbidity and Mortality Associated with Pandemic A/H1N1 Influenza in Mexico, Winter 2013–2014: Gradual Age Shift and Severity. *PLoS Curr*. 2014; 6.
41. Jiménez-Corona ME, Aguilar-Díaz F del C, León-Solís LE, Morales-Virgen JJ, de León-Rosales SP Knowledge, attitudes and practices about influenza A(H1N1) 2009, and influenza vaccine in Mexico: results of a population survey. *Salud Publica Mex*. 2012; 54(6):607–15.