



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Determinación de la concentración de citocinas en
suero de pacientes infectados durante la pandemia por
virus de influenza humana pandémica A(H1N1)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ESTEBAN DOMÍNGUEZ CEREZO



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Rodolfo Pastelín Palacios

VOCAL: Profesor: Constantino III Roberto López Macías

SECRETARIO: Profesor: Lourdes Andrea Arriaga Pizano

1er. SUPLENTE: Profesor: Rocío Gabriela Tirado Mendoza

2° SUPLENTE: Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. JACQUELINE LISZETH OLIVA RAMÍREZ

(nombre y firma)

SUSTENTANTE(S): ESTEBAN DOMÍNGUEZ CEREZO

(nombre y firma)

Agradecimientos

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

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

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

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

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

A Jacqueline, Isma y Javi, por hacer la transición de la facultad al trabajo del laboratorio mucho más sencilla y divertida, además de mostrar la madurez necesaria para dirigir alumnos de manera práctica y eficaz. Gracias por las enseñanzas académicas y personales, se les aprecia, de verdad, en serio.

A Liz, Ilka y Gaby porque sin ellas la vida en el peine de trabajo no sería lo mismo.

A Marisol, Adriana, Núriban, Hisaki, Pablo Vieyra y Alexis, porque además de mostrar la enorme capacidad que tienen como alumnos son excelentes compañeros de trabajo y grandes amigos. Los consejos, regaños, discusiones así como las risas y extravagancias son agradecidos por igual, esperando que las cosas no cambien por el mundo en el que decidimos entrar.

A mis compañeros de la UIMIQ, un excelente e incansable grupo de trabajo.

A Abraham, Hugo, Naybi, Vicky, Hazziel, Joselo, Yoi, Paulina y los que faltan de la secundaria, por encontrar antes, seguir durante y continuando mucho después la amistad que hemos alimentado con grandes experiencias. Mis hermanos, gracias por soportar las ausencias y apoyarme incondicionalmente durante todo este largo proceso, se les quiere muchísimo y nunca me olvido de ustedes, están conmigo siempre como yo con ustedes.

A Piffs, Myrna, Alicia, Memo, Paulina, Mónica, Lucoca, Iván, Caro, Kory, Gabriel, Rafa, Carlos, Marisol y los demás QFBs, QAs, IQs, Qs e IQMs de la jardinera, auditorio y otros lados, quienes a su muy particular manera y con la cual estoy feliz de haberme identificado, han sido un enorme apoyo dentro de la escuela, para cuestiones académicas y personales. Gracias por mostrarme que ser un ñoño no es malo, que el rock es de lo mejor, que las extravagancias tienen razón de ser y que por mucho que las cosas vayan mal, siempre se puede salir adelante e incluso ponerse de mejor manera; por haber soportado los malos ratos y por incluirme en todos los buenos. Ustedes son de lo mejor que hay y habrá en la facultad y me considero afortunado de ser su amigo, muchísimas gracias.

A la Facultad de Química, sus maestros y trabajadores, en cuyas instalaciones me desarrollé plenamente y de la cual me considero orgulloso alumno. Muchísimas gracias por todo.

Y porque el suspenso de la gran cantidad de letras anteriores le imprime una importancia sin igual, por ser la persona con el mayor impacto en mi vida, para la cual mi cariño es inmenso e incondicional y cuya ausencia causaría que muchas de las cosas que han sucedido en mi vida, incluyendo mi presencia en la escuela y este trabajo, simplemente no hubieran sucedido. Sin duda, mi ejemplo a seguir como persona, a quien ni todas las gracias del mundo le demostrarían lo que siento por ella. Mamá, no existe manera de expresar todo mi agradecimiento por lo que has hecho por mí. Todo esto, lo anterior y lo que venga de aquí en adelante es gracias a ti. Te quiero muchísimo.

Financiamientos

Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, a través del Fondo en Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/714).

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto con el número 120768.

Beca por estudios proporcionada por el proyecto número 2009-785-104 a través del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/703).

Abreviaturas

A(H1N1) 2009	Virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009
aSi	Ácido siálico
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
cDC	Célula dendrítica convencional
CMN S.XXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
FADD	Dominios de muerte asociados a Fad
H1N1-	Influenza pandémica A(H1N1) 2009 negativo
H1N1+	Influenza pandémica A(H1N1)2009 positivo
HA	Hemaglutinina
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IPS	Promotor estimulador de interferón
LRR	Repetidos ricos en leucina
M	Proteína de matriz
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos
MDA5	Gen asociado a diferenciación de melanoma 5
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
mRNA _v	RNA mensajero viral
MyD88	Proteína de diferenciación mieloide de respuesta primaria 88
NA	Neuraminidasa
NACHT	Dominio de unión de nucleótido y oligomerización
NFκB	Factor nuclear κB
NK	Células asesinas naturales
NLR	Receptor tipo NOD
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Polimerasa ácida
PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PB	Polimerasa básica
pDC	Célula dendrítica plasmacitoide

PKR	Proteína cinasa R
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrón
RANTES	Proteína regulada en activación expresada y secretada por células T normales
RIG	Gene inducible por retinoides
RIP	Proteína de interacción de receptor
RLR	Receptor tipo RIG
RNA	Ácido ribonucleico
RNAv	Ácido ribonucleico viral
RNP	Ribonucleoproteína
rRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa en tiempo real
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
ssRNA	RNA de cadena sencilla
Tc	Linfocito T citotóxico
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TIR	Dominio Toll/Receptor de IL-1
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRADD	Dominios de muerte asociados a TRAF
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF
TRIF	Inductor de interferon que contiene dominio TIR
vRNApol	RNA polimerasa viral dependiente de RNA

Índice

Resumen	1
Introducción	2
<i>-Biología y estructura del virus</i>	<i>2</i>
<i>-Genoma</i>	<i>3</i>
<i>-Proceso de replicación</i>	<i>4</i>
<i>-Reconocimiento molecular del virus por el sistema inmunológico</i>	<i>7</i>
<i>-Expresión de citocinas y quimiocinas</i>	<i>10</i>
<i>-Mutaciones y generación de nuevas cepas</i>	<i>13</i>
Planteamiento del problema	15
Justificación	15
Preguntas de investigación	15
Hipótesis	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares	16
Materiales y métodos	17
Resultados	22
Discusión	29
Conclusiones	35
Bibliografía	36

-Resumen

La influenza es una enfermedad cuyo agente etiológico es un virus, miembro de la familia *Orthomyxoviridae*. Durante la infección, células del tracto respiratorio y del sistema inmunológico reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) del virus, por medio de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), tales como helicasas de RNA citoplasmáticas, receptores tipo Toll (TLR) y receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótido (NLR), activando vías de señalización que derivan en la producción de citocinas y quimiocinas, cuya función será la activación y reclutamiento de células del sistema inmune, la eliminación del virus y la resolución de la enfermedad. Sin embargo, infecciones con cepas altamente patogénicas, ej. A(H1N1) 1918 o A(H5N1), se caracterizan por un cuadro clínico severo, asociado a una respuesta inflamatoria exacerbada, manifestada por altos niveles de citocinas y quimiocinas, tanto en tracto respiratorio como en torrente sanguíneo, además de la presencia de virus en sangre. Durante el año 2009, el virus de influenza humana A(H1N1) generó una pandemia que tuvo como epicentro a México. Las características moleculares de la enfermedad provocada por esta nueva cepa aún no son completamente conocidas en humanos y debido a los reportes iniciales acerca de su morbilidad y mortalidad, nos dimos a la tarea de caracterizar el fenómeno inflamatorio agudo por infección con A(H1N1) 2009, cuantificando por citometría de flujo citocinas y quimiocinas presentes en suero de pacientes, admitidos por sospecha de infección por virus de influenza, durante el periodo mayo de 2009 a febrero 2010, al Hospital Regional General No.1 "Carlos McGregor Sánchez" y al Hospital de Especialidades "Bernardo Sepúlveda"; pertenecientes al Instituto Mexicano del Seguro Social; para compararlas con la obtenida de sujetos sanos, sin obtener la "tormenta de citocinas" reportada para cepas altamente patogénicas, ni encontrando relación con el comportamiento epidemiológico del virus o con el desarrollo de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica como manifestación de la gravedad de la enfermedad.

-Introducción

-Biología y estructura del virus

Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomixoviridae*. Diferencias antigénicas en dos proteínas estructurales, la proteína de matriz y la nucleoproteína (NP), son utilizadas para separar a los virus de influenza en tres de los cinco géneros que conforman a la familia: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C*, conocidos también como tipos A, B y C respectivamente [1]. Los virus de influenza tipo A se subclasifican de acuerdo a las diferencias antigénicas de las glicoproteínas de su superficie, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Hasta la fecha se conocen 16 subtipos antigénicos de HA y 9 de NA, aislados de aves acuáticas[1, 2], de las cuales únicamente tres HA (H1, H2 y H3) y 2 NA (NA1 y NA2) han establecido linajes estables dentro de la población humana y han causado brotes epidémicos importantes, caracterizados por transmisión sostenida, amplia y de persona a persona [3].

Los virus de influenza se caracterizan por tener un genoma de ácido ribonucleico (RNA) de cadena sencilla y polaridad negativa, compuesto por ocho segmentos (tipos A y B) asociados a proteínas, contenidos dentro de una matriz protéica. Todo lo anterior se encuentra dentro de una bicapa lipídica derivada de la célula hospedera [2]. Presentan formas diversas, desde esféricos con diámetros de aproximadamente 100nm, hasta filamentosos con incluso más de 300nm de longitud [2, 4]. En la bicapa lipídica de la envoltura se encuentran ancladas las proteínas de superficie del virus HA y NA, en proporción aproximada de cuatro a uno respectivamente; además se encuentra también la proteína de matriz 2 (M2), cuya relación con respecto a la HA es de 1 a 10. Esta capa compuesta por proteínas y lípidos cubre una envoltura cuya unidad estructural es la proteína de matriz M1 (M1). Dentro de esta última envoltura se encuentran, tanto los complejos ribonucleoprotéicos (RNP), conformados por los segmentos de RNA virales (RNA_v) asociados tanto a la nucleoproteína (NP) como a la RNA polimerasa heterotrimérica dependiente de RNA (vRNA_{pol}), como pequeñas cantidades de proteína de exporte nuclear o proteína no estructural 2 (NS2). La

composición de la vRNAPol incluye tres subunidades: dos polimerasas básicas (PB1 y PB2) y una polimerasa ácida (PA) [2].

-Genoma

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

Tabla 1. Proteínas codificadas en los distintos segmentos del genoma del virus de influenza tipo A y su función, Modificado de Bouvier et al.

Número de segmento	Proteína codificada	Función de la proteína
1	PB2	Subunidad de polimerasa; reconocimiento del cap del mRNA
2	PB1 PB1-F2	Subunidad de polimerasa; alargamiento de RNA, actividad de endonucleasa Función pro-apoptótica; en ciertas cepas únicamente
3	PA	Subunidad de polimerasa; actividad de proteasa
4	HA	Glicoproteína de superficie; antígeno principal, involucrado en fusión y unión al receptor aSi
5	NP	Proteína de unión a vRNA; regulación del importe nuclear
6	NA	Glicoproteína de superficie; actividad de sialidasa, involucrada en liberación del virión
7	M1 M2	Proteína de matriz; interacción con vRNP, regulación del exporte nuclear de RNAv, budding viral Canal iónico; involucrado en liberación del virus y ensamblaje
8	NS1 NS2	Proteína antagonista de acción de interferon; involucrado en regulación de la expresión de genes del hospedero Exporte nuclear de RNAv

-Proceso de replicación

Para iniciar el proceso de infección, el virus de la influenza debe reconocer el ácido N-acetilneuramínico, conocido también como ácido siálico (aSi), sobre la superficie de la célula hospedera. La fracción de aSi es reconocida y unida por la HA de la superficie del virus, la cual tiene preferencia por las uniones α -2,6 y α -2,3, dependiendo del subtipo de virus involucrado [5].

Durante la replicación del virus, la HA es dividida por serin-proteasas en dos subunidades: HA1 y HA2; esta modificación postranscripcional es necesaria para la capacidad de infección del virus. La porción HA1 contiene el receptor de unión y los sitios antigénicos, mientras que la HA2 media la fusión de la envoltura del virus con las membranas celulares. También se reconoce la actividad de la NA dentro del proceso de infección, rompiendo las mucinas en el tracto respiratorio y permitiendo la penetración del virus a través del epitelio respiratorio [2].

Después del reconocimiento del aSi por la HA, el virus es endocitado por la célula hospedera. La acidez del endosoma formado es crucial para la liberación de los RNP [6], lográndose gracias a dos mecanismos. En primera instancia, el pH ácido endosomal provoca un cambio conformacional en la HA, exponiendo el péptido de fusión que permite la combinación de la bicapa lipídica viral con la membrana del endosoma [7]. El otro mecanismo involucra a la M2, cuya función de canal iónico permite la entrada de iones H^+ al interior del virus. La acidificación interna rompe las interacciones proteína-proteína de la cápside y junto con la formación de poros por la fusión de membranas, se logra la liberación de los RNP al citoplasma de la célula hospedera [2, 7].

Las RNP tienen señales de localización nuclear, que después de la liberación del contenido del virión dirigen a estos complejos hacia el interior del núcleo de la célula. El núcleo es el lugar donde se lleva a cabo la síntesis de los diferentes RNAv, debido a modificaciones pos-transcripcionales que requieren los mRNAv para su posterior traducción. Tales modificaciones incluyen la unión de 7-metilguanosa trifosfato a la posición 5' del mRNAv, tomados de RNAm de la célula

hospedera, y el corte y empalme de algunos mRNA_v [8]. La vRNA_{pol} utiliza los segmentos de polaridad negativa como moldes para sintetizar dos tipos de RNA de polaridad positiva: mRNA_v, que son utilizados para la síntesis de proteínas virales después de ser modificados y RNA complementario, del cual se obtienen nuevos segmentos de RNA_v de polaridad negativa que conformarán los nuevos genomas de la progenie viral. La salida de los RNA_v involucra la interacción de la M1, tanto con la NP y el RNA_v para la formación del RNP, como con la NS2 para mediar la salida de los RNP formados hacia el citoplasma a través de los poros nucleares.

La HA, NA y M2 son sintetizadas a partir de mRNA_v en ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico, donde son plegadas y transportadas al aparato de Golgi para modificaciones pos-traduccionales. Las tres proteínas contienen señales de distribución hacia la zona apical de la célula, que las dirigen hacia la membrana citoplasmática [4]. Se reconoce la participación de M1 en la interacción entre el complejo NS2-RNP con las proteínas HA, NA y M2 para el empaquetamiento de estos componentes en la membrana de la célula hospedera[2].

Para el ensamblaje de los nuevos viriones, las proteínas HA, NA y M2 son dirigidas hacia la membrana gracias a que contienen determinantes de asociación con balsas lipídicas y transporte apical en su dominio transmembranal. La M1 no contiene estos determinantes, pero posee otros correspondientes a unión de lípidos, RNP, RNA y NP, además de determinantes de asociación con las colas de HA y NA expuestas hacia el citoplasma, lo que sugiere que su transporte hacia la membrana es por unión a HA y NA. La participación de la M1 es crítica en los procesos de ensamblaje a medida que interactúa y favorece la interacción con RNP y NP, para mediar la salida del núcleo de estos complejos. Dentro del transporte de los complejos NP-RNP hacia el sitio de formación del virión se ha demostrado la interacción con microfilamentos de actina corticales y con balsas lipídicas [4].

La acumulación de proteínas HA, NA y M2 sobre la superficie de la célula, así como de la proteína M1 por debajo de esta, favorecen la elección del lugar y el comienzo del proceso de gemación, lográndose esto último gracias a la interacción entre los lípidos de la bicapa y las interacciones M1-M1. Las zonas no tipo balsas lipídicas, así como la M2 favorecen la fusión de la membrana. Cuando se ha completado la gemación, las HA continúan interactuando con los residuos de aSi de glicoproteínas y gangliósidos de la célula hospedera, hasta que la actividad de sialidasa de la NA provoca el corte de estos residuos, logrando que la nueva partícula viral sea liberada. También remueve aSi de la envoltura del virus, lo que previene la agregación de partículas virales y aumenta la infectividad [2] (Figura 1).

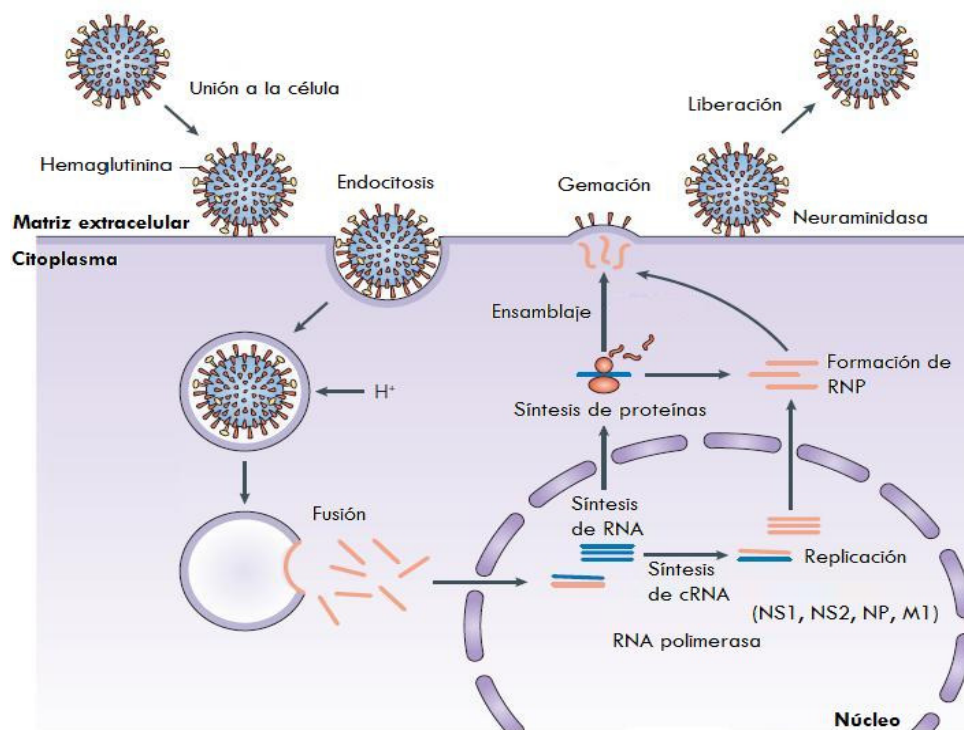


Figura 1. Proceso de replicación del virus. El reconocimiento de ácido siálico en la superficie de la célula por parte de la HA permite la endocitosis del virus. Una vez dentro, el cambio de pH, provocado por el canal iónico M2, induce cambios conformacionales en la HA y altera las interacciones M1-M1, permitiendo la fusión de las membranas viral y endosomal, liberándose así las RNP en el citoplasma. Estas últimas serán dirigidas hacia el núcleo, donde comenzará la producción de mRNA, para la síntesis de proteínas, y cRNA, que servirá de molde para formar nuevos genomas virales. La acumulación de HA y NA en la membrana celular, así como de M1 por debajo de esta, y la asociación con la RNP lleva a la gemación de la nueva partícula viral, la cuál es finalmente liberada por la acción de la NA. Modificado de von Itzstein et al., *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2007

-Reconocimiento molecular del virus de influenza por el sistema inmunológico

La infección por virus de influenza no es un proceso independiente y apartado dentro de la célula hospedera, ya que esta última tiene la capacidad de reconocer un proceso infeccioso por agentes patógenos y generar señales de alarma, que ayudarán a montar una respuesta inmune. Este reconocimiento es llevado a cabo gracias a la expresión de proteínas denominadas receptores de reconocimiento de patrón (PRR, *Pattern Recognition Receptor*), cuyos ligandos, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*), son estructuras conservadas entre diferentes agentes infecciosos, desencadenando diferentes vías de señalización que derivarán en la activación de una variedad de factores de transcripción, promoviendo la expresión de genes involucrados en los procesos de inflamación e inmunidad, para culminar, en el mejor de los casos, con la eliminación de la infección [9]. Tres importantes grupos de PRRs son los encargados de detectar la presencia de PAMPs del proceso de virus de influenza, siendo estos los receptores tipo gen inducible por retinoides-1 (RIG-1) (RLR, *RIG-Like Receptor*), los receptores tipo Toll (TLR, *Toll-Like Receptor*) y los receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD) (NLR, *NOD-Like Receptor*) [10].

De los RLR, se sabe que de sus integrantes, el gen asociado a diferenciación de mieloma 5 (MDA5) es dispensable para el reconocimiento de influenza A mientras que la participación de RIG-1 es de gran importancia en el montaje inicial de la respuesta inmune [11]. RIG-1 es una helicasa de RNA que se encuentra en el citoplasma, compuesta por dos dominios de reclutamiento de caspasas (CARD), un dominio de helicasa y un dominio represor. Los dominios helicasa y represor son importantes para el reconocimiento de su ligando, mientras que los CARD son esenciales para la señalización intracelular. Su ligando es ssRNA trifosfatado en la posición 5' y el reconocimiento puede ser directo con los segmentos del genoma viral o después de su síntesis por los mecanismos de replicación del virus [12]. Seguido del acoplamiento de RIG-1 con su ligando, por medio de sus dominios CARD, se asocia con una proteína adaptadora localizada en la membrana externa

de la mitocondria, llamada promotor estimulador de interferón (IFN)- β (IPS-1). Después de este acoplamiento, proteínas con dominios de muerte asociadas al receptor de factor de necrosis tumoral (TNF) (TRADD), o asociadas a Fad (FADD), forman un complejo junto con la proteína de interacción de receptor (RIP1) así como con el factor asociado al receptor de TNF (TRAF)-3, que a su vez activarán a dos cinasas relacionadas al inhibidor κ B (I κ B), TBK1 e IKKi, cuya función será la activación de dos factores reguladores de IFN (IRF), IRF-3 e IRF-7. La estimulación de RIG-1 también promueve la activación del factor nuclear κ B (NF κ B) vía la interacción de FADD con las caspasas 8 o 10 [10].

Los TLRs son receptores transmembranales que reconocen PAMPs a través de repetidos ricos en leucina (LRR) en su ectodominio. Su fracción citosólica contiene un dominio de interacción llamado Toll/IL-1 receptor (TIR), cuya función es la interacción con moléculas adaptadoras que también contienen este dominio, tales como la proteína de diferenciación mielóide de respuesta primaria 88 (MyD88) o el adaptador inductor de IFN- β que contiene dominio TIR (TRIF) [13]. Los TLRs involucrados en el reconocimiento del virus de influenza A son TLR-3 y -7/8, presentes en membranas endosomales [10]. La señalización por TLR-3, disparada por el reconocimiento de RNA de doble cadena (dsRNA), es dependiente de TRIF, a diferencia de la vía inducida por la unión de ssRNA a TLR-7/8, que requiere la participación de MyD88, acidificación del endosoma y que es activada por el reconocimiento de ssRNA [14-16]. Estas cascadas de señalización culminan en la activación de los factores de transcripción IRF-3, IRF-5 e IRF-7, además de NF- κ B y ATFs-c-Jun [14], que serán translocados al núcleo para promover la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en diversos procesos relacionados con la generación de un estado inflamatorio, mediante el reclutamiento de diversos tipos celulares del sistema inmune y la activación de los mismos, para llevar a cabo diversas acciones relacionadas con el procesamiento de antígenos, la generación de inmunidad a largo plazo y la resolución de la infección [13].

El virus de influenza puede activar al inflammasoma, plataforma proteica cuya función es la activación de caspasa-1 para el control de la maduración y secreción de citocinas como IL-1 β o IL-18 [17]. En el caso del virus de influenza, la infección puede activar al complejo NLRP3, conformado por la proteína adaptadora ASC, caspasa-1 y la plataforma NLRP3. Esta última contiene dominios de unión a nucleótido y oligomerización (NACHT), de reclutamiento de caspasas (CARD) y LRR, que determinan sus interacciones con otras proteínas y el reconocimiento de PAMP [17]. En lo que respecta al virus de influenza, se sabe que para la activación del complejo NLRP3 en macrófagos y células dendríticas, se requiere de un mecanismo que involucra la expresión de pro-IL1 β vía activación de TLR-7 y la participación de la proteína M2 localizada en el aparato de Golgi, cuyo pH ácido origina el transporte de iones H⁺ hacia el citoplasma y este cambio iónico es detectado por NLRP3, induciendo su activación y permitiendo la posterior liberación de IL-1 β activada [18]. (Figura 2)

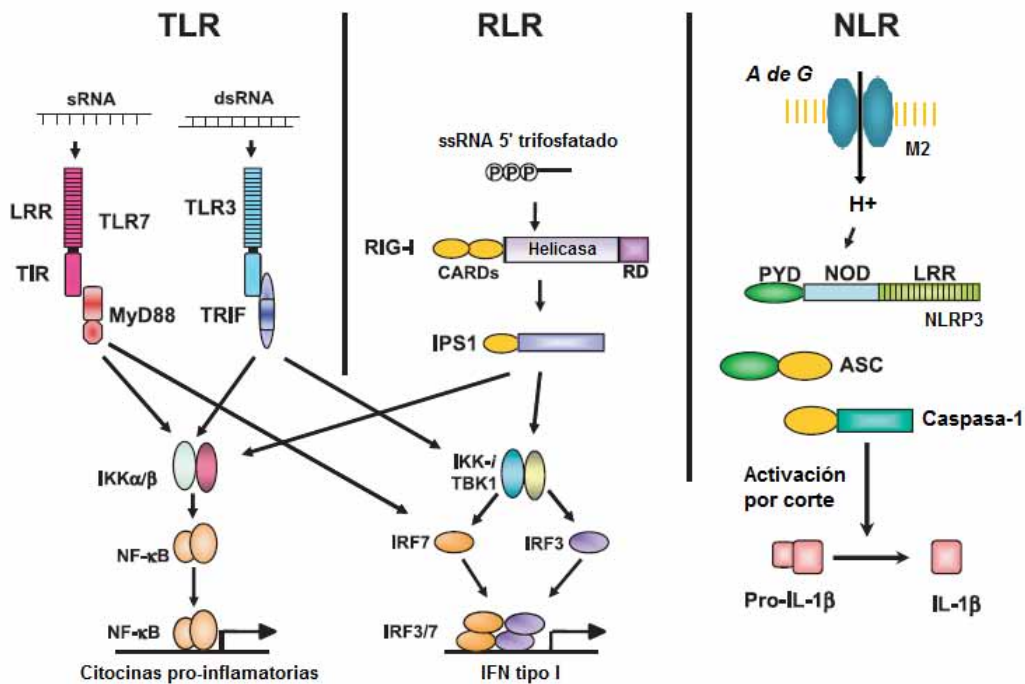


Figura 2. Reconocimiento de PAMPs virales por PRRs, señalización y activación de factores de transcripción. Modificado de Akira et al, Ann Rev Immun, 2009.

-Expresión de citocinas y quimiocinas

Dentro de los genes que serán expresados durante el proceso infectivo del virus de influenza, se encuentran aquellos que corresponden a la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular (aproximadamente 25kD), liberadas por diversas células en el cuerpo, por lo general en respuesta a un estímulo activador, e inducen respuestas mediante la unión a receptores específicos [19]. Por otro lado, la super familia de las quimiocinas, constituida por más de 40 miembros y dividida de acuerdo al acomodo de las cisteínas en la región amino terminal en CXC, CC, C y CX3C, provocan la migración por quimiotaxis de diferentes poblaciones celulares [20]. La participación de estas moléculas puede dirigir los procesos de reclutamiento, activación, diferenciación y muerte de los diferentes tipos celulares involucrados en la respuesta inmune innata contra una infección, tanto células del sistema inmune, como monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC, *Dendritic Cell*), células asesinas naturales (NK, *Natural Killer*), linfocitos T y B, entre otras, así como células que conforman el epitelio respiratorio y el endotelio vascular.

Debido a que la propagación del virus entre humanos se basa en la inhalación de gotas de saliva, generadas por estornudar, toser y hablar, que contienen partículas virales, son las células del epitelio respiratorio las primeras en entrar en contacto con el patógeno [21]. Estas células, tras la entrada del virus, tienen la capacidad de sintetizar quimiocinas, como la regulada en activación, expresada y secretada por células T normales (RANTES o CCL5), la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1 o CCL2) e interleucina-8 (IL-8 o CXCL8), en respuesta a la infección por influenza [22, 23]. Líneas celulares de epitelio pulmonar muestran baja producción de IFN- α , IFN- β y de citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 o TNF- α durante la infección por virus de influenza [23].

Algunos macrófagos son células residentes del tejido respiratorio que, en condiciones normales, muestran una baja producción de citocinas inflamatorias, actividad fagocítica disminuida y regulan la actividad inmunológica local vía

producción de citocinas anti-inflamatorias, como factor de crecimiento tumoral (TGF)- β o IL-10 [24, 25]. Tras la infección por virus de influenza, este fenotipo se revierte, llegando incluso a diferenciarse a DC derivadas de monocitos, dando lugar a una alta producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α e IFN- β y de quimiocinas como la proteína inflamatoria de macrófagos (CCL3 o MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL20 (MIP-3 α), CCL2, CCL5 y CXCL8, aunque la expresión de esta última se ve limitada [23, 26].

Las DC, al igual que los macrófagos, se encuentran en diferentes sitios del tejido pulmonar, con la función de vigilar y procesar antígenos en estos sitios [24, 27]. La activación de estas células se lleva a cabo tras la adquisición del antígeno viral, ya sea por la infección directa con el virus o por la inclusión de este por fagocitosis, del virus mismo o de cuerpos apoptóticos de células infectadas [28]. Esto inducirá la síntesis de IL-6, IL-12, TNF- α , CXCL8, CXCL10, CCL5, CCL4 e importantemente grandes cantidades de IFN- α e IFN- β , vía estimulación de TLR-3 y TLR-7, expresado diferencialmente entre las distintas poblaciones de DC, convencionales (cDC) y plasmacitoides (pDC), siendo estas últimas las principales productoras de IFN tipo I, citocinas clave producidas también por células epiteliales, monocitos y macrófagos, aunque en cantidades mucho menores[29].

La respuesta inflamatoria inicial por parte del epitelio, caracterizada por la liberación de CXCL8, CXCL5 y CXCL1 provoca la migración temprana de neutrófilos y NK al sitio de infección por medio de sus receptores CXCR1 y CXCR2 [20]. Aunque la participación de los neutrófilos en infección por virus de influenza aún no ha sido completamente dilucidada, se conoce de su participación en la liberación de citocinas, como TNF- α , y aclaramiento de cuerpos apoptóticos, estos últimos como consecuencia de la infección por el virus [30]. Por otra parte, las células NK se encargan de la eliminación de células infectadas por medio de su activación vía señales activadoras e inhibitoras por reconocimiento de complejo principal de histocompatibilidad-I y posterior liberación de gránulos citolíticos.

Las DC pueden liberar IL-12, lo que activará células NK y promoverá la síntesis de IFN- γ , que en conjunto con la continua liberación de IFN tipo I y citocinas pro-inflamatorias, dirigirá la respuesta inmune hacia un fenotipo Th1 [31] además de generar en las células un estado antiviral, caracterizado por la expresión de genes encargados de evitar la replicación del virus dentro de la célula hospedera, como la activación de la proteína cinasa R (PKR) o el sistema 2-5 oligoadenilato sintetasa/RNAsa L [32]. Los IFN tipo I logran conectar señalizaciones de retroalimentación con la producción de TNF- α , IL-1 e IL-6 en células residentes de pulmón para activar macrófagos alveolares, DC y células epiteliales, y al mismo tiempo iniciar un programa coordinado de expresión de quimiocinas, tras la infección por el virus [33, 34], iniciando con la liberación CXCL16, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL7, y CXCL8, induciendo reclutamiento de neutrófilos y linfocitos citotóxicos, gracias a sus receptores CXCR2 y CXCR6 respectivamente y continuando con CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, y CCL8 reclutando linfocitos T de memoria y monocitos, estos últimos con la posibilidad de reponer la cantidad de células DC o macrófagos en el tejido pulmonar [35].

TNF- α , IL-6 e IL-1 β son citocinas de función múltiple, asociadas al desarrollo de varios síntomas característicos de la enfermedad, como fiebre, fatiga y anorexia [36]. Sin embargo, en algunos estudios en infecciones en humanos, se ha observado que es IL-6 la encargada de dirigir la respuesta inflamatoria a nivel sistémico, puesto que su elevación en vías nasales y en suero correlaciona con la presencia de síntomas sistémicos (fiebre, dolor muscular, fatiga y dolor de cabeza) y de vías aéreas altas y bajas (congestión nasal, dolor en garganta, estornudos o tos, dificultad para respirar y molestia en el pecho) [37]. TNF- α e IL-1 son conocidas por su capacidad de activar neutrófilos y macrófagos y de elevar la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, mediando así uno de los pasos iniciales para el reclutamiento de estas células al tracto respiratorio. Estas dos citocinas pueden estimular la expresión de IL-6, además de algunas quimiocinas.

Durante una infección por virus de influenza estacional, denominada así por el aumento en el número de casos en temporada invernal [38], la respuesta descrita anteriormente se manifiesta con un cuadro clínico de severidad media, manifestándose con presencia de fiebre, tos, dolor de cabeza, postración, ataque al estado general e inflamación del tracto respiratorio superior [39]. Estos síntomas persisten de 7 a 10 días y puede llegar a desarrollarse neumonía viral primaria o bacteriana secundaria, en recién nacidos hasta un año de edad, adultos mayores (grupos de edad que muestran una mayor incidencia de casos) y en personas con enfermedades comórbidas (obesidad, diabetes, etc.)[21]. La elevación de IL-6 y TNF- α se observa de manera más marcada en lavados nasales o bronquioalveolares, mientras que la presencia de estas moléculas en suero no suele observarse de manera prominente bajo la infección por virus de influenza tipo A [37].

Sin embargo, este cuadro clínico puede verse alterado cuando la enfermedad es derivada de una infección por virus de influenza pandémicos o altamente patogénicos, como A(H1N1) de 1918, causante de la pandemia llamada “Gripe Española” de 1918, o A(H5N1). Estas cepas de influenza tipo A son de linaje aviar, a diferencia de cepas humanas tienen una mayor afinidad por la unión α -2,3 del aSi, suelen atacar a diversos grupos de edad por lo que la presencia del virus puede observarse en vías aéreas inferiores, muestran manifestaciones clínicas como neumonía, diarrea, y la presencia de virus en torrente sanguíneo [39, 40]. De manera importante, estas cepas tiene un índice elevado de mortalidad asociado a una elevación exacerbada de IL-6, CXCL8, CCL2 y CCL-5 para A(H1N1) 1918 y CXCL10, CCL9 y CCL2 para A(H5N1) en suero, demostrado en modelos animales y humanos [41, 42].

-Mutaciones y generación de nuevas cepas

Estas cepas de influenza surgen a partir de mecanismos de mutación inherentes al proceso de replicación del virus. Debido a que el vRNAPol no tiene mecanismos de revisión al momento de insertar los nucleótidos durante la formación de los

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

Además de esta posibilidad de evadir la respuesta inmunológica, las cepas emergentes de virus de influenza pueden aumentar su patogenicidad y/o virulencia. Así, las cepas altamente virulentas como las de A(H5N1) son capaces de afectar no solo vías respiratorias altas (característico de la mayoría de las cepas estacionales), sino también bajas, aumentando la probabilidad de generar neumonía [39]. Como se mencionó previamente estas nuevas variantes virales son capaces de desencadenar respuesta inflamatorias severas que dan lugar a un mayor daño de los tejidos afectados, con neumonitis ó alveolitis que comprometen severamente el recambio gaseoso. En modelos de macacos, la cepa de influenza A(H1N1) 1918 es capaz de incrementar, en los primeros días de infección, los transcritos de múltiples genes involucrados en potenciar la respuesta inflamatoria (ISIG15, IFIT2, CXCL10 y 11) al inducir la expresión de citocinas proinflamatorias. Esta desregulación de la respuesta inmune se relaciona con una mayor letalidad por neumonía [43].

-Planteamiento del problema

A partir del segundo trimestre del año 2009 hubo un alto registro de pacientes con neumonía atípica, fuera de la época del año donde se registran la mayor parte de casos de influenza y dentro del sector de la población, de entre 20 a 54 años de edad, que no suele reportar una alta incidencia de casos de esta enfermedad. El agente etiológico de la enfermedad es un virus caracterizado como influenza humana A(H1N1) 2009. La aparición entre la población humana de este virus, su gran capacidad de contagio en la población y el alto número de casos y decesos registrados ocasionó que las autoridades nacionales, en abril del año 2009, declararan estado de emergencia nacional. Tiempo después, el 11 de Junio del mismo año, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la declaró como la primera pandemia del siglo XXI ante el aumento de casos y decesos en diferentes países.

-Justificación

Aunque las características clínicas de esta enfermedad ya han sido reportadas, aún son desconocidos los aspectos celulares y moleculares originados en respuesta a la infección por esta nueva cepa de virus de influenza humana tipo A(H1N1) 2009. Debido a esto es importante estudiar el proceso inflamatorio agudo asociado a su infección en humanos y las moléculas involucradas, lo que permitirá desarrollar estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento oportunas.

-Preguntas de investigación

¿Cuáles son las citocinas y quimiocinas que se encuentran en suero de pacientes infectados con virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009?

¿Cuáles son las concentraciones de las citocinas y quimiocinas en suero de pacientes con respecto a controles sanos?

¿Existe relación entre el periodo de tiempo de captación de la muestra o la gravedad de la enfermedad y las concentraciones de citocinas?

-Hipótesis

Las concentraciones de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF- α , IFN- γ , CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5 y CXCL8, involucradas en la fase aguda de la infección por virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009 se encuentran elevadas en circulación con respecto a aquellas determinadas en sujetos sanos.

Existirá una relación directa entre la gravedad de la enfermedad y el periodo de tiempo de captación de las muestras con la concentración de citocinas y quimiocinas séricas de pacientes infectados con influenza A(H1N1) 2009.

-Objetivo general

Determinar la concentración de citocinas y quimiocinas en suero de pacientes con sospecha de infección con virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009 durante la fase aguda de la enfermedad y comparar sus concentraciones con las encontradas en sujetos sanos.

-Objetivos particulares

Cuantificar la concentración de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17A en suero de pacientes y sujetos sanos.

Cuantificar la concentración sérica de CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5 y CXCL8 en suero de pacientes y sujetos sanos.

Comparar las concentraciones entre pacientes y sujetos sanos y determinar si existe diferencia significativa, entre pacientes clasificados por fecha de captación de muestra o por gravedad de la enfermedad, por métodos estadísticos.

-Materiales y métodos

Diseño del estudio

Estudio de casos y controles, donde los grupos serán conformados de la siguiente manera:

Universo de estudio

Pacientes que fueron ingresados al Servicio de Medicina Interna del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS (CMN S.XXI) o al Hospital General Regional No. 1 “Dr. Carlos McGregor Sánchez”, durante el periodo de abril de 2009 a febrero de 2010.

Los voluntarios sanos incluyen estudiantes de medicina y personal diverso de la institución (capturistas y jubilados).

Criterios de selección de sujetos de estudio

Los sujetos con infección respiratoria por virus de influenza A(H1N1)2009 y pacientes con infección respiratoria derivada de agentes etiológicos diferentes a este virus, fueron diagnosticados e ingresados al servicio de Medicina Interna del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI o al Hospital General Regional No. 1, clasificados de acuerdo al resultado de la prueba rápida de diagnóstico realizada *in situ* y a la prueba confirmatoria por rRT-PCR, realizada en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica.

Los sujetos control fueron seleccionados al azar de entre estudiantes de medicina y personal diverso (jubilados, capturistas, etcétera). Todos los pacientes se sometieron a los siguientes criterios de selección.

Criterios de inclusión

- Sospecha clínica de infección por virus de influenza.
- De cualquier edad.

- De cualquier sexo.
- Para el caso de pacientes:

Sospecha clínica de infección por virus de influenza por las siguientes características: inicio súbito del cuadro clínico durante los 7 días previos a su ingreso, con 2 o más de los siguientes síntomas: fiebre mayor a 38° C, cefalea intensa, mialgias, odinofagia, rinorrea, astenia, insuficiencia respiratoria, náusea, vómito y/o diarrea.

Criterios de no inclusión

- Pacientes que decidan no tomar parte dentro del estudio.

Criterios de exclusión

- Muestras de sangre o suero no óptimas para su procesamiento.
- Sujetos que decidan retirarse del estudio.
- Datos incompletos.

Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio se dividirán en tres grandes grupos: pacientes con influenza A (H1N1) 2009, confirmada por PCR en tiempo real por transcripción reversa (rRT-PCR) (de aquí en adelante denominados H1N1+); pacientes con infección respiratoria de etiología diferente al virus pandémico (de aquí en adelante denominados H1N1-) y un grupo control conformado por voluntarios sanos.

Tamaño de la muestra

Debido a la súbita aparición del virus pandémico y ya que el objetivo de este estudio es el análisis del proceso inflamatorio agudo asociado a la infección por este virus, se decidió analizar a pacientes que fueran hospitalizados dentro del periodo entre abril de 2009 y febrero de 2010, con diagnóstico probable de

infección por virus de influenza y con posterior realización de la prueba confirmatoria por rRT-PCR. La cantidad de pacientes captados durante este periodo de tiempo se comparó con un grupo equiparable de voluntarios sanos para conformar al grupo control.

Descripción y definición operacional de las variables

Variables de control

- Diagnóstico de infección por virus de influenza.
Variable cuantitativa nominal, que se expresa como diagnóstico definitivo o negativo. Se consideró que el diagnóstico era definitivo cuando los pacientes, además de presentar el cuadro clínico descrito en los criterios de inclusión, contaban con el resultado, positivo o negativo, de la prueba confirmatoria para A(H1N1)2009 por rRT-PCR.
- Días entre aparición de síntomas y toma de muestra.
Variable cuantitativa continua que se expresa en días calendario.
- Evolución clínica.
Variable cualitativa ordinal, que se define como mejoría, agravamiento o deceso.

Variables de estudio

- Concentración de citocinas o quimiocinas en suero.
Variable cuantitativa continua, que se expresa como cantidad de citocina o quimiocina de estudio, en picogramos, por volumen de suero, en mL.

Variables demográficas

- Edad.
Variable cuantitativa continua que se expresa en años calendario.
- Sexo.

Variable cualitativa nominal que se expresa como masculino o femenino.

Consideraciones éticas

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

Procedimiento experimental

De cada sujeto de estudio que cumpliera con los criterios de inclusión se obtuvieron, por venopunción, 10 mL de sangre periférica humeral con previa asepsia de la zona. La sangre fue colectada en tubos sin anticoagulante por el método de vacío Vacutainer™ (BD™ Biosciences, San Jose, CA, USA). La sangre obtenida se centrifugó a 2500rpm por 10 minutos y posteriormente se colectaron, dentro de un área de nivel de bioseguridad 2 plus, alícuotas de 200µL de suero en tubos eppendorf de 600µL para su inmediata preservación por congelación a -70° C, hasta el momento de su análisis. De cada muestra obtenida y procesada, se registraron nombre y apellidos, clave (correspondiente a sus iniciales), número de alícuotas de suero obtenidas y tratamiento de la muestra realizado. Estos datos, junto con la historia clínica de cada paciente, conformaron una base de datos para el análisis posterior.

Las concentraciones de citocinas y quimiocinas se obtuvieron utilizando kits de arreglos citométricos en perlas (CBAs, por sus siglas en inglés: *Cytometric Bead Arrays*). Los kits utilizados fueron CBA Human Chemokine Kit (BD™ Biosciences, San Jose, CA, USA), para la medición de IL-8/CXCL-8, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL-10 y CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD™ Biosciences, San Jose, CA, USA) para la obtención de la concentración de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A. De cada kit se utilizaron 5µL de cada CBA, recubierta con anticuerpos dirigidos contra cada una de las proteínas a analizarse, realizándose mezclas específicas para cada kit y de volúmenes finales de acuerdo al número de muestras a analizarse; para la mezcla

de perlas del kit de Th's se le realizó un cambio de medio, del buffer de dilución de fábrica a uno que asemeja la composición del suero, realizándose esto centrifugando la mezcla de perlas a 1000rpm por 5min, decantando inmediatamente y restituyendo el volumen con el buffer tipo suero. Se colocaron 25µL de cada mezcla de perlas en cada tubo de citometría rotulado con la clave de la muestra y kit correspondientes.

Dentro de las muestras a analizarse se incluyeron diez puntos de una curva estándar, (estándar de proteínas, ocho diluciones del estándar y un blanco), preparada de acuerdo a especificaciones del fabricante a partir de proteína liofilizada, específica de cada kit. Se agregaron 50µL de muestra, siendo suero, dilución o blanco, a su tubo rotulado correspondiente y se incubaron a temperatura ambiente por una hora, protegidos de la luz. Posteriormente se añadieron 25µL de reactivo de detección, específico de cada kit, por muestra, siendo estos reactivos anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas a cuantificarse, acoplados al fluorocromo ficoeritrina para los dos kits. Las muestras fueron analizadas con un citómetro de flujo FACSAria (BD™ Biosciences, San Jose, CA, USA), tras realizar el acondicionamiento del aparato con los controles de compensación de los kits. A los datos obtenidos se les realizó prueba no paramétrica de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software Inc.).

-Resultados

Se analizaron 57 muestras de suero en total, correspondientes a 46 pacientes con sospecha clínica de influenza y a 11 sujetos sanos. Veintiocho muestras de pacientes se tomaron durante el primer brote de la pandemia, de mayo a noviembre del 2009, mientras que 18 se obtuvieron entre diciembre del 2009 y febrero de 2010. Treinta pacientes se encontraban hospitalizados al momento de la toma de muestra y dos de ellos fallecieron durante su estancia en el hospital, mientras que 16 desarrollaron cuadro clínico de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). De acuerdo con el resultado de la prueba confirmatoria por RT-PCR, los pacientes se dividieron en positivos (H1N1+) y negativos (H1N1-) para A (H1N1) 2009, obteniéndose 24 H1N1+ y 22 H1N1-. Las características de cada grupo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Datos demográficos de población de estudio.

	H1N1+	H1N1-	Sanos
Número de sujetos	24	22	11
Género (Hombres/Mujeres)	14 / 10	12 / 10	4 / 7
Fecha (May-Nov/ Dic-Feb)^Δ	18 / 6	10 / 12	-
Edad*	32.6 (78-16)	43.8 (76-15)	30.8 (64-22)
Días síntomas-muestra[†]*	4.0 (0-10)	3.5 (1-8)	-
Hospitalizados	15	15	-
SIRS[‡]	8	8	-

^Δ muestras captadas entre mayo y noviembre de 2009 o diciembre de 2009 y febrero de 2010.

* media de años de edad (intervalo).

[†] días entre inicio de síntomas y toma de muestra.

[‡] pacientes que desarrollaron SIRS, de acuerdo con historia clínica; SIRS, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Concentración de quimiocinas en suero de pacientes H1N1+, H1N1- y sujetos sanos.

Utilizando la clasificación basada en la infección por influenza A(H1N1) 2009, se analizaron las medias de concentración sérica para cada quimiocina analizada, observándose un claro aumento de los niveles de CXCL10 (2536±2037 y 1734±1622 vs 2.5±0; pg/mL±DE), CCL2 (572.4±1030 y 137.1±117.3 vs 3.9±0; pg/mL±DE) y CCL9 (1616±1493 y 1353±1548 vs 3.061±1.674) en pacientes H1N1+ con respecto a pacientes H1N1- o contra Sanos respectivamente, siendo la diferencia significativa entre los Sanos y H1N1+ o H1N1-. No se observan diferencias entre los niveles de los diferentes grupos de estudio para IL-8. CCL5 no pudo ser cuantificada. (Figura 3)

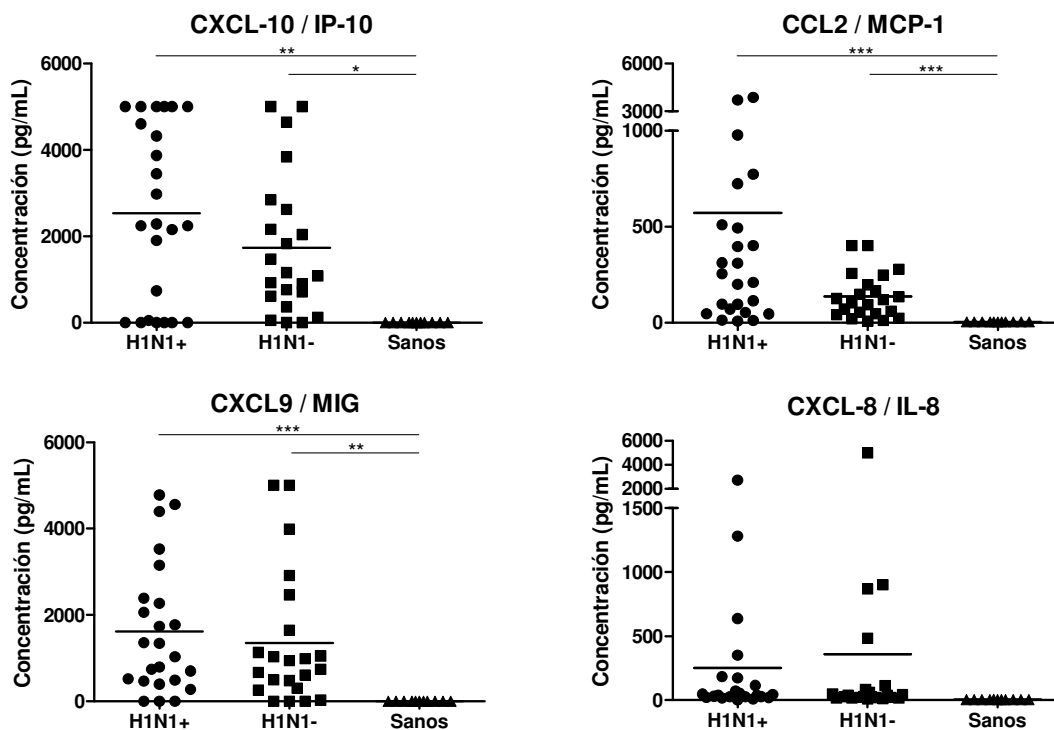


Figura 3. Concentraciones séricas de quimiocinas de acuerdo al agente etiológico de la enfermedad. Comparación entre pacientes divididos como positivos (H1N1+) o negativos (H1N1-) para influenza A(H1N1) 2009 y sujetos sanos. Se muestran las medias de las concentraciones de cada grupo de estudio. Límites de detección: 0.2pg/mL IL-8/CXCL8, 2.5pg/mL MIG/CXCL9, 2.7pg/mL CCL2/MCP-1 and 2.8pg/mL CXCL10. Prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, con prueba de Dunn a posteriori; Significancia: $p < 0.05$.

Concentración de citocinas en suero de pacientes H1N1+, H1N1- y sujetos sanos.

El análisis de las concentraciones séricas de IL-2 (2.613 ± 0.384 , 3.032 ± 1.992 y 2.5 ± 0 ; pg/mL \pm DE) IL-4 (17.65 ± 51.52 , 5.618 ± 5.205 y 3.9 ± 0 ; pg/mL \pm DE), IL-6 (228.3 ± 789.8 , 51.72 ± 167.8 y 3.061 ± 1.674 ; pg/mL \pm DE) IL-10 (11.73 ± 25.21 , 5.482 ± 4.843 y 3.660 ± 0.5307 ; pg/mL \pm DE), IFN- γ (3.858 ± 1.266 , 4.141 ± 2.406 y 3.600 ± 0 ; pg/mL \pm DE) e IL-17A (19.46 ± 3.225 , 20.12 ± 6.183 y 22.75 ± 12.11 ; pg/mL \pm DE) no muestra diferencia significativa entre los tres grupos de estudio H1N1+, H1N1- y Sanos, a excepción de TNF- α donde los pacientes H1N1+ y H1N1- muestran una elevación de los niveles séricos de esta proteína comparados con los sujetos sanos (16.30 ± 64.10 y 6.919 ± 16.49 vs 3.8 ± 0 ; pg/mL \pm DE). (Figura 4)

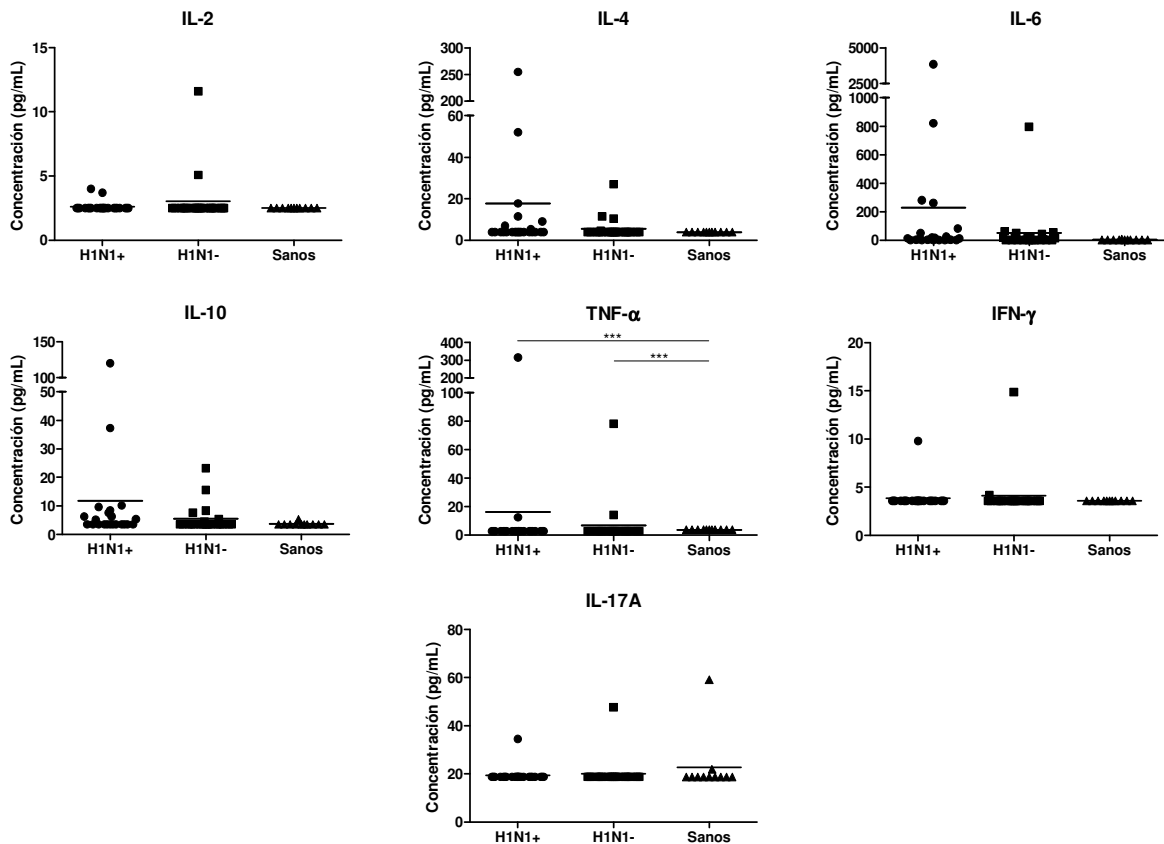


Figura 4. Concentraciones séricas de citocinas de acuerdo al agente etiológico de la enfermedad Comparación entre pacientes divididos como positivos (H1N1+) o negativos (H1N1-) para influenza A(H1N1) 2009 y sujetos sanos. Se muestran las medias de las concentraciones de cada grupo de estudio. Límites de detección: 2.6pg/mL IL-2, 4.9pg/mL IL-4, 2.4pg/mL IL-6, 4.5pg/mL IL-10, 3.8pg/mL TNF- α , 3.7pg/mL IFN- γ y 18.9pg/mL IL-17A. Prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, con prueba de Dunn a posteriori; Significancia: $p < 0.05$.

Relación entre periodos de tiempo de captación de muestras y concentraciones séricas de quimiocinas.

Las concentraciones de CCL9 y CXCL8 no muestran valores con diferencia significativa entre distintos periodos de tiempo de captación de muestras, mientras que las concentraciones encontradas de CCL2 muestran diferencia entre pacientes H1N1- de las dos temporadas; CXCL10 muestra diferencias en las concentraciones entre pacientes H1N1+ y H1N1- para Dic-Feb. (Figura 5)

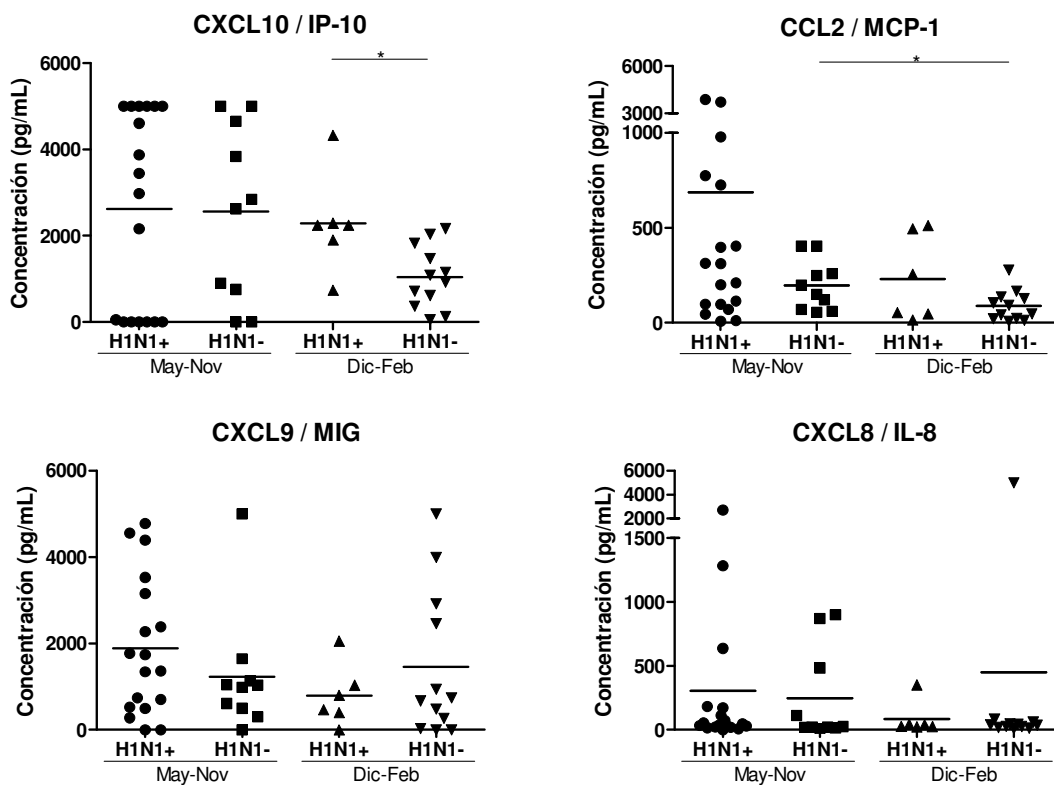


Figura 5. Relación entre periodo de tiempo y concentraciones séricas de quimiocinas. Comparación entre pacientes H1N1+ o H1N1- clasificados de acuerdo a los periodos de tiempo de mayo a noviembre de 2009 (May-Nov) o de diciembre de 2009 a febrero de 2010 (Dic-Feb), durante los cuales se recibieron las muestras y que coinciden con brotes de aparición de casos de A(H1N1) 2009. Se muestra la media de las concentraciones de cada grupo de estudio. Prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Significancia: $p < 0.05$.

Relación entre periodos de tiempo de captación de muestras y concentraciones séricas de quimiocinas.

En el caso de las citocinas, no existe diferencia significativa entre los grupos comparados para ninguna citocina en particular. (*Figura 6*)

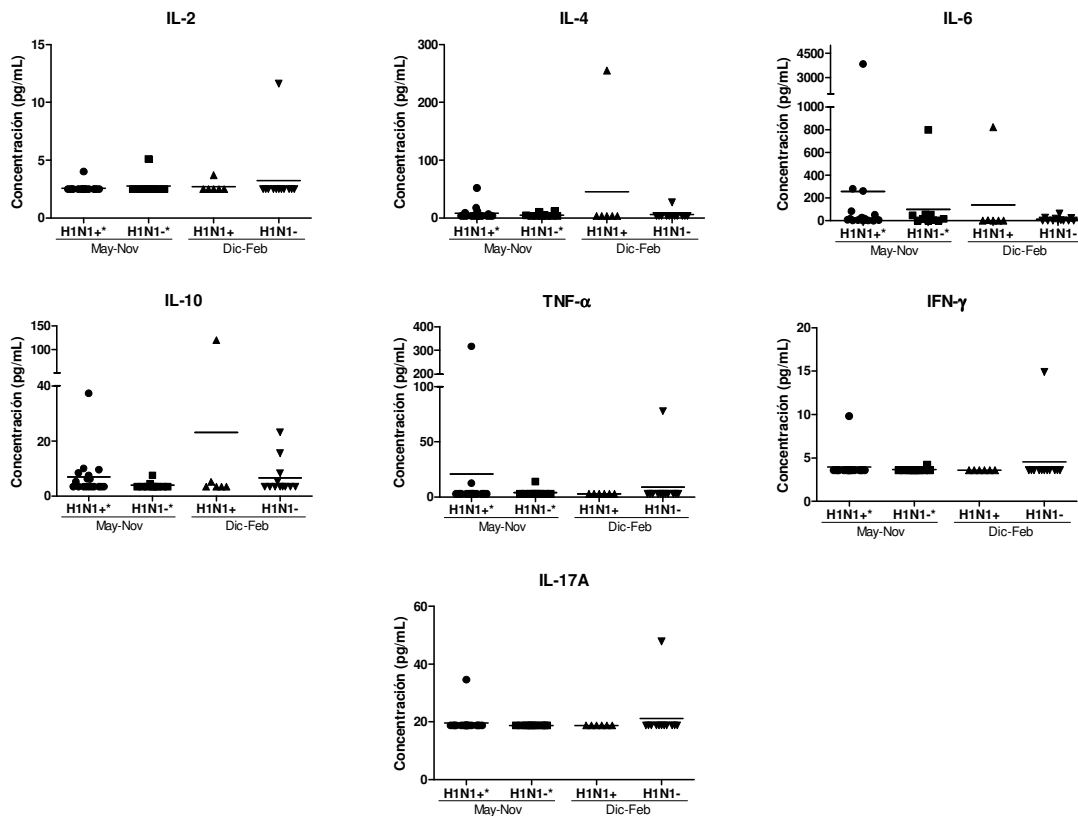


Figura 6. Relación entre periodo de tiempo y concentraciones séricas de citocinas. Comparación entre pacientes H1N1+ o H1N1- clasificados de acuerdo a los periodos de tiempo de mayo a noviembre de 2009 (May-Nov) o de diciembre de 2009 a febrero de 2010 (Dic-Feb), durante los cuales se recibieron las muestras y que coinciden con brotes de aparición de casos de A(H1N1) 2009. Se muestra la media de las concentraciones de cada grupo de estudio. Prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Significancia: $p < 0.05$.

Comparación entre concentraciones séricas de quimiocinas de pacientes que desarrollaron o no síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Durante el transcurso de la enfermedad de algunos pacientes, los signos y síntomas se agravaron y derivaron en el desarrollo de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. La relación de la manifestación de este síndrome y la concentración de quimiocinas no se observa al no encontrarse diferencias significativas entre los diferentes subgrupos H1N1+ SIRS+, H1N1+SIRS-, H1N1-SIRS+ y H1N1-SIRS-, aunque puede observarse una diferencia significativa en los niveles séricos encontrados para CCL2 entre las personas H1N1+ y H1N1- que no desarrollaron SIRS. (Figura 7)

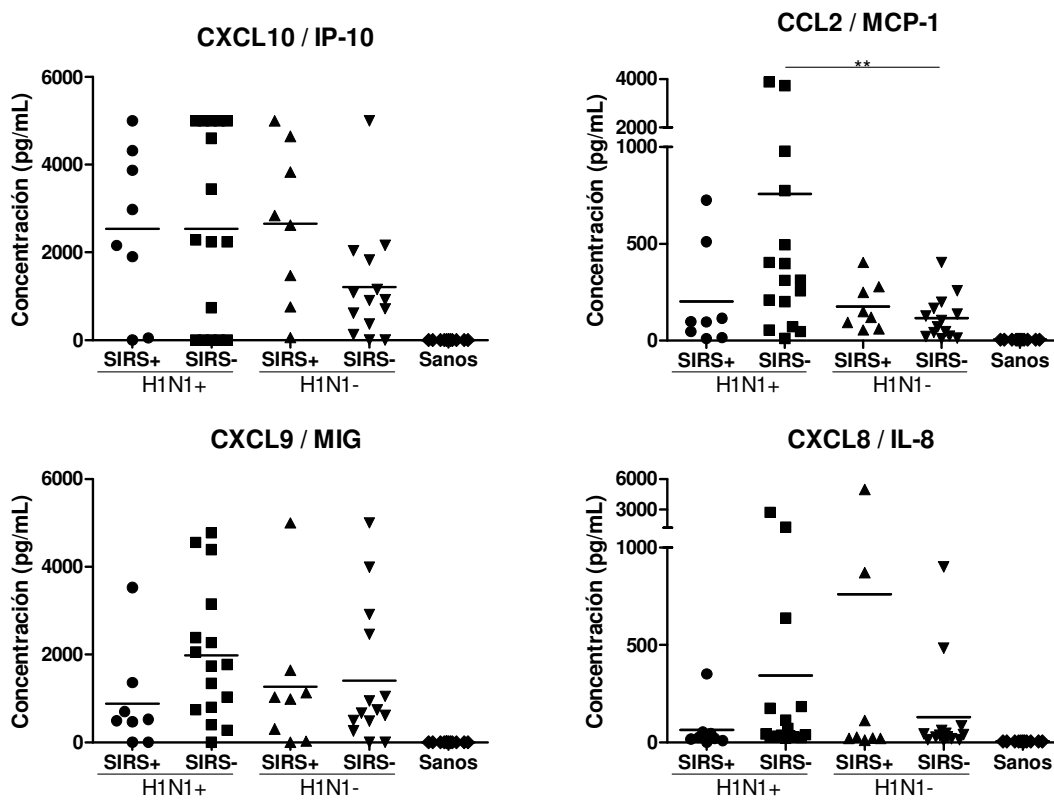


Figura 7. Concentraciones séricas de quimiocinas de acuerdo a la gravedad de la enfermedad. Los grupos de pacientes H1N1+ y H1N1- se subclasificaron de acuerdo al desarrollo (SIRS+) o no (SIRS-) de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Se muestra la media de las concentraciones de cada grupo de estudio. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Significancia: $p < 0.05$.

Comparación entre concentraciones séricas de citocinas de pacientes que desarrollaron o no síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Por parte de las citocinas, las concentraciones no muestran diferencias significativas entre los subgrupos H1N1+SIRS+, H1N1+SIRS-, H1N1-SIRS+ y H1N1-SIRS-. Sin embargo, para los grupos H1N1+SIRS+ de IL-4, IL-6 e IL-10 y para el grupo H1N1-SIRS+ la media de concentración es más elevada que en los subgrupos restantes. (Figura 8)

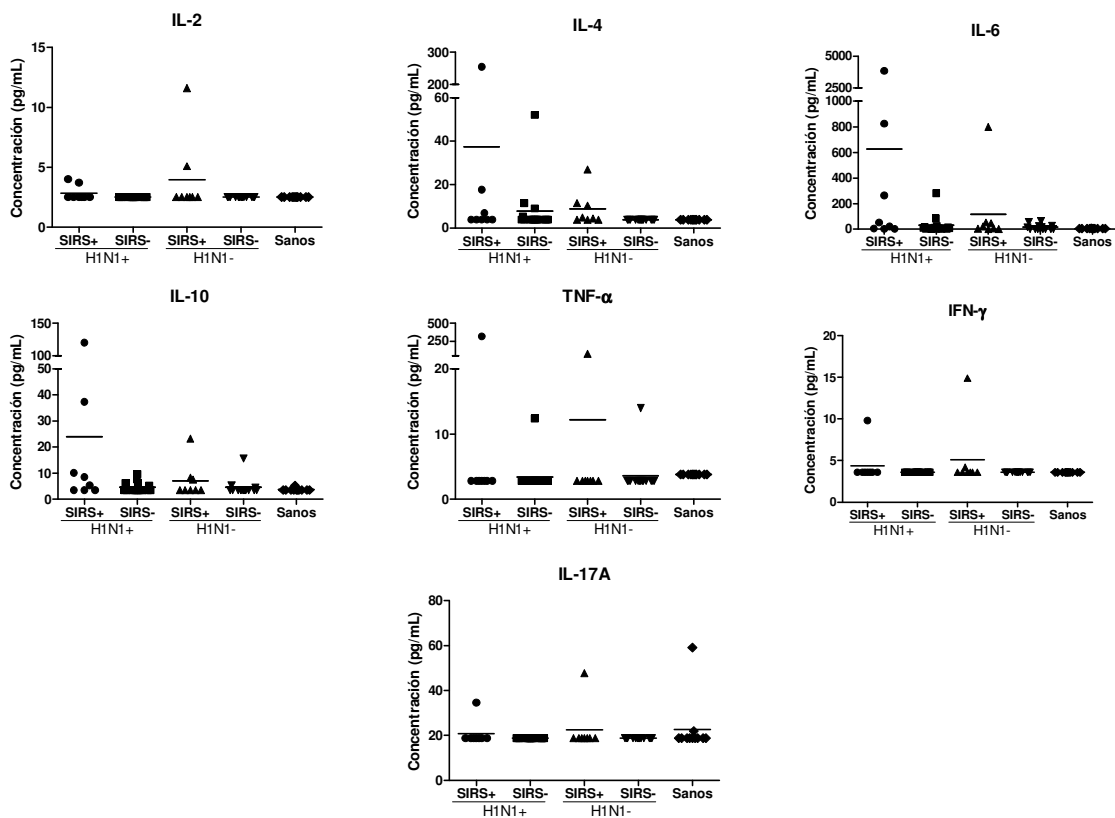


Figura 8. Concentraciones séricas de citocinas de acuerdo a la gravedad de la enfermedad. Los grupos de pacientes H1N1+ y H1N1- se subclasificaron de acuerdo al desarrollo (SIRS+) o no (SIRS-) de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Se muestra la media de las concentraciones de cada grupo de estudio. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Significancia: $p < 0.05$.

-Discusión

En el primer trimestre del año 2009 empezaron a reportarse un número elevado de casos de neumonía atípica en el grupo de la población de 20 a 40 años de edad [44]. El primer brote, cuyo epicentro fue México, se esparció por todo el mundo, por lo que en Junio fue declarada pandemia. Las características clínicas de esta enfermedad comenzaron a ser reportadas meses después [45], generando preocupación acerca de la gravedad de la enfermedad que podía alcanzar la infección por el ya caracterizado virus de influenza A(H1N1) 2009. Por la asociación entre su potencial pandémico, las características epidemiológicas y enfermedades asociadas, se comenzó a especular que la patología observada podría estar relacionada con una respuesta inflamatoria exacerbada, fenómeno observado con cepas pandémicas como A(H1N1) 1918, causa del fallecimiento de aproximadamente 40 millones de personas [46], o con cepas altamente patogénicas A(H5N1), virus de linaje aviar causante de epidemias localizadas y con índice de mortalidad elevado. Estudios en ratones y macacos cinomólogos confirmaron la observación de una patología asociada a la infección de A(H1N1) 2009 mucho más severa que con una cepa estacional [47]. Con estos antecedentes se decidió describir la respuesta inflamatoria en la fase aguda de la enfermedad, analizando las concentraciones de citocinas y quimiocinas proinflamatorias a nivel sistémico.

Dentro de los resultados obtenidos, las concentraciones séricas no detectables de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-17A, TNF- α y CCL5 (*Figura 3 y 4*) pueden dar indicio de que su producción durante el proceso inflamatorio agudo, desatado por la infección por A(H1N1) 2009 no genera estado de hipercitocinemia o tormenta de citocinas, que espera asociado a cuadros severos de la enfermedad por virus altamente patogénicos. Es factible que no se detecten estas citocinas en pacientes infectados por A(H1N1) 2009 u otros virus de influenza tipo A (dado que poseían prueba rápida para influenza, pero resultaron negativos en RT-PCR) ya que la concentración no es lo suficientemente alta para superar la biodisponibilidad requerida en el tracto respiratorio y alcanzar niveles detectables en circulación,

denotando una expresión de estas proteínas a niveles de acción autócrinos y parácrinos, y manifestando así una participación de tipo local por parte estas citocinas y quimiocinas. Lo anterior está respaldado en un estudio de infección con virus de influenza estacional en humanos, donde se observó que los niveles de IL-6 y TNF- α son más elevados en lavados nasales y traqueales, comparados con las concentraciones encontradas en suero y plasma de voluntarios y esta elevación de citocinas y quimiocinas en el tejido respiratorio concuerda con el desarrollo de síntomas característicos de la enfermedad [37].

Tampoco debe descartarse por completo que la expresión de algunas citocinas proinflamatorias, puede estar siendo inhibida por los mecanismos inherentes al virus, como la proteína NS1 [48], de expresión temprana durante la infección por virus de influenza y cuya principal actividad es la evasión del sistema inmune vía inhibición de la producción de IFN- β , TNF- α , IL-6 y CCL2 en los primeros dos días de la infección, por interferencia de la señalización desatada por PRRs como RIG-1 [48, 49]. En un estudio realizado con muestras de pacientes, separados en dos grupos, H1N1+ y con síntomas tipo influenza, se detectaron en suero TNF- α , IL-6 e IL-1 β , observándose una elevación de la media de las concentraciones de IL-6 en ambos grupos de estudio al compararlos contra la concentración observada en los voluntarios sanos [50], lo que contrasta con nuestros resultados, ya que en gran parte de los pacientes, H1N1+ o H1N1-, se encontraron concentraciones de TNF- α e IL-6 por debajo del límite de detección (3.8 μ g/mL) con excepción de algunos casos aislados.

Con lo que respecta a CXCL10, CCL2 y CXCL9, las concentraciones séricas mostraron diferencias significativas entre los pacientes, H1N1+ o H1N1-, y los Sanos (*Figura 4*), mostrando la reacción normal del tejido respiratorio (de células epiteliales y del sistema inmune) ante una infección de tipo viral, generando una respuesta tipo Th1, ya que estas quimiocinas promueven el desarrollo de este tipo de reacción inmunológica por el tipo de células que pueden reclutar, como lo son monocitos, por medio de CCL2 y CXCL9, y linfocitos por medio de CXCL10 [20], y porque tienen la capacidad de inhibir receptores de quimiocinas que generarían

una respuesta tipo Th2 [51]; además, para los días entre el inicio de los síntomas y la toma de muestra (media de 4 días aproximadamente), la presencia de estas quimiocinas en torrente sanguíneo coincide con la migración de NK, neutrófilos, monocitos y DC hacia tracto respiratorio durante una infección viral [33]. Sin embargo, el grupo H1N1+ muestra una concentración mayor de estas tres quimiocinas en comparación con el grupo H1N1-, aunque sin diferencia significativa. Este comportamiento ya se ha observado en suero de macacos infectados con virus reconstruido de 1918 [42] y en plasma de pacientes con H5N1 [41], donde las concentraciones de CXCL10 y CCL2 están por encima que las generadas por una infección con virus de influenza estacional, así como en un estudio donde estas tres quimiocinas, entre otras citocinas, se encontraron elevadas en suero de un paciente que falleció al quinto día de ingresar al hospital con infección confirmada para A(H1N1) 2009 [52], lo que podría denotar que en pacientes con infección por este virus la reacción inflamatoria está caracterizada por una mayor producción de CXCL10 y CCL2; sin embargo, la falta de diferencia significativa, así como la gran dispersión de los datos evita que la infección por A(H1N1) 2009 sea caracterizada únicamente por estas dos quimiocinas. CXCL8 no muestra diferencia alguna entre los tres diferentes grupos y no se muestra elevado en el caso de H1N1+, lo cuál puede ser consecuencia de la expresión diferencial de quimiocinas provocada por virus de influenza, que no favorece la expresión de esta quimiocina, no así con otras como las inicialmente analizadas [53]. Es así, que aunque se muestren algunas diferencias entre los grupos para ciertas citocinas y quimiocinas, las concentraciones encontradas para los diferentes grupos no son lo suficientemente elevadas para poder ser llamadas “tormenta de citocinas”, ni existe una diferencia significativa entre ellos que sustente la existencia de una reacción inflamatoria aguda exacerbada, provocada diferencialmente por la cepa pandémica A(H1N1) 2009.

Una de las características epidemiológicas que puede mostrar una cepa pandémica de virus de influenza es la aparición de múltiples brotes consecutivos, con una mayor aparición de casos de infección y mortalidad en los subsecuentes al primero, pudiendo deberse a la estacionalidad, variación demográfica o

geográfica, inmunidad de la población o a la adaptación del virus al hospedero [54]. Dentro de los mecanismos de adaptación al hospedero se encuentran las mutaciones puntuales provocadas por las altas tasas de error de la vRNAPol al ir uniendo los nucleótidos durante el proceso de transcripción (falta de actividad de *proof-reading*). Para este virus pandémico ya se han identificado mutaciones en posiciones clave (relacionadas con las identificadas en virus pandémicos de 1918, 1957, 1968 y 1977) y no clave de las proteínas NP, NA, HA y NS1 [55]. Debido a que la mortalidad de los pacientes está asociada a la elevación de citocinas y quimiocinas en suero y que estas pueden estar relacionadas con las mutaciones generadas durante el tiempo que lleva la pandemia, se agrupó a los pacientes de acuerdo al periodo de captación de muestra, cuyos periodos de tiempo, mayo a noviembre de 2009 (May-Nov) y diciembre de 2009 a febrero de 2010 (Dic-Feb), delimitan la clasificación de los pacientes H1N1+ o H1N1-. La clasificación por periodos coincide con las dos oleadas de casos que se presentaron durante el año, y aunque en pandemias pasadas el número de casos suele mostrar un aumento para las oleadas secundarias [56], nuestros resultados muestran que para A(H1N1)2009 la captación de muestras disminuyó para el periodo Dic-Feb. Únicamente CXCL10 (entre H1N1+ y H1N1- ambos de Dic-Feb) y CCL2 (entre May-Nov y Dic-Feb, ambos H1N1-) muestran diferencias significativas (*Figura 5*), sin existir diferencia entre las concentraciones de las citocinas y quimiocinas analizadas de los grupos H1N1+ de ambos periodos, lo que muestra que el comportamiento epidemiológico del virus A(H1N1) 2009 y las consecuencias moleculares sobre la estructura de las proteínas del virus que esto conlleva, no alteró la expresión de quimiocinas y citocinas de los pacientes más allá de lo observado al ser comparados los grupos de pacientes organizados por agente etiológico.

Dentro de las respuestas inflamatorias que pueden ser desatadas por una expresión elevada de citocinas se encuentra el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), fenómeno caracterizado clínicamente por fiebre o hipotermia, leucocitosis o leucopenia, taquicardia y disnea [57]. El desarrollo de SIRS se ha propuesto anteriormente

como una manifestación de la gravedad de la infección por virus de influenza, pudiendo derivar en el fallecimiento del paciente [58]. Durante su estancia en las unidades hospitalarias, algunos pacientes, H1N1+ y H1N1-, desarrollaron SIRS, por lo que la población de estudio fue clasificada de acuerdo a su historia clínica en SIRS+ y SIRS-. La única molécula que muestra diferencia significativa es CCL2 entre los pacientes H1N1+ y H1N1- que no desarrollaron SIRS (*Figura 7*), comportamiento que podría estar indicando que solo en personas que no muestran complicación de la enfermedad por inflamación sistémica, el virus de influenza pandémico si juega un papel importante en la inducción de esta quimiocina. El mismo comportamiento se observa para las medias de la concentración sérica de las quimiocinas restantes, aunque sin diferencia significativa. Para los pacientes SIRS+, CXCL8 se encuentra elevada en pacientes H1N1- comparada con H1N1+, hecho que puede explicarse con la inducción diferencial de quimiocinas, ya mencionado anteriormente. Estos resultados concuerdan con lo ya establecido para algunos biomarcadores durante la evolución de este síndrome inflamatorio, puesto que anteriormente no se ha reportado alguna relación entre el desarrollo de SIRS y las concentraciones séricas de pacientes con SIRS o sus complicaciones (sepsis, sepsis severa y choque séptico) [59]. Caso contrario ocurre con mediadores pro-inflamatorios como IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10, donde está descrito que concentraciones sistémicas de estas moléculas se muestran elevadas en pacientes que sufren de SIRS y sus variantes [59]. Inclusive se ha relacionado las concentraciones de IL-6 y los índices IL-6/IL-10 e IL-10/IL-6 con la evolución y pronóstico de los pacientes [60]. Sin embargo, aunque los resultados muestran que existe una mayor media de concentración de IL-4, IL-6 e IL-10 entre los pacientes SIRS+H1N1+, este fenómeno es provocado por algunos resultados elevados aislados de ciertos pacientes, sin generar diferencia significativa entre pacientes SIRS+ de diferente etiología. Esto sugiere, que si bien algunos pacientes con prueba positiva para A(H1N1) 2009 también fueron diagnosticados con SIRS de manera clínica, esta manifestación de la severidad de la enfermedad no pudo ser caracterizada molecularmente como anteriormente se ha reportado. Esto puede deberse a que,

si bien la historia clínica menciona la aparición del SIRS, no especifica si la toma de muestra fue antes, durante o después de que el síndrome apareciera, lo cuál es importante, ya que las moléculas proinflamatorias que suelen estar relacionadas con procesos inflamatorios sistémicos suelen mantenerse elevadas en circulación por tiempos cortos durante el proceso patológico, debido a la corta vida media de estas moléculas y la eliminación de estas debido a la rápida utilización por sus respectivos receptores [59], por lo que no puede definirse claramente una relación directa entre la infección por virus pandémico y el desarrollo de SIRS por parte de los pacientes. Además con respecto a la severidad de la enfermedad, otros grupos de investigación han obtenido resultados donde las concentraciones de las citocinas IFN- γ , IL-13 e IL-10, así como CXCL8, y no las quimiocinas CXCL10, CCL2 ni CCL4, son las que tienen una concentración más elevada en sueros de pacientes hospitalizados críticos y no críticos, donde ambos grupos muestran insuficiencia respiratoria como único criterio para la severidad de la enfermedad [61]. Es así que la elevación de las citocinas en suero por la infección con virus A(H1N1) 2009 está más relacionada al desarrollo de otro tipo de complicaciones, como la insuficiencia respiratoria.

De manera global, los resultados arrojan características del proceso inflamatorio agudo durante el proceso infeccioso del virus de influenza pandémico, donde se puede mencionar que las concentraciones encontradas de las citocinas y quimiocinas analizadas en los dos grandes grupos de estudio, H1N1+ y H1N1-, no difieren significativamente en sus medias de concentración, por lo que no puede hablarse de que una tormenta de citocinas sea la causa principal de la patología asociada y las complicaciones observadas. Por otro lado, ni el comportamiento epidemiológico ni el desarrollo de SIRS que puede llegar a manifestarse durante la infección están relacionadas con las concentraciones séricas de los mediadores inflamatorios cuantificados en este trabajo. Así, este virus de influenza A(H1N1) 2009 tiene como consecuencia un proceso inflamatorio agudo más parecido al desatado por virus de influenza estacional, sin dejar de lado la aparición de casos de severidad alta durante el periodo temprano de la pandemia.

-Conclusiones

El proceso inflamatorio agudo en pacientes con infección de virus de influenza pandémico A(H1N1)2009 no muestra elevación exacerbada de la concentración sérica de citocinas y quimiocinas en suero.

Las concentraciones séricas no muestran cambios dependiendo del periodo de tiempo de captación de muestra, por lo que el comportamiento epidemiológico para A(H1N1)2009 no afecta de manera directa los niveles de citocinas y quimiocinas en suero.

La severidad de la enfermedad en pacientes infectados por A(H1N1) caracterizada por desarrollo de SIRS, no muestra aumento significativo de citocinas y quimiocinas comparado con pacientes que no lo desarrollan, por lo que no existe una relación directa entre complicaciones de la enfermedad y la concentración sistémica de citocinas y quimiocinas proinflamatorias.

-Bibliografía

1. Patrick R. Murray, E.J.B., James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, Michael A. Pfaller, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Edition ed. Vol. 2. 2007, American Society of Microbiology Press Washington D.C.
2. Bouvier, N.M. and P. Palese, *The biology of influenza viruses*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**: p. D49-53.
3. Nicholson, K.G., J.M. Wood, and M. Zambon, *Influenza*. Lancet, 2003. **362**(9397): p. 1733-45.
4. Nayak, D.P., et al., *Influenza virus morphogenesis and budding*. Virus Res, 2009. **143**(2): p. 147-61.
5. Varki, A.C., R.D.; Esko, J.D.; Freeze, H.H.; Stanley, P.; Bertozzi, C.R.; Hart, G.W.; Etzler, M.E, ed. *Essentials of Glycobiology*. 2008, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
6. Lakadamyali, M., M.J. Rust, and X. Zhuang, *Endocytosis of influenza viruses*. Microbes Infect, 2004. **6**(10): p. 929-36.
7. Harrison, S.C., *Viral membrane fusion*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(7): p. 690-8.
8. Amorim, M.J. and P. Digard, *Influenza A virus and the cell nucleus*. Vaccine, 2006. **24**(44-46): p. 6651-5.
9. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell. **140**(6): p. 805-20.
10. Takeuchi, O. and S. Akira, *Innate immunity to virus infection*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 75-86.
11. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
12. Pichlmair, A., et al., *RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates*. Science, 2006. **314**(5801): p. 997-1001.
13. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.

14. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 24-32.
15. Lund, J.M., et al., *Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5598-603.
16. Diebold, S.S., et al., *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1529-31.
17. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. Cell. **140**(6): p. 821-32.
18. Ichinohe, T., I.K. Pang, and A. Iwasaki, *Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel*. Nat Immunol. **11**(5): p. 404-10.
19. Murphy, K.T., P.; Walport, M., ed. *Janeway's Immunobiology*. 7th Edition ed. 2008, McGraw Hill.
20. Esche, C., C. Stellato, and L.A. Beck, *Chemokines: key players in innate and adaptive immunity*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(4): p. 615-28.
21. Taubenberger, J.K. and D.M. Morens, *The pathology of influenza virus infections*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 499-522.
22. Matsukura, S., et al., *Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **98**(6 Pt 1): p. 1080-7.
23. Julkunen, I., et al., *Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression*. Cytokine Growth Factor Rev, 2001. **12**(2-3): p. 171-80.
24. McGill, J., J.W. Heusel, and K.L. Legge, *Innate immune control and regulation of influenza virus infections*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(4): p. 803-12.
25. Bilyk, N. and P.G. Holt, *Cytokine modulation of the immunosuppressive phenotype of pulmonary alveolar macrophage populations*. Immunology, 1995. **86**(2): p. 231-7.
26. Bussfeld, D., et al., *Differential mononuclear leukocyte attracting chemokine production after stimulation with active and inactivated influenza A virus*. Cell Immunol, 1998. **186**(1): p. 1-7.

27. Holt, P.G., et al., *Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(2): p. 142-52.
28. Albert, M.L., B. Sauter, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 86-9.
29. Gilliet, M., W. Cao, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 594-606.
30. Tate, M.D., A.G. Brooks, and P.C. Reading, *The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice*. Respir Res, 2008. **9**: p. 57.
31. Kadowaki, N., et al., *Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 219-26.
32. Ehrhardt, C., et al., *Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling*. Microbes Infect, 2009. **12**(1): p. 81-7.
33. Kohlmeier, J.E. and D.L. Woodland, *Immunity to respiratory viruses*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 61-82.
34. Veckman, V., et al., *TNF-alpha and IFN-alpha enhance influenza-A-virus-induced chemokine gene expression in human A549 lung epithelial cells*. Virology, 2006. **345**(1): p. 96-104.
35. Piqueras, B., et al., *Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2613-8.
36. Van Reeth, K., *Cytokines in the pathogenesis of influenza*. Vet Microbiol, 2000. **74**(1-2): p. 109-16.
37. Hayden, F.G., et al., *Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense*. J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 643-9.
38. Monto, A.S., *Epidemiology of influenza*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**: p. D45-8.

39. Kuiken, T. and J.K. Taubenberger, *Pathology of human influenza revisited. Vaccine*, 2008. **26 Suppl 4**: p. D59-66.
40. Gambotto, A., et al., *Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus*. *Lancet*, 2008. **371**(9622): p. 1464-75.
41. de Jong, M.D., et al., *Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia*. *Nat Med*, 2006. **12**(10): p. 1203-7.
42. Kobasa, D., et al., *Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus*. *Nature*, 2007. **445**(7125): p. 319-23.
43. Cilloniz, C., et al., *Lethal influenza virus infection in macaques is associated with early dysregulation of inflammatory related genes*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(10): p. e1000604.
44. *Update: novel influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-May, 2009*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2009. **58**(21): p. 585-9.
45. Perez-Padilla, R., et al., *Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(7): p. 680-9.
46. Taubenberger, J.K., *The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus*. *Proc Am Philos Soc*, 2006. **150**(1): p. 86-112.
47. Itoh, Y., et al., *In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses*. *Nature*, 2009. **460**(7258): p. 1021-5.
48. Hale, B.G., et al., *The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses*. *J Gen Virol*, 2008. **89**(Pt 10): p. 2359-76.
49. Moltedo, B., et al., *Cutting edge: stealth influenza virus replication precedes the initiation of adaptive immunity*. *J Immunol*, 2009. **183**(6): p. 3569-73.
50. Giamarellos-Bourboulis, E.J., et al., *Effect of the novel influenza A (H1N1) virus in the human immune system*. *PLoS One*, 2009. **4**(12): p. e8393.
51. Moser, B., et al., *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(2): p. 75-84.
52. Nakajima, N., et al., *The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: detection of a high copy number of*

- the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. Jpn J Infect Dis.* **63**(1): p. 67-71.
53. Matikainen, S., et al., *Influenza A and sendai viruses induce differential chemokine gene expression and transcription factor activation in human macrophages.* *Virology*, 2000. **276**(1): p. 138-47.
 54. Miller, M.A., et al., *The signature features of influenza pandemics--implications for policy.* *N Engl J Med*, 2009. **360**(25): p. 2595-8.
 55. Pan, C., et al., *Genomic signature and mutation trend analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus.* *PLoS One.* **5**(3): p. e9549.
 56. Lagace-Wiens, P.R., E. Rubinstein, and A. Gumel, *Influenza epidemiology--past, present, and future.* *Crit Care Med.* **38**(4 Suppl): p. e1-9.
 57. O'Brien, J.M., Jr., et al., *Sepsis.* *Am J Med*, 2007. **120**(12): p. 1012-22.
 58. Giriputro, S., et al., *Clinical and epidemiological features of patients with confirmed avian influenza presenting to Sulianti Saroso Infectious Diseases Hospital, Indonesia, 2005-2007.* *Ann Acad Med Singapore*, 2008. **37**(6): p. 454-7.
 59. Reinhart, K., M. Meisner, and F.M. Brunkhorst, *Markers for sepsis diagnosis: what is useful?* *Crit Care Clin*, 2006. **22**(3): p. 503-19, ix-x.
 60. Rodriguez-Gaspar, M., et al., *Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients.* *Cytokine*, 2001. **15**(4): p. 232-6.
 61. Bermejo-Martin, J.F., et al., *Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza.* *Crit Care*, 2009. **13**(6): p. R201.