



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TESIS DOCTORAL:

**INMUNOPATOLOGÍA MOLECULAR DE LA NEUMONÍA
POR VIRUS DE LA GRIPE PANDÉMICA DE 2009 EN
MODELO DE RATÓN**

Presentada por D^a Ana Isabel Expósito Navarro para optar al
grado de doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dr. Jesús Francisco Bermejo Martín
Dra. Raquel Almansa Mora

A mis hombros de gigante:

mi padre, mi madre, mi hermana, mi esposo y mi bello.

Mi primer agradecimiento es a Jesús Bermejo, por hacer posible la realización de esta tesis doctoral. Por su excelente dirección, ánimos continuos y amenas conversaciones. No me hubiera atrevido a coger sin él este último tren. Gracias, por ofrecerme la oportunidad de cumplir uno de mis objetivos.

A Raquel Almansa, te agradezco tu dirección, trabajo a deshoras y esfuerzo sin los que hubiera sido imposible finalizar esta tesis.

A Lucía y Verónica, por su buen hacer en el laboratorio y a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de esta tesis.

Agradecer a Ana Sánchez la oportunidad de iniciarme en la Investigación, en la Unidad de Genética Molecular del IBGM.

A Rosalba Fonteriz, por su amabilidad y colaboración en las gestiones para la finalización de la tesis. A Teresa Pérez por su disponibilidad y poder resolutivo ante mis dudas de última hora.

A Mari Luz, Conchi, Susana, Mila, Blanca, Sara, Chus, Ana, compañeras del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, y a las grandes guardadoras de secretos, Eva, Bea y Charo por vuestro afecto, complicidad e incondicional apoyo. Gracias, también a los compañeros de café, Mercedes, Esteban, Luís, Nieves, María, Chus, por hacerme reír y dejarme disfrutar de vuestras disparatadas y divertidas conversaciones, que son una excelente válvula de escape.

A mi querida amiga Chus Barrientos, por su sincera amistad, gracias por hacerme saber que siempre puedo contar contigo. A Emma Puertas, por su amistad, compañerismo, apoyo y por las largas conversaciones que tenemos cuando podemos.

Mis agradecimientos, a mis tres deliciosos: Carlos, Leen y Cayetano por sus aportaciones científicas, pero sobre todo por vuestro amor incondicional y por las interesantes y divertidas conversaciones que mantenemos.

Finalmente, agradecer a mi hermana Toñi, todos los esfuerzos que siempre ha realizado por mí para que consiguiera los objetivos que me propusiera en la vida. Eternamente agradecida. Y al tito Javier, por su disposición y entrega.

Gracias a mi esposo, Juanma por su imprescindible ayuda en esta etapa y me gustaría que iniciáramos otras que contengan nada más que tres cositas, y a mi hijo, Pedro Antonio por su astucia y simpatía, a partir de ahora, mi tiempo forma parte del tuyo.

Gracias, a mis padres, Pedro y Nani por sus demostraciones constantes de amor y por enseñarme la importancia de los valores en la vida. Muchas gracias.

*“Imagination is more important than knowledge”
(La imaginación es más importante que el conocimiento)
Albert Einstein.*

INDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	1
ABREVIATURAS	13
1 INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 LA GRIPE H1N1 DE 2009	17
1.1.1 <i>Características virológicas</i>	21
1.1.2 <i>Aspectos clínicos de la infección por el virus H1N1 pdm 2009</i>	37
1.2 INMUNOPATOGÉNESIS DE LA GRIPE A (H1N1) PDM 2009	45
1.2.1 <i>Respuesta inmune a la infección por el virus de la gripe</i>	45
1.2.2 <i>Inmunopatogénesis de la gripe A (H1N1) pdm de 2009</i>	55
1.3 MODELOS ANIMALES Y PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA	58
1.3.1 <i>Estandarización del modelo murino de la gripe</i>	58
1.3.2 <i>Perfiles de expresión génica</i>	60
2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS	63
2.1 HIPÓTESIS	63
2.2 OBJETIVOS	63
2.2.1 <i>Objetivo principal</i>	63
2.2.2 <i>Objetivos secundarios</i>	63
3 MATERIAL Y MÉTODOS	65
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	65
3.2 DECLARACIÓN ÉTICA.....	66
3.3 LÍNEA CELULAR.....	66
3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL	66
3.5 VIRUS PDM H1N1 E INFECCIÓN DE LOS RATONES.....	67
3.6 MONITORIZACIÓN DE LOS RATONES Y RECOGIDA DE MUESTRAS.....	67
3.7 DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL EN TEJIDOS	67
3.8 HISTOPATOLOGÍA	67
3.9 EXTRACCIÓN DE ARN DE TEJIDO DE PULMÓN	68
3.10 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE ARN.....	69
3.11 MICROARRAYS	72
3.12 ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA	78
3.13 ANÁLISIS DE RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR	79
3.14 REPOSITORIO DE DATOS GENÓMICOS: ARRAY EXPRESS.....	79
3.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79

4	RESULTADOS	81
4.1	SIGNOS CLÍNICOS	81
4.2	HISTOPATOLOGÍA	81
4.3	ESTUDIO DE LA CARGA VIRAL EN PULMÓN DE RATÓN	83
4.4	NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	83
4.5	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL.	85
4.6	GENES MÁS ALTERADOS TRAS LA INFECCIÓN POR EL VIRUS CAT09.....	85
4.7	RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR A DÍA 5 (INGENUITY PATHWAYS, IPA).....	88
	<i>Ruta 1. Papel de la hipercitoquinemia/hiperquimioquinemia en la patogénesis de la gripe</i>	<i>90</i>
	<i>Ruta 2. Fibrosis hepática / Activación de las células estrelladas hepáticas.....</i>	<i>94</i>
	<i>Ruta 3. Comunicación entre las células de la respuesta inmune innata y adaptativa.....</i>	<i>99</i>
	<i>Ruta 4: Señalización de wnt/beta-catenin.....</i>	<i>103</i>
	<i>Ruta 5: Adhesión de los granulocitos y diapedesis</i>	<i>105</i>
	<i>Ruta 6: Señalización de TREM 1</i>	<i>109</i>
	<i>Ruta 7: Regulación diferencial de la producción de citocinas en células epiteliales intestinales por la IL-17A e IL-17F</i>	<i>113</i>
	<i>Ruta 8: Adhesión de granulocitos y diapedesis</i>	<i>115</i>
	<i>Ruta 9: Señalización celular en la artritis reumatoide. Alteración de las células T y B.....</i>	<i>119</i>
	<i>Ruta 10: Regulación diferencial de la producción de citocinas en los macrófagos y las células T auxiliares por la IL-17A e IL-17F.....</i>	<i>123</i>
	<i>Ruta 11: Papel de la IL-17F en las enfermedades alérgicas inflamatorias de las vías respiratorias.</i>	<i>125</i>
5	DISCUSIÓN	131
6	CONCLUSIONES	145
7	BIBLIOGRAFÍA	147

RESUMEN

La gripe pandémica causó una gran morbilidad durante la temporada 2009-2010 y en determinados pacientes en edades medias de la vida, causó neumonía viral primaria que en algunos casos requirió ingreso en la UCI.

Nuestro grupo de investigación objetivó, en los pacientes más graves (aquellos que necesitaban de ventilación mecánica), niveles elevados de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias en plasma, acompañando a la presencia de infiltrados neumónicos. Esta tesis pretende comprobar el papel de la inflamación en la patogénesis de la infección por el virus de la gripe pandémica de 2009, utilizando un modelo de ratón C57BL6 infectado y un grupo de ratones control.

El análisis de expresión génica a nivel pulmonar mediante microarrays de transcriptoma completo demostró la presencia de una marcada activación de genes de la inmunidad innata a día 5 post-infección, coincidiendo con la existencia de infiltrados neumónicos extensos, infiltración celular intensa en el pulmón y replicación viral activa. Este programa transcriptómico relacionado con la inmunidad innata se normalizó a día 10, coincidiendo con la desaparición de los infiltrados neumónicos y del virus.

En este trabajo se diseccionó a nivel molecular las rutas de señalización celular alteradas a nivel pulmonar tras la infección por este virus, lo cual será útil para diseñar modelos de inmunomodulación de estas rutas en el futuro.

En conclusión, la inducción de una reacción exacerbada de la inmunidad innata/inflamación se asocia con la génesis de la neumonía tras la infección por el virus de la gripe pandémica de 2009, pero también parece ser necesaria para eliminar el mismo.

ABSTRACT

Pandemic influenza caused high morbidity during the 2009-2010 season and, in selected patients at their middle age of life, it caused primary viral pneumonia requiring even ICU admission in some cases.

Our research group evidenced, in the most severe patients (those who needed mechanical ventilation), high levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines in plasma, accompanying the presence of pneumonic infiltrates. This thesis is aimed to investigate the role of inflammation in the pathogenesis of infection caused by the 2009 pandemic influenza virus, using a murine model (infected C57BL6 mice and a group of control /non infected mice).

Analysis of gene expression at the lung level using full transcriptome microarrays showed the presence of marked activation of innate immunity genes by day 5 post-infection, paralleling the existence of extensive pneumonic / cellular infiltrates into the lung and active viral replication. This transcriptomic program related to innate immunity got normalized by day 10 post-infection, when pneumonic infiltrates had already disappeared and viral replication was no more present in the lung.

This work dissected at molecular level the cell signaling pathways altered in the lungs after infection with this virus, which will be useful for designing strategies of immunomodulation of these routes in the future.

In conclusion, induction of an exacerbated reaction of the innate immunity / inflammation is associated with the genesis of pneumonia following infection by the 2009 influenza pandemic virus, but at the same time, it also seems to be necessary to overcome it.

ABREVIATURAS

ACIP	Advisory Committee on Immunization Practices
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNc	Ácido Ribonucleico complementario
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
CAT09	A/Cataluña/63/2009
CD4+	Linfocitos T memoria
CD8+	Linfocitos T memoria
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.
CDs	Células dendríticas
CPE	Efecto citopático
CReSA	Centro de Investigación de Sanidad Animal
DMEN	Modificación de medio Basal Medium Eagle
DPI	Días Post-Infección
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Food and Drug Administration
FDR	Test de corrección de pruebas múltiples
GS	Gel-Stain
H1N1pdm	H1N1 pandémico
HA	Hemaglutinina
HCUV	Hospital Clínico Universitario de Valladolid
HE	Hematoxilina y Eosina
HPAIV	Virus de la gripe aviar
IFN- γ	Interferón γ
IG	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IMI	Investigación en Infección e Inmunidad

14 ABREVIATURAS

IP	Intraperitoneal
IP-10	Proteína inducible por interferón 10
IPA	Ingenuity Systems Pathway Analysis
IRF9	Factor regulatorio 9 del IFN
ISGs	Genes de respuesta al Interferón
LAL	Tejido linfoide asociado a la laringe
MALT	Tejido linfoide asociado a las mucosas
MCP-1	Proteína 1 quimiotáctica de monocitos
MDCK	Madin Darbey Canine Kidney
MEM	Medio esencial mínimo Eagle
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIAME	Minimum Information About a Microarray Experiment
MIP-1 β	Proteína inflamatoria del macrófago 1 beta
NA	Neuraminidasa
NALT	Tejido linfoide asociado a la nariz
NBS3	Unidad de Biocontención
NK	Natural Killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PB	Proteína básica (PB1,PB2)
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Perfiles de Expresión Génica
PFU	Unidades formadoras de placa
PI	Post-Infeción
PRRS	Receptores de reconocimiento de patrones
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RNP	Ribonucleoproteína
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto

RQI	Valor de pureza
RT-PCR	Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa
SA	Actividad específica
SARDS	Síndrome respiratorio agudo severo
SA α	Ácido siálico/galactosa unidos por un enlace α 2-6
SDRA	Síndrome de distress respiratorio agudo grave
SLE	Lupus eritematoso sistémico
TCID50	Determinación de la dosis infecciosa 50% en cultivos tisulares
Th T	Células T colaboradoras
TLR	Toll like receptor
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg T	Células T reguladoras
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La gripe H1N1 de 2009

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa, que parece haber afectado a los humanos desde la antigüedad. Schmidt definió la gripe del siglo XX como una enfermedad invariable producida por un virus variable (Schmidt, 1975).

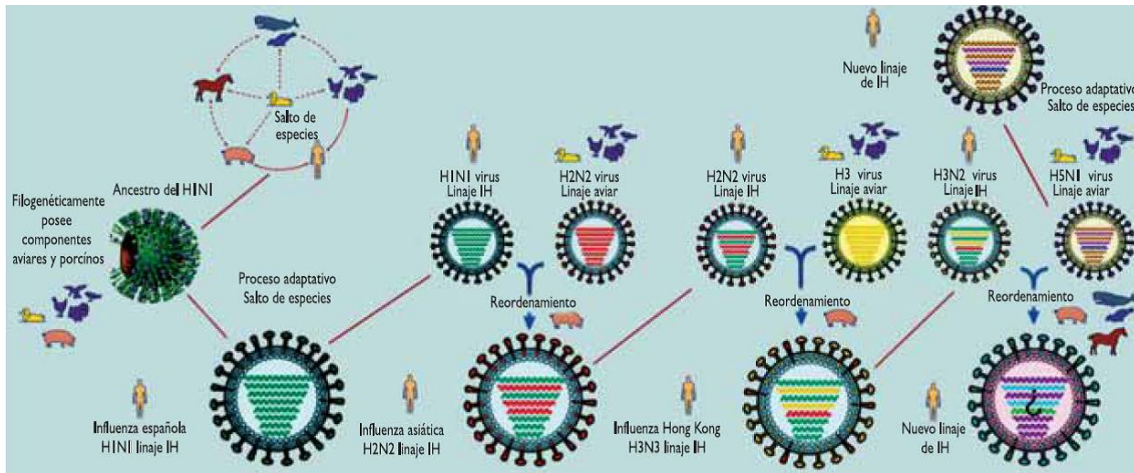


Figura 1: Evolución filogenética del virus de la gripe en el hombre: alrededor de 1915 se estima que un ancestro del virus H1N1 tomó contacto con áreas densamente pobladas por seres humanos. Este virus se fue adaptando hasta ser transmitido eficientemente de persona a persona, momento en el cual se transformó en la fatídica cepa H1N1 que originó la pandemia de la gripe española. En 1957, el virus original sufrió un reordenamiento viral y adquirió 3 genes desde algún subtipo viral aviar (HA, NA y PB1) originando la cepa H2N2, luego en 1968 se produjo nuevamente otro reordenamiento viral y el virus adquirió 2 genes (HA y PB1) nuevamente desde otro subtipo viral aviar. En la actualidad este u otros subtipos virales podrían reordenarse con el subtipo H5N1 generando un nuevo miembro del linaje humano, también podrían ocurrir que en H5N1 se adapte y adquiera la capacidad de transmitirse e infectar a los seres humanos. Todo indica que hasta la fecha el H5N1 está siguiendo este camino hacia la especie humana. Adaptado y modificado de Belshe RB. *N Engl J Med* 2005;353(21):2209-2211.

Las epidemias de los virus de la gripe son causadas por la rápida evolución del genoma viral. Ocurren prácticamente cada año, pero varían en intensidad sobre todo en los meses más fríos del año en las zonas de clima templado, causando una considerable morbilidad en todos los grupos etarios. Surgen por una combinación de deriva antigénica, que ocurre de temporada en temporada, y por una disminución de la inmunidad entre la población. Cuando la epidemia se extiende por distintos países y continentes hablamos de pandemia (Napoli y cols, 2015).

La primera pandemia “probable” de gripe ocurrió en Europa en 1510 (Valdez, 2002), sin embargo, la primera pandemia con acuerdo unánime de todos los historiadores médicos aconteció en 1580 (Pyle, 1986). Se originó en Asia y se extendió por África y Europa. La mortalidad fue elevada: “el 31 de agosto de 1580 volvió a presentarse el catarro epidémico en España, el que aseguran despobló casi a Madrid y otras muchas villas y ciudades; cundiendo tanto en Barcelona, que en diez o doce días enfermaron más de veinte mil personas” (Jenner,

1798). Sin embargo, otros estudios ponen en duda este diagnóstico, señalando a la tos ferina como causante de los sucesos” (Camaño y cols, 2005).

Sin embargo, hasta que el primer virus de la gripe de origen humano no fue aislado en 1933, fue imposible determinar con certeza qué pandemias eran causadas por dicho virus. Desde 1933 se han producido grandes cambios antigénicos: en 1957, cuando el subtipo H2N2 reemplazó al H1N1, conocida como la gripe asiática, en 1968 cuando el virus H3N2 reemplazó a H2N2, conocida como la gripe de Hong Kong, y en 1977 cuando reapareció el subtipo H1N1. La última referencia es la pandemia originada en 2009, denominada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como gripe A H1N1.

La cronología de las pandemias y brotes aislados ocurridos desde finales del siglo XIX con referencia a los subtipos del virus que los produjo quedan reflejados en la Tabla 1.

Tabla 1: Cuadro cronológico de pandemias y brotes aislados de gripe. (Fuente: Organización Mundial de la Salud)

	NOMBRE	AÑO	SUBTIPO
PANDEMIAS	Gripe Rusa	1889-90	H2N2
	Gripe española	1918-19	H1N1
	Gripe asiática	1957-58	H2N2
	Gripe Hong Kong	1968-69	H3N2
	gripe A	2009	H1N1
		ZONA	
BROTOS AISLADOS	Nueva Jersey (EEUU)	1976	H1N1
	Norte China	1977	H1N1
	Hong Kong	1997	H5N1
	Hong Kong	1999	H9N2
	China, Holanda, Nueva York, Hong Kong	2003	H5N1, H7N7, H7N2, H9N2
	Tailandia, Vietnam	2004	H5N1
	Canadá	2004	H7N3
	Egipto	2004	H10N7
	Tailandia, Vietnam, Camboya, Indonesia, China	2005	H5N1
	Turquía, Irak, Azerbaijan, Djibouti	2006	H5N1
	Laos, Nigueria, Pakistán, Vietnam	2007	H5N1
	Dangladesh, Camboya, China, Egipto, Indonesia	2008	H5N1

Las pandemias más importantes causadas por el virus de la gripe A se produjeron en 1918, 1957, 1968 y 1977. Tan solo entre 1918 y 1919 se estima que murieron 40 a 60 millones de personas y se infectaron con la cepa circulante unos 500 millones más.

El virus que produjo la pandemia de 1918 fue del subtipo H1N1 de origen aviar. En 1957, un virus del subtipo H2 produjo la epidemia y un virus H1 en 1977. El número de decesos tanto en 1957 como en 1968 fue cercano a los seis millones. En 1997, un virus aviar H5 y en 1999 un virus H9 causaron brotes de la gripe en la región de Hong Kong (Ha y cols, 2002).

Cuando la enfermedad comenzó en otoño de 1918 en Estados Unidos, se pensó que se trataba de una nueva y terrible arma química debido a que la Primera Guerra Mundial estaba en curso. Se llegó a especular, a pesar de su inviabilidad, que la compañía alemana Bayer había insertado el virus en las aspirinas para diseminarlo entre los estadounidenses. También se consideró la posibilidad de que los primeros casos en Boston se debieron a que un navío alemán encallado en el puerto lo había liberado allí (Kolata, 2001). Las víctimas de esa plaga tenían que encontrar alguna explicación a tan atroz padecimiento.

Recientemente se ha descubierto y sólo después de reconstruir al virus causante de esta pandemia, que éste surgió en la naturaleza y fue de origen aviar (H1N1). Se han identificado también las mutaciones específicas que le confirieron la capacidad de ser transmitido de humano a humano y de producir la alta mortalidad que lo caracterizó (Tumpey y cols, 2005; García-Sastre y Whitley, 2006)

La gripe de Hong Kong acaecida entre 1968 y 1969 fue un brote de categoría dos causado por una cepa H3N2, derivada de una H2N2 por reasociación de los segmentos HA. Este virus infectó a 500 mil residentes de Hong Kong, lo que representó aproximadamente el 15 % de su población, aunque con una baja tasa de mortalidad. En Estados Unidos aproximadamente 33 800 personas murieron a causa de esta infección. Esta pandemia mató aproximadamente a un millón de personas en todo el mundo (Daum y cols, 2005)

Ya en este siglo, otro brote por un virus aviar H5N1 amenazó con convertirse en una pandemia de grandes dimensiones en 2003. Este virus se transmitió de aves a humanos sin ningún huésped intermediario hasta ahora identificado. Los casos de gripe por H5N1 en humanos comenzaron a ser notificados desde 2002 y aparecieron en zonas rurales de diferentes países asiáticos. Los contagios ocurrieron en personas expuestas a dosis muy altas de virus presentes en aerosoles, generados al sacrificar aves enfermas sin las medidas de higiene adecuadas.

Experimentos posteriores en ratones indicaron que la replicación del H5N1 se limitaba solo a la parte superior del tracto respiratorio (Hatta y cols, 2007). En los humanos el virus no se transmitía eficientemente para infectar a otras personas, pues la infección se producía directamente en el pulmón, lo cual limitó los riesgos (Shinya y cols, 2006).

Aunque en un principio se pensó que este virus H5N1 solo se transmitía de ave a humano y no de humano a humano, casos posteriores indicaron que podía reconocer directamente receptores en células humanas (Wong y Yuen, 2006). Así, debido en parte a su ineficiente

transmisión de humano a humano, fueron relativamente pocas las infecciones humanas ocurridas por este virus H5N1 (Mount y cols, 1997; Yamada y cols, 2006).

Nueva cepa humana 2009. H1N1. En marzo de 2009, se registraron en México brotes de enfermedad respiratoria aguda y un incremento en las notificaciones de pacientes con síndromes gripales en varias zonas del país. El día 21 de abril de 2009, los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC, EE.UU.) alertaron acerca de la aparición de dos casos confirmados de gripe asociados a un nuevo virus en dicho país, en dos niños del condado de San Diego, California, en la frontera con México.

El Ministerio de Salud de México comunicó el 23 de abril a la Organización Panamericana de la Salud la existencia de varios casos confirmados de enfermedad respiratoria grave debida a infecciones por virus de la gripe A (H1N1) de origen porcino. Al estudiarse la secuencia nucleotídica del genoma viral a partir de las muestras clínicas se determinó que correspondía a la misma cepa detectada en los dos niños de California (reconocida como cepa prototipo). Dos días después, la OMS determinó que el brote epidémico estaba causado por un nuevo virus de la gripe A/H1N1.

El 27 de abril, la OMS elevó el nivel de Alerta de pandemia a la fase 4, tras documentarse una transmisión interhumana capaz de causar brotes a nivel comunitario. Apenas dos días después, se elevó el Alerta a la fase 5, luego de comprobarse la diseminación viral interhumana en al menos dos países de una misma región geográfica de la OMS (Tabla 2). Finalmente, el 11 de junio, la OMS declaró la fase 6 (pandemia), al registrarse una transmisión eficiente y sostenida del virus emergente en el mundo (Meunier y cols, 2009; Huerta García y cols, 2010).

Tabla 2: Fases de la pandemia de la OMS y objetivos de plan. Fuente: OMS, 2009a

Fase interpandémica	
Fase 1 No se han detectado nuevos subtipos de gripe en humanos. Un subtipo que ha causado infección puede estar presente en animales, pero el riesgo de infección humana es considerado bajo.	Reforzar preparativos para la pandemia de gripe a niveles global, regional, nacional, subnacional y local.
Fase 2 No se han detectado nuevos subtipos de gripe en humanos. Sin embargo un subtipo de gripe animal circulante posee un riesgo importante de enfermedad humana.	Minimizar el riesgo de transmisión a humanos: detectar e informar rápidamente dicha transmisión, si ocurre.
Alerta pandémico	
Fase 3 Infección/es humana/s con un nuevo subtipo, pero sin diseminación humano a humano, o muy raras instancias de diseminación a un contacto cercano.	Asegurar la rápida caracterización del nuevo subtipo de virus y su detección temprana, su notificación y respuesta a casos adicionales.

<p>Fase 4 Pequeños núcleos con transmisión humano a humano limitada., pero la diseminación es altamente localizada, sugiriendo que el virus no está bien adaptado a humanos.</p>	<p>Contener el nuevo virus a focos limitados o demorar la diseminación para ganar tiempo a fin de implementar medidas preparatorias, incluyendo el desarrollo de vacunas.</p>
<p>Fase 5 Núcleos crecientes pero la transmisión humano a humano todavía localizada, sugiriendo que el virus está adaptándose mucho mejor a los humanos, pero todavía no es totalmente transmisible. (Riesgo importante de pandemia)</p>	<p>Maximizar esfuerzos para contener o demorar la diseminación, para demorar una posible pandemia y ganar tiempo para implementar medidas de respuesta a la pandemia.</p>
<p>Pandemia</p>	
<p>Fase 6 Transmisión interhumana eficiente y sostenida</p>	<p>Minimizar el efecto de la pandemia</p>

1.1.1 Características virológicas

Clasificación de los virus de la gripe

La palabra virus significa “veneno”. Un virus se define como un agente que posee tres características: 1) parasitismo genético para su replicación; 2) infectividad; 3) antigenicidad.

Los virus de la gripe forman parte de la familia de Orthomyxoviridae. El nombre Orthomyxoviridae hace referencia a la afinidad que presentan por la mucina, mucoproteína presente en el moco de diversas secreciones y en algunos receptores epiteliales, en la membrana de los hematíes y en el suero (de ahí su capacidad hemaglutinante). Esta familia incluye cinco géneros, en base a sus diferencias genómicas y estructurales (Tabla 3).

Tabla 3: Clasificación de los virus Orthomyxoviridae

Orthomyxoviridae: Clasificación Baltimore Grupo V: (-) virus del ARNss			
Género	Especie	Subtipo	Huésped
Influenza virus A	Gripe A	H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H9N2, H10N7	Humanos, aves, otros mamíferos (cerdo, caballo...)
Influenza virus B	Gripe B		Humanos, focas
Influenza virus C	Gripe C		Humanos, cerdos y perros.
Isavirus	Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISA)		<i>Salmo salar</i> (Salmón del Atlántico)
Thogotovirus	Thogoto virus (THOV)	Thogoto virus (THOV)	Garrapatas, Mosquitos, Mamíferos (incluyendo humanos)
	Dhori virus	Batken virus (BATV) Dhori virus (DHOV)	

Estos virus están compuestos por aproximadamente 1% de ARN, 70% de proteínas, 20% de lípidos y entre 5 a 8% de carbohidratos (Dannevig y cols, 1995; Strauss y Strauss, 2008; Salazar y cols, 2010).

Dentro de los virus de la gripe se distinguen tres tipos: A, B y C, en base a diferencias antigénicas de dos de sus proteínas (la nucleoproteína NP y la proteína matriz M). Además los virus de la gripe tipo A se clasifican en subtipos en función de la naturaleza antigénica de sus glicoproteínas de superficie: Hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA).

Los virus de la gripe se denominan taxonómicamente por un acrónimo en el que se incluye en primer lugar el tipo de virus gripal A, B o C, indicándose a continuación el hospedador animal en el que se ha aislado, si la cepa no es de origen humano. Posteriormente se incluye el origen geográfico de la cepa aislada, número de laboratorio de la cepa y año de aislamiento seguido entre paréntesis de la descripción antigénica del subtipo de HA y NA. El virus utilizado en el presente estudio es el que se muestra en la Figura 2.

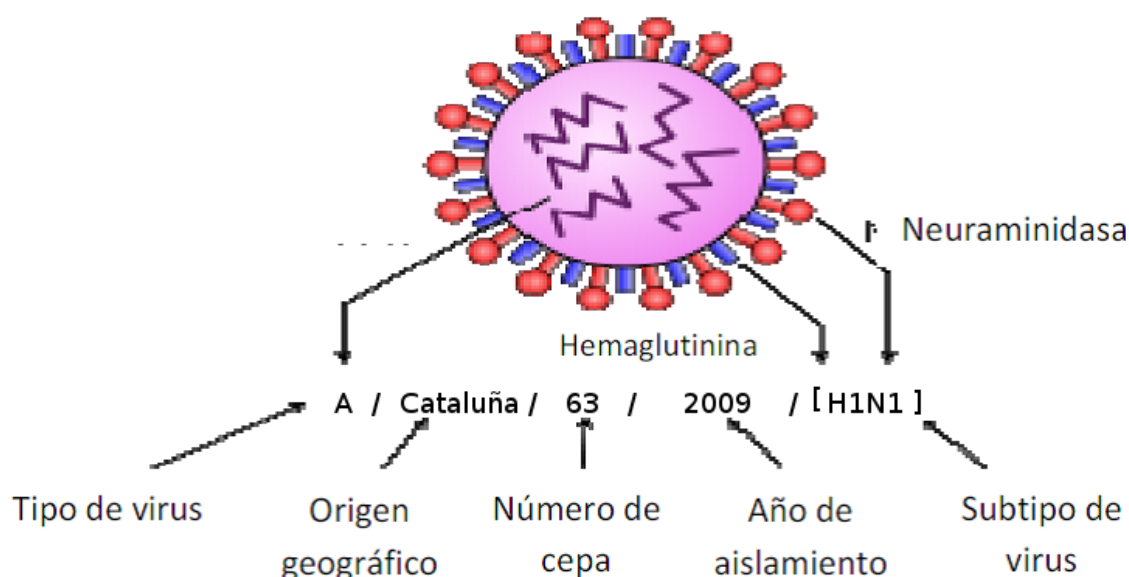


Figura 2: Nomenclatura de los virus de la gripe A

Morfología y estructura del virión

Los virus de la gripe se pueden observar al microscopio electrónico con características pleomórficas, redondeadas u ovals, con diámetro entre 80 a 120 nm (Treanor, 2005) (Figura 3, Figura 4).

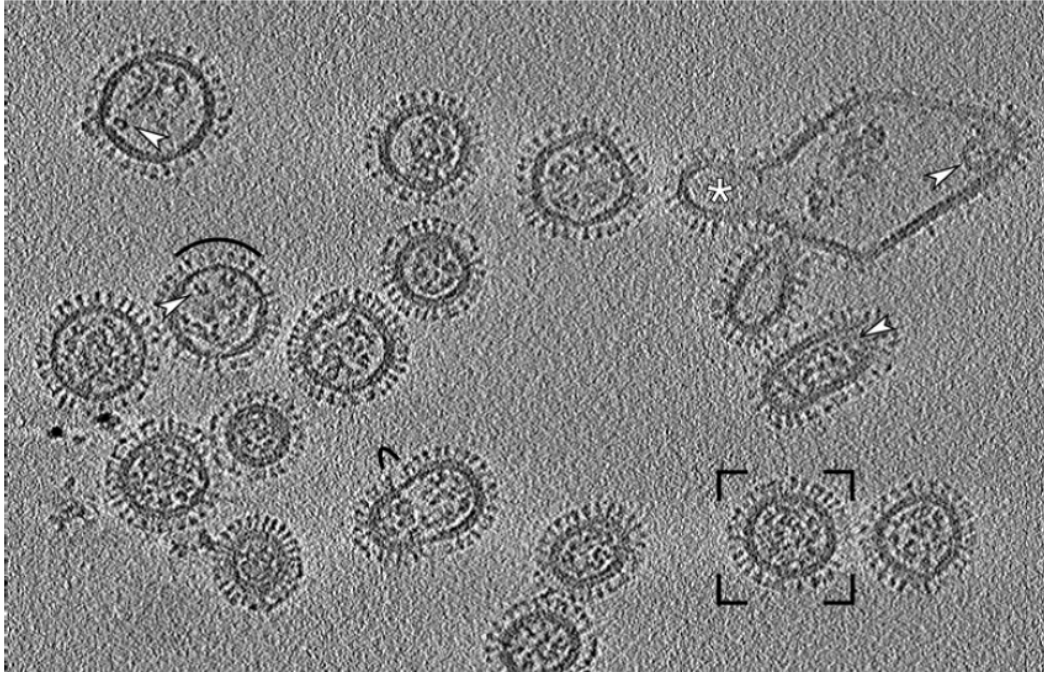


Figura 3: Sección obtenida mediante tomografía crioeléctronica correspondiente a un campo conteniendo partículas de virus de la gripe. Las flechas blancas indican ribonucleoproteínas (RNP) típicas del virus. Los arcos negros indican áreas de la capa de matriz con zonas que exhiben gaps o una menor densidad de “paquetes” de glicoproteínas de envoltura. La imagen irregular marcada con un asterisco (probablemente se haya formado en el proceso de disrupción celular) contiene en su interior una partícula brotando. Se observa el pleomorfismo de las partículas del virus de la gripe. La barra ubicada en el extremo inferior derecho del panel indica 100 nm. Fuente: Harris A. y cols. PNAS 2006; 13:19123-7.

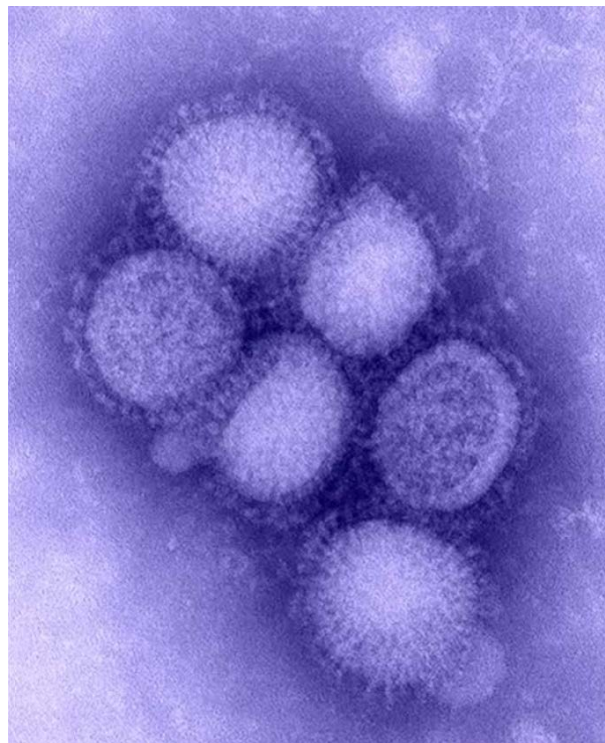


Figura 4: Virus de la gripe A (H1N1) causante de la actual pandemia de la gripe de origen porcino en 2009. Se observan partículas ovals o esféricas con espículas correspondientes a la expresión en su superficie de moléculas de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Fuente: CDC 2009c.

La envoltura que los rodea es una bicapa lipídica cuyo origen es la membrana celular de la célula huésped. En su superficie interna se encuentra la proteína matriz M1, con función estructural y que da estabilidad al virión, la cual es la proteína más abundante del virus (Figura 5).

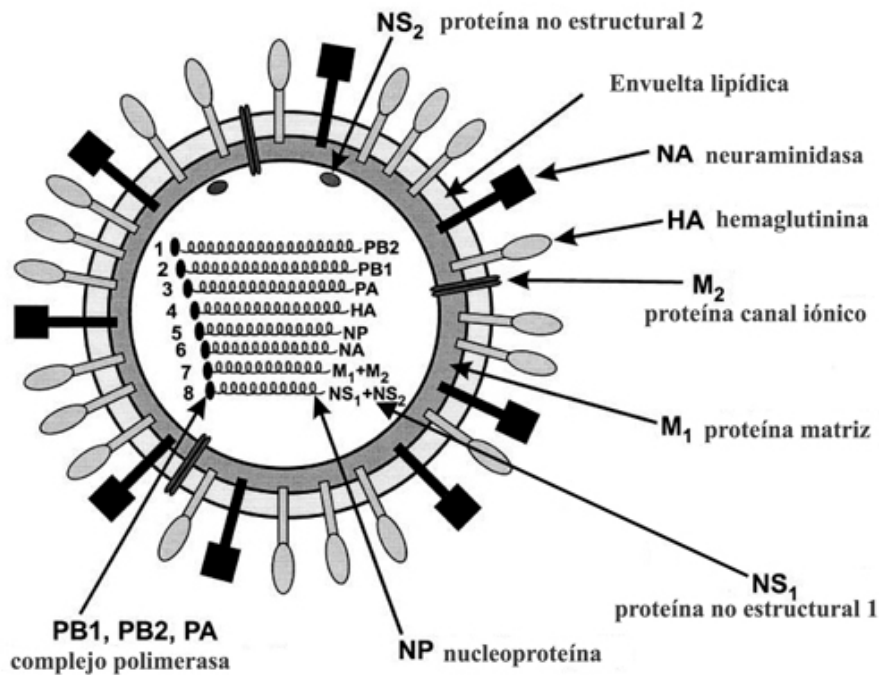


Figura 5: Morfología y componentes principales del virus de la gripe A (Cuevas y cols, 2010)

Más internamente en la estructura, atravesando la envoltura y a modo de proyecciones se disponen dos glicoproteínas: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) en los virus A y B (Figura 6). El virus de la gripe C sólo tiene una proteína con actividad hemaglutinina y esterasa (HE) (Wright y Webster, 2001). Otra proteína que se encuentra atravesando la envoltura es la proteína de matriz M2, que forma un canal iónico y sólo se encuentra en el virus A. El virus B tiene otra proteína (NB) que parece tener una función similar.

En conjunto, las principales características que distinguen a los tres tipos de virus de la gripe, además de la especificidad de infección en las distintas especies de animales, están dadas por:

1. Diferencias antigénicas entre las proteínas NP y M2.
2. Grado de variabilidad antigénica en sus glucoproteínas de superficie (las HA y NA de los virus tipo A presentan la mayor diversidad).
3. El número de segmentos de ARN (el tipo C contiene solo siete segmentos).

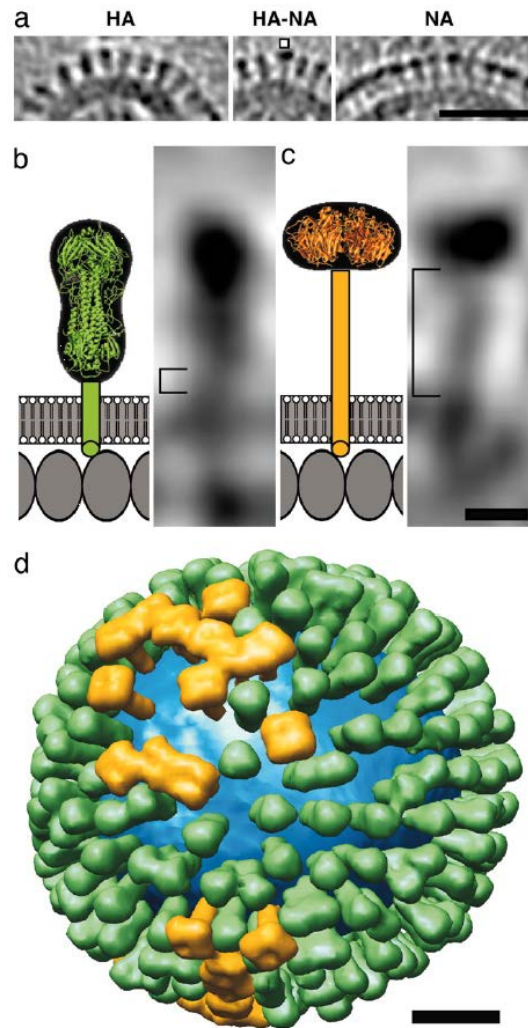


Figura 6: Distribución de las hemaglutininas (HA) y neuraminidasas (NA) en la superficie del virus de la gripe, según su disposición espacial. Se observa un clúster de hemaglutininas (panel "a", a la izquierda), una molécula de neuraminidasa en un clúster de hemaglutininas (panel "a", al centro) y un clúster de neuraminidasas (panel "a", a la derecha). Los paneles "b" y "c" muestran dentro del recuadro respectivo la estructura de HA y NA. La barra horizontal indica 5 nm. El panel "d" muestra un modelo de distribución de HA (en verde) y NA (en amarillo), así como de la capa lipídica de envoltura (en azul). La barra indica 20 nm. Fuente: Harris A. y cols. PNAS 2006; 13:19123-7.

Organización del genoma y proteínas codificantes

El virus de la gripe se caracteriza por poseer un genoma de ARN de hebra única con polaridad negativa, cuya información genética está codificada en el sentido opuesto a los ARNm. Este ARN está segmentado, con ocho segmentos en el caso del virus de la gripe A y B y siete segmentos en el virus de la gripe C. Estos segmentos independientes entre sí y de distinto tamaño, forman un complejo con la nucleoproteína, llevando asociado cada uno de ellos una ARN polimerasa. El tamaño total del genoma es de 12.000 a 15.000 nucleótidos.

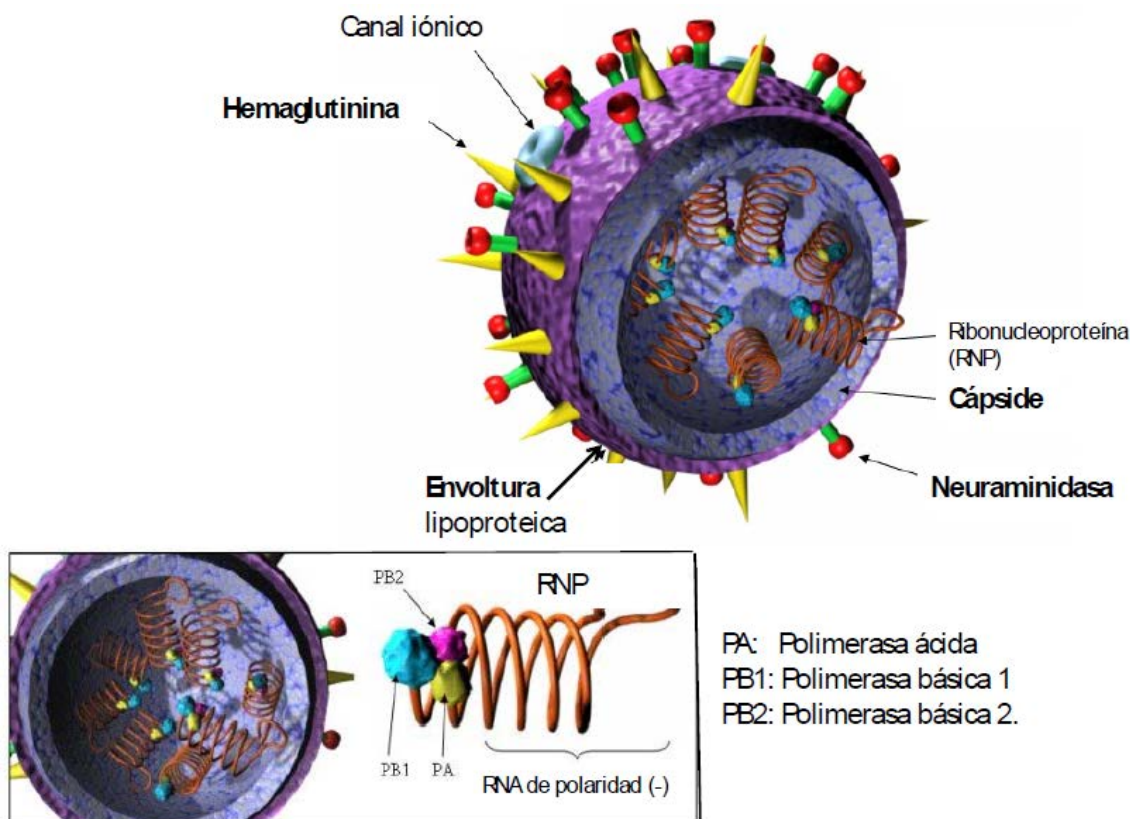


Figura 7: Esquema del virus de la gripe y sus principales componentes.

Los segmentos de ARN del virus son capaces de codificar distintos tipos de proteínas, proteínas estructurales y proteínas no estructurales, encargadas de realizar diferentes funciones. Las proteínas estructurales están presentes en la partícula viral completa, pudiendo distinguir a la hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), matriz (M1), proteína transmembrana (M2), nucleoproteína (NP) y un complejo formado por las proteínas PA, PB1 y PB2 que forman el complejo polimerasa. Las proteínas no estructurales solo se encuentran en la célula infectada y pueden aparecer en el núcleo como NS1 o en el núcleo y citoplasma como NS2. Todas estas proteínas son codificadas por los ocho segmentos de ARN (Tabla 4).

Igualmente se ha descrito una nueva proteína (Chen y cols, 2001), denominada PB1-F2, que parece estar codificada por el gen PB1 y tiene algunas características particulares que la diferencian del resto de las proteínas, que son: su ausencia en algunas cepas gripales de origen animal (particularmente en cerdos), expresión variable en células infectadas individuales y localización mitocondrial. Esta proteína parece desempeñar un papel importante en la severidad de la enfermedad por parte de algunas cepas gripales, como la implicada en la pandemia de 1918-1919 (Krug, 2006).

El centro del virión está ocupado por la ribonucleoproteína, conformada tanto por el genoma viral (RNA de polaridad negativa) como por las proteínas de la nucleocápside y por otras tres proteínas (PA, PB1 y PB2) que conforman la polimerasa encargada de copiar el material genético viral (Duesberg, 1969; White y Fenner, 1994). Esta organización génica permite el

intercambio de segmentos de RNA cuando dos o más virus diferentes se multiplican en una misma célula, dando lugar a nuevas variantes que pueden exhibir cambios en la virulencia para una especie dada (Webster y cols, 1992).

Tabla 4: Relación entre los segmentos del genoma a RNA viral y las proteínas codificadas por el virus de la gripe A.

Segmento de RNA	Proteínas codificadas	Algunas funciones de importancia asociadas a las proteínas virales
1	PB2 (polimerasa básica 2)	- Polimeriza el RNA viral complementario (+)
2	PB1 (polimerasa básica 1) PB1-F2 (proteína codificada en el segundo marco de lectura de este segmento del RNA viral)	- Polimeriza el RNA viral complementario (con polaridad [+]) - Promueve la muerte de células del sistema inmune (macrófagos alveolares tipo II; células dendríticas) mediante apoptosis mediada por las mitocondrias; regula a PB1. Péptido truncado inactivo en las cepas del nuevo virus emergente A(H1N1).
3	PA (polimerasa ácida)	- Polimeriza el ARN viral (-)
4	HA (hemaglutinina)	- Promueve la adsorción viral a los receptores celulares de ácido siálico, por lo que determina el rango de especie
5	NP (nucleoproteína)	- Protege el material genético viral en la célula - Transporta el ARN viral al núcleo - Colabora con la actividad de la PA
6	NA (neuraminidasa)	- Libera las partículas virales de sustancias mucoides y permite el egreso viral de la célula, por lo que está implicada en la transmisibilidad viral
7	M1 (proteína de matriz 1) M2 (proteína de matriz 2)	- Promueve la interacción entre la nucleocápside y la envoltura viral - Actúa como canal iónico de transmembrana permitiendo la acidificación viral necesaria para proseguir la infección intracelular
8	NS1 (proteína no estructural 1) NS2 / NEP (proteína no estructural 2 / proteína de exportación nuclear)	- Inhibe la actividad antiviral inducida por el sistema Interferón, al impedir el reconocimiento celular del RNA viral por el "sensor" celular RIG-1 (limitando la inducción de aquél), y al bloquear la actividad de las proteínas celulares PKR y CPSF30. - Regula la transcripción / replicación viral - Péptido truncado inactivo para su interacción con otras proteínas en las cepas del nuevo virus emergente A(H1N1). - Se asocia al transporte de nucleocápsides hacia la membrana citoplasmática (junto a M1)

Cada género del virus de la gripe posee mecanismos particulares para la codificación de sus propias proteínas. En el virus de la gripe A, el segmento siete contiene información para M1 y

M2 y el segmento ocho para NS1 y NS2. Cada uno de estos segmentos forma un complejo de ribonucleoproteína con la proteína NP y tiene unida la triada PB1, PB2 y PA que constituye la RNA polimerasa viral (Duesberg, 1969; Lamb y Krug, 2001). Esta enzima cataliza, además de la síntesis de RNAm virales, la replicación y la formación de los nuevos RNA genómicos en las células infectadas (Inglis y cols, 1976; Lamb y Choppin, 1976).

La polimerasa dependiente de RNA viral carece de la actividad para corregir los errores introducidos durante el copiado de cadena molde de RNA, dando lugar por tanto a mutaciones. Típicamente una RNA polimerasa viral exhibe una tasa de error de 1×10^3 a 1×10^5 , es decir, que introduce una mutación por cada mil o 100 mil nucleótidos copiados. Los virus de la gripe A muestra el mayor número de mutaciones acumuladas a través del tiempo (deriva antigénica), mientras que el virus de la gripe C tiene poca variabilidad, incluso si se han aislado con décadas de separación (Smith y Palese, 1989).

Muchas de estas mutaciones se mantendrán silenciosas o darán origen a sustituciones sinónimas de aminoácidos, sin efecto en funcionalidad, pero algunas de ellas se traducirán en cambios significativos en la proteína correspondiente. La comparación de aminoácidos de la proteína HA de virus porcinos, mostró entre 1976 y 1982 que las mutaciones provocaron nueve cambios de aminoácidos en esta proteína (Luo y cols, 1992). Otras observaciones sugieren que el subtipo H1 porcina tiene cambios más lentos que el H1 o H3 de virus humanos (Both y cols, 1983).

Las dos proteínas más importantes del virus desde el punto de vista de la infectividad, antigenicidad e inmunidad, son la hemaglutinina y la neuraminidasa:

HEMAGLUTININA (HA)

El segmento 4 de ARN codifica la proteína HA, llamada así por su capacidad para aglutinar hematíes. Es la responsable de la unión con el receptor de la célula huésped e interviene en la fusión y penetración del virus dentro de la célula. Es uno de los principales antígenos del virus y se encuentra en la superficie de las células infectadas, siendo desencadenante fundamental de la producción de anticuerpos neutralizantes.

Es la proteína más frecuentemente involucrada en la variación antigénica (Reina, 2002). Es sintetizada como un único polipéptido, pero la HA funcional existe como un homotrímero. Cuando se une a los receptores celulares, debe ser hidrolizada en HA1 y HA2 para permitir la fusión y posterior entrada del virus. Esta hidrólisis es llevada a cabo por proteasas celulares.

La HA se une a receptores de ácido siálico específicos de especie: en el hombre, ácido N-acetilneuramínico unido a galactosa mediante enlaces tipo α 2,6, mientras que en aves y equinos son fundamentalmente de tipo α 2,3 (Lamb y Krug, 1996; Malakhov y cols, 2006). La proteína tiene un extremo hidrófobo y un extremo hidrófilo y posee varios determinantes antigénicos, algunos son comunes para los subtipos y otros son específicos de especie. Los anticuerpos dirigidos frente a HA son neutralizantes y por lo tanto tienen un papel crucial en la

protección frente a la infección. Variaciones en la molécula de HA permiten al virus evadir la inmunidad preexistente.

Actualmente en el virus de la gripe A hay descritas 16 clases de HA que se denominan de H1 a H16. En humanos se han descrito sólo unas pocas HAs, fundamentalmente H1, H2 y H3 y ocasionalmente H5, H7 y H9. La HA 16 es la de más reciente identificación y se ha constatado en gaviotas de cabeza negra en Suecia (Fouchier y cols, 2005).

NEURAMINIDASA (NA)

La glicoproteína NA es codificada por el segmento 6 del genoma y se encuentra atravesando la envoltura viral al igual que la HA en forma de homotetrámero. Es también un antígeno importante del virus de la gripe y contiene determinantes antigénicos comunes para cada subtipo y específicos de cepa. La NA es una enzima que hidroliza las uniones α -cetósido entre un ácido siálico terminal y una D-galactosa o D-galactosamina adyacentes. Las principales funciones de la proteína NA son la eliminación de los residuos de ácido siálico de la HA y superficie celular favoreciendo la liberación de las partículas virales y su propagación y expansión a otras células. También participa en el transporte del virus a través de la mucina presente en el tracto respiratorio permitiendo la llegada del virus a la superficie de las células epiteliales del tracto respiratorio superior (Hausmann y cols, 1995; Kobasa y cols, 1997).

Actualmente en el virus de la gripe A se conocen 9 clases de NA diferentes, que se denominan de N1 a N9, de las cuales N1, N2 y ocasionalmente N7, se han descrito en humanos. Al igual que la HA y otras proteínas virales, la NA parece desempeñar un papel importante en la “discriminación” del hospedador (Wright y Webster, 2001).

En aves salvajes, sobre todo patos, es donde se han encontrado prácticamente todas las combinaciones posibles de las 16 HA y las 9 NA (Rodríguez, 1998; Pérez y Casas, 2004).

Replicación del virus de la gripe

El virus de la gripe infecta principalmente células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior. Las partículas virales se adhieren a su receptor celular, el ácido siálico, que es reconocido por la HA de la cubierta o membrana de envoltura (Weis y cols, 1988). La unión al receptor inicia la absorción de los virus a través de la endocitosis mediada por receptores. Se forma así una vesícula que se fusiona con los compartimentos intracelulares denominados endosomas (Smith y Helenius, 2004; Matlin y cols, 1981).

Gracias al bajo pH del interior de los endosomas, mantenido por medio de las bombas de protones del interior de la membrana, se desencadena la reacción de fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal (Stegmann y cols, 1987b).

El bajo pH de las vesículas llega al interior del virión por el canal iónico formado por la proteína M2 (Pinto y cols, 1992) lo que genera una desestabilización de la interacción de la RNPs con la proteína M1 y un cambio conformacional de la hemaglutinina (Stegmann y cols, 1987a; Stegmann y cols, 1987b) que favorece a la fusión de la envuelta del virus con la membrana

endosomal (Skehel y cols, 1995) y la formación de un poro de fusión a través del cual el material genético entra en el interior de la célula. Las RNPs se liberan al citoplasma donde tienen lugar los procesos de transcripción y replicación del genoma viral.

Los complejos RNP se transportan al núcleo llevando consigo la transcriptasa formada por PB1, PB2 y PA (Lamb, 2001). La transcriptasa mediante un proceso denominado “hurto de cabeza”, escinde pequeñas regiones de la caperuza del ARNm celular que utiliza como cebos para la síntesis de ARNm viral. Este ARNm viral se transporta al citosol donde tendrá lugar la traducción a proteínas.

El virus utiliza toda la maquinaria de la célula para la síntesis y procesamiento de sus proteínas. La HA y la NA, a través del aparato de Golgi, llegan a la membrana plasmática. Las NP y los componentes de la ARN-polimerasa interactúan con el ARN viral sintetizado para formar las RNPs que interactúan con la M1 que las recubre. Las RNPs viajan a la membrana plasmática celular a través de microfilamentos de actina (Avalos y cols, 1997) y llegan a regiones ricas en colesterol denominadas *lipid raft* (Ali y cols, 2000) en las que se encuentran ancladas la NA y HA. Las partículas virales salen de célula por gemación o *budding*, adquiriendo la envuelta lipídica en la que se encontraban ancladas las glicoproteínas. Para finalizar, la NA hidroliza los receptores que el virus ha arrastrado de la membrana celular, lo cual evita que se agreguen y permite su dispersión por la vía respiratoria (Liu y cols, 1995) (Figura 8).

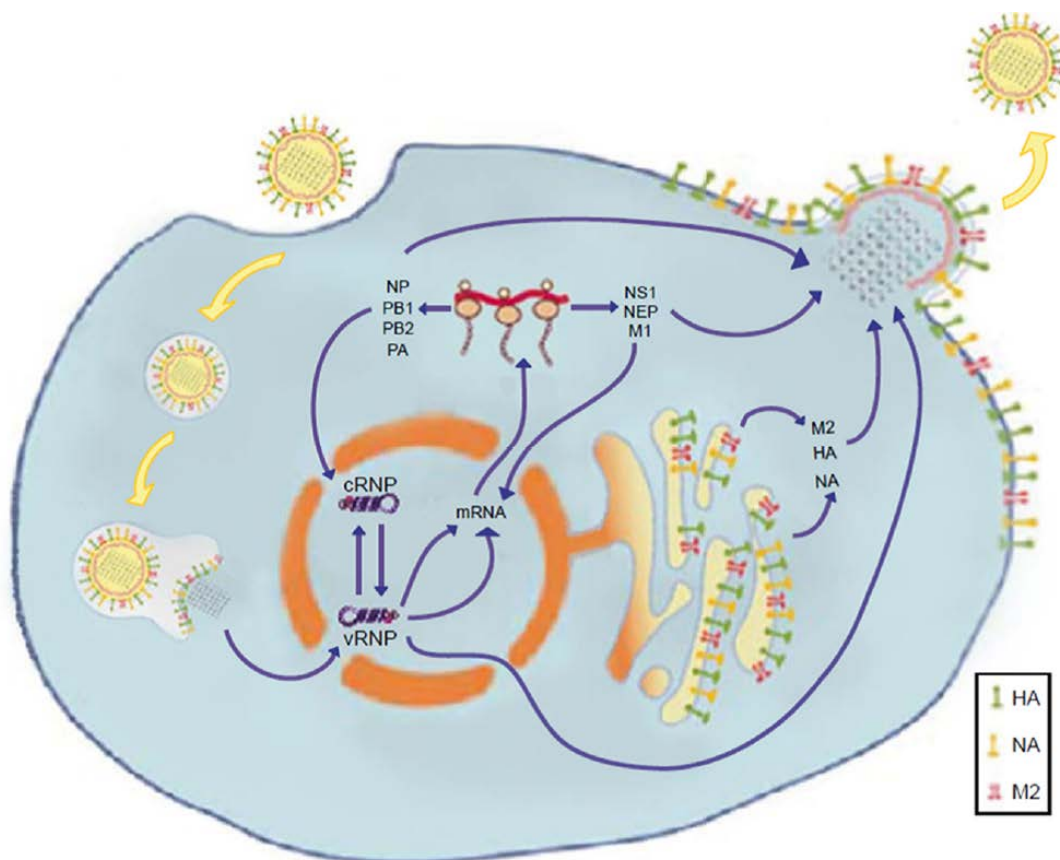


Figura 8: Esquema del ciclo de infección del virus de la gripe

Variabilidad del virus de la gripe

Los reordenamientos genómicos del virus son epidemiológicamente importantes ya que permiten grandes cambios en términos de antigenicidad de las proteínas que componen el virión. Adicionalmente a los ya comentados reordenamientos de segmentos, los ARN virales acumulan mutaciones puntuales que hacen que la cubierta antigénica cambie, dando lugar a que la respuesta inmune de la célula B de memoria no sea efectiva.

Deriva antigénica: Epidemias de gripe.

Dos de las características más importantes del virus de la gripe son la inestabilidad y la plasticidad de su ARN. Ambas características posibilitan la evolución particular e impredecible de este agente en la naturaleza. El virus es capaz de padecer cambios hasta en aproximadamente un 50% de su secuencia aminoacídica en las glicoproteínas de envoltura (hemaglutinina y neuraminidasa) y conservar aún su función. Algunas de dichas sustituciones (o en otras proteínas virales) se asocian a cambios antigénicos.

Por ser la gripe un virus con genoma a ARN que utiliza para su replicación un complejo de polimerasas virales (PA, PB1 y PB2) que no tienen capacidad de lectura de prueba (corrección de errores al momento de la copia del templado de ARN), pueden ocurrir errores en el proceso de copia de las bases complementarias (mutaciones). Estas mutaciones (así como las promovidas por la presión de selección positiva del sistema inmune) promueven cambios antigénicos menores en las glicoproteínas de envoltura (en inglés "*antigenic drifts*") y se asocian a las epidemias anuales. La ocurrencia de algunas mutaciones específicas puede afectar el tropismo del virus por un determinado hospedador u órgano, la virulencia de las cepas y su transmisibilidad. Estos pequeños cambios son los responsables de la necesidad de revisar y cambiar la composición antigénica de las vacunas antigripales de cada nueva temporada invernal.

En el caso del virus de la gripe A de humanos y otros mamíferos, el sistema inmunológico juega un papel importante en la selección de mutantes, mientras que en el virus de la gripe A en especies de aves y virus de la gripe B y C, la selección de mutantes no tiene un papel tan importante en la emergencia de derivas antigénicas (Wright P y Webster, 2001).

Salto antigénico: Gripe pandémica.

Las pandemias de gripe se deben a la aparición de una cepa antigénicamente nueva ("*antigenic shifts*"), es decir con una HA y/o NA perteneciente a un subtipo previamente no detectado en humanos, para los cuales la especie humana no tiene inmunidad.

Como se ha comentado anteriormente, los genes del virus de la gripe A se encuentran codificados en segmentos separados, permitiendo que los virus puedan intercambiar segmentos completos con otras variantes virales y generar nuevas entidades (Salazar y cols, 2010). Este hecho, ocurre con frecuencia en la naturaleza y es tal vez el principal origen de cepas con potencial pandémico.

El principal mecanismo biológico responsable de este fenómeno ha sido el intercambio de genes entre cepas humanas y animales o entre cepas animales (especialmente porcinas y aviares) y su transmisión a la especie humana (cruce de la barrera interespecie) (Shortridge, 1995; Kuiken y Cols, 2006).

Los cerdos han sido considerados durante mucho tiempo el intermediario más importante y la principal fuente de nuevas variantes de virus de la gripe. Sin embargo, también encontramos variantes que pueden ser transmitidas directamente por las aves, como el caso del virus H5N1 que causó importantes brotes epidémicos en Asia en 2001. De hecho, se cree que éste es el primer paso de un virus zoonótico antes de que adquiriera la capacidad de ser transmitido de humano a humano. La transmisión directa del virus de la gripe porcina a humanos fue documentada por primera vez en Wisconsin en 1976 (Scholtissek y cols, 1985).

Las células susceptibles en los cerdos tiene receptores a los cuales se unen tanto los virus de la gripe de mamíferos como los de las aves, produciéndose en sus células una reasociación de segmentos y la emergencia de nuevas variantes (Thacker y Janke, 2008). Por esta razón, los cerdos son considerados como “cocteleras” y la principal fuente de generación de nuevos virus de la gripe con potencial pandémico (Scholtissek y cols, 1985; Webster y cols, 1992; Castrucci y cols, 1993; Brown y cols, 1998). Esto explicaría el hecho de que las pandemias a menudo surgen en áreas geográficas donde los humanos, cerdos y aves acuáticas viven en estrecha proximidad (Suarez y cols, 1998; Yuen, 1998; Hayden y Palese, 1997; Treanor, 2005).

En estos cambios antigénicos mayores, responsables del origen de las pandemias de gripe, se observan características comunes: su aparición brusca y el hecho de que son antigénicamente distintos de los virus gripales que circularon en humanos hasta el momento.

Origen del virus pdm H1N1 de 2009.

En el caso del virus responsable de la pandemia A H1N1 de 2009, el análisis filogenético de los diferentes fragmentos genómicos del virus muestra un cuádruple origen. En una fase final parece haberse producido una modificación triple del virus porcino A H1N1 (linaje clásico porcino norteamericano, linaje aviar norteamericano y linaje humano H3N2) que había emergido en Norteamérica en los años noventa, y que ha sustituido los segmentos correspondientes a los genes de la proteína matriz (M) y de la neuraminidasa (NA) por los del virus porcino A H1N1 de linaje euroasiático (Dawood y cols, 2009; Garten y cols, 2009).

En Estados Unidos, en el año 1918, a los pocos meses de la eclosión de la pandemia de gripe llamada española, el nuevo virus A (H1N1) de origen aviar, causante de ésta, pasó al cerdo, donde circuló de forma antigénicamente estable entre los años treinta y noventa del siglo pasado, produciendo la “gripe porcina clásica” o endémica.

Esta cepa, en los años 1997-1998 se reordenó con el virus humano H3N2 que circulaba desde 1968, y con un virus influenza aviar de subtipo desconocido. De todo ello, resultó un virus con una reordenación triple: porcina, humana y aviar, que desde entonces circula en los cerdos de Norteamérica junto a la cepa clásica. (Shinde y cols, 2009; Newman y cols, 2008). Hasta Abril

de 2009, solo se había reportado transmisión del virus de la gripe de origen porcino de humano a humano de manera irregular.

En Europa, la cepa porcina clásica se detectó ocasionalmente en los años cincuenta, y de forma extensa desde 1976, debido seguramente a introducciones a partir de cerdos importados de Estados Unidos. Alrededor del año 1979 dejó de circular al ser desplazado por un virus de probable origen aviar, que se adaptó plenamente a la transmisión porcina, y que desde entonces circula en los cerdos de Europa y Asia, constituyendo la cepa porcina de Eurasia, que no ha sido detectado fuera de dichos continentes. Los segmentos genéticos de este virus son filogenéticamente distintos a los del virus porcino clásico americano.

Antes del 2005, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) recibían informes de uno o dos casos de infecciones humanas por virus de la gripe de origen porcino clásico por año. En 2005 se reporta el primer caso de infección humana con virus de gripe A (H1) de origen porcino producto de triple reordenamiento en los Estados Unidos. Desde Diciembre 2005 hasta Febrero 2009, los CDC recibieron 11 notificaciones de infección humana con virus de la gripe A (H1) de origen porcino con reordenamiento triple.

El 24 de abril de 2009, La Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó una primera alerta indicando la existencia de casos confirmados de la gripe A (H1N1) (Cohen y Enserink 2009; CDC 2009b; Butler 2009) (Figura 9) producido por el virus porcino A (H1N1), resultado de una recombinación entre el referido virus porcino americano reordenado de 1997-1998 y el virus porcino de Eurasia.

La CDC desarrolló en 2008 una prueba basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa con retrotranscripción (rt-PCR) en tiempo real aprobada por la "*Food and Drug Administration*" (FDA) de los Estados Unidos y que sirvió para identificar los primeros casos en Norteamérica. El análisis de los 49 primeros aislamientos del entonces llamado "virus de la gripe humana de origen porcino" se realizó primero por secuenciación en la CDC el 5 de mayo de 2009 y dio como resultado que todos virus aislados tenían una similitud del 99 al 100% (se trataba del mismo virus).

En resumen, el nuevo virus contiene 5 segmentos de origen porcino (HA, NA, NP, NS y M), 2 aviares (PB2 y PA) y 1 humano (PB1):

- Los genes codificantes de la hemaglutinina, la nucleoproteína y las proteínas no estructurales (NS) provienen directamente del clásico linaje porcino "norteamericano", que pudo ser rastreado retrospectivamente en virus de la gripe circulante en 1918.
- Los dos genes codificantes de la neuraminidasa y la matriz provienen del linaje porcino "eurasiático", donde se introdujeron a partir de virus de gripe de aves alrededor de 1979.
- Dos de los genes codificantes del complejo de polimerasas (PB2 y PA) provienen del linaje aviar "norteamericano" y fueron introducidos en la población porcina alrededor de 1998.

- El otro gen codificante del complejo de polimerasas (PB1) se originó a partir de virus causantes de la gripe estacional humana (H3N2) alrededor del mismo año. Es conocido que dicho segmento de origen aviar se introdujo en la población humana en 1968.

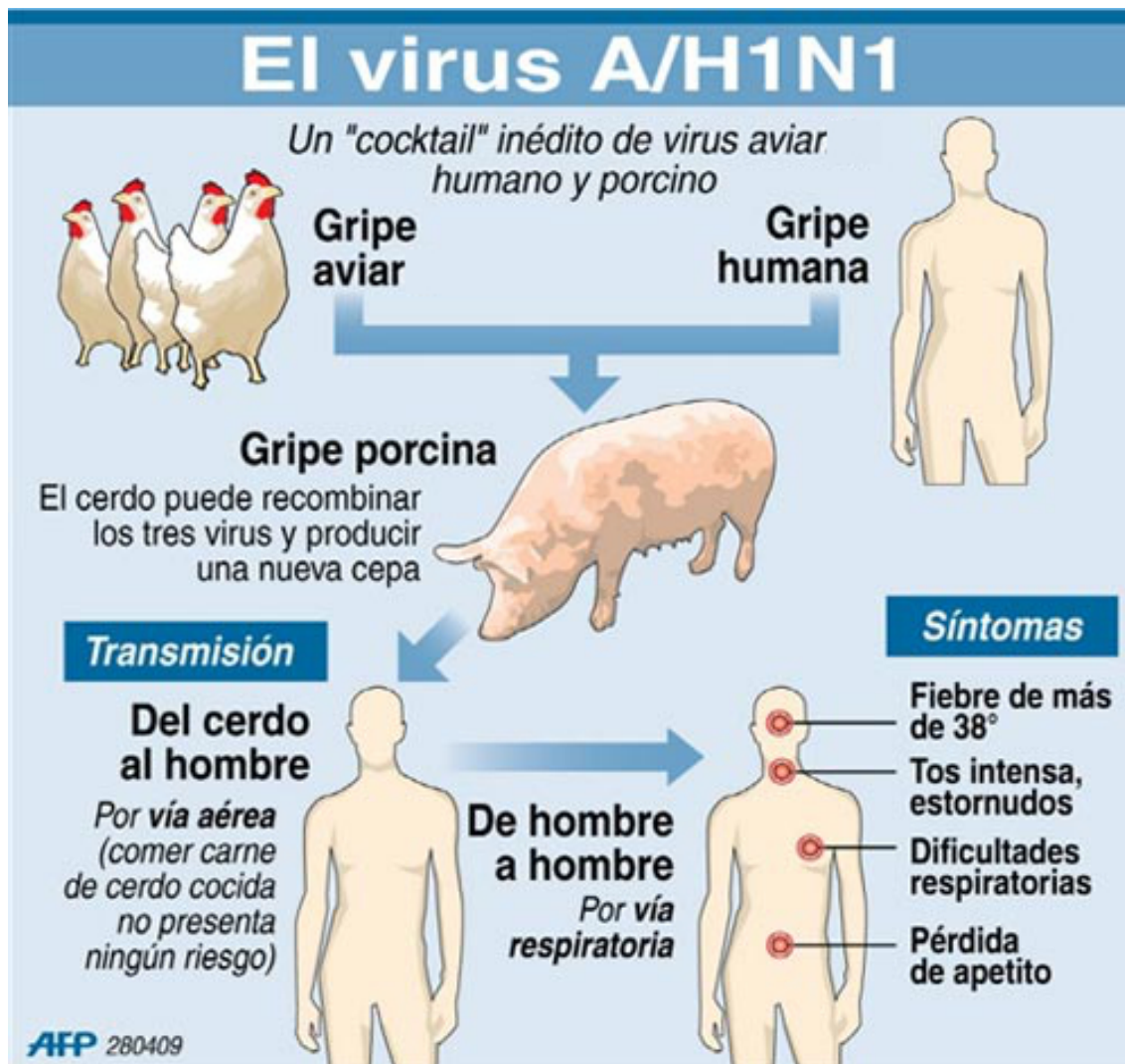


Figura 9: Esquema del origen del virus H1N1 pdm de 2009. El origen de la infección es una variante de la cepa H1N1, con material genético proveniente de una cepa aviar, dos cepas porcinas y una humana, que sufrió una mutación y dio un salto entre especies (o heterocontagio) de los cerdos a humanos, para después permitir el contagio de persona a persona. Fuente: <http://www.tusaludybienestar.es/consejos-de-salud/que-es-la-gripe-a/>

Factores de virulencia y transmisibilidad

En el caso de la pandemia de 2009, el virus presentó una baja virulencia pero una alta transmisibilidad. Aunque no se conocen con certeza todos los factores que determinan la patogenicidad (capacidad de producir enfermedad) y virulencia (gravedad de la enfermedad) de los virus de la gripe, se puede afirmar que algunos de estos factores se asocian a un amplio tropismo tisular y a la habilidad de replicarse sistémicamente. El tropismo viral se refiere al patrón de infección de ciertos órganos/tejidos y dentro de ellos a determinados tipos celulares,

debido a proteínas de superficie (receptores) en esos tipos celulares. Las proteínas de la superficie viral reconocen a su receptor específico en cada una de sus células hospedadoras, lo que facilita el contacto inicial y es indispensable para llevar a cabo la interiorización del virus (Strauss y Strauss, 2008).

La proteína HA viral reconoce en la célula blanco el binomio ácido siálico/galactosa presente en diferentes proteínas de membrana celular (Weiss y cols, 1988). Esta clase de receptores se encuentran en las células bronquiales no ciliadas, en células alveolares y en la conjuntiva de los seres humanos. La HA de los virus humanos reconocen los residuos de ácido siálico/galactosa unidos por un enlace α 2-6, localizándose en células epiteliales de la mucosa nasal y paranasal, en la faringe, tráquea, bronquios y bronquiolos (Yamada y cols, 2006) (Figura 10).

La virulencia asociada al virus de la gripe tiene un origen multigénico, ya que se asocia a la expresión de los genes codificantes de la HA, la NA, la polimerasa básica 1 (PB1), PB2, y de las proteínas NS1 y PB1-F2 (PB1 Frame2, codificada en forma parcialmente yuxtapuesta, aunque en un marco alternativo de lectura al correspondiente a PB1 y expresada en una significativa proporción de cepas del tipo A). En el genoma de las cepas analizadas hasta el momento de la aparición del nuevo virus emergente, PB1-F2 exhibía una mutación genómica que tornaría funcionalmente inactivo al péptido derivado, ya que no abarca el dominio de localización mitocondrial, responsable de su función proapoptótica.

Típicamente la gripe es transmitida por aerosoles que contiene virus y que son emitidos por personas infectadas al toser o estornudas. La gripe puede también transmitirse por saliva, secreciones nasales, heces y sangre de aves infectadas (Mathieu y cols, 2010)

El virus de la gripe es relativamente lábil, permaneciendo viable unas pocas horas a temperatura ambiente. Tiene capacidad infectante durante un lapso de 24-48 h en superficies no porosas como el acero inoxidable y el plástico, y hasta 12 h en la ropa, papel o pañuelos descartables de dicho material. Los virus de la gripe pueden transferirse con éxito a las manos aún después de 24 h de haberse contaminado la superficie con la que se las pone en contacto. La desecación lo inactiva, al igual que el alcohol, los detergentes, y las condiciones de acidez o alcalinidad de los medios líquidos. El hervor de agua con detergente durante por lo menos 5 minutos inactiva al virus, lo que es sugerido para el tratamiento de utensilios o vajilla de cocina potencialmente contaminados.

Si bien, la viabilidad es limitada con respecto a otros virus, el agente de la gripe estacional y el nuevo virus emergente de la gripe A (H1N1) de origen porcino (virus pandémico de la gripe A H1N1/09) pueden no sólo transmitirse mediante los aerosoles formados al toser y/o estornudar un individuo infectado, sino también mediante el mero contacto con superficies contaminadas muy diversas (por ejemplo, teléfonos, picaporte de puertas, canillas, o teclados / ratones de ordenadores, elementos de sujeción en el transporte público, etc.) con las que están en contacto múltiples usuarios, utensilios o fómites de enfermos, o al estrechar las manos

contaminadas de otro individuo. De allí la importancia y efectividad del lavado frecuente de manos durante 20 a 30 segundos con agua y jabón, o con alcohol-gel.

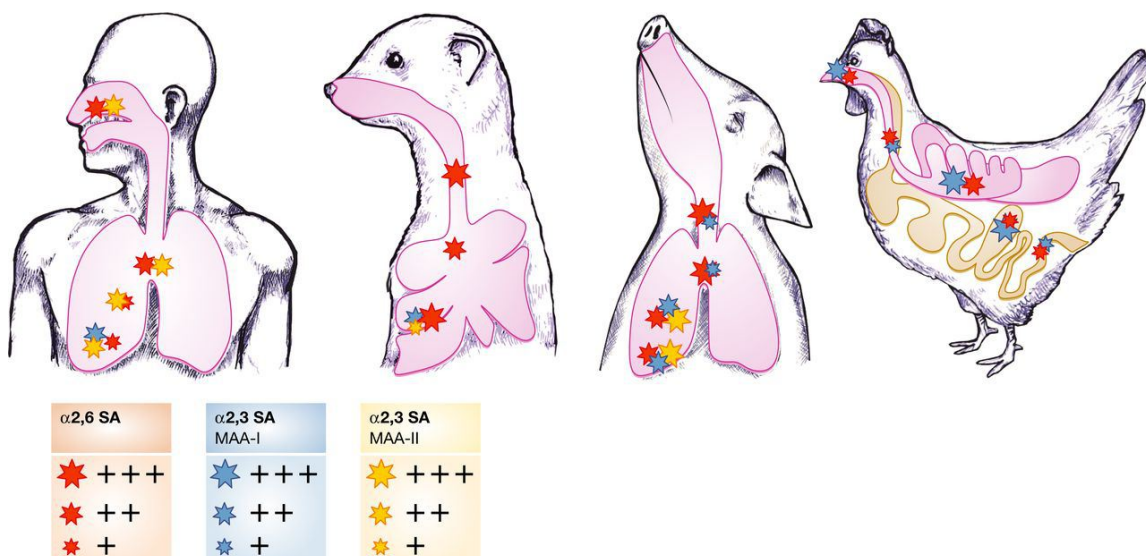


Figura 10: Distribución de las diferentes especies de ácido siálico/galactosa varía en los animales y los virus de la gripe difieren en su capacidad para reconocerlos (Suzuki y cols, 2000).

La viabilidad del virus de la gripe es favorecida por las condiciones de frío y baja a moderada humedad, lo que se asocia a una mayor transmisión en los meses de invierno (Kilbourne, 1979; Baumgartner y cols, 2012).

El virus de la gripe posee unas características de estacionalidad muy marcada entre las estaciones frías y cálidas en los países con diferencias climáticas importantes (Kilbourne, 1987). Esta estacionalidad aparece de igual forma en el hemisferio norte y sur.

La enfermedad alcanza sus picos de mayor prevalencia durante el invierno, y debido a que el hemisferio norte y el hemisferio sur atraviesan esta estación en diferentes momentos existen, de hecho, dos temporadas de gripe cada año: de octubre a abril en el hemisferio norte y de mayo a septiembre en el hemisferio sur. Este es el motivo por el que la OMS (asesorada por los Centros Nacionales para la Gripe) hace recomendaciones para dos formulaciones vacunales cada año: una para cada hemisferio (OMS, 2006). Además del clima y la humedad, el estilo de vida de las poblaciones y otros factores están asociados a la aparición de la gripe (Gutiérrez y cols, 2001).

No está completamente claro por qué las epidemias de gripe ocurren de esta forma estacional y no de manera más uniforme a lo largo de todo el año. Una posible explicación es que el contacto interpersonal es más estrecho en invierno debido a un mayor tiempo de vida en el interior de domicilio y edificios, y esto facilitaría una transmisión del virus de persona a persona. Otra explicación es que las temperaturas más altas de los meses de verano y la mayor sequedad del aire limitaría la expulsión del moco por deshidratación del mismo, dificultando la transmisión a través del mecanismo aerosol que se da durante la tos o el estornudo. El virus

también puede sobrevivir mucho más tiempo en los fómites (objetos y superficies transmisores como pomos de puertas) cuando el ambiente es más frío. Los factores ambientales también pueden ser un punto clave en la transmisibilidad del virus. Los virus sobreviven más fácilmente en los aerosoles producidos en condiciones de baja temperatura (por debajo de 5°C) y baja humedad, que son las predominantes en los países de estacionalidad marcada (Lowen y cols, 2007), con la ventilación reducida, el hacinamiento y la escolaridad. También se ha propuesto que la deficiencia de vitamina D durante los meses de invierno reduciría la efectividad del sistema inmune y entonces podría favorecer la estacionalidad del virus (Cannell y col, 2006).

Todos estos factores tienden a converger en los períodos invernales y por ello han sido propuestos como determinantes, sin que exista una explicación definitiva (Tacker y cols, 1986).

La estacionalidad en zonas de clima tropical y subtropical no es tan marcada, existiendo casos de gripe a lo largo de todo el año. Históricamente, el sudeste de Asia, debido a la estrecha convivencia del hombre con sus animales domésticos (Webster y cols, 1992), ha sido considerado una zona ideal para la generación de cepas pandémicas. Con un nivel bajo y constante de circulación de los virus de la gripe durante todo el año, el sudeste de Asia es considerado el epicentro ideal para la generación de nuevas cepas que luego se transmiten al resto del mundo (Viboud y cols, 2006; Rambaut y cols, 2008).

1.1.2 Aspectos clínicos de la infección por el virus H1N1 pdm 2009

Epidemiología

Durante la temporada de gripe de 2009, tanto la duración de la onda pandémica (11 semanas), como el nivel de intensidad gripal, se situaron en el rango de los observados en las últimas trece temporadas gripales anteriores al brote pandémico en España (Ministerio de Salud y Política Social, 2010) (Figura 11).

Al contrario de lo que ocurre en la gripe estacional, la gripe pandémica se focalizó en las edades jóvenes (Jhung y cols, 2011), lo que responde a un patrón típico de otras pandemias (Simonsen y cols, 2000) (Figura 12).

En cuanto a los factores predisponentes para padecer la enfermedad fueron la obesidad, diabetes, enfermedades pulmonares previas y embarazo. Además, la mayoría de los casos que requirieron su hospitalización presentaban alguna comorbilidad o patología previa (Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic H1N1 2009 Influenza y cols, 2010).

La mortalidad que se ha presentado durante esta pandemia no ha sido superior a la que se observa durante la gripe estacional. En un estudio comparativo entre países realizado por (Vaillant y cols, 2009), en donde se ha registrado la epidemiología de muertes por país, se ven tasas muy dispares. Mientras los países de América parecen ser los más castigados en cifras de mortalidad (Uruguay, 4.45; Argentina 3.37; México 1.12; EUA 0.66 por millón de habitantes),

los países de Europa no parecen tener las tasas tan altas (España, 0.04 por millón de habitantes).

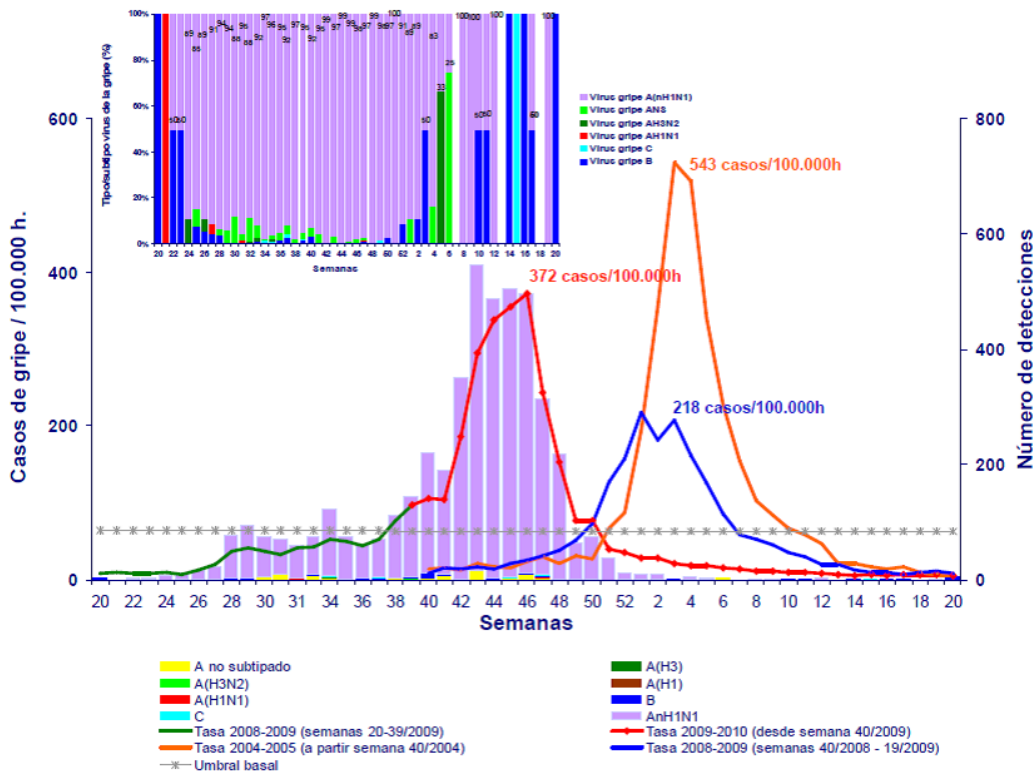


Figura 11: Tasa de incidencia semanal de gripe y número de detecciones por tipo/subtipo viral. Temporada 2009-2010. Sistemas centinela. España.

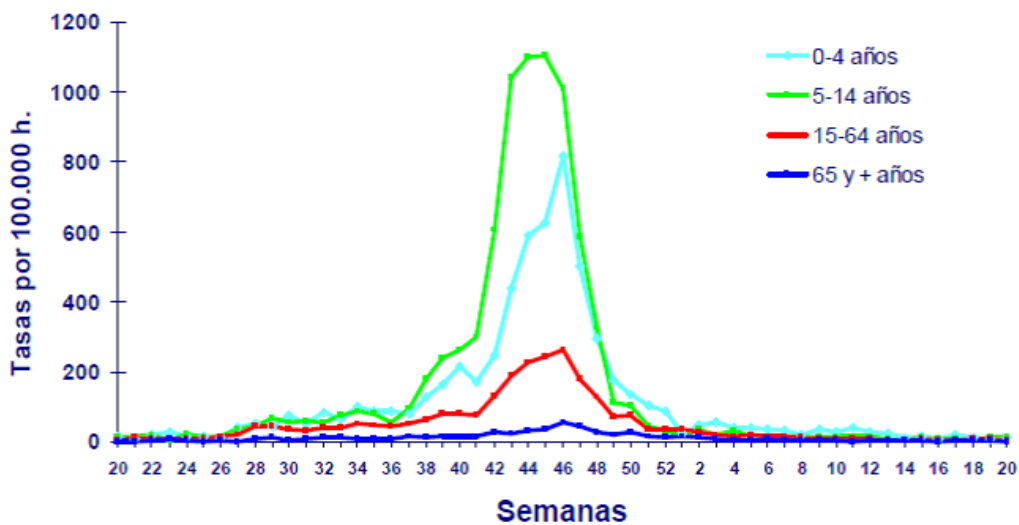


Figura 12: Evolución de la incidencia de gripe por grupos de edad. Temporada 2009-2010. Sistemas Centinela. España.

Cuadro clínico

Las manifestaciones clínicas que han desarrollado los pacientes han sido múltiples, pero van desde casos leves hasta la muerte (Meunier y cols, 2009). Actualmente, se conoce parte del espectro de las manifestaciones clínicas de la infección por el nuevo virus de la gripe A (H1N1). Se sabe que es un infección transmisible, que puede diseminarse por aerosoles o por el contacto persona a persona.

El periodo de incubación es de 1 a 7 días, siendo el promedio 3 días, dependiendo en parte de la dosis del virus y el estado inmunitario del hospedador. La enfermedad se inicia en general bruscamente, con fiebre superior a 38°C en la mayoría de los casos, cefalea, dolores musculares y articulares, odinofagia, rinorrea, tos seca y malestar general. En caso de que la enfermedad progrese, ésta se caracteriza por presentar los síntomas típicos que sugieren que el paciente tiene daño de órgano diana: dolor torácico, mala oxigenación (manifestando como taquipnea o hipoxemia), algún grado de insuficiencia cardiaca, deshidratación grave, alteración del sistema nervioso central y/o empeoramiento de alguna de sus comorbilidades (asma, EPOC, insuficiencia renal, diabetes, etc.).

Tabla 5: Manifestaciones clínicas de la enfermedad. Modificado de Echevarria-Zuno y cols, 2009.

	Echevarria-Zuno y cols, 2009	Cao y cols, 2009
Fiebre (%)	92	67.5
Tos (%)	91	69.5
Cefalea (%)	88	19.5
Odinofagia (%)	50	36.6
Mialgias (%)	72	10
Rinorrea (%)	77	23.7
Congestión nasal (%)	60	16
Otros		
Fatiga (%)	-	10
Congestión conjuntival (%)	-	2.8
Náusea/vómito (%)	-	1.9
Dolor torácico (%)	-	0.5

Los casos de máxima gravedad se caracterizan por signos de patología grave del tracto respiratorio (p.e. hipoxemia refractaria que amerita oxigenoterapia, radiografía de tórax anormal con infiltrados o áreas en vidrio deslustrado, requerimiento de ventilación mecánica, etc.), trastornos del sistema nervioso central (encefalopatía o encefalitis), complicaciones debidas a una presión arterial baja (shock, fallo multiorgánico), miocarditis, rabdomiólisis o, incluso, sobreinfección bacteriana

Además, hay algunos parámetros en la analítica convencional que, aunque no patognomónicos, se han observado que se presentan frecuentemente en el transcurso de la

enfermedad. Pacientes que cursan con linfopenia (hasta en el 68% de los adultos) e hipopotasemia (hasta en el 25% de los casos) (Cao y cols, 2009) o pacientes en donde se encontró además aumento de la creatin-kinasa sérica, aumento de la deshidrogenasa láctica y linfopenia (Perez-Padilla y cols, 2009).

Una mención especial debemos hacer al tema de las sobreinfecciones bacterianas. Las pandemias previas nos han enseñado que hay presencia de otros agentes (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* grupo A) como contribuyentes en la morbimortalidad (Brundage y Shanks, 2008; Moresn y cols, 2009).

Tratamiento y profilaxis

El tratamiento farmacológico ha demostrado reducir las complicaciones del virus A(H1N1) en personas con factores de riesgo, así como la replicación viral y, consecuentemente, la gravedad y los días de síntomas. Estos efectos beneficiosos se observan especialmente con la administración precoz (Perez-Padilla y cols, 2009).

Sin embargo, un reciente meta-análisis en población adulta (Jefferson y cols, 2009) y otro en población pediátrica (Shun-Shin y cols, 2009) han demostrado que los fármacos tienen una efectividad clínica moderada contra los síntomas de esta infección. Parece ser que sí que son efectivos en la post-exposición (profilaxis) en pacientes que presentan la enfermedad, confirmada por laboratorio, pero que se necesitan más ensayos clínicos para saber exactamente si ayudan o no a prevenir las complicaciones de la infección.

De momento, se recomienda el tratamiento con antivirales sólo en los siguientes casos:

- Personas que cumplen criterios de ingreso hospitalario (sin esperar a las pruebas de confirmación).
- Personas con factores de riesgo en los que la valoración individual lo aconseje (por pertenecer a grupos de riesgo).

Los tratamientos de elección son los inhibidores de la neuraminidasa:

- Oseltamivir (Tamiflu®) es un inhibidor de la neuraminidasa disponible en cápsulas o en suspensión oral para el tratamiento de la gripe en pacientes mayores de 1 año y que han estado sintomáticos al menos 2 días. También se utiliza en pacientes hospitalizados.
- Zanamivir (Relenza®) es un inhibidor de la neuraminidasa que se ha formulado en inhalación para pacientes con síntomas de gripe mayores de 7 años, que tienen síntomas leves desde al menos 2 días.
- Peramivir es el tercer agente de esta familia, de formulación intravenosa, autorizado durante esta pandemia. Su uso sólo está aceptado cuando: a) el paciente no ha respondido a la terapia oral o inhalada, o b) si la biodisponibilidad de los otros fármacos (oseltamivir o zanamivir) no se garantiza por otra vía que no sea la intravenosa (por mala absorción gastrointestinal, estado de shock, mala perfusión enteral).

A pesar de la existencia de estos tres antivirales, en algunos países ya se han detectado variaciones genotípicas del virus que le confieren resistencia al oseltamivir (Lackenby y cols, 2008; Hurt y cols, 2009).

En poblaciones especiales como son las mujeres embarazadas se estima un riesgo de hospitalización cuatro veces mayor que en la población general (Jamieson y cols, 2009). Aunque la presentación clínica del virus A (H1N1) en embarazadas es habitualmente la misma que en pacientes no embarazadas, se ha observado que las que adquieren el virus, habitualmente presentan un cuadro leve y no complicado. Sin embargo, la enfermedad puede progresar con insuficiencia respiratoria grave, neumonía y/o complicarse secundariamente con sobreinfecciones bacterianas. El embarazo no se debe considerar una contraindicación para el uso del oseltamivir y/o zanamivir (Jamieson y cols, 2009), ya que, en teoría, los beneficios potenciales superan los riesgos en la administración de este fármaco.

La biodisponibilidad de zanamivir por vía oral es muy baja, lo que indica que la exposición sistémica es aún más baja que la de oseltamivir y, por tanto, la exposición fetal, teóricamente, es menor. Eso haría que zanamivir fuera, en teoría, el fármaco de elección en mujeres embarazadas, pero los expertos opinan que en caso de una afectación sistémica importante de la madre, oseltamivir podría ofrecer ventajas y, por ello, es el antiviral recomendado (Burioni y cols, 2009). Se ha de tener en cuenta que la evidencia de la utilización en este momento de la combinación oseltamivir/zanamivir en mujeres embarazadas es muy limitada (clasificación C de la Food and Drug Administration, es decir, que no hay estudios clínicos acerca de la seguridad en esta población).

La transición de la madre a la función normal de los sistemas inmune, cardiovascular y respiratorio en el posparto no ocurre inmediatamente. Es por esto que los CDC recomiendan incluir en la población de riesgo a las pacientes en el período de posparto y hasta dos semanas después, independientemente de la forma en que haya terminado el embarazo (parto, cesárea, aborto, parto prematuro, muerte fetal).

El uso de oseltamivir y zanamivir no está contraindicado con la lactancia. Sin embargo, en las fichas técnicas de ambos medicamentos se recomienda administrarlos sólo cuando los beneficios superen los riesgos potenciales.

En los pacientes con insuficiencia renal crónica, con aclaramiento de creatinina de 10-30 ml/min, se han de reducir las dosis de tratamiento (75 mg 1 vez al día).

En pacientes que presenten complicaciones graves, como neumonía o insuficiencia respiratoria graves, y que requieran ingreso en unidades de cuidados intensivos y con sospecha de una disminución de la absorción enteral, se recomienda administrar mayores dosis (150 mg cada 12 h de oseltamivir) y prolongar la duración del tratamiento incluso hasta 10 días (Patel y cols, 2009; Kumar y cols, 2009). Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio controlado para evaluar los beneficios de esta dosis.

Tabla 6: Posología de tratamiento de antivirales para virus A (H1N1). Modificado de Huerta-García y cols, 2010.

Medicación	Tratamiento (5 días)
Osetamivir (Tamiflu®)*	
Adultos Niños ≥ 12 años	75 mg/12h
Peso	
≤ 15 kg	30 mg/12h
> 15 y < 23 kg	45 mg/12h
> 23 y < 40 kg	60 mg/12h
> 40 kg	75 mg/12h
Zanamivir (Relenza®)	
Adultos	10mg (2 inhalaciones de 5 mg/12h)
Niños	≥ 7 años 10 mg (2 inhalaciones de 5 mg/12h)

*En pacientes graves se han utilizado dosis de hasta 150 mg/12h de osetamivir.

Indicaciones profilácticas

La quimioprofilaxis está indicada en las personas que han tenido algún contacto con el virus y se encuentren en alguno de los siguientes grupos:

- Personas con alto riesgo de complicaciones.
- Trabajadores sanitarios y personal del área de urgencias.
- Mujeres embarazadas.

En los pacientes que sean tributarios de recibir la profilaxis, se hará igualmente con osetamivir o zanamivir a las dosis recomendadas por los organismos internacionales CDC y OMS (Tabla 7). Sin embargo, algunos expertos como (Moghadas y cols, 2009) sugieren que la profilaxis en momentos de pandemia puede ser contraproducente por el riesgo de que se desarrollen resistencias a los antivirales por cepas circulantes.

Tabla 7: Posología de profilaxis de antivirales para virus A (H1N1). Modificado de Huerta-García y cols, 2010.

Medicación	Profilaxis (10 días)
Osetamivir (Tamiflu®)*	
Adultos Niños ≥ 12 años	75 mg/24h
Peso	
≤ 15 kg	30 mg/24h
> 15 y < 23 kg	45 mg/24h
> 23 y < 40 kg	60 mg/24h
> 40 kg	75 mg/24h
Zanamivir (Relenza®)	
Adultos	10mg (2 inhalaciones de 5 mg/24h)
Niños	≥ 5 años 10 mg (2 inhalaciones de 5 mg/24h)

*En pacientes graves se han utilizado dosis de hasta 150 mg/12h de osetamivir.

Antivirales

Existen dos clases de antivirales aprobados para el tratamiento de la gripe, los adamantanos y los inhibidores de la neuraminidasa (Figura 13). Los adamantanos (amantadina y rimantadina) bloquean el canal iónico de la proteína M2 de forma que inhiben la liberación intracelular del virus. Estos fármacos generalmente se han asociado a resistencias y efectos tóxicos ocasionales. Los inhibidores de la neuraminidasa viral (oseltamivir, zanamivir y peramivir) evitan la liberación de los virus al tracto respiratorio y su posterior difusión (Moscona, 2005).

En el caso de la gripe pandémica el uso de adamantanos no fue posible debido a la resistencia natural que presentaba el gen M2 de origen porcino linaje euroasiático del virus H1N1pdm. Por tanto, el tratamiento más utilizado consistió en la administración de oseltamivir (vía oral) y de zanamivir (inhalado), aunque en algunos países también se llegó a dispensar peramivir (zanamivir de uso parenteral) (Leung y Nicoll, 2010). Al inicio de la pandemia, el virus era sensible al zanamivir y oseltamivir, sin embargo los casos de resistencia al oseltamivir, aunque escasos, se detectaron rápidamente sin clara asociación con el uso de oseltamivir (OMS, 2009a; Inoue y cols, 2010).

El principal cambio genético asociado a la resistencia al oseltamivir consiste en la sustitución de una histidina por una tirosina en la posición 275 del gen de la neuraminidasa (H275Y). Esta mutación no afecta a la susceptibilidad frente a zanamivir puesto que su diana terapéutica dentro de la molécula de la NA tiene una base genética diferente (Gaur y cols, 2010).

La administración tardía de la terapia antiviral se ha descrito como un factor de riesgo (Viasus y cols, 2011a; Jain y cols, 2009). En un estudio español se demostró que el tratamiento con oseltamivir durante las primeras 48 horas del inicio de la enfermedad, estaba asociado a un mejor pronóstico (Viasus y cols, 2011b). Sin embargo, otros autores documentaron casos de pacientes que, aun bajo la acción del tratamiento, continuaban eliminando virus más de 10 días desde su instauración (Liang y cols, 2009).

La OMS publicó una guía actualizada en agosto de 2009 aconsejando el uso de zanamivir para el tratamiento de pacientes infectados por una cepa de gripe resistente al oseltamivir (OMS, 2009b). Sin embargo, este tratamiento está contraindicado en pacientes EPOC, por el tipo de administración inhalada y su uso también es complicado en niños y lactantes, así como en pacientes graves con ventilación mecánica debido a que su alto contenido en lactosa que puede bloquear el tubo.

Existen otros tratamientos antivirales no tan utilizados como por ejemplo la ribavirina, que inhibe la enzima celular inosina-monofosfato, oligonucleótidos que interfieren con la traducción del ARN viral, inductores del interferón e inhibidores de la NS1 (De Clercq, 2006). También existe la posibilidad de administrar una terapia de combinación de antivirales, pero no hay suficiente información clínica. En un modelo in vitro de células MDCK infectadas por un virus gripal pandémico, resistente al oseltamivir, se demostró que la combinación triple de amantadina, ribavirina y oseltamivir era eficaz (Nguyen y cols, 2009). En un estudio de ratones

infectados con el virus pandémico también se demostró que la combinación de antivirales supuso un aumento de la supervivencia en estos animales (Masihi y cols, 2007; Ilyushina y cols, 2007).

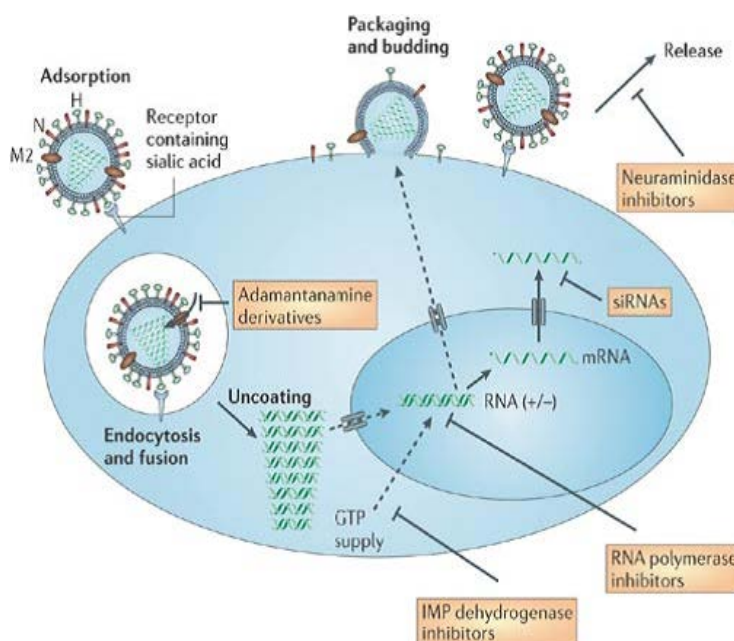


Figura 13: Fundamento de los principales antivirales utilizados en el tratamiento de la gripe (De Clercq, 2006).

Vacunación

La velocidad de fabricación de una vacuna durante una pandemia debe ser rápida, sin olvidar la seguridad y la realización de estudios que aseguren su eficacia. El 15 de septiembre de 2009, la FDA otorgó licencias para la comercialización de vacunas contra el virus H1N1pdm a cuatro compañías farmacéuticas: CSL Limited, MedImmune LLC, Novartis Vaccines y Diagnostics Limited, y Sanofi Pasteur Inc. Puesto que el proceso de fabricación era el mismo que el utilizado para las vacunas estacionales, la licencia se otorgó simplemente planteando un cambio de cepa en el proceso de fabricación, por lo que no se requirieron resultados de su eficacia (Rio, 2010). El 30 de septiembre la empresa GSK también obtuvo la licencia para comercializar su vacuna (Agency EM, 2009). Todas las vacunas se basaban en la cepa A/California/07/2009 (H1N1) y estaban disponibles tanto en formulaciones inactivadas como atenuadas. Inicialmente la vacuna se previó limitada, de forma que la ACIP estableció cinco grupos de la población de máxima prioridad de vacunación, en el que se incluían, embarazadas, personas cercanas a bebés menores de 6 meses, personal sanitario y médico de emergencia o personal sanitario en contacto directo con pacientes o material infeccioso, niños de 6 meses a 4 años, y niños y adolescentes con factores de riesgo (de 5-18 años) (Diseases CNCflaR, 2009).

Los estudios de seguridad e inmunogenicidad llevados a cabo durante la pandemia del 2009, demostraron niveles similares a los de la temporada anterior (Prevention CfDCa, 2009). Se ha

demostrado que una sola dosis de la vacuna es altamente inmunogénica en adultos, recomendándose inmunizar a niños de 6 meses a 9 años con dos dosis separadas por 4 semanas (Plennevaux y cols, 2010).

1.2 Inmunopatogénesis de la gripe A (H1N1) pdm 2009

1.2.1 Respuesta inmune a la infección por el virus de la gripe

Existe un sistema inmune especializado en la superficie de las distintas mucosas cuya principal función es proteger la mucosa de la colonización de potenciales patógenos microbianos, evitar la absorción de determinados antígenos y prevenir el desarrollo de respuestas inmunes inadecuadas.

El tracto respiratorio se encuentra protegido por estructuras linfoides asociadas a las mucosas que genéricamente se conocen con las siglas MALT (tejido linfoide asociado a las mucosas) (Brandtzaeg, 1989; Brandtzaeg y cols, 1999). Estas estructuras se encuentran localizadas a distintos niveles del tracto respiratorio, diferenciándose el tejido linfoide asociado a la nariz (NALT) (Kuper y cols, 1992), el tejido linfoide asociado a laringe (LAL) y el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT).

La infección de las células del tracto respiratorio origina la activación de la respuesta inmune innata o inespecífica y a medida que la infección progresa, se desarrolla la respuesta inmunitaria adaptativa o específica (Sanders y cols, 2011).

Existen dos estrategias que un individuo puede utilizar para combatir una infección: la resistencia a la infección, mediante el reconocimiento y eliminación del patógeno o la tolerancia, reduciendo el impacto negativo de la infección. Un individuo por lo tanto sería susceptible a la infección por el virus de la gripe si es incapaz de reducir la carga viral o si es incapaz controlar la respuesta inmune (Iwasaki y Pillai, 2014) (Figura 14).

Respuesta inmune innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa en la respuesta del huésped a la invasión viral. Cuando el virus de la gripe infecta a las células del tracto respiratorio, la respuesta innata se pone en funcionamiento rápidamente y controla la replicación viral durante las primeras fases de la infección.

La primera barrera que el virus de la gripe encuentra al invadir su huésped es la capa mucosa que cubre el epitelio respiratorio y oral. El moco presente en las vías respiratorias es una mezcla de células, restos celulares y polipéptidos que se mantienen unidos por constituyentes macromoleculares llamados mucinas, que se encuentran altamente glicosiladas (Nicholls, 2013). Si el virus supera con éxito esta barrera, se puede unir a las células del epitelio respiratorio, internalizarse y comenzar a replicarse (Cohen y cols, 2013) (Figura 15).

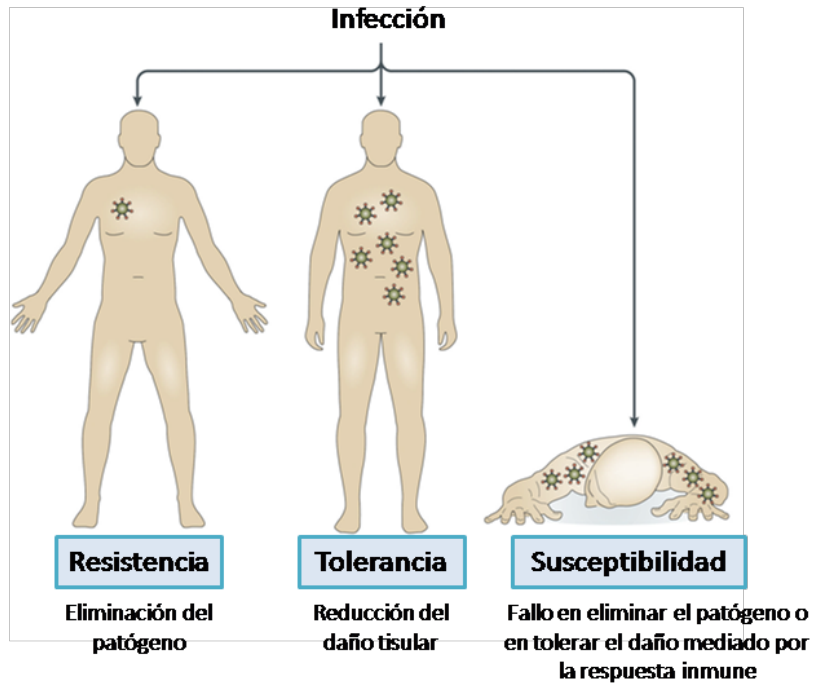


Figura 14: Resistencia antiviral y tolerancia a la infección. (Modificado de Iwasaki y Pillai. *Nat Rev Immunol.* 2014, Mayo).

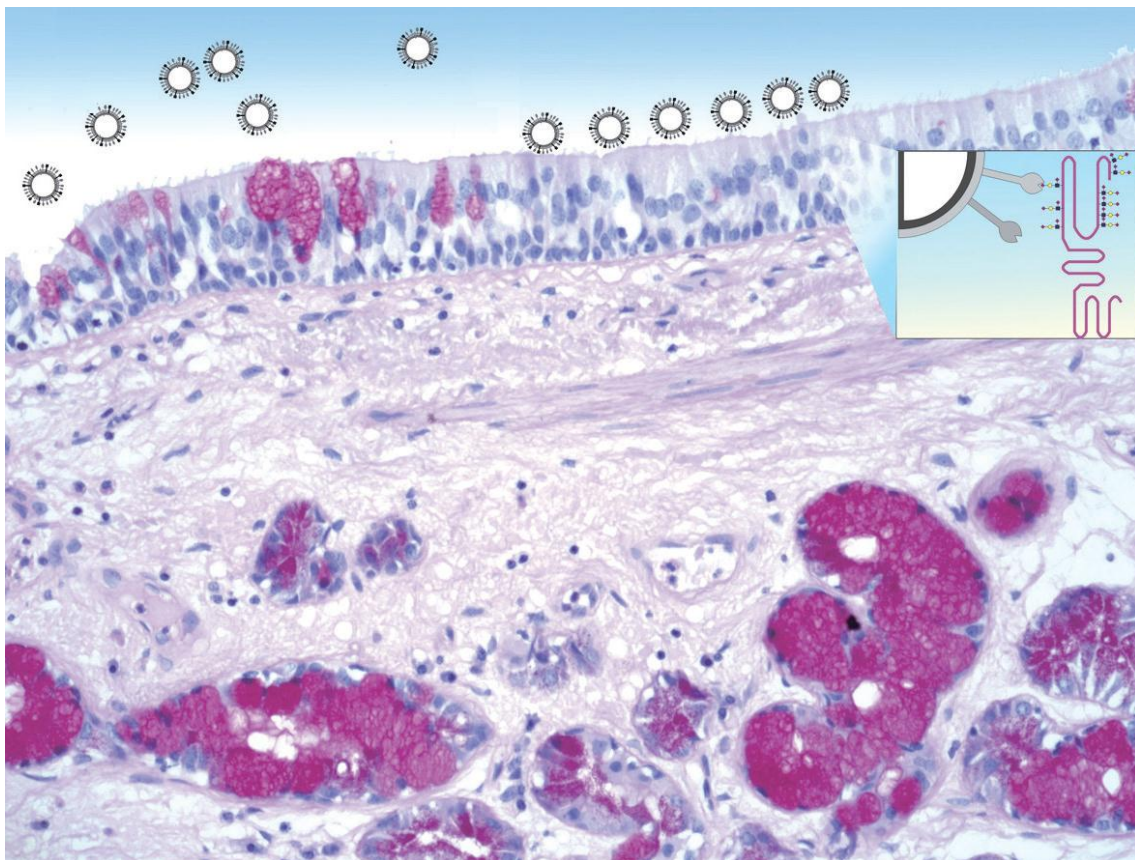


Figura 15: Sección de un bronquio humano sano: Células y glándulas submucosas que contienen mucina (tinción púrpura). El recuadro muestra la interacción de la hemaglutinina viral con el ácido siálico presente en la superficie de las células. (Modificado de Iwasaki y Pillai. *Nat Rev Immunol.* 2014, Mayo).

La segunda barrera de protección son las lectinas, proteínas que se unen específicamente a estructuras carbohidratadas y cuya función es reemplazar la mucina para que el intercambio de gases que se produce en los alveolos se haga de forma eficiente. Estas proteínas juegan un papel fundamental en la defensa antiviral. En el pulmón, las dos lectinas con mayor actividad antiviral frente al virus de la gripe son SP-A y SP-D. (Nicholls, 2013).

La tercera línea de defensa en la respuesta inmune innata la constituyen las células epiteliales pero también células del sistema inmune como los macrófagos, células dendríticas, células natural killer (NK), y neutrófilos. Los mecanismos de defensa celular que se inician tras la invasión de un microorganismo implican la detección de componentes del patógeno o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Para ello las células presentan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Pang y Iwasaki, 2012). En el caso de los virus gripales existen al menos tres tipos de PRRs: los receptores tipo Toll, (TLR3, TLR7 y TLR8), el receptor RIG- I y la familia de receptores NOD (NLRP3) (Iwasaki y Pillai, 2014) (Figura 16).

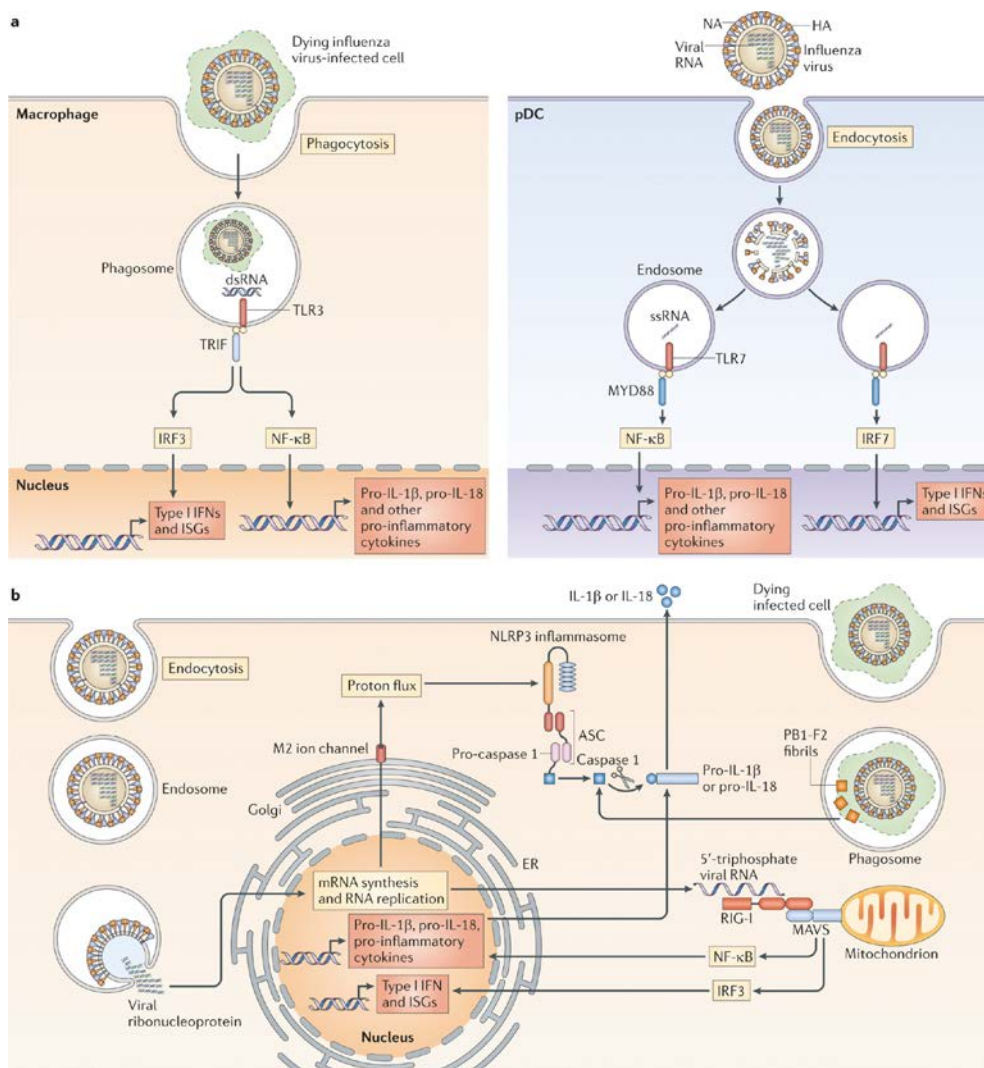


Figura 16: Reconocimiento del virus de la gripe. (Iwasaki y Pillai. *Nat Rev Immunol.* 2014, Mayo)

RIG-I y NLRP3 detectan virus presentes en el citosol de las células infectas (reconocimiento intrínseco) mientras que TLR3 detecta células infectadas y TLR7 y TLR8 reconocen ARN viral localizado en el endosoma de las células centinela (reconocimiento extrínseco).

El reconocimiento PAMPs-PPRs conduce a la activación de rutas de señalización posteriores que resultan en la secreción de citocinas inflamatorias, interferón de tipo I (IFN alfa y beta) (Honda y cols, 2005), quimiocinas y péptidos antimicrobianos (Ramos y Fernandez-Sesma, 2015). Estos mediadores reclutan neutrófilos al foco de la infección, activan macrófagos, favorecen la maduración de las células dendríticas, inducen la proliferación de las células T memoria, inhiben la apoptosis de las células T, potencian la secreción de IFN- gamma, la diferenciación de las células B a células plasmáticas y la activación de las células NK.

Mediadores inmunológicos.

En el caso de los virus de la gripe, el Interferon tipo I (alfa y beta) junto con el TNF alfa, la interleuquina 1 beta y la interleuquina 6 son las citocinas que más limitan la replicación viral, reclutando células inmunes al foco de infección y produciendo inflamación (Nicholls, 2013).

En el caso del virus de la gripe pandémica de 2009, las citocinas y quimiocinas detectadas en el suero o pulmón de pacientes infectados por el virus pandémico se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8: Mediadores inmunológicos detectados en el muestras de pacientes infectados por el virus H1N1 pdm del 2009. (Modificada de Ramos y Fernandez-Sesma, 2015)

Citocinas	Quimiocinas	Referencia
IL6, TNF α , IL9, IL17, IL15 e IL12	IL8	Bermejo-Martín y cols, 2009
IFN α 2, IL1 α , IL6, IL10 e IL15	IL8, IP10 y MCP1	To y cols, 2010
IL6, TNF α e IL15	IL8	Hagau y cols, 2010
IL2, IL12, IL6, IL10, IL17 e IL23		Yu y cols, 2011
IL6 y TNF α	IL8, IP10, MCP1 e MIP1 β	Gao y cols, 2013
IL6 e IL1b		Chiaretti y cols, 2013
IL6 e IL10	IL8 y MCP1	Tiwari y cols, 2014

Interferón tipo I e ISG.

La función más importante del interferón tipo I es inducir la activación de un estado antiviral en las células infectadas y sus células vecinas, así como la estimulación de la inmunidad adaptativa (Levy y cols, 2011). Estudios en hurones (Husseini y cols, 1982), ratones (Wyde y cols, 1982) y humanos han demostrado que la liberación temprana de niveles nasales y pulmonares de IFN tipo I correlacionan con la una menor replicación del virus gripal.

El IFN α e IFN β interactúan con el receptor IFNAR lo que resulta en la activación de dos proteínas del tipo tirosina kinasas (JAK1 y TYK2) que a su vez activan los factores de transcripción STA1 y STA2. Estos factores de transcripción se fosforilan, dimerizan y traslocan

al núcleo, uniéndose con el factor regulatorio 9 del IFN (IRF9) para formar el complejo ISGF3. Este complejo se une específicamente con secuencias de DNA y promueve la transcripción de cientos de genes estimulados por el interferón (ISGs) que generan numerosos cambios en el transcriptoma de las células ejerciendo así su respuesta antiviral (Levy y cols, 2002) (Tabla 9).

Tabla 9: Genes estimulados por el interferón que intervienen en el control de la infección por el virus gripal. (Modificado de Iwasaki y Pillai. Nat Rev Immunol. 2014)

ISG	Localización intracelular	Modo de acción
MXA	Citosol	Se une a la nucleocapside viral y previenen la importación del virus al núcleo
MX1	Nucleo	Bloquea la transcripción viral en el núcleo
OASL	Citosol	Activan la RNasa L que elimina el ARN viral
PKR	Citosol	Fosforila la sub-unidad α de EIF2 α y bloquea su traducción, activa la ruta de NF-kB y estabiliza el ARNm del IFN1 y IFNB
IFITM3 y otros IFITM	Endosomas	Bloquea la fusión entre la membrana celular del huésped y el virus tras su unión y endocitosis.
Viperin	Gotas de lípidos y la cara citosólica del retículo endoplasmático	Bloquea la liberación del virus de la gripe interfiriendo en la formación de los "lipid raft" que el virus construye.
CH25H	Citosol	Convierte el colesterol a la forma soluble 25-hidroxicolesterol, la cual bloquea la fusión del virus.
TRIM22	Nucleo	Marca la nucleocapside viral para posterior su degradación en el proteosoma
ISG15	Citosol	Proteína de tipo ubiquitina que marca las proteínas virales que se generan para su modificación.

Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular (menos de 30 kDa) que actúan mediando interacciones complejas entre células linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas (Pérez, 1997). Sus funciones son muy variadas: diferenciación y maduración de células del sistema inmunitario, comunicación entre células, y en algunos casos, ejercer funciones efectoras directas. Estas moléculas son secretadas por distintos tipos de células y su composición no está determinada por la del antígeno que la estimula.

Dentro de las citocinas más asociadas a la infección por los virus gripales destacan:

- **TNF α :** es una de las citocinas más estudiada ya que está implicada en muchas funciones, como es la activación de respuestas inflamatorias, la estimulación de la inmunidad adaptativa, la apoptosis, proliferación y diferenciación celular. En el contexto de la gripe se sabe que el TNF α activa la ruta NF-KB que promueve la expresión de un gran número de genes pro-inflamatorios (Wajant y cols, 2003; Sethu y cols, 2011).
- **IL-6:** a esta citocina se le han atribuido tanto funciones pro como antiinflamatorias, estando relacionada con numerosas enfermedades crónicas y autoinmunes (Scheller y cols, 2011). La síntesis de esta citocina se activa en el contexto de una infección, siendo sus funciones

más destacables la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y la estimulación de respuestas adaptativas (inducción de la diferenciación de las células B y activación de las células T CD4) (Tanaka y Kishimoto, 2014). En el caso de la gripe, el papel que juega esta citocina sigue siendo controvertido, aunque varios modelos animales proponen un papel protector al estar implicada en la eliminación del virus y limitar la inflamación (Lauder y cols, 2013).

- **IL1 β** : esta citocina se produce en las células inmunes como monocitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), en respuesta a la activación de TLR, complemento u otras citocinas como el TNF α (Dinarello y col, 2011). Induce la expresión de genes inflamatorios como IL-6, RANTES y favorece a la infiltración de células al espacio extravascular (Weber y col, 2010). Está relacionada con alteraciones inflamatorias tanto agudas como crónicas. Recientemente se ha postulado que esta citocina juega un papel esencial en la recuperación del epitelio en pacientes con síndrome de distress respiratorio agudo grave (SDRA), aunque un aumento prologando de dicha citocina parece contribuir al daño pulmonar (Geiser y col, 2003, Thickett y Perkins, 2008).

Quimiocinas

Las quimiocinas son un tipo de citocinas de pequeño tamaño (8 a 15 KDa), que dirigen la migración leucocitaria e intervienen en una amplia variedad de procesos fisiológicos, patológicos y fundamentalmente inmunológicos. En la infección por el virus H1N1pdm destacaron:

- **RANTES**: también conocida como CCL5, juega un papel fundamental en el reclutamiento de células T, DCs, macrófagos, monocitos, eosinófilos, células NK y basófilos al foco de inflamación (Ramos y Fernandez-Sesma, 2015). Los niveles altos de esta quimiocina se han asociado a la enfermedad grave producida por el virus de la gripe aviar (Korteweg y Gu, 2008). Su receptor (CCR5) es esencial para controlar la infección producida por el virus de la gripe, existiendo estudios en animales que demuestran un aumento en la mortalidad de los ratones CCR5- infectados con virus de la gripe A (Dawson y cols, 2000).
- **IP10**: la quimiocina también denominada CXCL10, juega un papel fundamental en la defensa antiviral. Es secretada por linfocitos T, neutrófilos, monocitos, DCs, células endoteliales y epiteliales y fibroblastos. Contribuye a la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas y autoinmunes (diabetes, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico SLE) (Liu y col, 2011; Antonelli y col, 2014). La inhibición o pérdida de esta quimiocina en modelos de ratón reduce la gravedad del SDRA durante la infección por gripe (Ichikawa y col, 2013).
- **IL8**: CXCL8 es un potente quimio-atrayente de neutrófilos, que juega un papel muy importante en el SDRA, movilizándolo al pulmón durante la infección grave producida por el virus de la gripe. Los neutrófilos son esenciales para el control de la infecciones, mediante la liberación de ROS, proteinasas y trampas extracelulares NETs, pero que en exceso también pueden contribuir al daño tisular (Williams y Chambers, 2014).

- **MCP1**: también conocida como CCL2, esta quimiocina regula la migración e infiltración de monocitos, células T memoria y células NK. Está asociada a la patogénesis de enfermedades como el asma, AR, enfermedades cardiovasculares, cáncer y algunas neuropatías (Deshmane y cols, 2009). En el caso de la gripe, esta proteína tiene un papel controvertido. La neutralización de esta quimiocina *in vivo* reduce la inmunopatología en modelo de ratón. Sin embargo otros estudios han visto que este tratamiento aumenta el daño del epitelio alveolar y la apoptosis (Damjanovic y cols, 2011; Narasaraju y cols, 2010).
- **MIP1 β** : esta proteína (CCL4) está involucrada en el reclutamiento de una gran variedad de células inmunes (monocitos, linfocitos T, eosinófilos, basófilos, dendríticas y células NK) induciendo su activación y adhesión (Tanaka y col, 1993). Se ha visto, que esta quimiocina está relacionada con enfermedades autoinmunes como el lupus, postulándose como un biomarcador de esta enfermedad (Barbado y cols, 2012).

Respuesta inmune adaptativa

El reconocimiento de patógenos virales por la interacción de las células del sistema inmune innato dará lugar a la activación de la inmunidad adaptativa que reconocerá antígenos virales específicos para su eliminación (Iwasaki y Medzhitov, 2004). La respuesta inmune adaptativa es específica frente a un determinado antígeno y crea memoria. La acción coordinada de las células TCD4, TCD8 y B efectoras (plasmáticas) será la encargada de eliminar la infección y de proteger contra la reinfección.

Reconocimiento de antígenos virales y activación de los linfocitos.

Los antígenos virales exógenos son detectados y captados por las células presentadoras de antígeno a través de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o de clase II. La interacción del patógeno con las células presentadoras de antígeno influyen en el balance de citocinas inicial de la respuesta inmune innata, determinando el desarrollo preferencial de células Th1 o Th2 y desplazando la respuesta inmune hacia una respuesta humoral o hacia una respuesta celular mediada por fagocitos y linfocitos T citotóxicos. Las células dendríticas reconocen al virus, migran a los nódulos linfáticos y allí presentan los antígenos virales, restringidos por el CMH II, a los linfocitos T. Los linfocitos T CD4+, en función del ambiente de citocinas en el que se encuentre, se diferenciarán a células T colaboradoras (Th o T helper) de tipo 1, si el ambiente es rico en IL-2, o en Th2, si el ambiente es rico en IL-4. También pueden diferenciarse a células Th17 (Figura 17).

Respuestas celulares

Las células Th1 y Th17 promueven principalmente la respuesta celular contra patógenos intracelulares. En el caso de las infecciones virales, la respuesta celular en su modalidad citotóxica es la más efectiva. Las células Th1 secretan IL-2 e IFN γ , las cuales activan la proliferación de células T CD8+ citotóxicas principalmente.

De esta forma las células T citotóxicas, CD8+, una vez activadas migran hacia el foco de infección, reconocen a las células infectadas que muestran los péptidos virales asociados a

moléculas del MHC I en su superficie celular de forma que las eliminan mediante la combinación de distintos mecanismos que incluyen: la liberación de moléculas citotóxicas como la perforina y granzima B, la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IFN-gamma y TNF α o la inducción de la expresión de genes FasL y TRAIL que inician la muerte celular tras unirse a sus respectivos ligandos. (Tamura y Kurata, 2004; Singh y cols, 1997; La Gruta y Turner, 2014).

Por otro lado, cuando las células T CD4 se activan y migran al pulmón (mediadas por CCR5), ejercerán su función antiviral mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias Th1 y Th17. La sobre-expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en la superficie de las células epiteliales inflamadas harán que el CD4 reconozca las células infectadas, postulándose un posible efecto citotóxico por la liberación de perforinas y grancimas. Además los linfocitos T CD4 activos también inducen la secreción de citocinas relacionadas con la inmunidad innata, como la IL1 β , CXCL9 y CCL2, que contribuyen a la respuesta inflamatoria del tejido infectado (Figura 18).

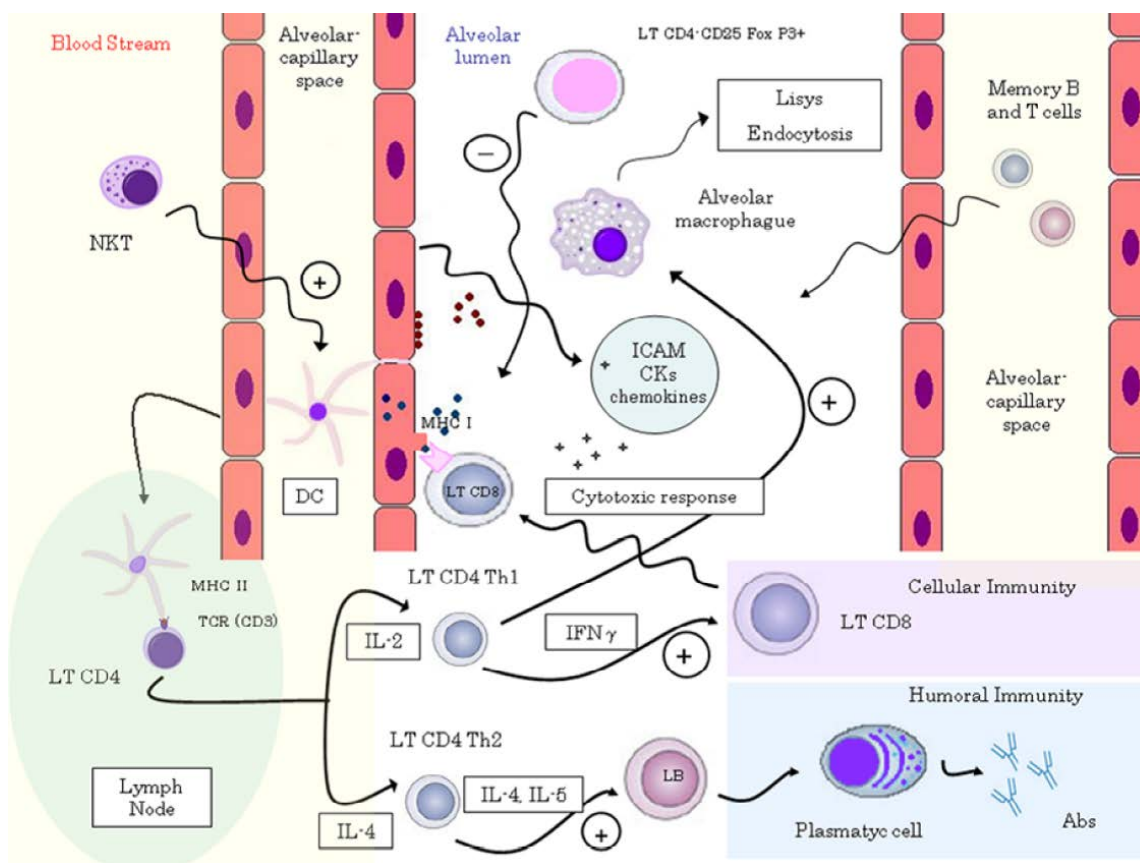


Figura 17: Esquema de la respuesta inmune a las infecciones respiratorias. (Almansa y Bermejo, 2011)

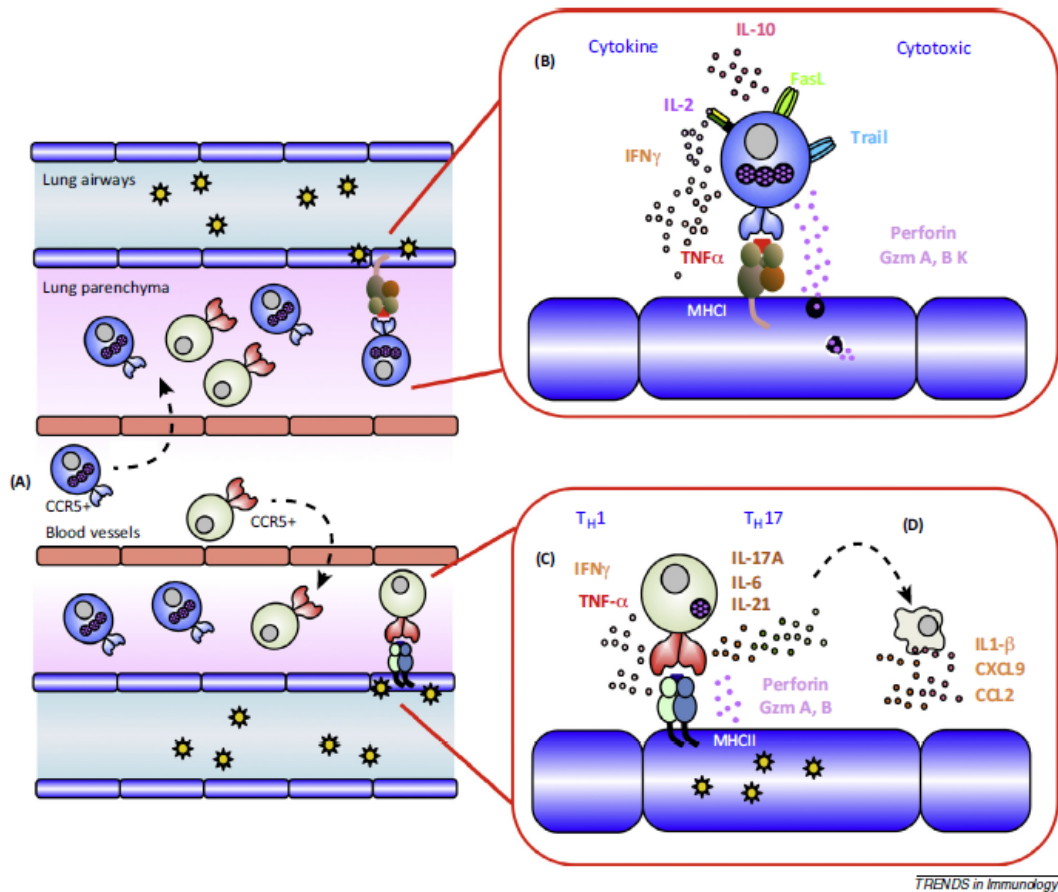


Figura 18: Mecanismos de acción de las células T efectoras. A) Migración de los linfocitos T CD4 y T CD8 activados al foco de infección. B) Mecanismo de acción de los linfocitos T CD8. C y D) Mecanismo de acción de los linfocitos T CD4. (Modificado de La Gruta y Turner, 2014).

Respuesta humoral

Como ya se ha comentado, si el ambiente es rico en IL-4 y la afinidad por el antígeno es adecuada, las células T CD4+ se diferenciarán a células Th2 que son capaces de secretar IL-4 e IL-5 activando las células B (Singh y cols, 1997). La célula B evolucionará hacia una célula plasmática productora de anticuerpos. Lo normal es que en la respuesta primaria sólo se fabrique inmunoglobulina IgM, de baja afinidad, la cual se detecta tras una fase de latencia de 5 días. Algunas células B se convertirán en células B memoria que fabricarán anticuerpos de mayor afinidad, IgG, IgA, IgE de manera casi inmediata durante la respuesta inmunitaria secundaria, cuando se enfrentan al mismo antígeno por segunda vez.

Los anticuerpos cumplen un papel relativamente pobre en las infecciones virales agudas, sin embargo son importantes en la prevención de reinfecciones. Los anticuerpos pueden unirse a epítopos presentes en las proteínas de superficie de la partícula viral, favoreciendo a la neutralización del virus, reduciendo su infectividad (Gerhard y cols, 1997). La existencia de anticuerpos previos puede traducirse en la detección de epítopos antigénicamente similares, frenando la infección más rápidamente.

Como ya se ha mencionado, la gripe pandémica del 2009 se ha focalizado principalmente en las personas menores de 65 años. Esto podría explicarse porque los adultos nacidos antes de

1957 probablemente han estado expuestos a variantes menores del virus de la “Gripe Española” (H1N1) que circularon hasta 1958, fecha en la que fueron sustituidos por el subtipo H3N2 de la Gripe asiática.

Aquellos virus H1N1 estaban antigénicamente relacionados con el virus actual, de forma que algunas personas habrían desarrollado anticuerpos con reactividad heterosubtípica cruzada frente a la nueva cepa, frenando o disminuyendo la sintomatología clínica de la infección.

Existen estudios que detectan la presencia de anticuerpos con reactividad cruzada en el 33% de la población mayor de 60 años contra antígenos del nuevo virus emergente (Booy y cols, 2011). Estudios de modelado tridimensional de proteínas, sugieren que la infección con las cepas circulantes en 1918 o sus variantes menores sucesoras (cepas H1N1 humanas) que circularon antes de 1940, tenían la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes con reactividad cruzada frente al virus H1N1 emergente en 2009.

Linfocitos T memoria

Además de los linfocitos B memoria existe otra población circulante de linfocitos T memoria (tanto CD8+ como CD4+) que surgen como subpoblaciones diferenciadas a partir de la proliferación de linfocitos T vírgenes y T efectores durante una respuesta primaria.

Permanecen en reposo durante mucho tiempo como una subpoblación expandida, una vez que ha declinado la subpoblación “hermana” de células T efectoras. Estas células de memoria están preparadas para responder de un modo más rápido e intenso cuando se vuelvan a encontrar con el antígeno (en la respuesta secundaria), ya que poseen menores requerimientos para ser activadas. En modelos *ex vivo*, se ha demostrado que los linfocitos T CD4+ memoria obtenidos de donantes no infectados con el virus emergente reconocían el virus gripal pandémico.

Linfocitos T reguladores

Recientemente se han descrito otra subpoblación de células T, CD4+, CD25+ conocidas como células T reguladoras (Treg) que modulan la respuesta inmune como mecanismo de prevención del daño tisular (Vahlenkamp y cols, 2005; Belkaid y Rouse, 2005). Estas células juegan un papel muy importante ya que una respuesta adaptativa apropiada se traduce en la eliminación del virus y la resolución de la enfermedad, pero un fallo en la regulación de esta respuesta se traduce en inmunopatología y daño pulmonar. Las células Treg son capaces de inhibir y modular los fenómenos inmunopatogénicos controlando la proliferación de células CD4+ y CD8+ *in vivo* (Shevach, 2002). Se cree que algunos virus inducen la activación de este tipo de células como una estrategia de inmuno-evasión (Mittrucker y Kaufmann, 2004).

1.2.2 Inmunopatogénesis de la gripe A (H1N1) pdm de 2009

En un cuadro de gripe las causas principales de la enfermedad están relacionadas con la replicación del virus en el epitelio respiratorio. Los virus gripales quedan restringidos al tracto respiratorio, siendo rara la presencia de viremia y su expansión a otros tejidos.

El proceso de infección viral altera la fisiología normal de la célula, lo que provoca la muerte celular y la consecuente descamación del epitelio respiratorio, ocasionando un proceso inflamatorio del tracto respiratorio superior y en ocasiones, afectando al tracto respiratorio inferior (bronquios, bronquiolos y alvéolos) produciendo complicaciones broncopulmonares y neumonías (Wilschut, 2005).

La neumonía viral provoca una neumonitis intersticial con infiltración leucocitaria. Las paredes alveolares pierden el epitelio, se forman membranas hialinas y el espacio intra-alveolar se llena del exudado. La hemorragia proveniente de los capilares que lo rodean altera la difusión de los gases. A medida que se obstruye el espacio alveolar, aparece una hipoxia progresiva (Nicholson y cols, 2003; Fukuyama y Kawaoka, 2011).

La virulencia de una cepa gripal se caracteriza por la infectividad (capacidad de infectar un determinado tejido o sistema celular) y por su transmisibilidad (facilidad de difusión). A nivel molecular, la transmisibilidad puede deberse en parte a los genes que codifican las proteínas virales HA y NA, entre otras (Rott y cols, 1995). La presencia de una serie de aminoácidos básicos en la secuencia de la HA, permite al virus utilizar una serie de proteasas, presentes en muchos tejidos para escindir la molécula nativa de HA en dos fracciones, HA1 y HA2, que tienen mucha más capacidad infectante.

La NA interviene también en la infectividad, potenciando el efecto proteasa y favoreciendo al desdoblamiento de la HA y facilitando la infección de tejidos distintos al respiratorio. Además, media en la liberación de las partículas virales adheridas a la membrana citoplasmática, y degrada el moco, fluidificándolo lo que favorece la diseminación de las partículas virales por el tracto respiratorio (Rott y cols, 1995).

En el caso de la gripe pandémica del 2009, el virus presentaba una alta transmisibilidad, mayor que las gripes estacionales pero con una baja severidad, si se comparaba con la gripe pandémica del 18 (Fraser y cols, 2009). En un modelo de hurón, que comparaba la patogenicidad de la gripe pandémica H1N1 del 2009 con la gripe estacional, se vio que la tasa de replicación viral en los tejidos pulmonares era mayor en el caso del virus pandémico y provenía tanto del tracto respiratorio superior, como del inferior (Maines y cols, 2009).

La gripe A pandémica de 2009 se caracteriza por una disfunción/alteración inmunológica compleja (Almansa y cols, 2012). El estudio de la gripe pandémica de 2009 ha dado como fruto un mayor conocimiento de las respuestas inmunológicas innatas y adaptativas al virus de la gripe A (H1N1) pdm09 y de la contribución de las respuestas a la inmunopatología asociada con esta infección.

Los pacientes que sufren las formas más graves de la enfermedad de la gripe A (H1N1) presentan una respuesta inmune desregulada/alterada. Esta respuesta se caracteriza por una secreción exacerbada de citocinas proinflamatorias e inmunomoduladoras en el inicio de la respuesta innata al virus y por respuestas de células T desreguladas (respuesta defectuosa de las células T) durante el desarrollo de la inmunidad adaptativa específica. Estas alteraciones se traducen en un mal control de la infección creando un círculo vicioso de replicación viral-producción de citocinas, lo que podría perpetuar la inflamación producida en los tejidos dañados y la insuficiencia respiratoria.

En los pacientes con neumonía viral grave la secreción de citocinas se mantuvo y estaba relacionada directamente con el grado de replicación viral en el tracto respiratorio. Si bien las citocinas tienen un papel importante en la defensa antiviral, sin embargo la persistencia de hipercitoquinemia puede dañar el tejido inflamatorio y ser uno de los motivos que provocan el fracaso respiratorio observado en estos pacientes. Casi en todos los pacientes que sufren las formas leves y graves de la enfermedad se observó ausencia de anticuerpos protectores preexistentes. Los casos graves de infección causados por el virus de la gripe A (H1N1) pdm09 se caracterizan por una respuesta defectuosa de las células T. En el desarrollo normal de la respuesta específica al virus pueden interferir trastornos inmunológicos asociados con situaciones concomitantes como obesidad, embarazo o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Figura 19).

El papel de mediadores como el IFN gamma, TNF alfa o quimiocinas tales como el IP-10, MCP-1 e IL-8, parece ser relevante no sólo al inicio de la respuesta inmune a la infección, sino que puede perpetuarse dando lugar a un componente inflamatorio pulmonar muy importante, en principio destinado a combatir la presencia del virus pero que debido a niveles excesivamente mantenidos en el tiempo, conlleva un daño inflamatorio pulmonar agudo con infiltración de neutrófilos y macrófagos, respuesta celular e inducción de fenómenos de necrosis/apoptosis en el tejido tanto infectado como sano (Julkunen y cols, 2000).

En el inicio de la enfermedad de los casos graves de neumonía causados por H1N1pdm, se reveló la elevación de dos citocinas Th17 relacionadas (IL-9 y la IL-6). La inmunidad Th17 tiene importantes funciones en la defensa anti-bacteriana y antiviral pero también está implicada en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes/alérgicas, como por ejemplo, el asma (Nalbandian y cols, 2009; Louten y cols, 2009).

La citocina IL-6 es un biomarcador potencial de infección severa por virus de gripe A (H1N1) pdm2009 tanto en humanos como en estudios con ratones (Bermejo-Martin y cols, 2009; Bautista y cols, 2010; Paquette y cols, 2012). Elevados niveles sistémicos de IL-6 se asociaron con la admisión de pacientes en las unidades de cuidados intensivos (UCI) con fatales resultados. IL-6 está presente en los lavados bronco-alveolares de pacientes con infección severa por gripe A pandémica 2009 (Zuñiga y cols, 2011). En ratones infectados con este virus se desencadenó un agravamiento de la enfermedad y un aumento de IL-6 a nivel pulmonar y sérico. Además, en animales y en estudios clínicos, el análisis de la expresión génica global

indica una pronunciada respuesta inflamatoria asociada a la IL-6 (Paquette y cols, 2012; Zuñiga y cols 2011, Bermejo-Martin y cols, 2010).

La IL-6 es una citocina pleiotrópica implicada significativamente en varias facetas de la respuesta inmune, estuvo implicada en la tormenta de citocinas tras la gripe aviar A H5N1 y en el síndrome de infección respiratoria severo (De Jong y cols, 2006; Zhang y cols, 2004; Huang y cols, 2005). También, los niveles de IL-6 se han asociado con la duración de los síntomas y gravedad en los casos de infección por virus de la gripe estacional (Skoner y cols, 1999; Gentile y cols, 1998; Fritz y cols, 1999).

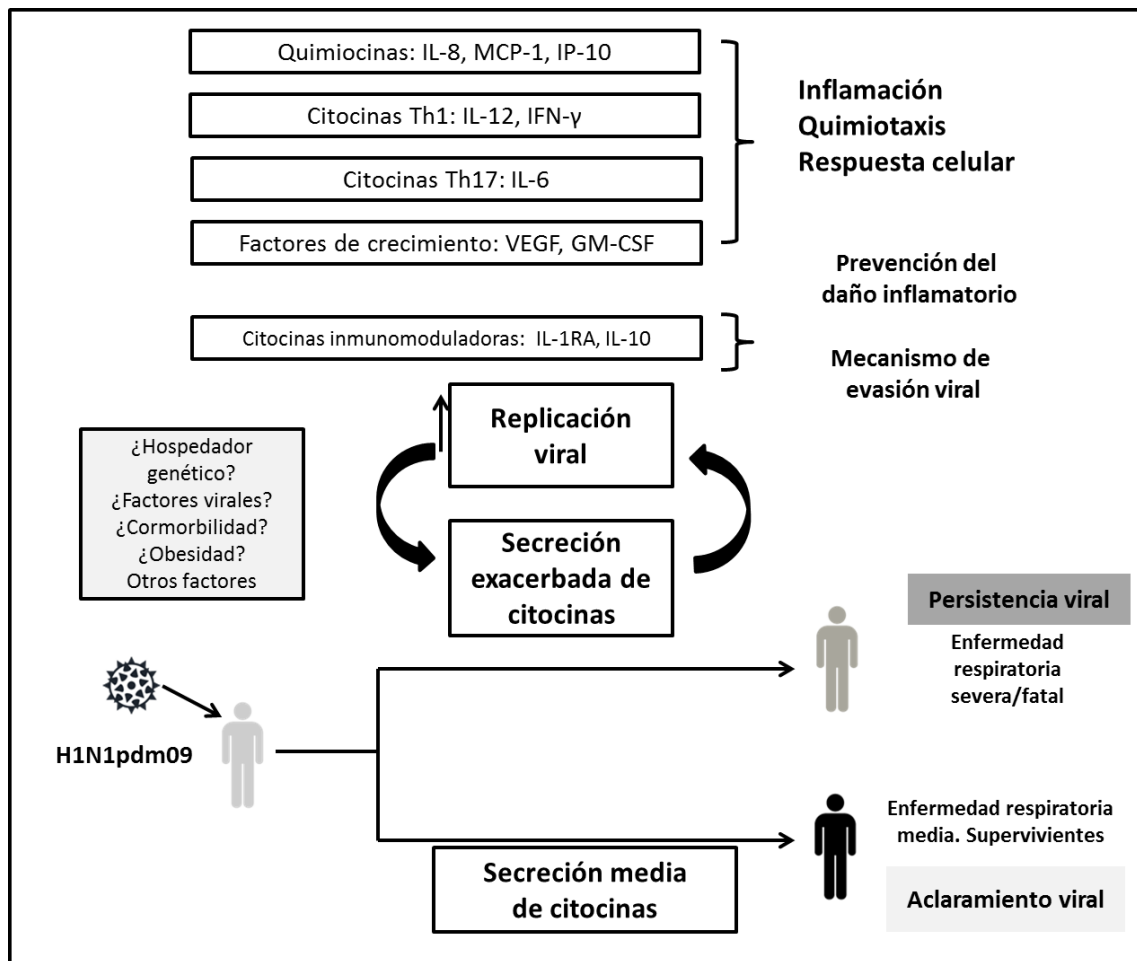


Figura 19: HiperCitocinemia como señal de respuesta del hospedador en gripe pandémica severa. Basado en los resultados de (Bermejo-Martin y cols, 2009-2010) y (Almansa y cols, 2010)

Por lo tanto, los altos niveles observados de este mediador en la patogénesis de la infección por el virus pandémico apuntan hacia un papel perjudicial de la IL-6. Sin embargo, un modelo de ratón knockout para IL-6 (Paquette y cols, 2012) ha demostrado recientemente que la ausencia de IL-6 no tuvo grandes repercusiones clínicas importantes, lo que sugiere que la IL-6, no juega un papel esencial no redundante en la infección de ratón por virus de la gripe A (H1N1) pdm09.

El primer estudio anatomopatológico publicado sobre la gripe pandémica, documentó tres patrones histológicos de afectación pulmonar: daño alveolar difuso, hemorragias y bronquiolitis necrotizantes. El examen inmunohistopatológico demostró la existencia de una respuesta inmune pulmonar aberrante asociada a la presencia de un gran número de células citotóxicas (con marcación positiva para CD8 y granzima B), y significativa expresión local de TLR-3 (Toll like receptor 3), e interferón gamma (Mauad y cols, 2010).

Las células CD8+ promueven la eliminación del agente infeccioso mediante mecanismos citotóxicos directos mediados por granzima B, o a través de la secreción de citocinas como el TNF- α y el interferón γ . Sin embargo, la producción exacerbada podría estar implicada en el daño tisular (La Gruta y cols, 2007).

Se ha visto que ratones TLR3 -/- infectados experimentalmente producen menores niveles de mediadores inflamatorios (RANTES, IL-6, IL-12) así como de linfocitos T CD8 + en los pulmones y una mayor tasa de supervivencia (Le Goffic y cols, 2006). La expresión de TLR-3 por tanto, podría contribuir al daño tisular observado en estos pacientes.

1.3 Modelos animales y perfiles de expresión génica

1.3.1 Estandarización del modelo murino de la gripe

Aunque el uso de animales para la investigación de la gripe es muy común, los investigadores deben cuidar y utilizar a los animales de manera adecuada, tanto técnica como humanamente, planificando y llevando a cabo los experimento con animales de manera ética. El Consejo Superior de Investigaciones Científicas y el Instituto de Recursos Animales de Laboratorio han escrito guías detalladas sobre este tema (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Academies Press).

En el caso del virus de la gripe, se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones antes de elegir el modelo animal:

- La susceptibilidad del animal a la infección viral.
- La capacidad para soportar la replicación viral.
- Las manifestaciones clínicas de la infección en ese modelo animal.
- La transmisión del virus.
- Si el modelo requiere la adaptación del virus humano.

Por lo tanto, la elección del modelo animal para cualquier estudio dado debe seleccionarse sobre la base de la pregunta de investigación (Radigan y cols, 2015).

Los ratones constituyen uno de los modelos más utilizados para la investigación del virus de la gripe, debido a su pequeño tamaño, bajo coste y sus mínimos requisitos para la cría (Renegar, 1992). Además, existen un gran número de cepas murinas genéticamente modificadas que permiten a los investigadores estudiar cómo afecta, por ejemplo, la pérdida de la función de una proteína a una ruta relacionada con la patogénesis de la enfermedad o cómo actúa una

terapia concreta sobre un determinado mecanismo. Además, existen muchos reactivos disponibles para trabajar con este tipo de animales. Sin embargo uno de los principales problemas que presenta éste modelo es que el ratón no es un huésped natural de los virus de la gripe humanos, por lo que las cepas humanas deben adaptarse a los ratones para que el virus se replique de manera eficiente dentro del tracto respiratorio murino.

La habilidad del virus de la gripe para infectar a una especie específica se determina por la capacidad del virus para unirse, replicarse y liberarse de ese huésped (Matrosovich y cols, 2004). La especificidad del receptor del virus es un determinante principal en la infección viral. La distribución del ácido siálico como receptor varía entre especies y entre tejidos y tipos celulares dentro del mismo hospedador. En el caso de las distintas cepas de ratones, la distribución específica de estos receptores todavía se está estudiando. La expresión de ambos tipos de receptores SA α 2,6 y SA α 2,3, se localizan en múltiples órganos del ratón BALB/c, incluyendo la tráquea, pulmones, el cerebelo, el bazo, el hígado y el riñón, mientras que estudios con los ratones C57BL6/J informan de la falta de expresión del receptor SA α 2,6 en pulmones aunque los receptores tipo SA α 2,3 si se localizan en las vías aéreas ciliadas y células epiteliales alveolares de tipo II (Ibricevic y cols, 2006).

En el caso del virus pandémico H1N1 de 2009 se sabe que presenta una baja patogenicidad en ratones BALB/c siendo algo mayor en los ratones tipo C57BL6/J. En contraste en un estudio (Otte y Gabriel, 2011) en el que infectaban ratones de ambas cepas con el virus de la gripe aviar (HPAIV) del subtipo H5N1 aislado de un caso humano mortal, se observó que éste era más virulento en los ratones BALB/c que en los ratones C57BL6/J. En este estudio se utilizó como control la cepa del virus H1N1 pdm de 2009, llegando a la conclusión de que los marcadores de patogenicidad de la cepa pandémica se hacen visibles en los ratones C57BL6/J, mientras que en los BALB/c se enmascaran.

Otros estudios muestran como los patrones de patogenicidad del virus pandémico H1N1 2009 mostraron una replicación más eficiente en los pulmones de los ratones infectados, generando antes bronquitis y alveolitis en comparación con la cepa estacional. También fue notable el aumento de la producción de IL-10, IFN- γ , IL-4 e IL-5 (Girard y cols, 2010). Estos hallazgos indican que la gravedad de la enfermedad puede ser muy dependiente de la genética del huésped. En consecuencia, las variaciones genéticas que existen entre cepas de ratón en la mayoría de los genes implicados en la replicación viral y en la respuesta inmune innata y adaptativa pueden tener una gran influencia sobre el resultado de la enfermedad.

Por lo tanto, la susceptibilidad de los ratones a infectarse por los virus de la gripe es dependiente tanto de la cepa del ratón, como de la cepa del virus de la gripe.

En la literatura (Menendez y cols, 2005), la histopatología de la neumonía primaria provocada por la gripe en humanos describe una congestión vascular intensa, la dilatación y el engrosamiento del tabique alveolar. En el interior de los alvéolos también se describe la presencia de neutrófilos, escasos macrófagos alveolares y eritrocitos; presentándose la pared de los alvéolos revestida por membranas eosinofílicas gruesas y hialinas. Se observa en los

cortes de los animales infectados características histopatológicas muy semejantes a dicha descripción, pero con mucho mayor grado de daño al parénquima pulmonar; sugiriendo que el virus adaptado al pulmón murino, es altamente virulento.

Atendiendo a este y otros resultados se propone la cepa de ratón C57BL6/J como un buen modelo animal para estudiar los determinantes de virulencia del virus de la gripe A H1N1 pandémico de 2009 (Otte y Gabriel, 2011).

1.3.2 Perfiles de expresión génica

El análisis de expresión génica mediante tecnologías de alto rendimiento como los microarrays se ha convertido en una herramienta muy utilizada en la biología de sistemas. Esta tecnología permite estudiar la expresión y activación de miles de genes simultáneamente para crear una imagen global de las funciones celulares que acontecen en una enfermedad.

El objetivo de la biología de sistemas radica en integrar la información procedente de diferentes disciplinas (genómica, transcriptómica, proteómica, fisiología, patología, etc.) con el fin de entender mejor los procesos biológicos que tienen lugar en los seres vivos (Germain y cols, 2011).

En el campo de la microbiología, la biología de sistemas juega un papel muy importante en el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas y en el diseño de vacunas, al analizar las rutas celulares y las interacciones patógeno-huésped que tienen lugar en determinadas enfermedades infecciosas. Además, el conocimiento de estas interacciones y de las rutas que se activan en un proceso infeccioso también es crucial para entender la patogénesis de la enfermedad (Yan, 2012; Sakata y Winzeler, 2007). Es por ello que existen numerosos estudios que utilizan este tipo de aproximaciones para la búsqueda de marcadores moleculares asociados a enfermedades como el cáncer, lupus, esclerosis múltiple, asma, infecciones virales, etc (Sharon y cols, 2010; Andersen-Nissen y cols, 2012).

La mayoría de estudios de los perfiles de expresión génica (PEG) asociados a la infección gripal se han desarrollado en sistemas celulares o animales. Muchos de estos estudios utilizan los microarrays para comparar los PEG asociados a la infección por diferentes subtipos gripales (Lee y cols, 2010; Yan y cols, 2010). Otros, para diferenciar entre una neumonía bacteriana y una neumonía gripal (Zhang y cols, 2006).

Los estudios sobre la inmunopatología de la infección gripal se han realizado, en la mayoría de los casos, en modelos de hurón (Rowe y cols, 2010; Cameron y cols, 2008) y en macacos (Baskin y cols, 2004), aunque también se han utilizados modelos murinos y cultivos celulares (Pennings y cols, 2008; Lee y cols, 2010). Los resultados obtenidos en estos estudios apuntan a que la infección viral activa induce la expresión de una serie de genes implicados en la ruta del IFN, procesos inflamatorios y fenómenos de apoptosis.

Sin embargo son muy pocos los estudios desarrollados en pacientes. Uno de estos trabajos fue realizado en pacientes pediátricos infectados con H3N2 donde se encontraron 200 genes

sobre-expresados, muchos de los cuales relacionados con la ruta de expresión del IFN (Kawada y cols, 2006).

Estudio del transcriptoma en sangre periférica

El estudio de los perfiles de expresión génica en sangre periférica ha demostrado ser una forma útil de entender los procesos patológicos que ocurren en los distintos órganos y sistemas. Esta aproximación ha permitido diagnosticar sepsis abdominal y pulmonar en modelos murinos, diferenciar la respuesta inmune asociada a neumonías producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas (Polpitiya y cols, 2009), distinguir las huellas transcripcionales asociadas a patógenos como la gripe, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Ramilo y cols, 2007), así como discriminar entre pacientes con SIRS y sepsis temprana (Johnson y cols, 2007).

En cuanto a su utilización en infecciones localizadas, se ha demostrado que lo que suceda en el sitio de infección afecta a los niveles de expresión de las células blancas y por lo tanto, los perfiles de expresión génica de las células blancas podría ser un reflejo de los fenómenos patogénicos que ocurren en el foco de agresión (Chaussabel y cols, 2010). Cuando se produce una infección, las células blancas migran al foco de agresión donde las células dendríticas reconocen los antígenos del patógeno implicado (Figura 20).

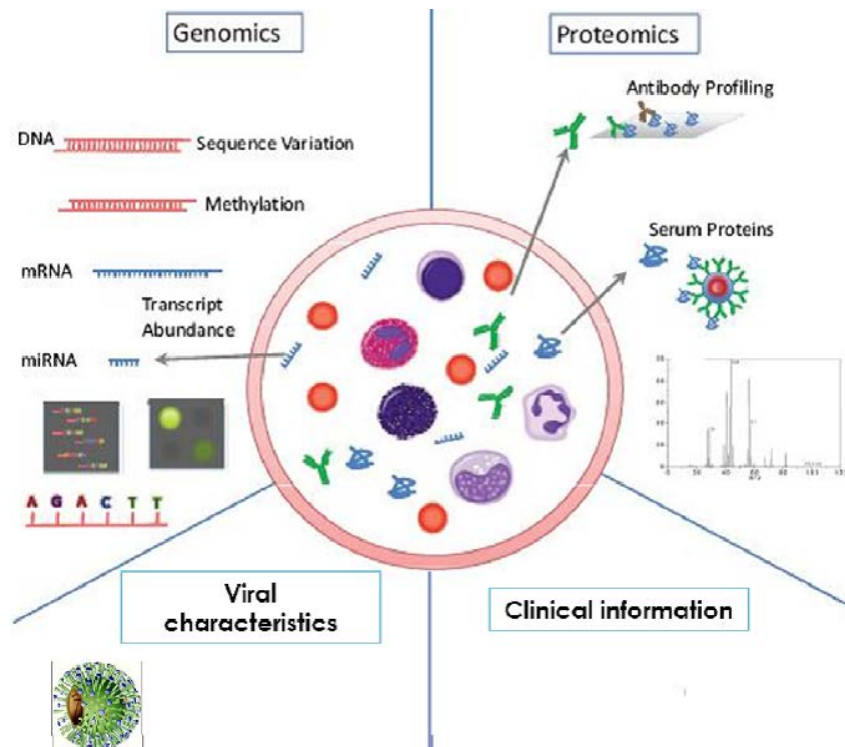


Figura 20: Biología de sistemas (Chaussabel y cols, 2010).

De allí, las células presentadoras de antígeno migran a los nódulos linfoides regionales donde se produce la presentación antigénica a los linfocitos. Estos linfocitos activados salen al sistema linfático por los vasos linfáticos eferentes y posteriormente por el conducto torácico

llegan a la circulación sanguínea (Figura 21). Esta recirculación de las células blancas -desde el sitio de infección a la circulación sanguínea- es lo que hace pensar que el estudio del transcriptoma en sangre periférica puede ser útil para conocer los eventos inmunopatogénicos que acontecen en el órgano afectado.

Existe no obstante, un gran desconocimiento de las bases patogénicas de la infección causada por el virus pandémico H1N1 2009, existiendo grandes dudas sobre el papel que puede ejercer la respuesta inflamatoria en esta enfermedad. Con el fin de intentar aportar luz en este asunto, desarrollamos en esta tesis un modelo de ratón infectado por el virus pandémico H1N1 2009 para estudiar la inmunopatogénesis causada por el mismo a nivel pulmonar.

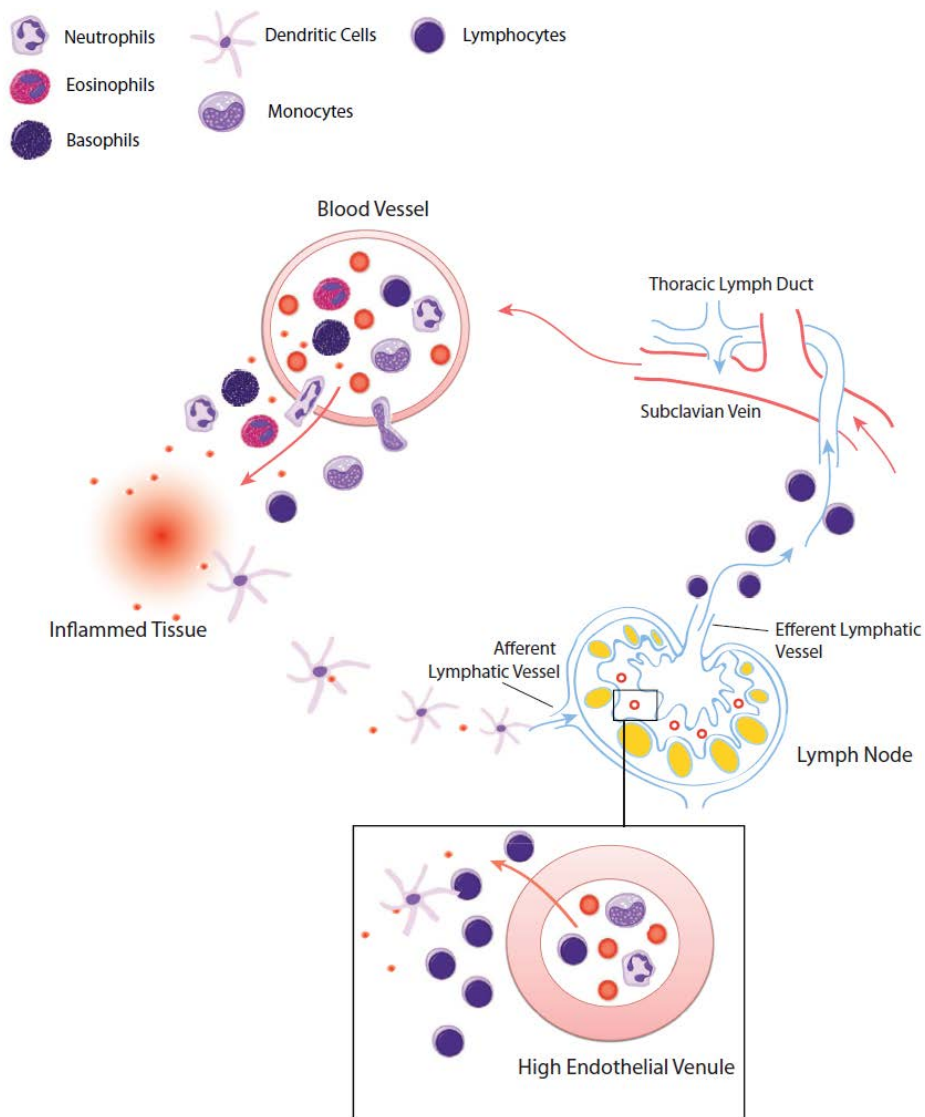


Figura 21: Recirculación de las células blancas (Chaussabel y cols, 2010).

2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La infección por virus de la gripe pandémica de 2009 genera cambios en los niveles de expresión génica de moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria a nivel pulmonar, necesarios para resolver la infección pero que causan importantes repercusiones clínicas.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo principal

Estudiar la respuesta inmune molecular a nivel pulmonar secundaria a la infección por virus de la gripe pandémica de 2009, utilizando un modelo de ratón C57BL6.

2.2.2 Objetivos secundarios

- Generar un modelo animal de infección gripal utilizando ratones inmunocompetentes C57BL6 infectados por un virus humano A/Cataluña/63/2009 pH1N1 (CAT09).
- Evaluar el comportamiento clínico de los animales infectados por el virus CAT09 hasta la resolución de la enfermedad.
- Estudiar la dinámica viral mediante la cuantificación de la carga viral en pulmón.
- Estudiar los cambios en los niveles de expresión génica inducidos por el virus CAT09 a nivel pulmonar.
- Estudiar las rutas de señalización intracelular implicadas en la enfermedad producida por el virus pandémico.
- Generar un modelo que explique los cambios inmunológicos moleculares a nivel pulmonar secundarios a la infección por el virus de la gripe.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

Se generó un modelo de infección gripal no letal en ratón con el fin de estudiar los cambios clínicos, virológicos e inmunológicos a nivel pulmonar que se asocian a la enfermedad producida por el virus gripal pandémico H1N1 de 2009.

Brevemente, se infectaron 36 ratones C57BL6/JOlaHsd con un virus pandémico H1N1 de origen humano. En paralelo se generó un grupo de 36 ratones "mock", como control de no infección. Se monitorizó el peso y los síntomas clínicos de estos animales durante 10 días, realizando necropsias programadas los días 1, 5 y 10 post-infección (p.i.) para la extracción de tejido de pulmón. Sobre los tejidos de pulmón se cuantificó la carga viral, los niveles de expresión génica del transcriptoma completo de ratón y se realizó el estudio histopatológico.

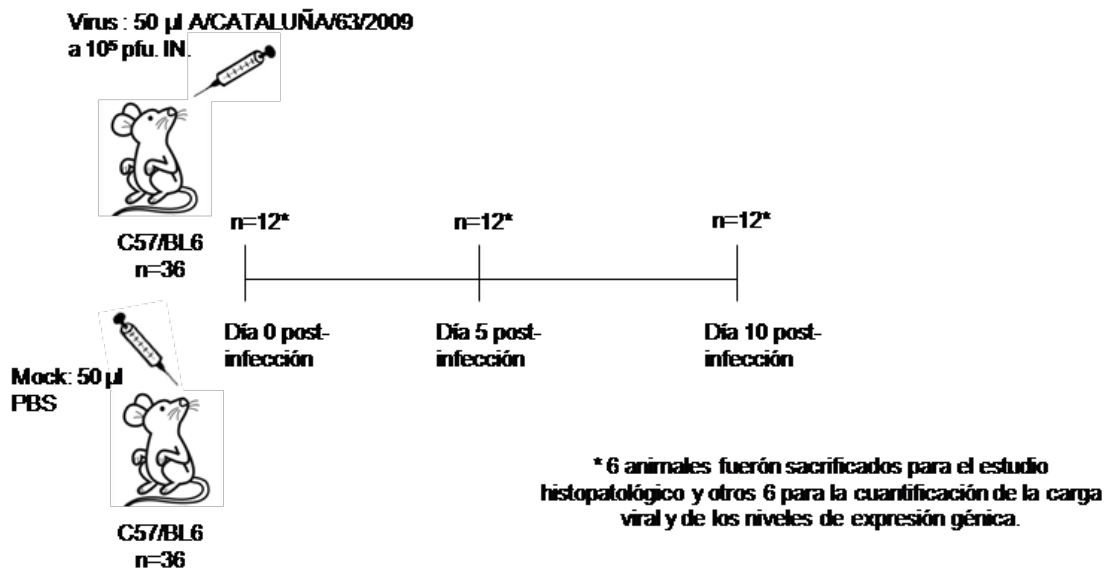


Figura 22: Esquema del diseño del estudio.

Todos los experimentos realizados con ratones durante el desarrollo de la tesis se realizaron en el laboratorio de la Dra. María Montoya de la Universidad Autónoma de Barcelona, en las instalaciones del Centro de Investigación de Sanidad Animal (CReSA), así como todas las técnicas que pudieran suponer un riesgo al manipular muestras infecciosas. Los estudios histopatológicos también se realizaron en el CReSA, ya que este centro cuenta con anatomopatólogos especializados en sanidad animal.

La hibridación y el análisis de los perfiles de expresión génica de tejido pulmonar se realizaron en el laboratorio de Investigación en Infección e Inmunidad (IMI) del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, una vez que las muestras fueron inactivadas y enviadas desde la Unidad de Biocontención (NBS3) de CReSA.

3.2 Declaración ética

Los experimentos con animales se realizaron siguiendo un protocolo de utilización animal aprobado por la “Comisión de ética y experimentación animal y humana de la Universidad Autónoma de Barcelona”. Los animales que se utilizaron fueron ratones hembra, C57BL6/JOlaHsd (C57BL6) de siete semanas de edad. Estos animales se agruparon en jaulas experimentales de aislamiento en el nivel de bioseguridad 3. Antes de comenzar el experimento, los animales pasaron una semana de aclimatación en las mismas instalaciones. Los animales vivieron en jaulas estándar y dispusieron de alimentación comercial y agua durante todo el experimento.

3.3 Línea celular

Para el mantenimiento, aislamiento del virus gripal así como para la cuantificación de virus en las muestras de tejido de pulmón obtenidas en las necropsias de los animales, se utilizaron células *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK). Estas células se cultivaron en medio DMEN (modificación de medio Basal Medium Eagle) de Dubeco (Lonza, Walkesville, USA), suplementado con Suero Bovino Fetal (FBS) al 5%, 100UI/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomina (Invitrogen®, Barcelona, España) y 2mM glutaminina (Invitrogen®, Barcelona, España).

3.4 Cuantificación de la carga viral

La cuantificación viral se determinó por dos métodos estándar: Determinación de la Dosis Infecciosa 50% en cultivos tisulares (TCID₅₀) y la determinación de las unidades formadoras de placa (PFU). Ambas técnicas se utilizaron para titular tanto el stock de virus como las muestras procedentes del tejido de pulmón.

Determinación del TCID₅₀: Para esta técnica se utilizaron cultivos de células MDCK confluentes (90-95%). Se realizó la tripsinización y conteo de las células. Se sembraron 2.5×10^5 células en placas de 96 pocillos que se incubaron toda la noche a 37°C y 5%CO₂. Una vez preparadas las células se añadieron 20µl de la muestra, realizando diluciones seriadas con un factor de dilución de 10 que se dejaron incubar una hora para la absorción del virus. Una vez infectadas las células se cultivaron con un medio DMEM suplementado con 1µg/ml de tripsina porcina tipo 9 (Sigma-Aldrich SA, Madrid, España) 7 días a 37° C. Todos los días se observó el efecto citopático (CPE) para comprobar que las células estaban infectadas y a los 7 días se determinó el TCID₅₀ utilizando el método Reed y Muench (Reed y Muench, 1938).

Determinación de PFU: Para esta técnica se utilizaron células MDCK sembradas en placas de cultivo de 12 pocillos. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de virus (factor de dilución 10) utilizando el medio Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS) (AttenBio Research, S.L, Barcelona, Spain). Una vez preparadas las muestras se inoculando 0.1ml de éstas diluciones sobre los cultivos celulares. Las muestras se incubaron 1 hora para la absorción del virus retirando el inóculo por absorción transcurrido el tiempo de incubación. Las células se

lavar con buffer PBS (Lonza, Walkesville, USA) y los pocillos se recubrieron con Agar (noble agar, Becton Dickinson, France) al 1,4% mezclado con Medio Esencial Mínimo Eagle (MEM) (Sigma-Aldrich SA, Madrid, España) en una proporción 1:1 y suplementado con 1000UI/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina y 0.5 µg/ml de tripsina bovina. Las placas se invirtieron y se incubaron durante 4 días. Tras ese periodo, las células se fijaron durante 20 minutos utilizando 10% de formalina y después se recubrieron con cristal violeta al 1%. Finalmente las células se lavaron con agua para visualizar y contabilizar las unidades formadoras de placa generadas, comparándolas con los cultivos no infectados.

3.5 Virus pdm H1N1 e infección de los ratones

El virus utilizado para realizar los experimentos fue un virus pandémico de la gripe A H1N1 de origen humano, proporcionado por el Hospital Clínic de Barcelona [A/Cataluña/63/2009 (CAT09), GenBank número GQ464405-GQ464411 y GQ168897]. Éste virus se propagó en células MDCK siguiendo los procesos estándar (Voeten y cols, 1999). Se realizaron dos pases del virus en células MDCK consiguiendo un título de 10^6 pfu/ml. Se inocularon 10^5 pfu de virus suspendidos en 50 µl de PBS estéril por vía intranasal utilizando una micropipeta y dejando intervalos para la recuperación del ritmo respiratorio del ratón.

3.6 Monitorización de los ratones y recogida de muestras

Los ratones se observaron diariamente anotando el peso de cada animal así como cualquier cambio clínico interesante. Las necropsias se realizaron a día 1,5 y 10 post-infección (dpi). Los animales se sacrificaron por inoculación intraperitoneal (IP) de pentobarbitol. De los 12 animales por grupo sacrificados en las necropsias, las muestras de pulmón procedentes de 6 de estos animales se utilizaron para los estudios histopatológicos. Las seis restantes se emplearon para la cuantificación de la carga viral y el estudio de expresión génica.

3.7 Determinación de la carga viral en tejidos

Las muestras de tejido pulmonar destinadas a la cuantificación de la carga viral se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta su posterior procesamiento. Los tejidos se pesaron, homogenizaron y centrifugaron brevemente. La infectividad del virus CAT09 se determinó mediante ensayo de determinación de PFU descrito previamente.

3.8 Histopatología

Inmediatamente después de la eutanasia, las muestras de tejido pulmonar destinadas al estudio histopatológico se fijaron durante 48 horas en formalina tamponada neutra al 10%. Se incrustaron en cera de parafina y se seccionaron a 3 µm. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) para su valoración histopatológica.

3.9 Extracción de ARN de tejido de pulmón

Durante la necropsia, las muestras de pulmón reservadas para los estudios de perfiles de expresión de genes se introdujeron en RNA-later (Thermo Fisher Scientific) para su mejor preservación. El RNA-later es una solución que estabiliza de forma inmediata el ARN de manera que los niveles de expresión de un gen se mantienen constantes.

La extracción de ARN se realizó utilizando el kit RiboPure (Ambion, Life Technology), según las instrucciones del fabricante.

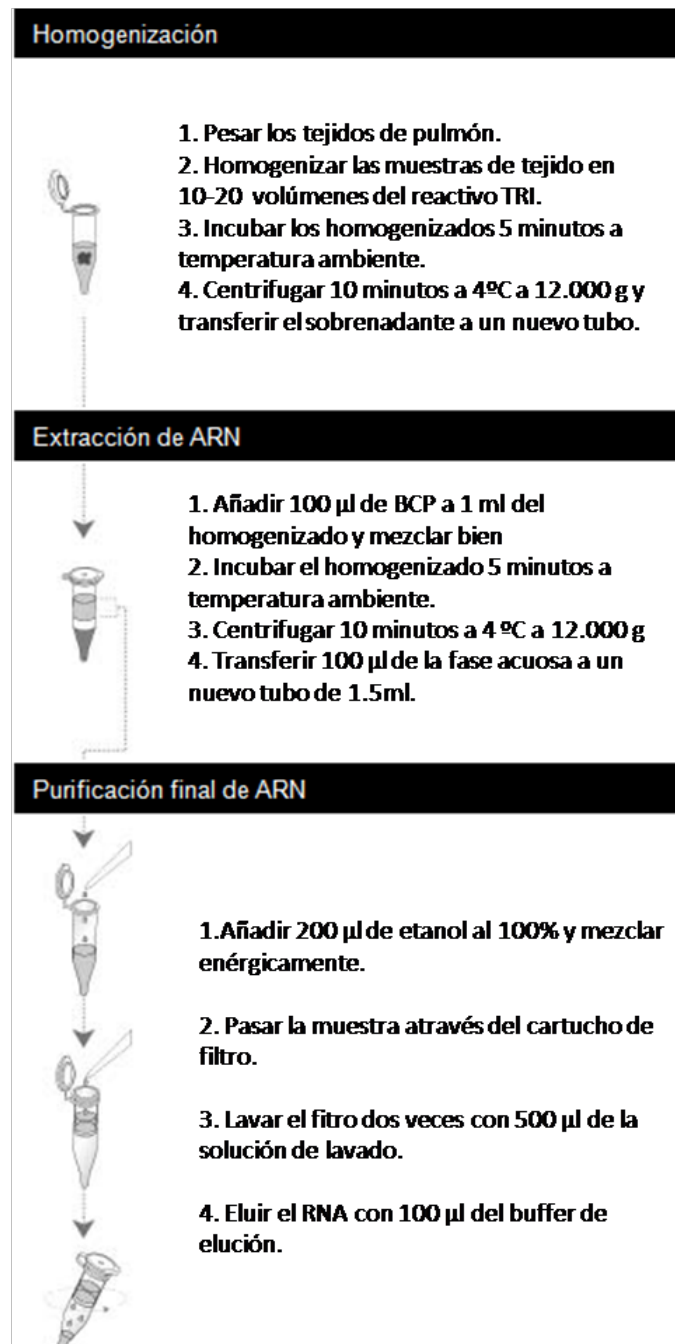


Figura 23: Procedimiento de extracción del ARN

3.10 Evaluación de la calidad y cantidad de ARN

Evaluación de la calidad: Las reacciones de amplificación de ARN pueden variar considerablemente en función de la integridad y la pureza del ARN de partida. Para evaluar estos parámetros en el ARN obtenido tras la extracción a partir de tejido de pulmón se realizó una electroforesis automatizada utilizando el bioanalizador Experion de BioRad (California, EE.UU.).



Figura 24: Bioanalizador Experion de BioRad

Esta plataforma realiza todos los pasos de la electroforesis en uno: separación de bandas, tinción y detección de las bandas generadas, lectura y toma de imagen. En este caso se evaluó la integridad estudiando las bandas de ARNr 28s y 18s. Para considerar que un ARN está intacto, la banda del ARNr 28s debe ser aproximadamente el doble de intensa que la banda de ARNr 18s. Esta proporción 2:1 (28s:18s) es un buen indicador de calidad. Por el contrario el ARN parcialmente degradado tendrá un aspecto manchado sin bandas fuertes, o sin guardar la proporción 2:1. El ARN que se encuentre totalmente degradado aparecerá como una mancha de muy bajo peso molecular.

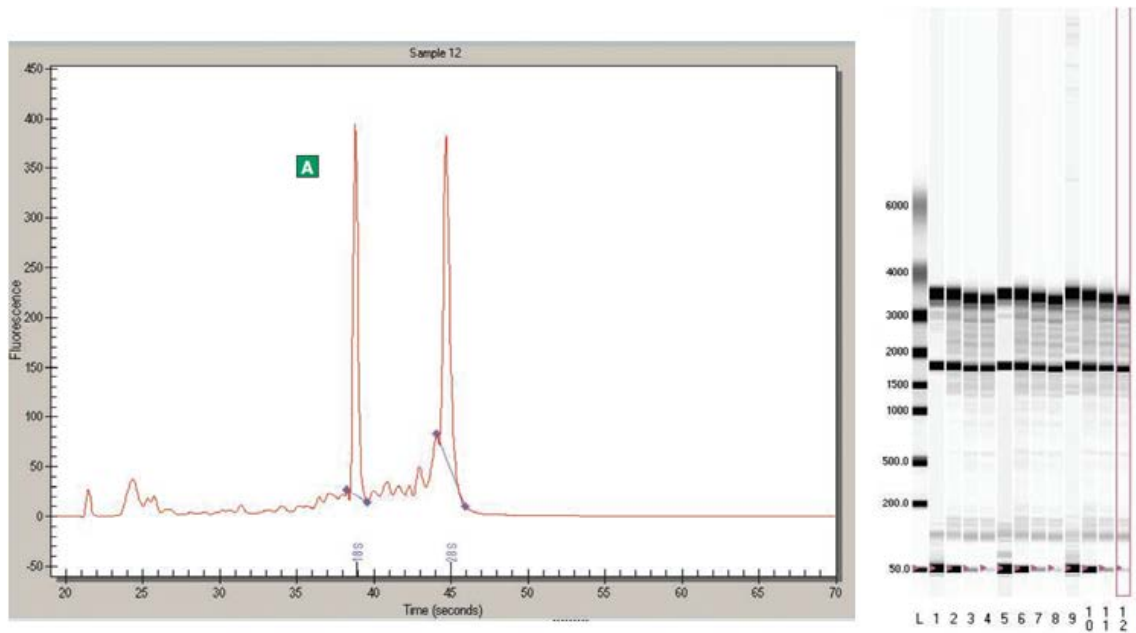


Figura 25: Resultado de la electroforesis

Además de las bandas, el bionalizador Experion proporciona un valor de pureza definido como RQI. Cuanto más próximo a 10 sea este valor, más puro será el ARN, considerándose como buenos los valores comprendidos entre 7 a 10, aceptables entre 4 a 6 e inaceptables entre 1 y 3.

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	38.25	39.55	352.70	19.64
2	28S	44.10	45.90	339.52	18.91
RNA Area		1795.51			
RNA Concentration		492.25 ng/µl			
Ratio [28S/18S]		0.96			
RQI		8.7	■		

Figura 26: Valor de pureza RQI

El protocolo de trabajo se detalla a continuación. Las muestras de RNA y el “ladder” se desnaturalizaron mediante su incubación durante 2 minutos a 70°C. Inmediatamente después las muestras se enfriaron durante 5 minutos. Se generó el gel-stain (GS) y se limpiaron los electrodos del aparato según las recomendaciones del fabricante. Los chips utilizados fueron RNA StdSens Chip (Biorad). Cada chip se introdujo en la estación de cebado (Priming Station) donde se añadieron las soluciones tampón, el gel y las muestras (12 por cada chip). Una vez cebado el chip y dispensadas las muestras, se trasladó a la estación de electroforesis donde tuvo lugar la electroforesis y la adquisición de los resultados.



Figura 27: RNA StdSens Chip (BIO-RAD)

Cuantificación de concentración: Para obtener resultados reproducibles y comparables en los análisis de expresión génica, es necesario utilizar una cantidad fija de ARN en todos los experimentos. Si se adapta un cantidad de ARN fijo y un tiempo de reacción de amplificado y marcaje concreto, se conseguirá la cantidad de ARNc necesaria para el experimento. Para cuantificar el ARN obtenido tras la extracción también se utilizó el bioanalizador Experion, (BioRad, California, EE.UU.) La concentración de ARN de partida recomendada para obtener una cantidad óptima de ARNc (500 ng a 2 g) es 65 y 200 ng/μl, siendo 100 ng/μl la concentración recomendada para los estudios de microarrays. Aquellas muestras que no mostraron una concentración de partida suficiente o una pureza aceptable no se hibridaron.

Tabla 10: Resultados obtenidos con el bioanalizador Experion

	Nombre de la muestra	Concentración (ng/μl)	RQI
Controles	1B1	668,51	7,1
	1B2	228,62	7,3
	1B3	417,16	6,2
	1B4	382,74	6,3
	1B5	290,47	7,2
	1B6	279,38	6,9
Ratones infectados (día 1 post-infección)	3B1	361,91	8,8
	3B2	637	7,2
	3B3	166,48	7,7
	3B4	437,4	6,9
	3B5	288,71	6,5

	Nombre de la muestra	Concentración (ng/ μ l)	RQI
	3B6	358,4	8
Ratones infectados (día 5 post-infección)	3F1	511,85	7,8
	3F2	495,99	7,5
	3F3	171,32	7,5
	3F4	161,08	8,1
	3F5	342,34	6,3
	3F6	261,56	7,8
Ratones infectados (día 10 post-infección)	3H1	271,49	6,1
	3H2	209,26	6,5
	3H3	704,21	6
	3H4	119,7	6,3
	3H5	218,19	6,6
	3H6	367,65	6,4

3.11 Microarrays

Una vez evaluada la calidad y concentración de las muestras, se procedió a la hibridación de los microarrays de transcriptoma completo. Se trata de una técnica compleja con múltiples pasos que se detallan a continuación (Figura 29).

Preparación de las muestras y generación de ADN copia (ADNc). Antes de comenzar con las muestras se prepararon los "Spikes" (controles internos). Se realizaron tres diluciones de la mezcla de controles internos con el buffer de dilución.

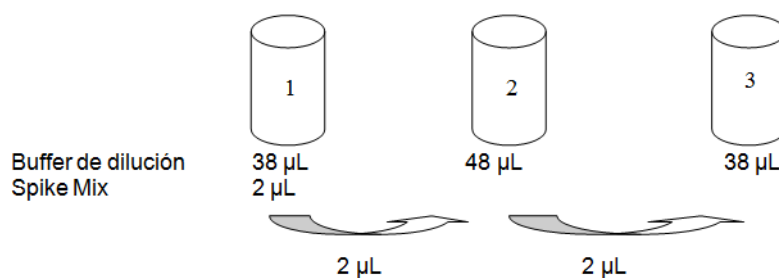


Figura 28: Diluciones del Spike mix con el buffer de dilución

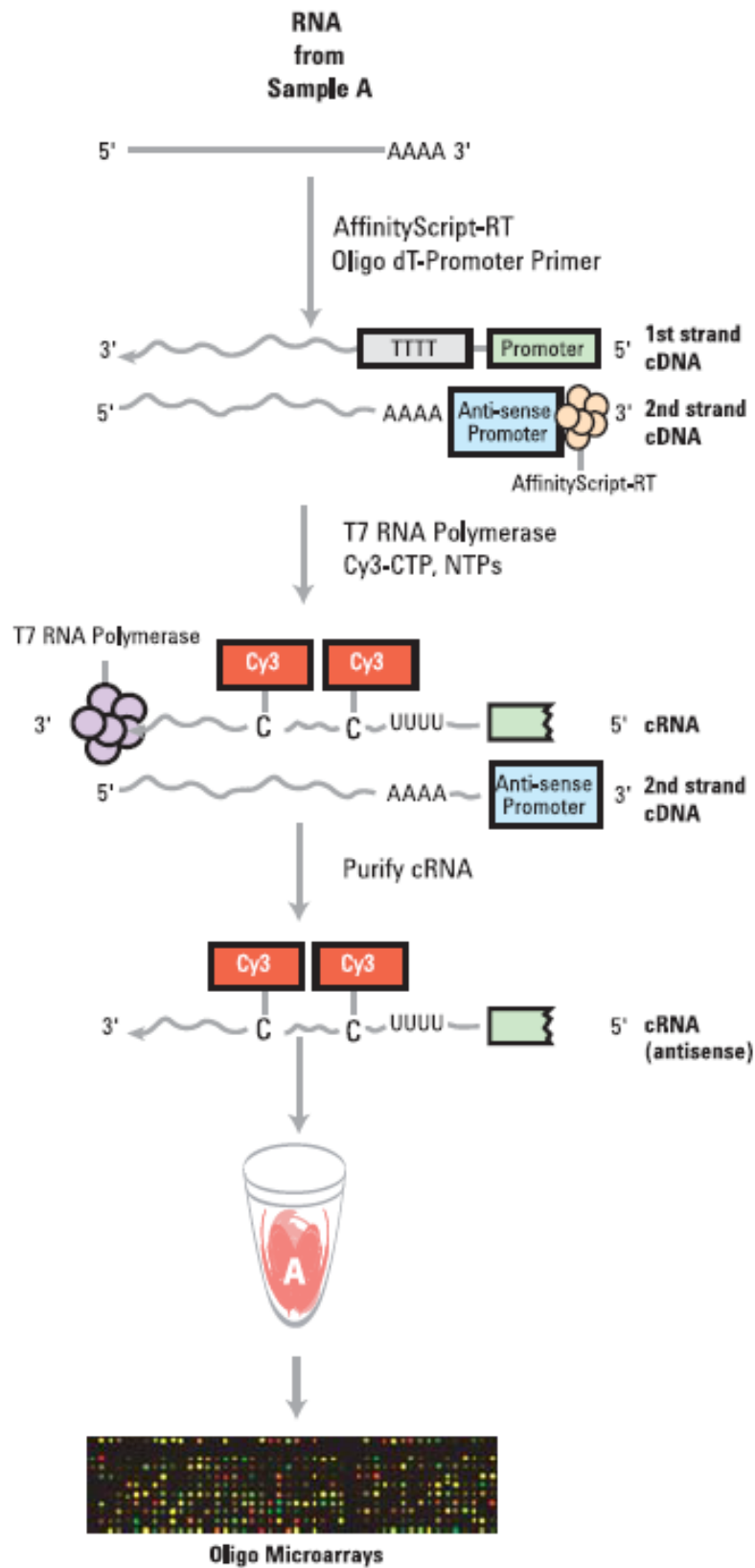


Figura 29: Fases de la hibridación de los microarrays de transcriptoma completo

Se mezclaron 0,5 μL de muestra con 2 μL de la última dilución de los controles internos y 1,8 μL de la mezcla de reacción que contenía los primers y H_2O libre de RNAsas. Esta mezcla se incubó 10 minutos a 65°C. Transcurridos los diez minutos las muestras se mantuvieron en hielo durante 5 minutos. Durante este proceso se preparó el resto de mezcla de reacción como se detalla en la siguiente tabla:

Componentes	Volumen μL
<i>5x First Strand Buffer</i>	2
<i>0,1 M DTT</i>	1
<i>10 mM dNTP Mix</i>	0,5
<i>Affinity Script RNase Block Mix</i>	1,2
<i>Volumen total</i>	4,7

Las muestras, junto con los primers y el agua se añadieron a la mezcla generada y se introdujeron en el termociclador 2 horas a 40°C y 15 minutos a 70° para generar el ADNc. Finalizado el proceso el ADNc se mantuvo en hielo 5 minutos.

Amplificación y marcaje. Se preparó la mezcla de reacción para la amplificación, marcaje y generación del “ARNc sintetizado”. Para ello se utilizó el kit Quick Amp Labeling de Agilent (p / n 5190-0442).

Componentes	Volumen μL
<i>H₂O libre de RNAsas</i>	0,75
<i>5x Transcription Buffer</i>	3,2
<i>0,1 M DTT</i>	0,6
<i>NTP Mix</i>	1
<i>T7 RNA Polimerase Blend</i>	0,21
<i>Cyanine 3 CTP</i>	0,24
<i>Volumen Total</i>	6

Se añadió la mezcla al ADNc previamente generado y se mantuvo 2 horas a 40 °C.

Purificación del ARNc. Una vez generado el ARNc marcado con la Cianina se procedió a su purificación mediante la utilización del kit Rneasy MiniKit (Quiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

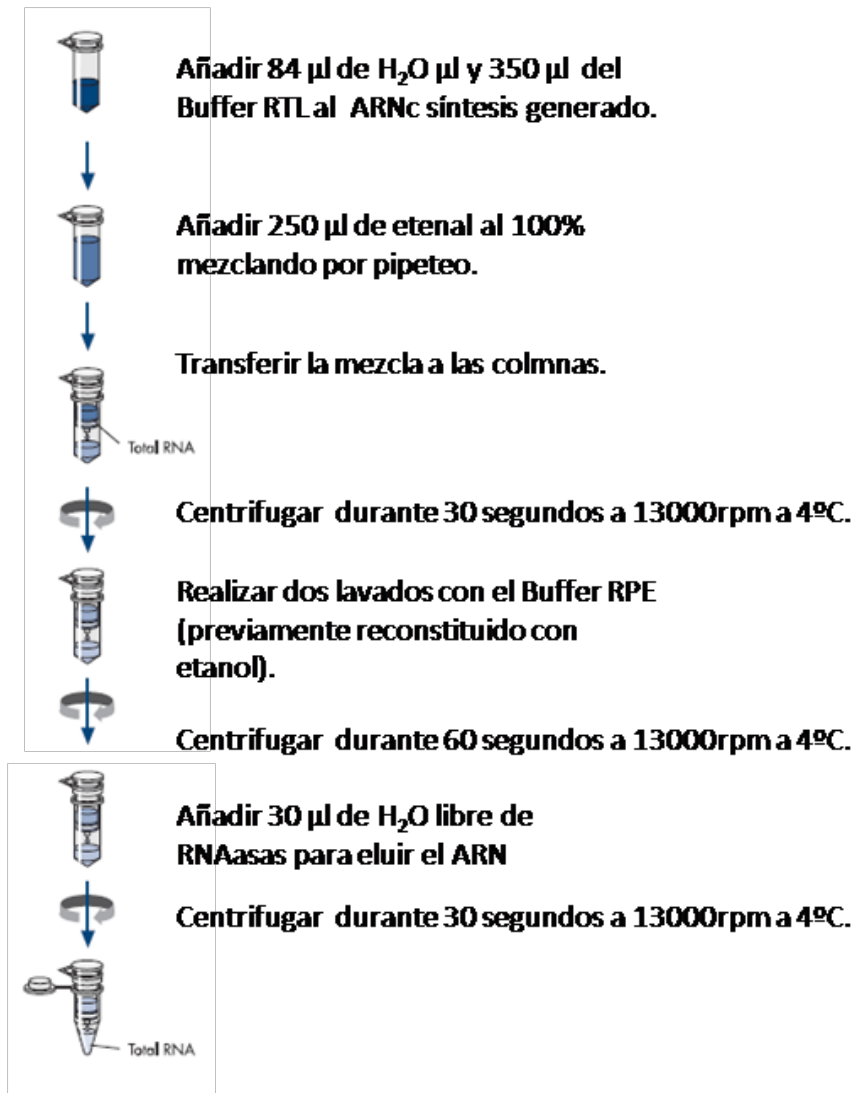


Figura 30: Purificación del ARNc

Evaluación de la actividad específica, el rendimiento y la cantidad de ARNc marcado. Mediante espectrofotometría (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware EE.UU.) se evaluó la cantidad y calidad del ARN marcado. Los datos que proporcionó el espectrofotómetro fueron la concentración de la sonda Cianina 3 (pmol/ µL), el ratio de absorbancia a 260 nm/280 nm, y la concentración de ARNc (ng/µL). De esta manera calculamos el rendimiento de la reacción de marcaje (“total yield”) y la actividad específica (SA).

Rendimiento:
$$\frac{\text{Concentración de ARNc} \times 30 \mu\text{L (volumen de eluido)}}{1000} = \mu\text{g de ARNc}$$

Actividad específica:
$$\frac{\text{Concentración de Cy3}}{\text{Concetración de ARNc}} \times 1000 = \text{pmol de Cy3 por } \mu\text{g de ARNc}$$

El rendimiento recomendado para la hibridación de microarrays debe ser 1,65 y la actividad específica 6, según las especificaciones de la casa comercial. Sólo se hibridaron aquellas

muestras que tras el marcaje y purificación presentaron un rendimiento y actividad específica adecuados.

Hibridación. Tras realizar el marcaje y purificación del ARNc se procedió a hibridar las muestras con los microarrays de expresión génica de ratón [Mouse GE 4x44K v2 Microarray Kit (Agilent p/n G4846A)] de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Previamente las muestras se incubaron 30 minutos a 60°C en oscuridad con una mezcla de buffer de fragmentación y bloqueo.

Componentes	Volumen μL
ARNc-Cy3	Volumen necesario para 1,65 ng de muestra
H ₂ O libre de RNAsas	Volumen para completar
10X Blocking Agilent Buffer	11
25X Fragmentation Buffer	2,2
Volumen Total	55

Transcurrida la incubación se añadieron 55 μL de buffer de hibridación (2x GEx hybridization buffer HI-RPM) y se procedió a su incubación con los microarrays.

La forma de cargar las muestras sobre los microarrays es un paso clave para una buena hibridación. En este experimento el formato de los microarrays fue 4x lo que significa que sobre un portaobjetos de cristal ("slide") encontramos 4 microarrays. Se cargaron 100 μL de cada muestra la muestra en un cubre de cristal evitando formar burbujas. Posteriormente se colocó el slide sobre el cubre y este sándwich se transfirió a una cámara de acero necesaria para sellar el cubre con el slide. Las cámaras se introdujeron en el rotor del horno hibridador donde se mantuvieron 17 horas a 65°C a 10rpm.



Figura 31: Procedimiento de carga de muestras sobre microarrays

Tras la incubación se procedió a los lavados de los slides para eliminar restos de fluorescencia con los buffer 1 y 2 proporcionados por el fabricante. Para ello los slides se sacaron de las cámaras de acero y se sumergieron en una bañera con el buffer 1 separando el cubre del slide. Inmediatamente después se introdujeron en una nueva bañera que contenía la solución tampón 1, manteniéndolos en agitación durante 30 segundos. Por último, los slides se transfirieron a una nueva bañera que contenía la solución tampón 2 a 37°C donde se lavaron durante un minuto en agitación. Finalmente se secaron cuidadosamente y cada uno de los slides se introdujo en un soporte especial para su escaneado.



Figura 32: Secado e introducción de los slides en el soporte para escaneo

Escaneado, procesamiento de la imagen y generación de resultados. Los microarrays se escanearon en la plataforma Agilent G2565BA. Para la extracción de los datos se utilizó el programa "Feature Extraction 10.7.1.1" de la misma casa comercial. El protocolo utilizado para la extracción de los datos fue GE1-107_sep09.

Control de calidad de la técnica. Tras el escaneado, el programa "Feature Extraction", además de generar los datos de expresión génica de cada una de las muestras, también aporta un documento pdf con información concerniente a la calidad de la técnica. Se evaluaron unos a uno los ficheros de calidad de cada microarray valorando parámetros como la señal neta del microarray, la distribución de la señal media en cada columna y fila del microarray, el ruido de fondo, la reproducibilidad (mediante el porcentaje de variación de sondas control que se encuentran duplicadas en todo el microarray) y la curva de los controles internos (spikes).

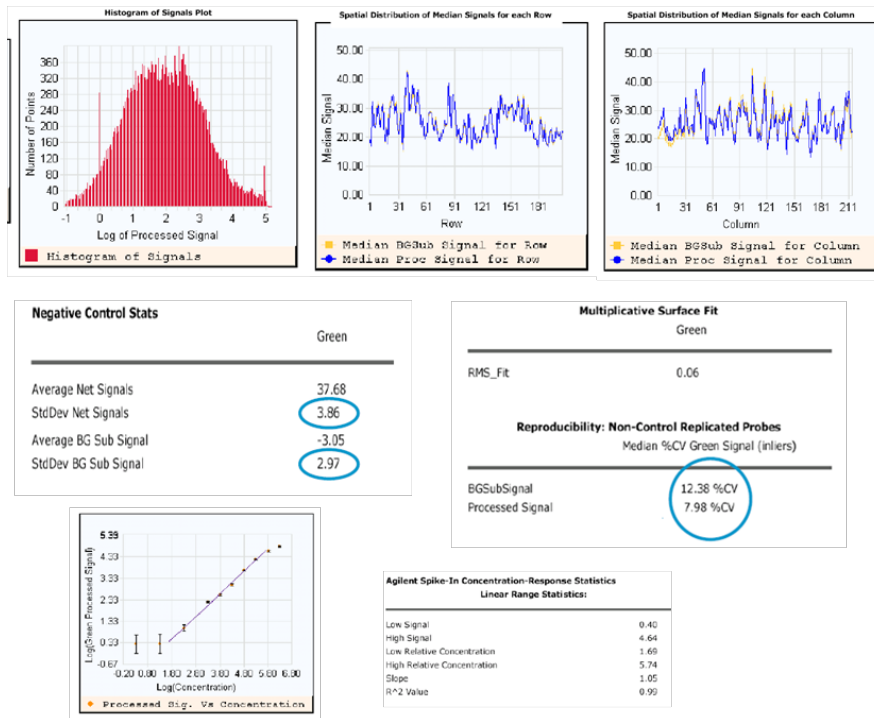


Figura 33: Control de calidad de la técnica

Únicamente se analizaron los niveles de expresión génica de aquellas muestras cuyos arrays pasaron los criterios de calidad.

3.12 Análisis de perfiles de expresión génica

El análisis de datos se llevó a cabo mediante el uso del software GeneSpring GX 12.0. Los datos originales se limpiaron y se normalizaron siguiendo tres pasos: 1) se restó de la intensidad de fondo a cada una de las sondas del array, 2) los valores de intensidad de señal de cada sonda que se transformaron, para ello se realizó la normalización con el percentil 75 del valor de intensidad de todo el array, seguido de la transformación logarítmica de los datos, 3) finalmente se realizó una transformación basal utilizando la mediana de los niveles de expresión de todas las muestras.

Tras realizar el pre-procesamiento de las muestras, se evaluó la calidad de los datos mediante un análisis de componentes principales (PCA), comprobando que ninguna muestra de un grupo se dispersara de las demás.

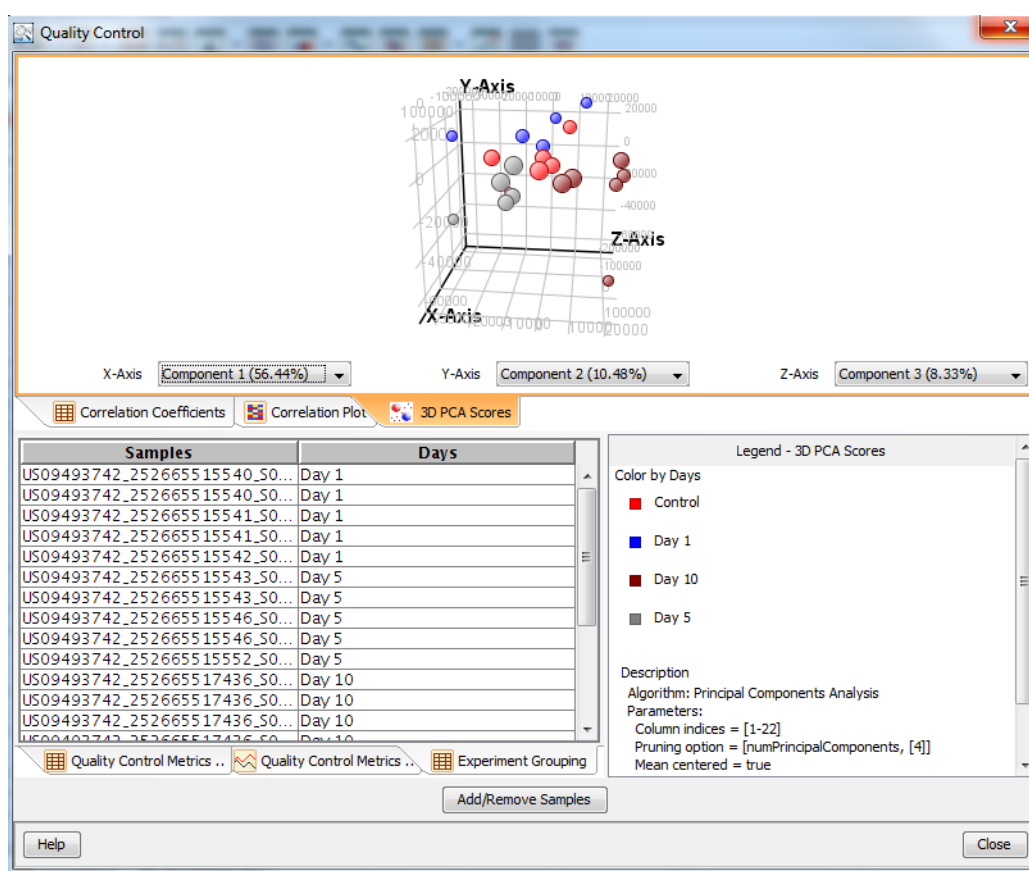


Figura 34: Resultados del análisis PCA

Una vez comprobada la calidad de las muestras, se realizaron diferentes filtros de los genes a comparar. Únicamente se analizaron aquellos genes cuyas sondas se hubieran detectado en al menos el 75% de las muestras de un grupo, eliminado también aquellos genes cuyos valores de expresión fueran muy bajos (entre -1 y 1). Se generó una lista final de genes en base a la cual se realizaron las comparaciones estadísticas.

Se compararon los niveles de expresión génica entre el grupo de ratones infectados y el grupo de ratones control a distintos días (1, 5 y 10 post-infección) mediante el test estadístico T

Moderado (GeneSpring GX 12.0). El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$, aplicando un test de corrección de pruebas múltiples (Benjamini-Hochberg-FDR). Además se aplicó un filtro para seleccionar aquellos genes cuyos niveles de expresión en el grupo de los ratones infectados variaban al menos dos veces con respecto a los niveles de expresión del grupo control (“fold change” = 2)

3.13 Análisis de rutas de señalización intracelular

Una vez realizadas las comparaciones e identificados los genes diferencialmente expresados entre grupos, se realizó un análisis de las rutas de señalización intracelular en las que estos genes estaban implicados. Para ello se utilizó el programa bioinformático Ingenuity Pathways Analysis [IPA, (Ingenuity Systems-QuiaGen, Redwood City, CA)]. Mediante IPA, se analizaron las listas de genes y aplicando el Test de Fisher se identificaron las rutas canónicas diferencialmente expresadas (p valor < 0.05). Este método calcula el valor de significación de una ruta teniendo en cuenta el número de genes que están diferencialmente expresados en el análisis y que participan en la ruta y el número total de genes que se conoce previamente que intervienen en esa ruta de señalización. Además de identificar las rutas diferencialmente expresadas, IPA se utilizó para representar estas rutas y estudiar el papel de cada uno de los genes dentro de la vía.

3.14 Repositorio de datos genómicos: Array Express

Como dictan las guías MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment), los datos obtenidos de cada microarray así como el diseño del estudio y los protocolos experimentales se subieron al repositorio público de datos genómicos Array Express. Este tipo de repositorios evalúan la calidad de los datos que se facilitan y los ponen a disposición de la comunidad científica para su posible reutilización. El código de acceso generado para este experimento fue: E-MTAB-3866 (*Molecular lung immunopathology of uncomplicated pdm H1N1 pneumonia in mice*).

3.15 Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico desarrollado en el presente trabajo de tesis se realizó con el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago; IL, USA). En todos los análisis, los ratones se utilizaron como unidad experimental. Se fijó el nivel de significación en 0.05. Para evaluar la normalidad de las variables cuantitativas examinadas y la homogeneidad de las varianzas se usaron los test de Shapiro Wilk y el test de Levene, respectivamente. Para analizar y representar las diferencias en el peso de los animales así como los cambios en la carga viral se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

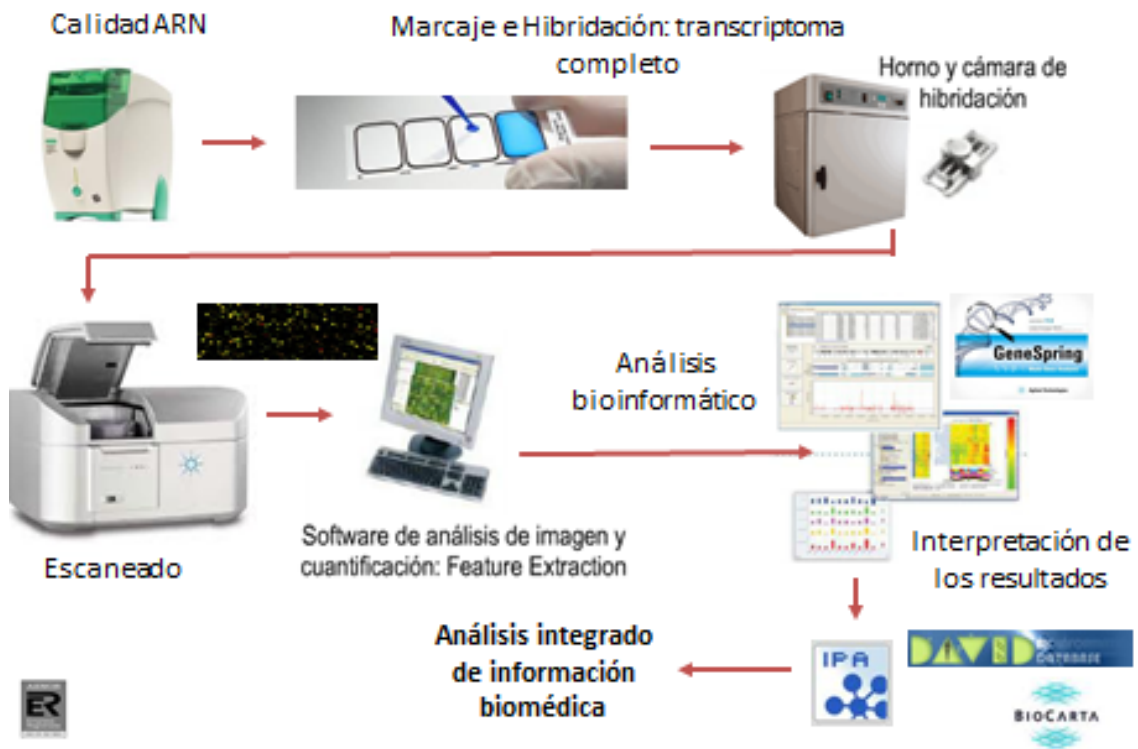
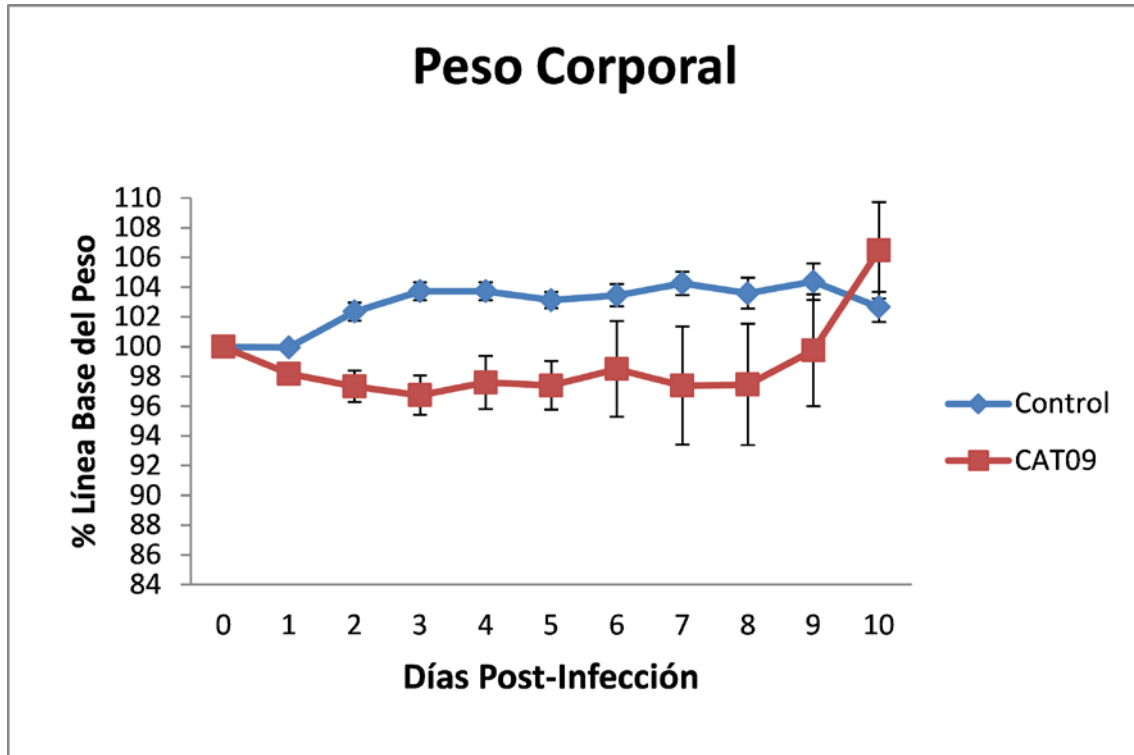


Figura 35: Flujo de trabajo en el análisis del ARN

4 RESULTADOS

4.1 Signos clínicos

Se monitorizó el peso de los ratones durante 10 días tras la infección con el virus pandémico CAT09. Los ratones infectados mostraron una disminución significativa de peso los primeros cinco días tras la infección, comparado con los cambios de peso que experimentaron los controles sin infectar ($p < 0,05$). A partir de ese día los ratones infectados comenzaron a recuperar peso sin existir diferencias significativas respecto a los animales sin infectar.



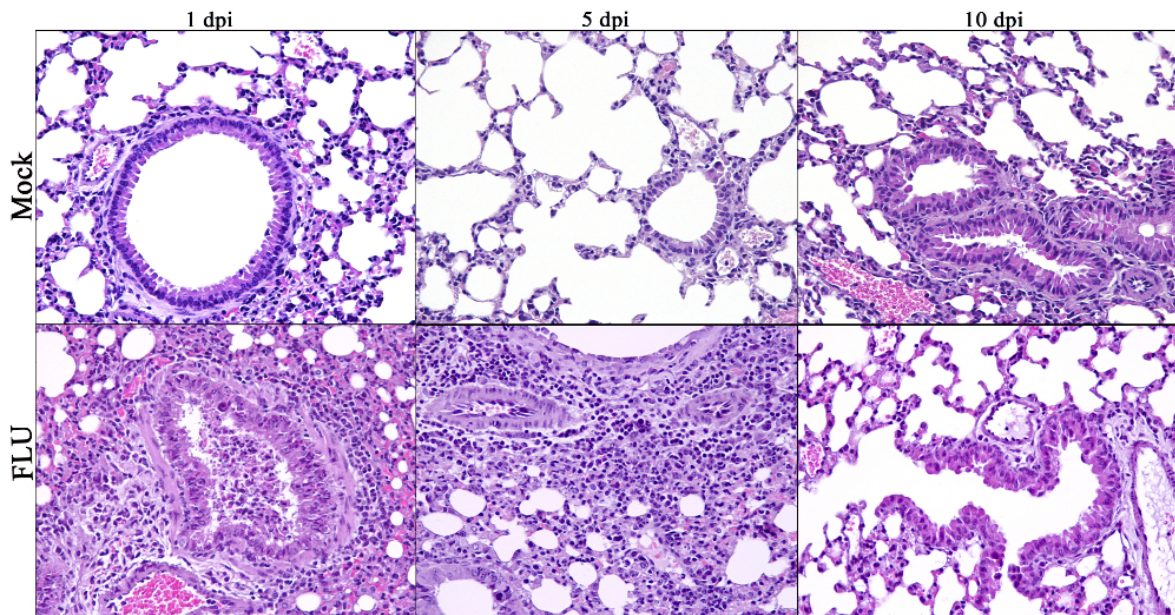
Estadísticos de contraste (Mann Whitney)										
	1dpi	2dpi	3dpi	4dpi	5dpi	6dpi	7dpi	8dpi	9dpi	10dpi
Significación estadística (valor p)	0.000	0.002	0.001	0.033	0.036	0.862	0.908	0.686	0.862	0.082

Figura 36: Cambios del peso corporal en ratones infectados con CAT-09 en comparación con los ratones control. El peso corporal de cada día se expresa como porcentaje con respecto al nivel basal en el día 0. Las barras de error representan el error estándar de la media. El símbolo "*" representa diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2 Histopatología

Se examinaron los tejidos pulmonares de los ratones infectados a día 1, 5 y 10 pi. en busca de lesiones histopatológicas, comparándolos con los tejidos de pulmón de los ratones control. A día 1 pi. tres de los seis ratones infectados presentaban lesiones pulmonares, dos de ellos presentaban bronquiolitis necrotizante y el otro neumonía bronquiolito-intersticial. A día 5 p.i.,

cinco de los ratones mostraban una neumonía bronquiolo-intersticial y sólo 1 ratón no presentaba lesiones. Por el contrario a día 10 pi. se observó la ausencia de lesiones en todos los ratones.



Preparación	Grado lesional				Media
	0	1	2	3	
Control 1pi	6				0
FLU 1pi	3	2	1		0.7
Control 5pi	5				0
FLU 5pi	1		5		1.7
Control 10pi	6				0
FLU 10pi	6				0

0 = ausencia de lesiones.

1 = bronquiolitis necrotizante (necrosis y/o degeneración del epitelio bronquiolar)

2 = neumonía bronquiolo-intersticial (necrosis y/o degeneración del epitelio bronquiolar con hiperplasia del BALT y leve infiltración de macrófagos, linfocitos y plasmáticas en tabiques alveolares peribronquiolares).

3 = neumonía intersticial (marcada infiltración difusa de los tabiques alveolares por macrófagos, linfocitos y plasmáticas).

Figura 37: Histopatología de los ratones pertenecientes al grupo de ratones infectados con CAT-09, respecto a los controles. Tinción de Hematoxilina/Eosina. Cada imagen se eligió por ser representativa de cada grupo experimental.

4.3 Estudio de la carga viral en pulmón de ratón

Respecto a la carga viral obtenida en los sobrenadantes de muestras pulmonares, se observó que el primer día post-infección los ratones mostraban el valor máximo, con un título de $1.08E+05$ PFU/gr de media (DS: 143052.661). A día 5 pi. los animales infectados seguían secretando virus en pulmón, aunque con un título menor, $1.01E+04$ PFU/gr (8623.8447), siendo la carga viral a día 10 pi. indetectable.

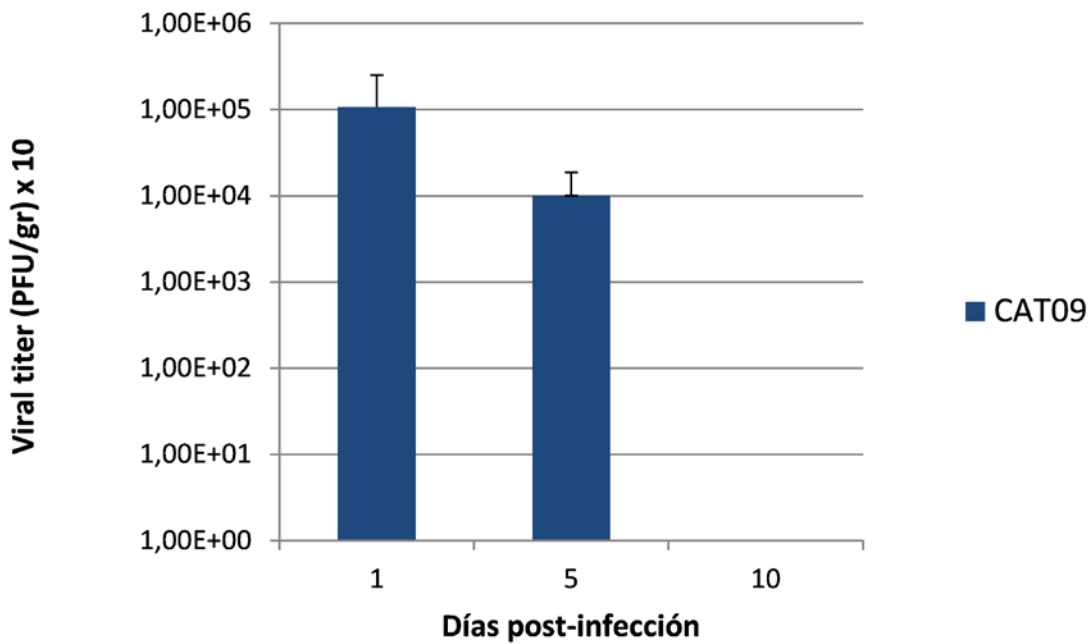


Figura 38: Carga viral a los 1,5 y 10 días post-infección en sobrenadantes de muestras pulmonares de 6 ratones infectados.

4.4 Niveles de expresión génica

Los resultados obtenidos al comparar los niveles de expresión génica de los ratones infectados con los niveles de expresión de los ratones control a diferentes tiempos se detallan en la siguiente tabla:

Día 1:	Día 5:	Día 10:
No diferencias	1264 genes diferencialmente expresados: 418 genes sobre-expresados 847 genes con expresión reprimida	74 genes diferencialmente expresados:

A día 1 no se encontraron diferencias en los niveles de expresión génica entre ambos grupos. Sin embargo a día 5 pi, el virus pandémico indujo cambios en los niveles de expresión de 1264 genes, de los cuales 418 estaban sobre-expresados y 846 reprimidos en comparación con los niveles de expresión de los ratones control. La mayoría de estos cambios desaparecieron a día 10 pi. con la excepción de los niveles de expresión de 30 de estos genes.

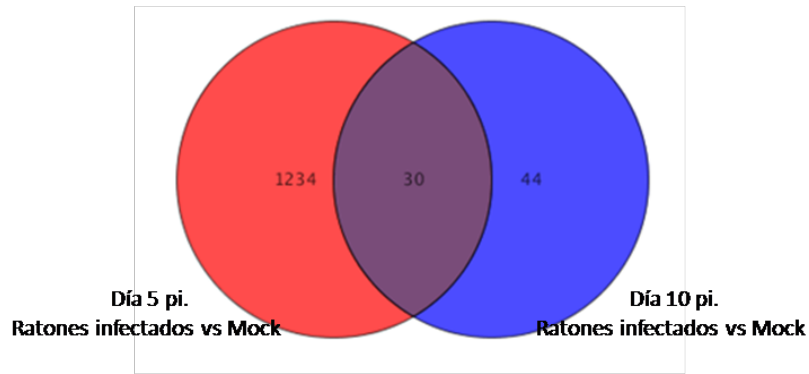


Figura 39: Diagrama de Venn. Número de genes diferencialmente expresados a día 5 (rojo) y a día 10 (azul).

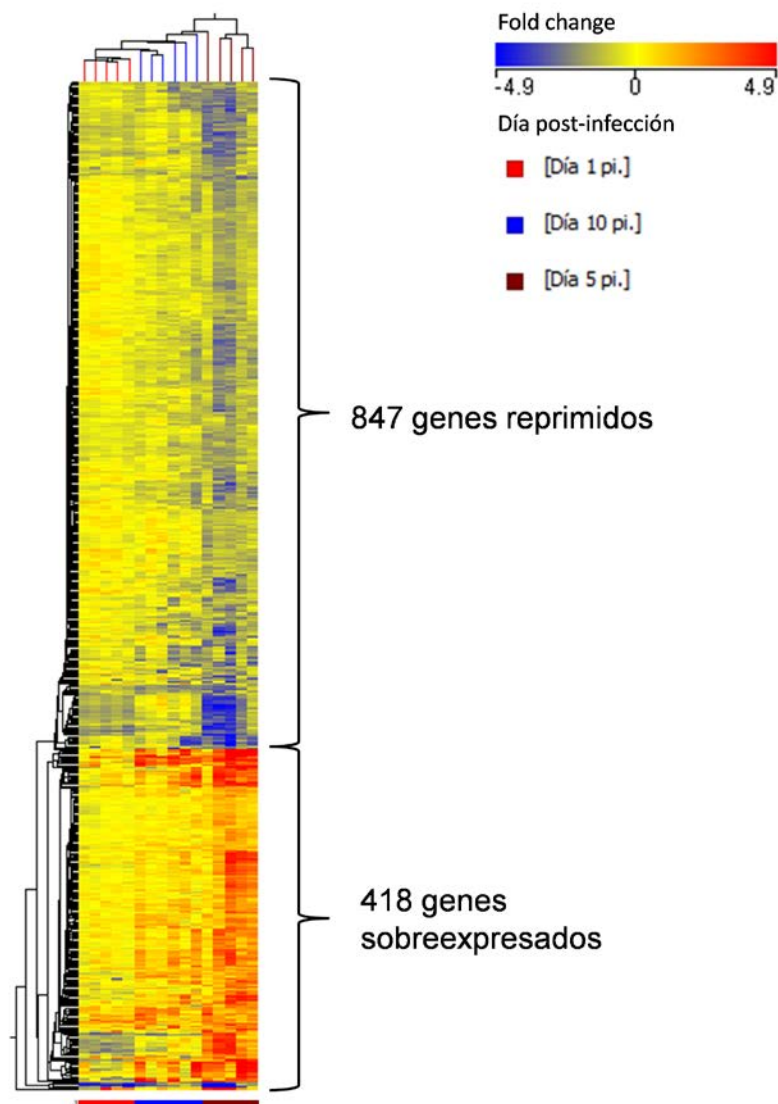


Figura 40: Diagrama de color de los niveles de expresión génica de los ratones infectados a día 1,5 y 10 pi. Únicamente se representan los 1264 genes cuyos niveles diferían entre ambos grupos a día 5. Cada fila constituye un gen y cada columna un ratón, representándose en color el “fold change” de cada gen (infección/control). Los valores en rojo representan aquellos genes sobre expresados en la infección con el virus CAT09 y en azul los genes reprimidos. También se representa un análisis de cluster de los

ratones infectados (agrupándose por día) y un cluster de los genes (agrupándose por niveles de expresión).

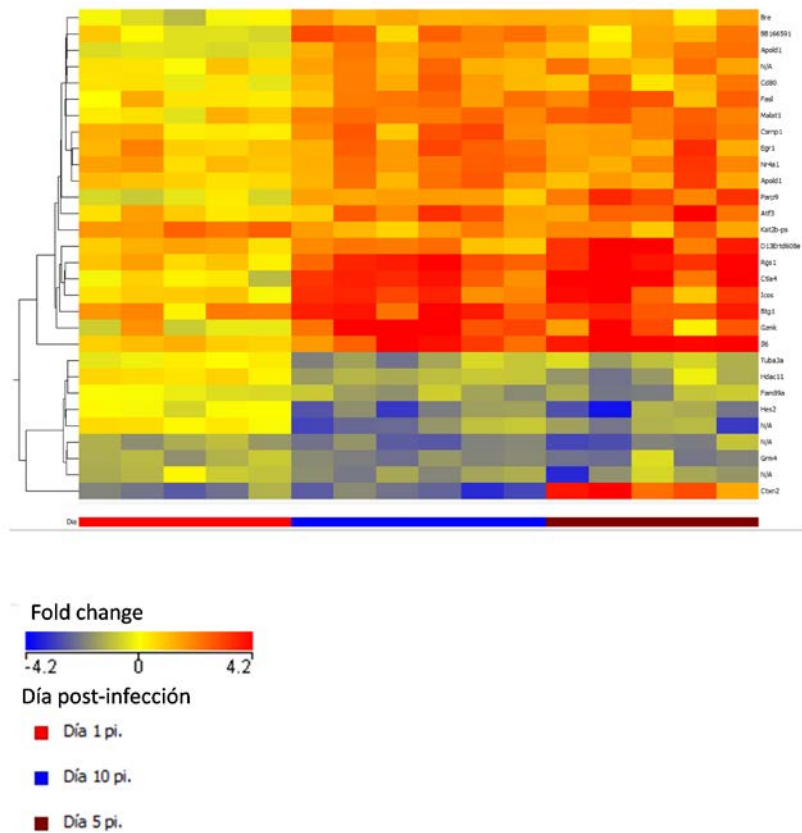


Figura 41: Diagrama de color de los niveles de expresión génica de los 30 genes cuyos niveles de expresión continúan alterados a día 10 pi.

4.5 Análisis de expresión génica diferencial.

Una vez comprobado que los cambios más significativos ocurrían en el día 5 pi., el estudio se centró en identificar los genes cuyos niveles de expresión variaban más tras la infección con el virus pandémico y las rutas de señalización en la que éstos intervenían. Para ello la lista de genes se analizó con el software IPA, identificando por un lado los genes más alterados y por otro lado las rutas de señalización intracelular significativas.

4.6 Genes más alterados tras la infección por el virus CAT09

IPA identificó los genes sobre los que el virus inducía cambios más agudos en función del “fold change”.

Moléculas	Exp. Value
IL6	↑86.593
IFNB1	↑62.582
CXCL10 / IP-10	↑43.306
Saa3	↑39.326
Oxct2a/Oxct2b	↑27.026
SLC4A7	↑23.486
SLFN12L	↑23.158
Ccl2	↑22.767
Cxcl9*	↑21.490
IRG1	↑21.411

Citoquinas pro-inflamatorias típicas de la defensa antiviral

Genes sobre-expresados		
Molécula	Símbolo del gen	FC
Mus musculus interleukin 6	IL6	86.593
Mus musculus interferon beta 1	IFNB1	62.582
Mus musculus chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (IP10)	CXCL10	43.306
Mus musculus serum amyloid A 3	Saa3	39.326
Mus musculus 3-oxoacid CoA transferase 2B	Oxct2a/Oxct2b	27.026
Mus musculus solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	SLC4A7	23.486
Mus musculus schlafen family member 12	SLFN12L	23.158
Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand	Ccl2	22.767
Mus musculus chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (MIP-1γ)	Cxcl9*	21.490
Mus musculus immunoresponsive gene 1	IRG1	21.411

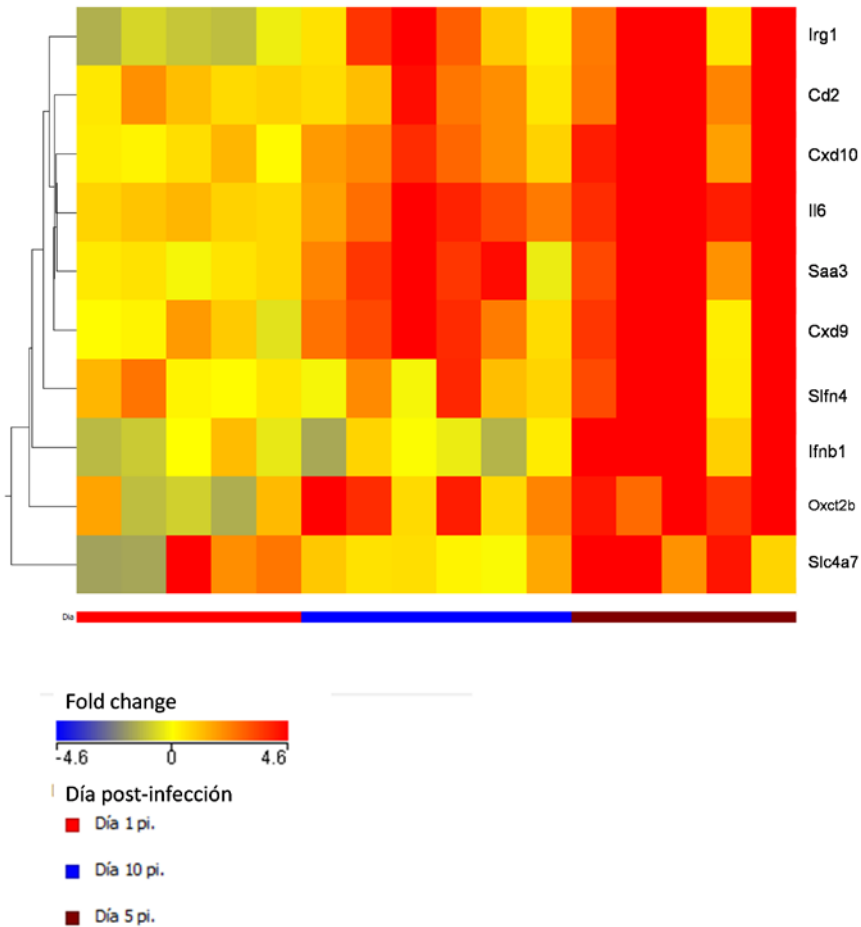


Figura 42: Clúster de los genes top sobreexpresados.

Genes reprimidos		
Molécula	Símbolo del	FC
Mus musculus cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	CYP17A1	-11.400
Mus musculus family with sequence similarity 123, member C (Fam123c)	AMER3	-11.378
Mus musculus glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 4	GFRA4*	-10.526
Mus musculus adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	Ap2b1	-9.944
Mus musculus cytochrome P450, family 2. subfamily c, polypeptide 37	Cyp2c37	-9.388
Mus musculus keratin associated protein 16-4	KRTAP19-3	-8.956
pancreatic polypeptide receptor 1 (Ppyr1) Npy4r	Npy4r	-8.870
Mus musculus dishevelled 3, dsh homolog (Drosophila)	DVL3	-8.751
Mus musculus wingless-related MMTV integration site 1	WNT1	-8.744
Mus musculus von Willebrand factor A domain containing 3B	VWA3B	-8.649

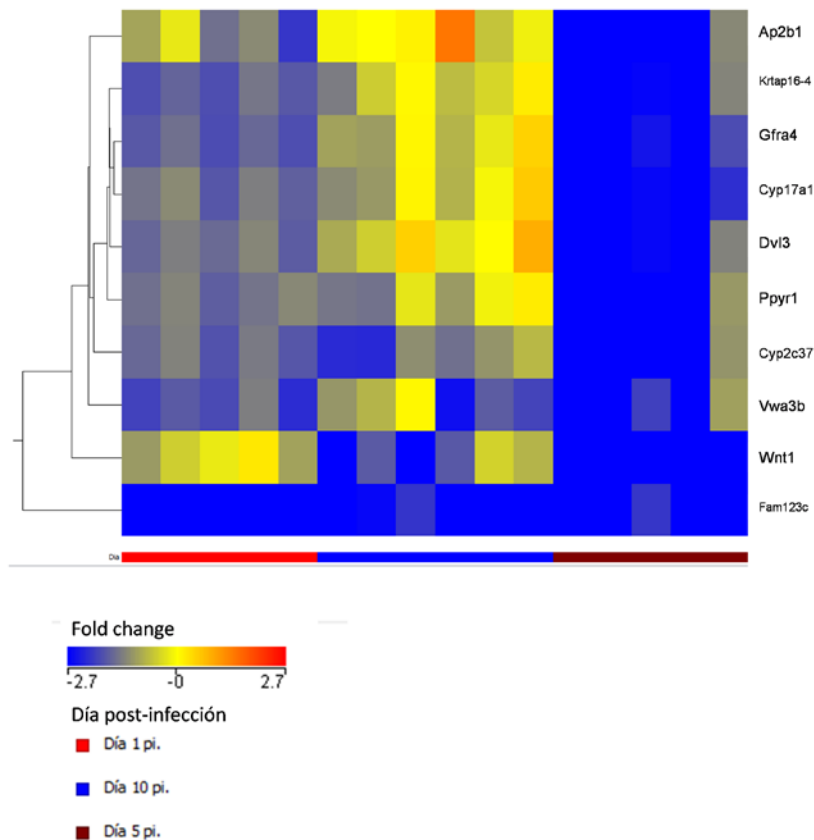


Figura 43: Clúster de los genes top reprimidos.

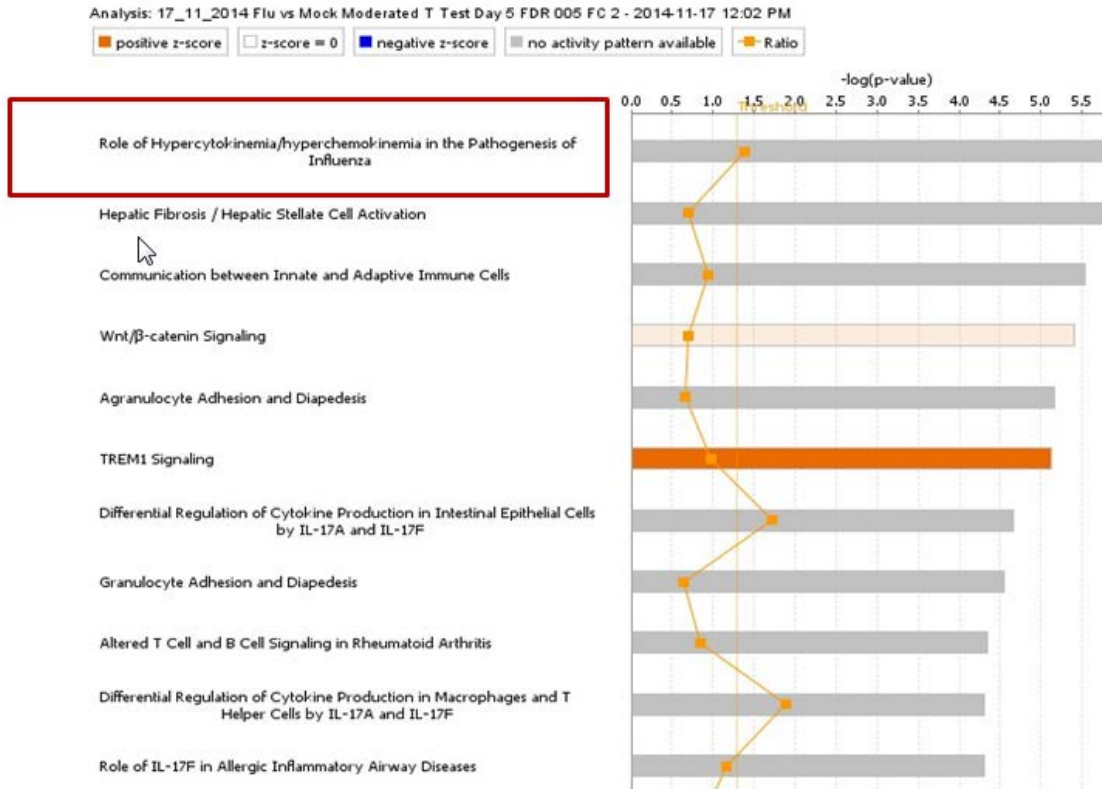
4.7 Rutas de señalización intracelular a día 5 (Ingenuity Pathways, IPA)

Las rutas más destacadas por el IPA se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 11: Rutas de señalización intracelular

	Rutas de señalización intracelular	-log (p-value)	Ratio	Moléculas	Funciones principales y enfermedades asociadas
1	Papel de la hipercitoquinemia/ hiperquimioquinemia en la patogénesis de la gripe	5.95E00	2.44E-01	CXCL10,IFNG,IL1A,CCR5,CCL4,CCL2,IL12B,IFNB1,IL1B,IL6,TNF	Respuesta inflamatoria; Señalización e interacción célula a célula; Movimiento celular; Desarrollo y Función del sistema hematológico
2	Fibrosis hepática / Activación de las células estrelladas hepáticas	5.92E00	1.22E-01	IFNG,CCR5,IL1A,MYH9,LHX2,LEPR,MYH14,VEGF B,MMP13,IL6,MYH7B,PDGFB,IL1R2,CXCL3,IGF2,CCL2,IGF1,TNFSF12,TGFB1,TIMP1,IL1B,KDR,TNF,FASLG	Lesiones y anomalías del organismo; Desarrollo y función del sistema cardiovascular; Desarrollo de organismos
3	Comunicación entre las células de la respuesta inmune innata y adaptativa	5.53E00	1.65E-01	B2M,IFNG,IL1A,IFNB1,C D83,IL6,CXCL10,CCL4,C D80,CCL3L3,IL12B,CD86,Tlr13,IL1B,TNF	Señalización Celular e interacción célula-célula; Crecimiento y proliferación celular; Desarrollo y función del sistema hematológico
4	Señalización de Wnt/ β -catenin	5.4E00	1.24E-01	SOX7,LRP5,AKT2,CSNK1G2,TLE1,WNT16,SOX13,ACVR1B,H2BFM,SOX2,WNT7A,APC2,CDH3,TGFB1,PPP2R2C,DVL3,SOX18,ACVR1C,FZD2,WNT1,FZD7	La Expresión Génica; Desarrollo celular; Desarrollo de tejido
5	Adhesión de los agranulocitos y diapédesis	5.16E00	1.16E-01	IL1A,MYH9,MYH14,MMP15,MMP13,Cxcl9,MYH7B,CXCL6,CXCL10,CXCL3,CLDN23,CCL4,CCL2,CXCL13,Ccl8,CCL3L3,Ccl2,IL1B,XCL1,CXCL2,TNF,Ccl7	Señalización Celular e interacción; Desarrollo de los tejidos; Desarrollo y Función del Sistema hematológico
6	Señalización de TREM1	5.12E00	1.73E-01	CXCL3,AKT2,CCL2,MAPK3,CASP1,IL1B,CD86,Tlr13,CD83,IL6,FCGR2B,TNF,IRAK1	Señalización Celular e interacción; Desarrollo y función del Sistema hematológico; Circulación inmune celular
7	Regulación diferencial de la producción de citocinas en células epiteliales intestinales por la IL-17A e IL-17F	4.66E00	3.04E-01	IFNG,IL1A,CCL4,CCL2,IL12B,IL1B,TNF	Señalización Celular e interacción; Desarrollo y función del sistema hematológico; Circulación inmune celular
8	Adhesión de granulocitos y diapédesis	4.56E00	1.13E-01	IL1A,MMP15,MMP13,Cxcl9,CXCL6,CXCL10,IL1R2,CXCL3,CLDN23,CCL4,CCL2,CXCL13,Ccl8,CCL3L3,Ccl2,IL1B,XCL1,CXCL2,TNF,Ccl7	Señalización Celular e interacción; Desarrollo y función del sistema hematológico; Circulación inmune celular
9	Señalización celular en la artritis reumatoide. Alteración de las células T y B.	4.35E00	1.48E-01	IFNG,IL1A,CXCL13,CD80,TGFB1,IL12B,H2-Eb2,IL1B,CD86,Tlr13,IL6,TNF,FASLG	Desarrollo y función del sistema hematológico; La morfología del tejido; Desarrollo celular
10	Regulación diferencial de la producción de citocinas en los macrófagos y las	4.31E00	3.33E-01	CCL4,CCL2,IL12B,IL1B,IL6,TNF	Señalización Celular e interacción; Desarrollo y función del Sistema

	Rutas de señalización intracelular	-log (p-value)	Ratio	Moléculas	Funciones principales y enfermedades asociadas
	células T auxiliares por la IL-17A e IL-17F				hematológico
11	Papel de la IL-17F en las enfermedades alérgicas inflamatorias de las vías respiratorias	4.31E00	2.05E-01	CXCL10,CCL4,IGF1,CCL2,MAPK3,MMP13,IL1B,IL6,CXCL6	Enfermedades del tejido conectivo; Enfermedades inmunológicas; Enfermedad Inflamatoria



Ruta 1. Papel de la hipercitoquinemia/hiperquimioquinemia en la patogénesis de la gripe

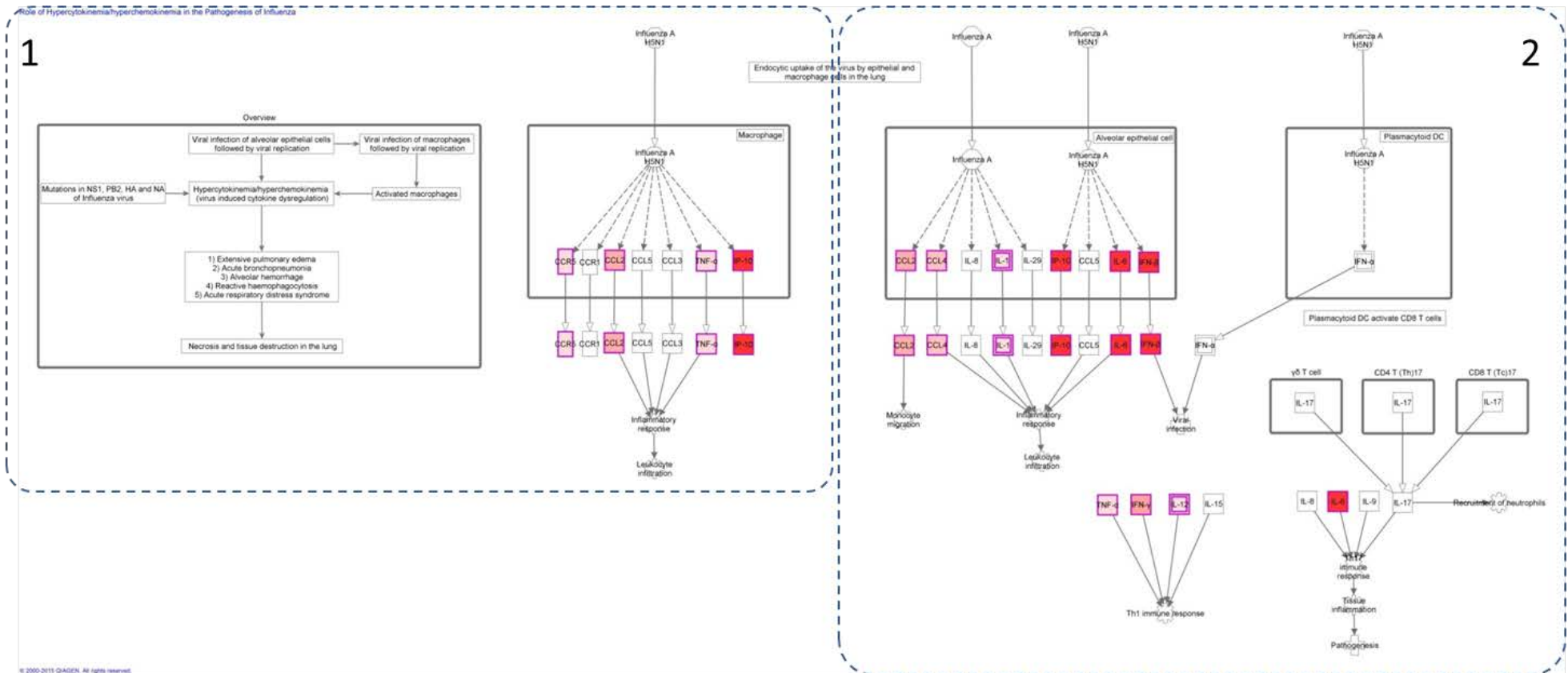


Figura 44: Ruta 1 completa

Role of Hypercytokinemia/hyperchemokineemia in the Pathogenesis of Influenza

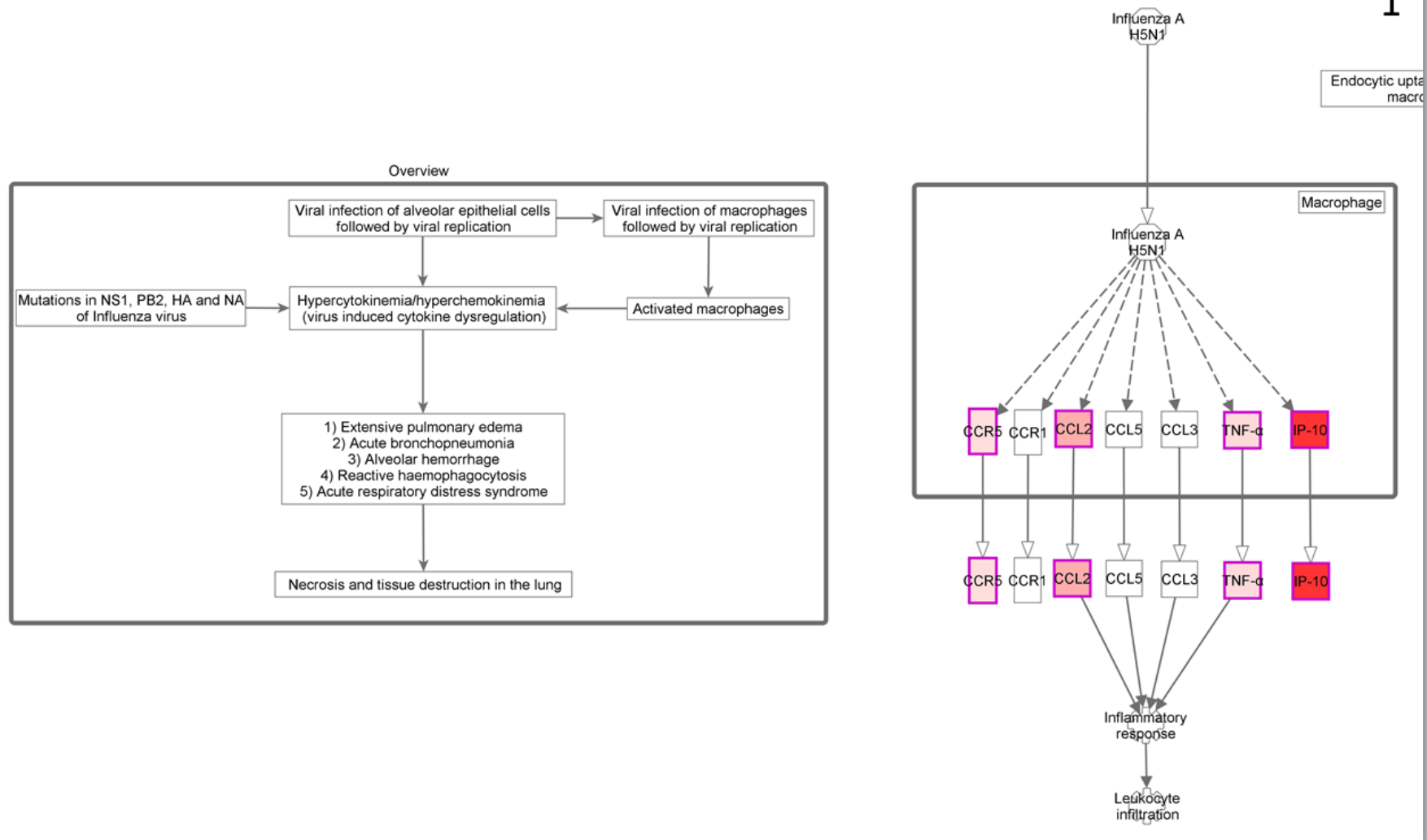


Figura 45: Ruta 1 - Sección 1 de 2

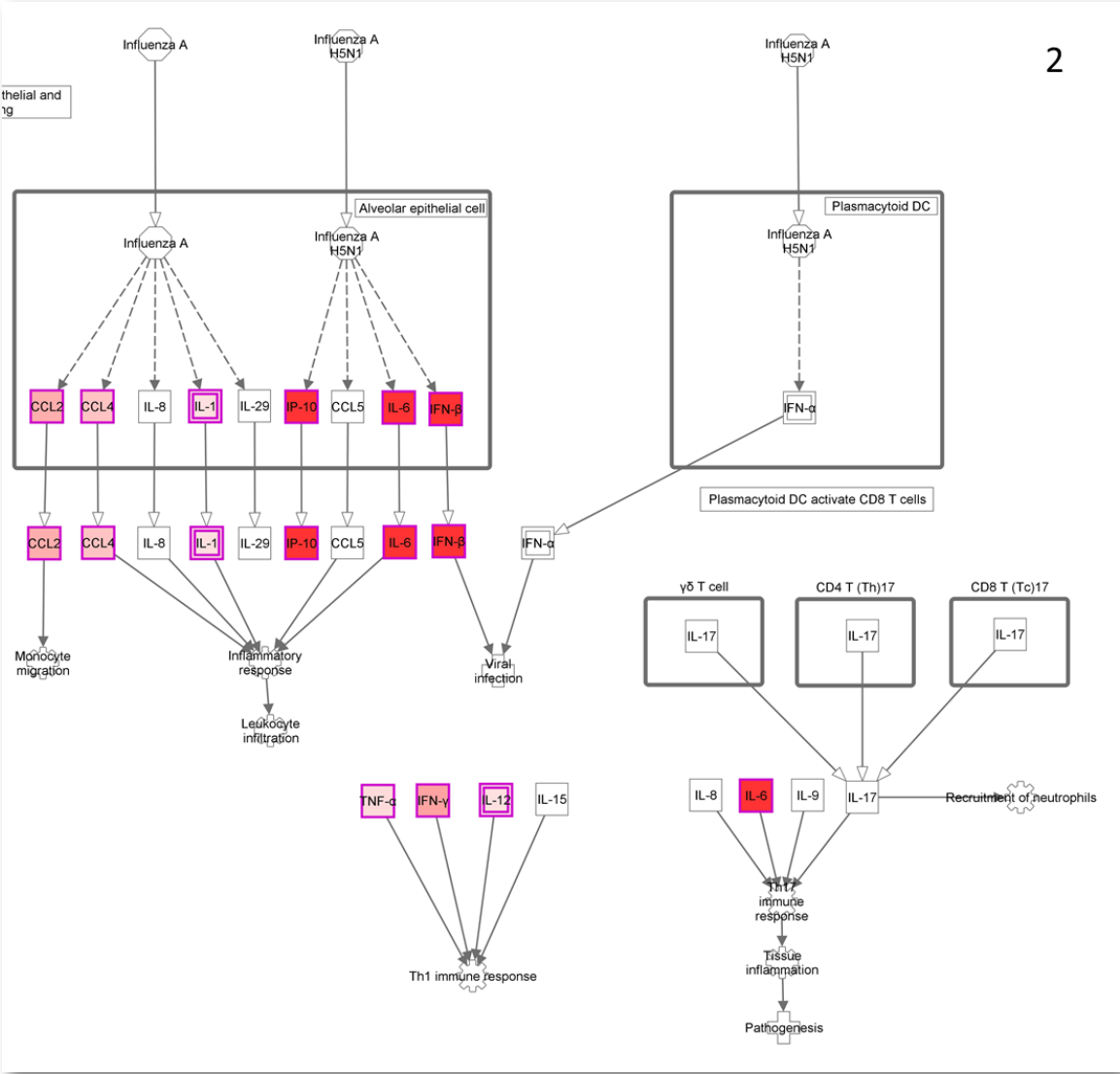


Figura 46: Ruta 1 - Sección 2 de 2

Tabla 12: Genes de la ruta 1

Símbolo del gen	Nombre del gen	Log Ratio
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	10.716
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	7.854
CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene)	4.406
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	43.306
IFNB1	interferon, beta 1, fibroblast	62.582
IFNG	interferon, gamma	12.286
IL6	interleukin 6	86.593
IL12B	interleukin 12B	4.080
IL1A	interleukin 1, alpha	3.755
IL1B	interleukin 1, beta	4.419
TNF	tumor necrosis factor	4.820

Ruta 2. Fibrosis hepática / Activación de las células estrelladas hepáticas

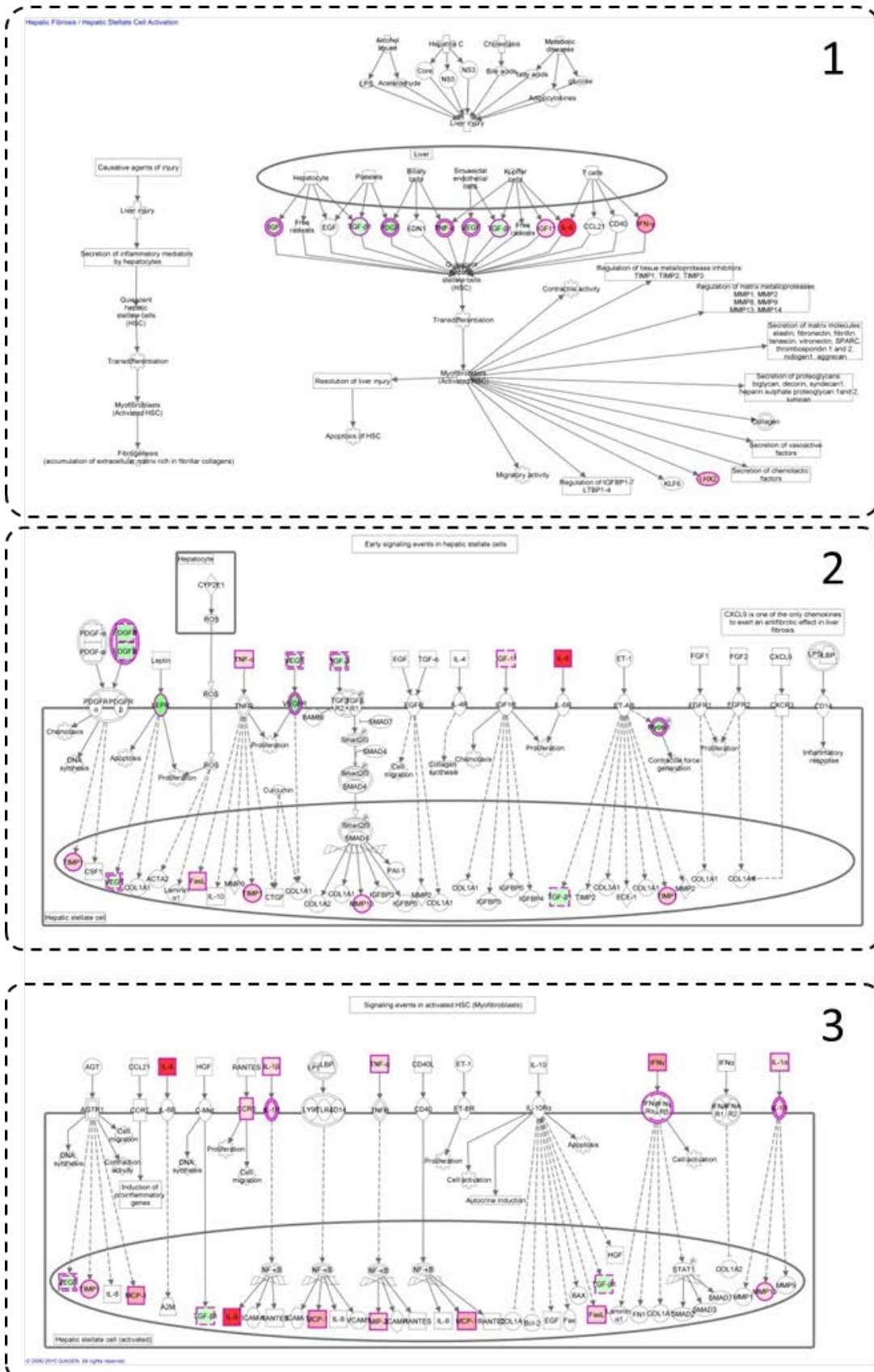


Figura 47: Esquema de la ruta 2

1

Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation

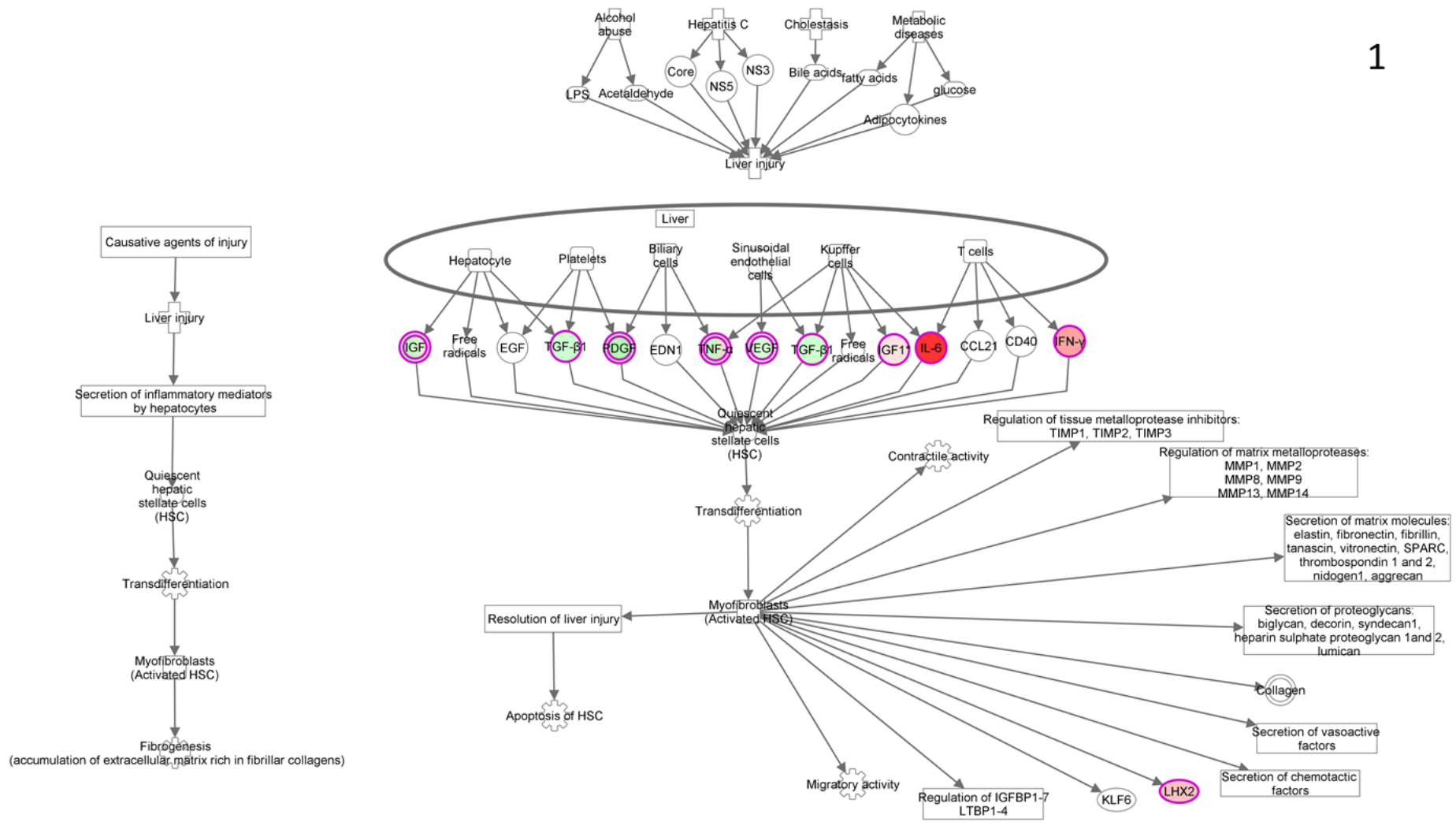


Figura 48: Ruta 2 – Sección 1 de 3

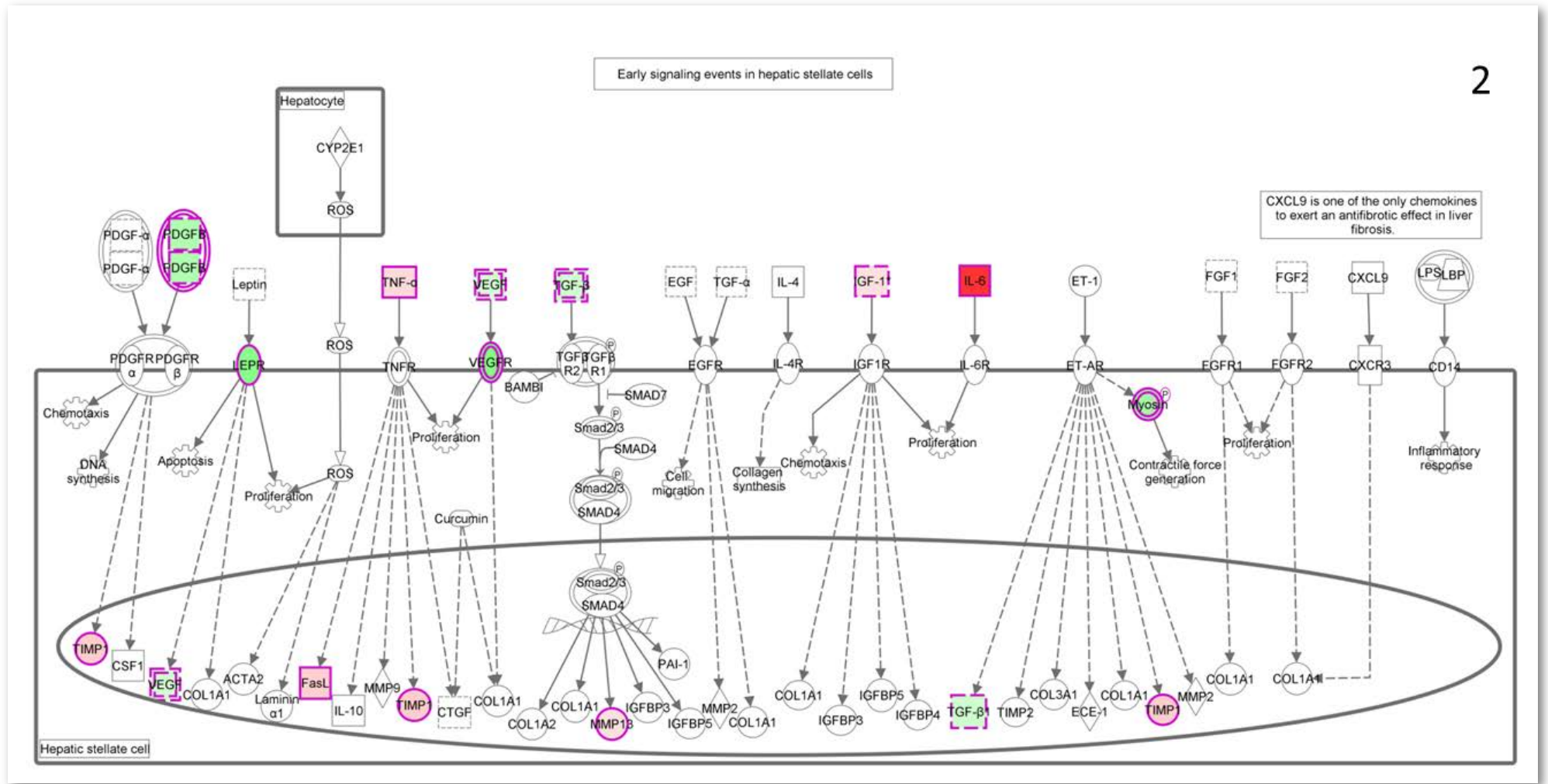


Figura 49: Ruta 2 – Sección 2 de 3

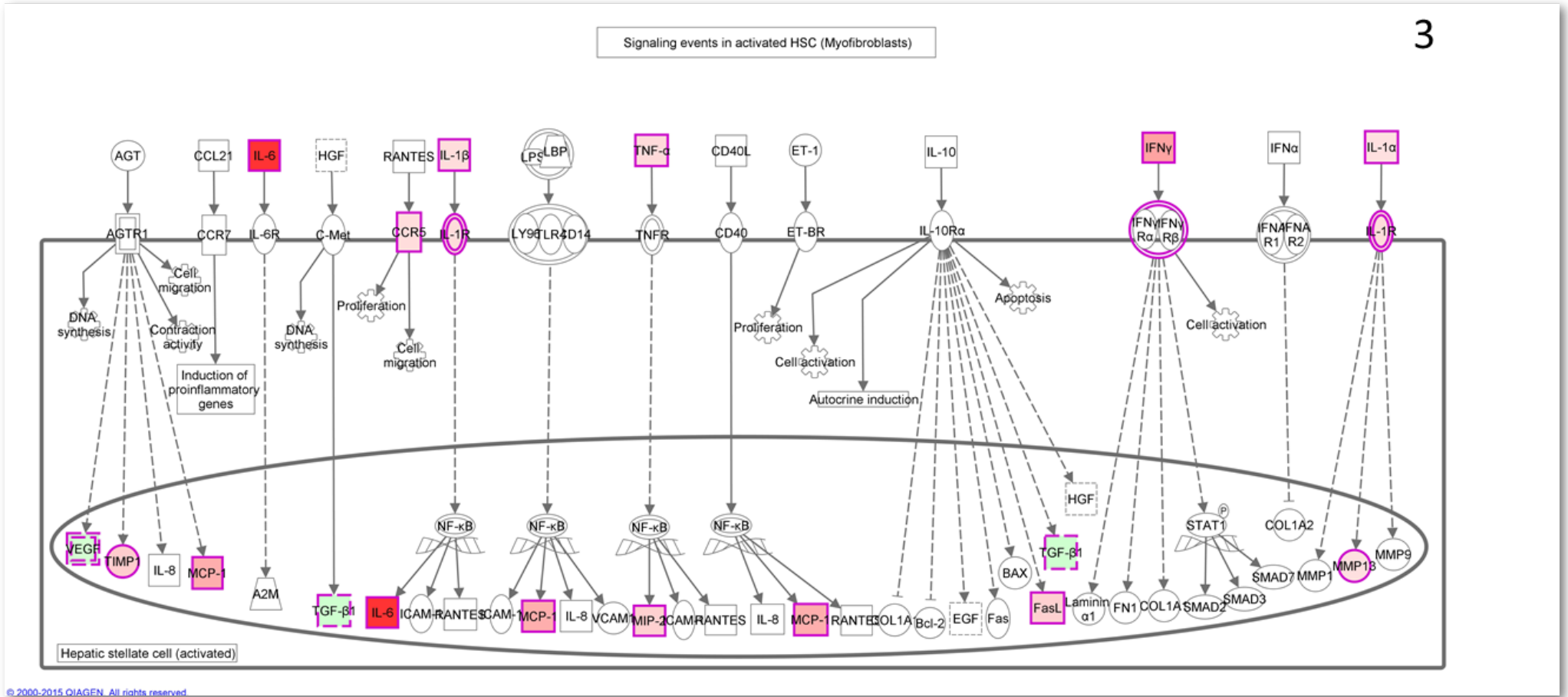


Figura 50: Ruta 2 – Sección 3 de 3

Tabla 13: Genes de la ruta 2

Símbolo del gen	Nombre del gen	Log Ratio
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	10.716
CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene)	4.406
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	6.183
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	6.134
IFNG	interferon, gamma	12.286
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	3.535
IGF2	insulin-like growth factor 2	-3.486
IL6	interleukin 6	86.593
IL1A	interleukin 1, alpha	3.755
IL1B	interleukin 1, beta	4.419
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	4.595
KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	-6.254
LEPR	leptin receptor	-5.890
LHX2	LIM homeobox 2	7.958
MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	3.128
MYH9	myosin, heavy chain 9, non-muscle	-2.973
MYH14	myosin, heavy chain 14, non-muscle	-4.824
MYH7B	myosin, heavy chain 7B, cardiac muscle, beta	-3.028
PDGFB	platelet-derived growth factor beta polypeptide	-3.961
TGFB1	transforming growth factor, beta 1	-2.463
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	6.592
TNF	tumor necrosis factor	4.820
TNFSF12	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	-3.253
VEGFB	vascular endothelial growth factor B	-2.205

Ruta 3. Comunicación entre las células de la respuesta inmune innata y adaptativa.1

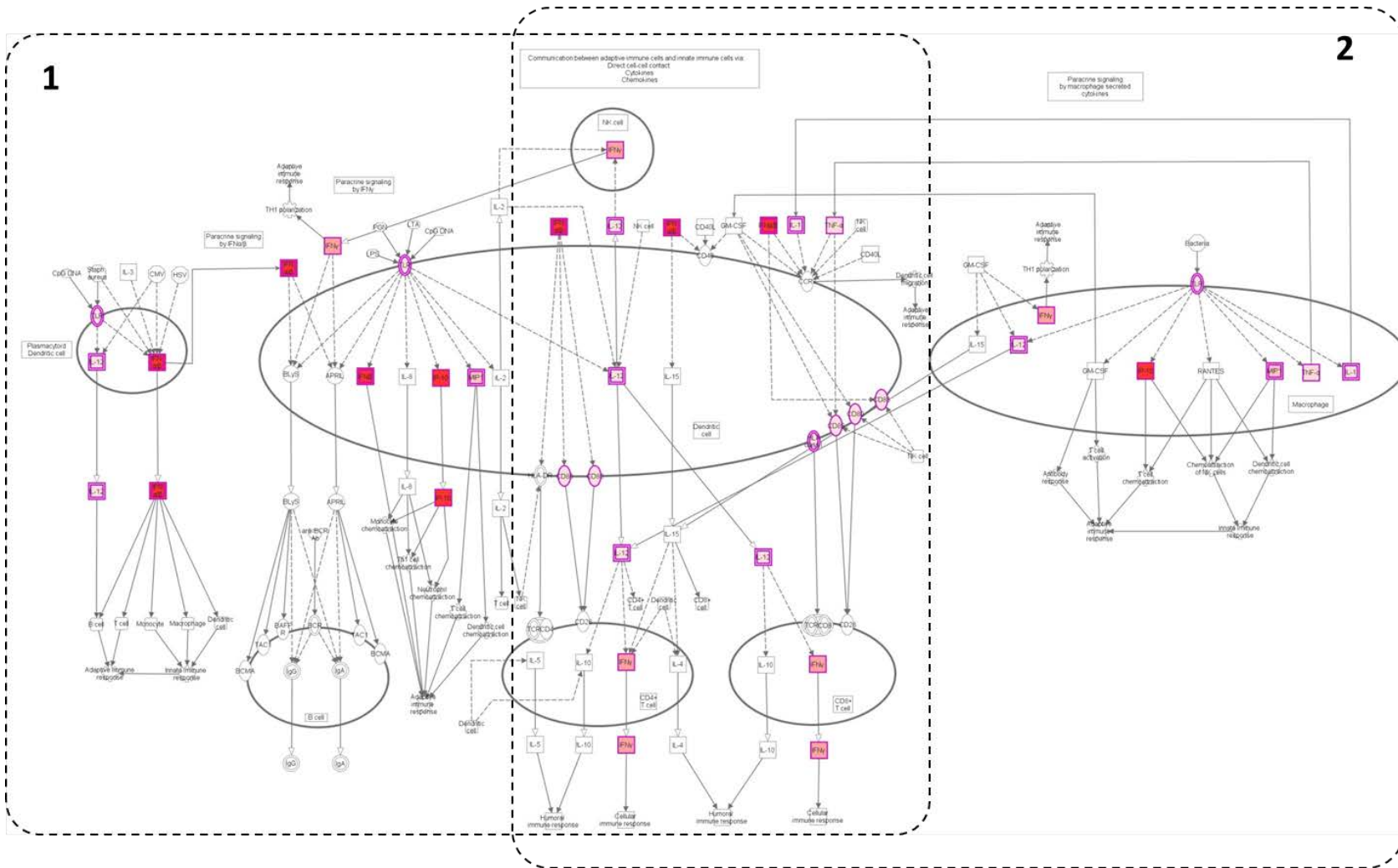


Figura 51: Ruta 3 – Esquema global

¹ Rojo: sobre-expresión, verde: descenso de la expresión

1

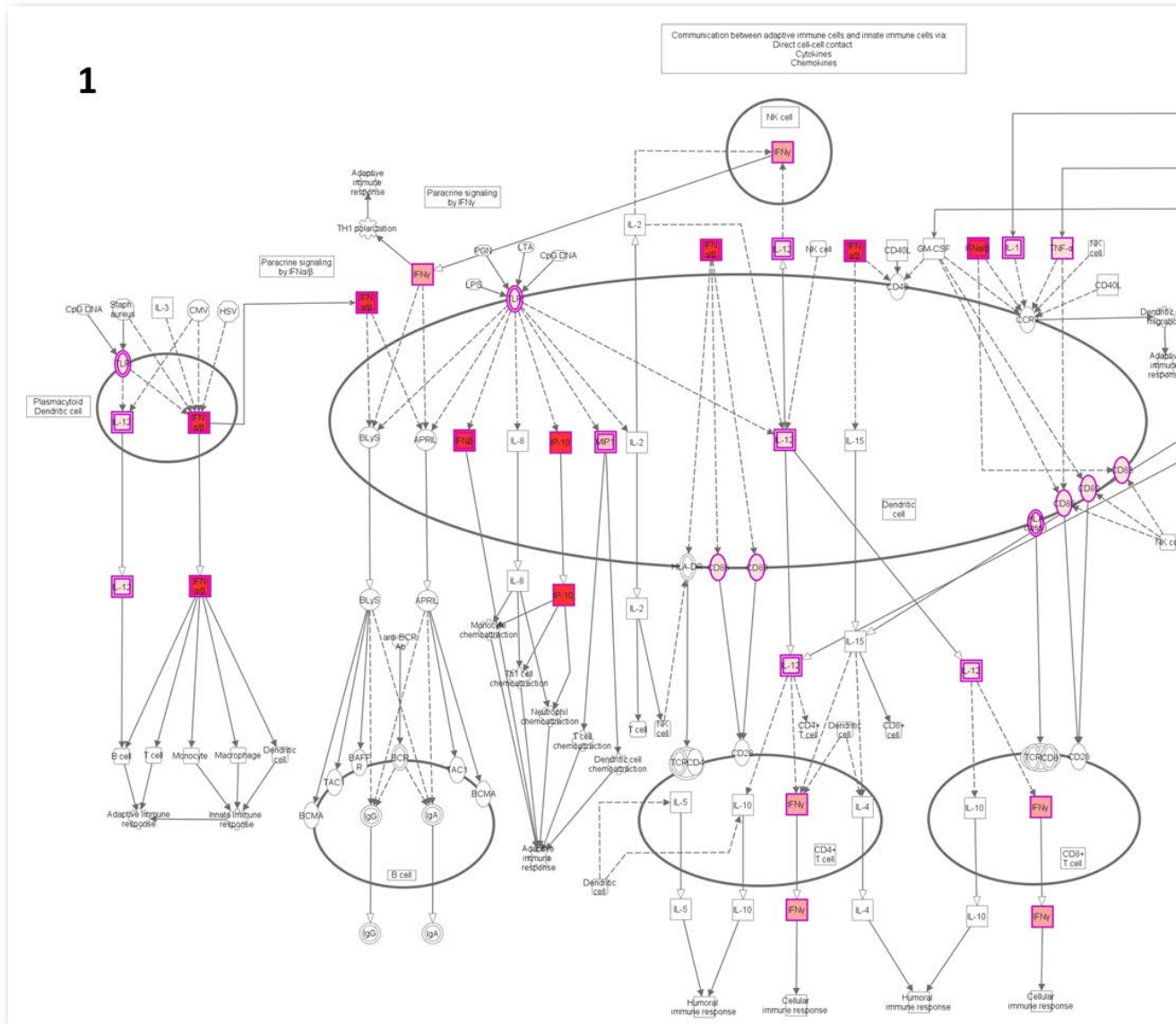


Figura 52: Ruta 3 – Sección 1 de 2

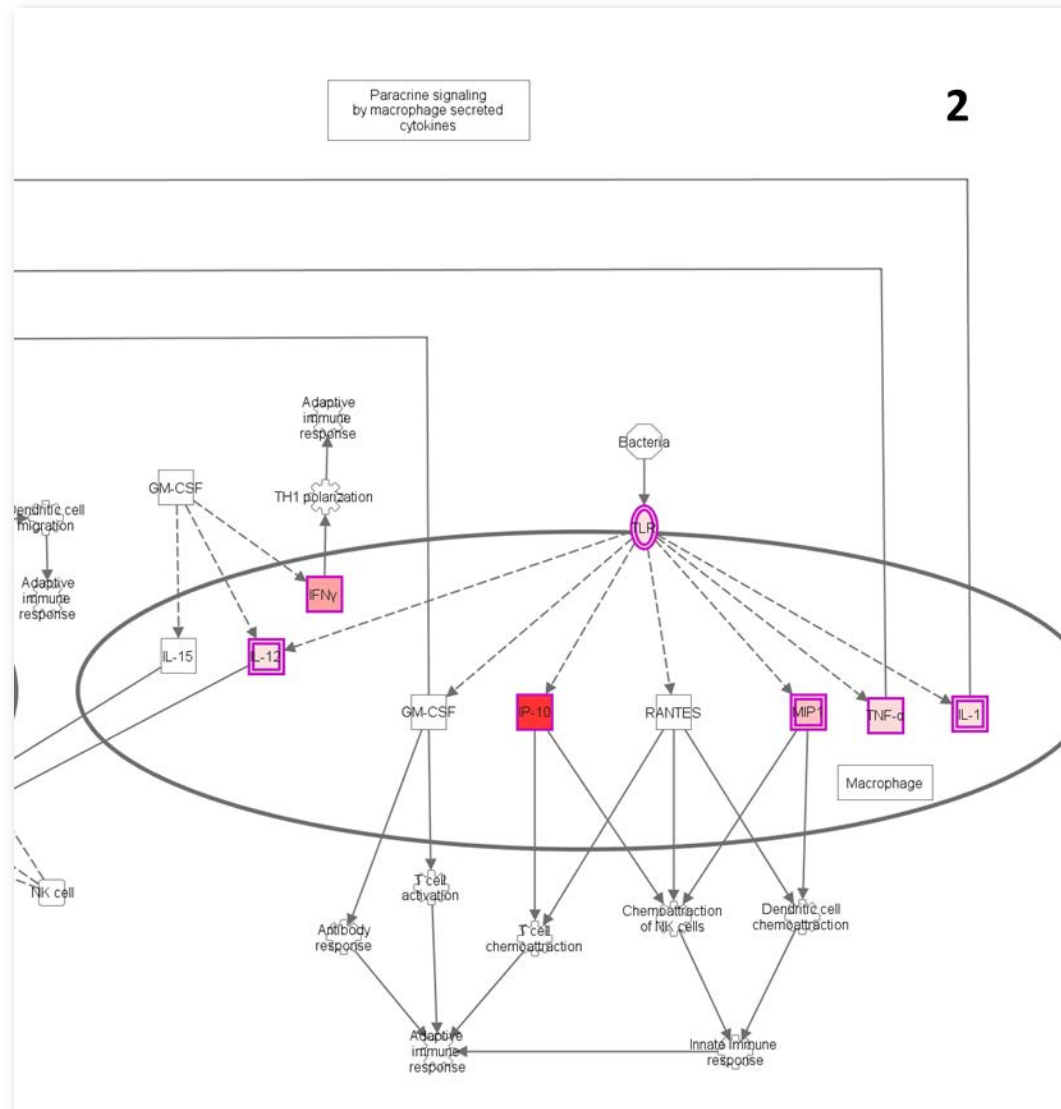


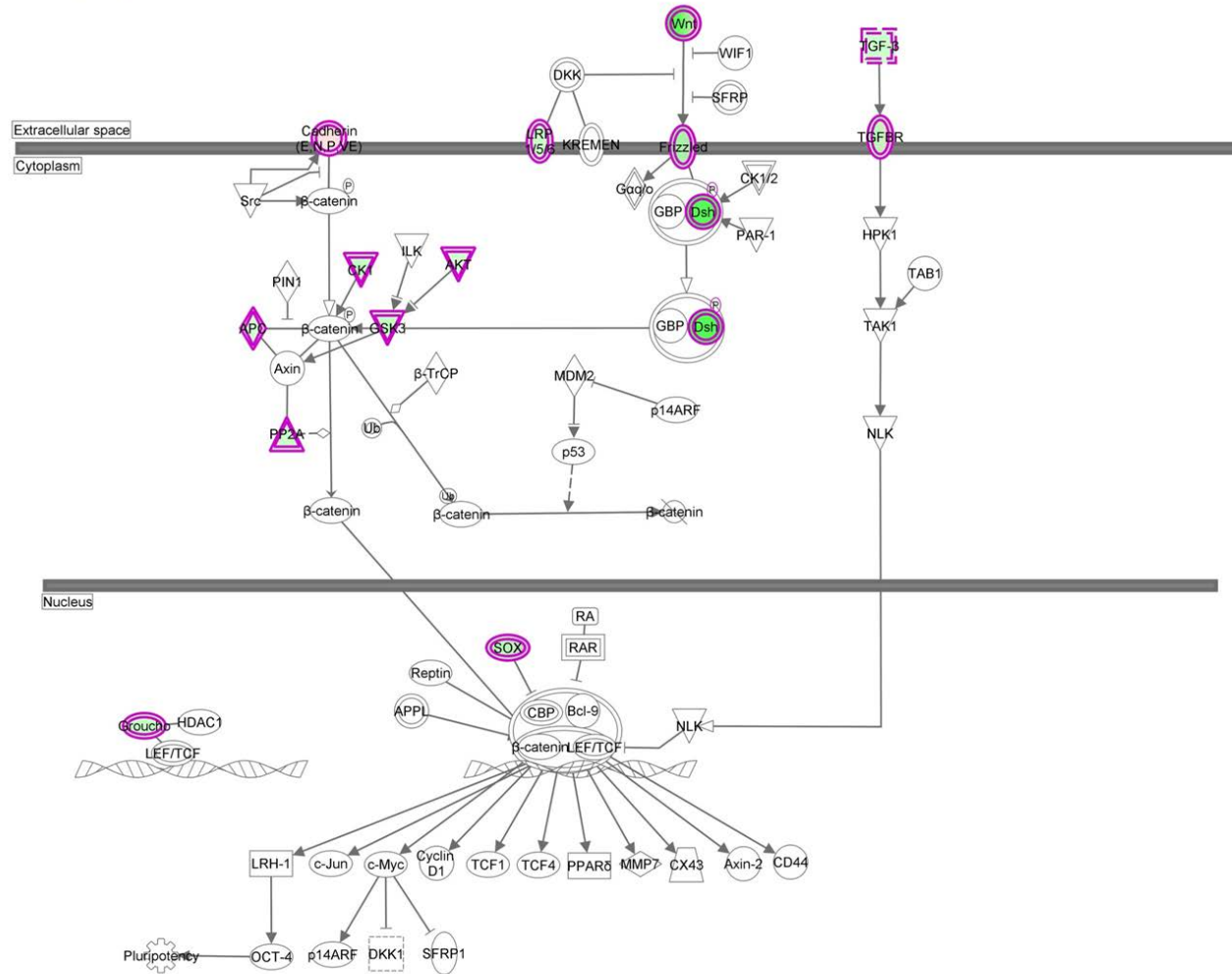
Figura 53: Ruta 3 – Sección 2 de 2

Tabla 14: Genes de la ruta 3

Símbolo del gen	Nombre del gen	Log Ratio
B2M	beta-2-microglobulin	2.442
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	7.854
CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	7.930
CD80	CD80 molecule	2.878
CD83	CD83 molecule	2.795
CD86	CD86 molecule	3.579
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	43.306
IFNB1	interferon, beta 1, fibroblast	62.582
IFNG	interferon, gamma	12.286
IL6	interleukin 6	86.593
IL12B	interleukin 12B	4.080
IL1A	interleukin 1, alpha	3.755
IL1B	interleukin 1, beta	4.419
Tlr13	toll-like receptor 13	2.571
TNF	tumor necrosis factor	4.820

Ruta 4: Señalización de wnt/beta-catenin

Wnt/ β -catenin Signaling



© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 54: Ruta 4

Tabla 15: Genes de la ruta 4

Símbolo del gen	Nombre del gen	Log Ratio
ACVR1B	activin A receptor, type IB	-3.808
ACVR1C	activin A receptor, type IC	5.640
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	-2.279
APC2	adenomatosis polyposis coli 2	-2.268
CDH3	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	3.750
CSNK1G2	casein kinase 1, gamma 2	-3.069
DVL3	dishevelled segment polarity protein 3	-8.751
FZD2	frizzled class receptor 2	-2.463
FZD7	frizzled class receptor 7	-4.819
H2BFM	H2B histone family, member M	-3.130
LRP5	low density lipoprotein receptor-related protein 5	-2.690
PPP2R2C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma	-2.681
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	-3.538
SOX7	SRY (sex determining region Y)-box 7	-2.515
SOX13	SRY (sex determining region Y)-box 13	-2.444
SOX18	SRY (sex determining region Y)-box 18	-3.054
TGFB1	transforming growth factor, beta 1	-2.463
TLE1	transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)	-2.845
WNT1	wingless-type MMTV integration site family, member 1	-8.744
WNT16	wingless-type MMTV integration site family, member 16	3.664
WNT7A	wingless-type MMTV integration site family, member 7A	-2.596

Ruta 5: Adhesión de los granulocitos y diapedesis

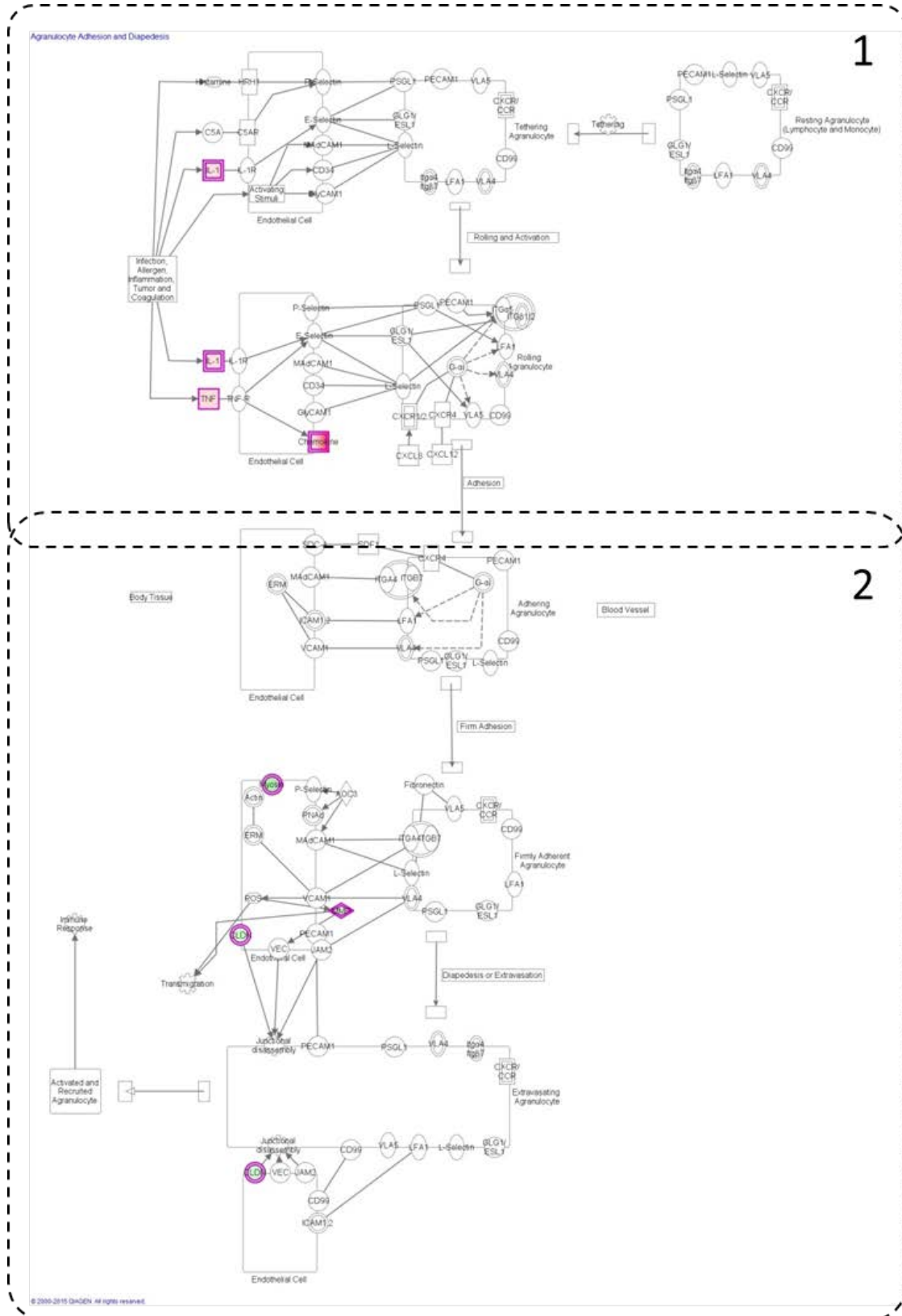


Figura 55: Ruta 5

Agranulocyte Adhesion and Diapedesis

1

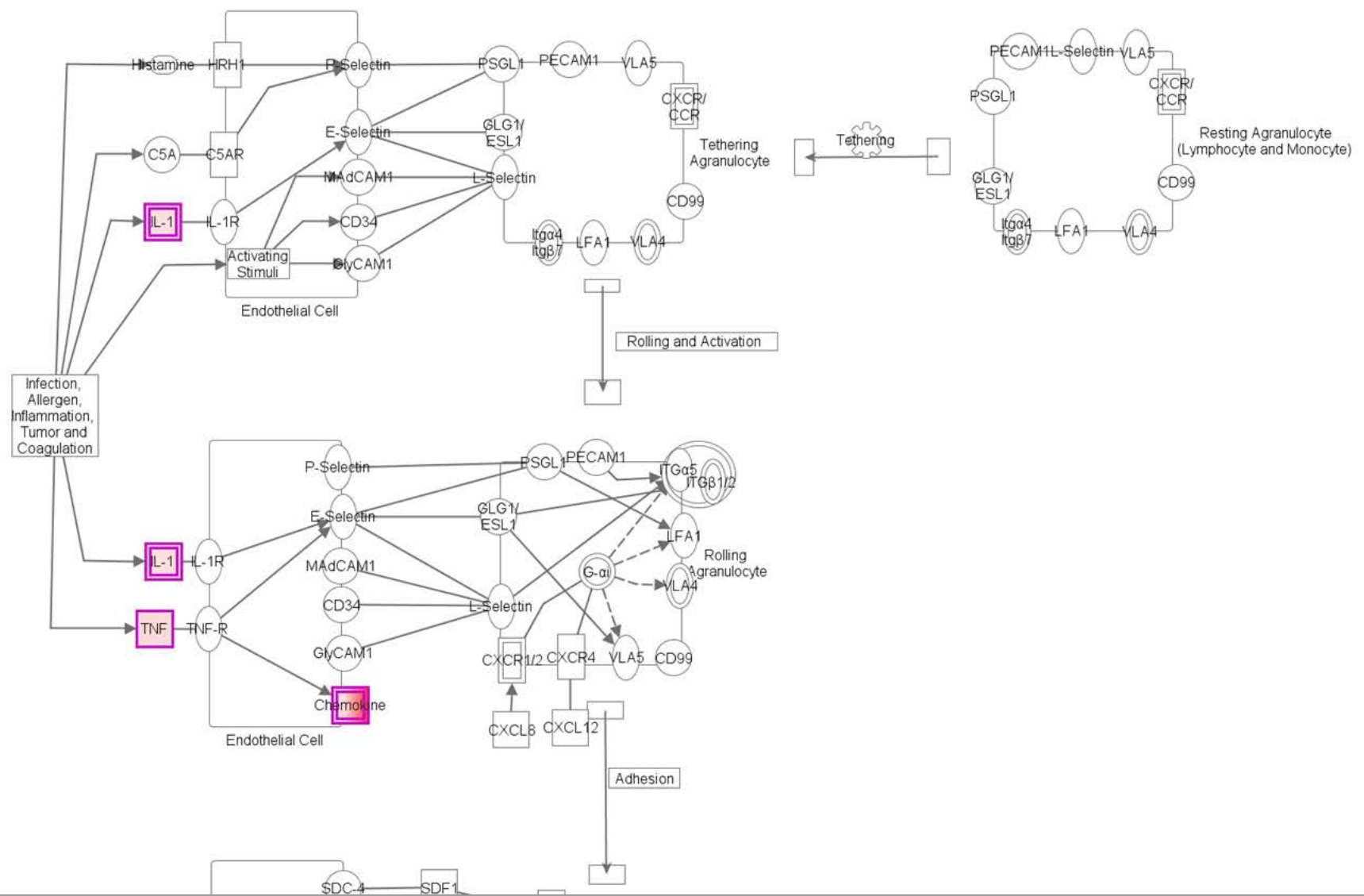


Figura 56: Ruta 5 - Sección 1 de 2

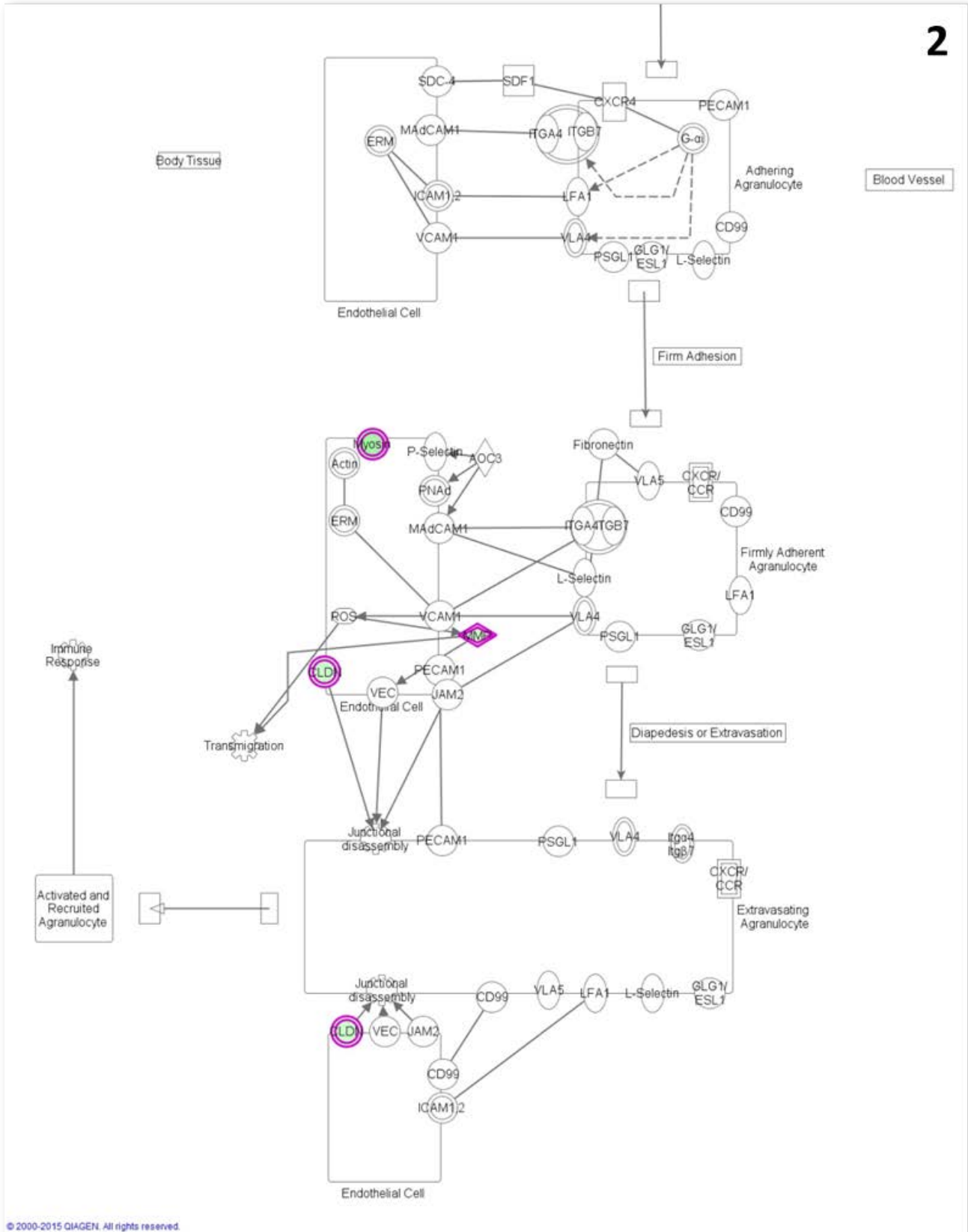


Figura 57: Ruta 5 – Sección 2 de 2

Tabla 16: Genes de la ruta 5

Símbolo del gen	Nombre del gen	Log Ratio
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	10.716
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	22.767
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	7.854
Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	17.583
Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8	4.707
CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	7.930
CLDN23	claudin 23	-2.553
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	17.150
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	6.183
CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6	13.017
Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	21.490
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	43.306
CXCL13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	9.946
IL1A	interleukin 1, alpha	3.755
IL1B	interleukin 1, beta	4.419
MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	3.128
MMP15	matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	-3.009
MYH9	myosin, heavy chain 9, non-muscle	-2.973
MYH14	myosin, heavy chain 14, non-muscle	-4.824
MYH7B	myosin, heavy chain 7B, cardiac muscle, beta	-3.028
TNF	tumor necrosis factor	4.820
XCL1	chemokine (C motif) ligand 1	7.081

Ruta 6: Señalización de TREM 1

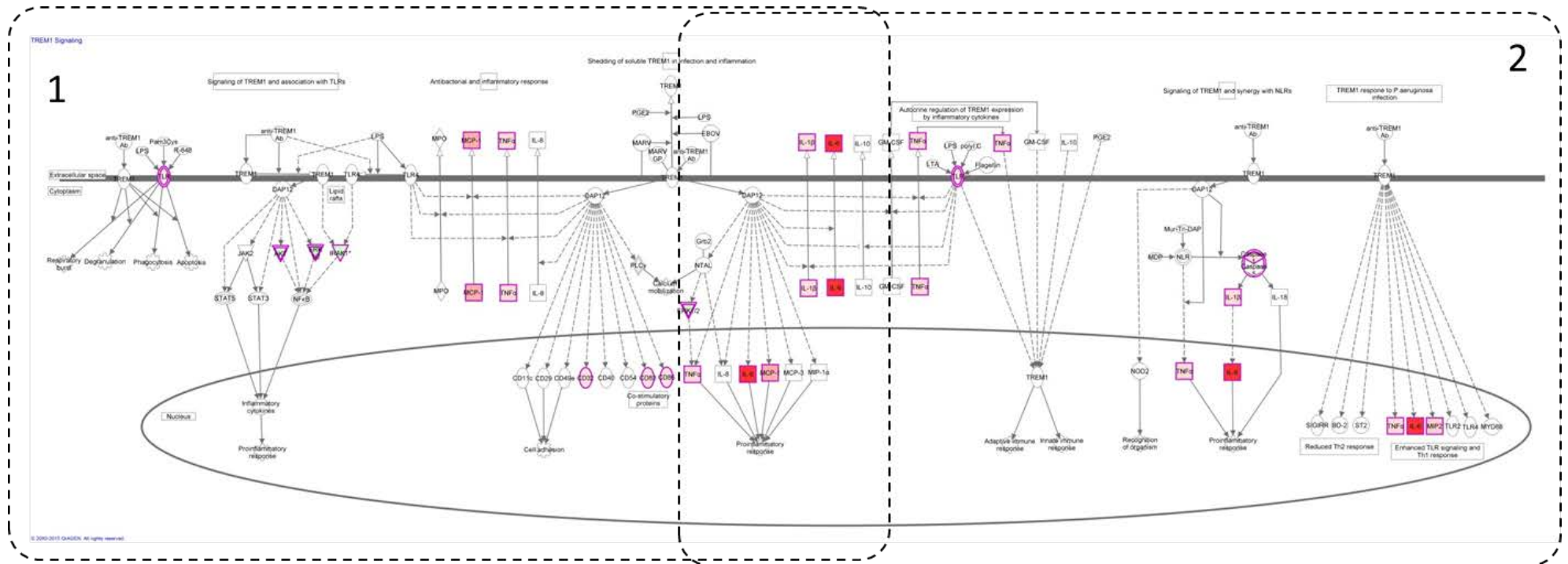


Figura 58: Ruta 6

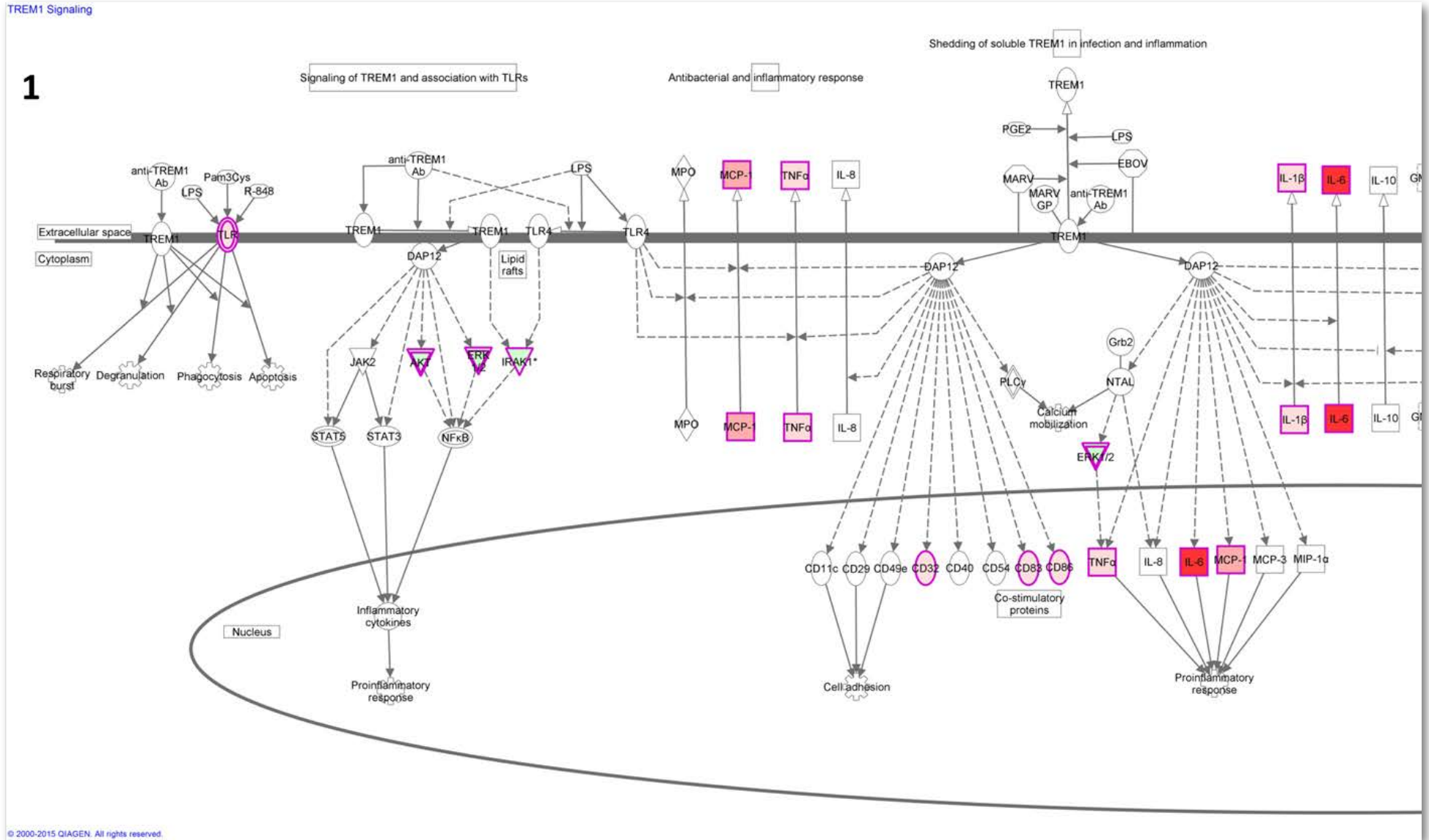


Figura 59: Ruta 6 – Sección 1 de 2

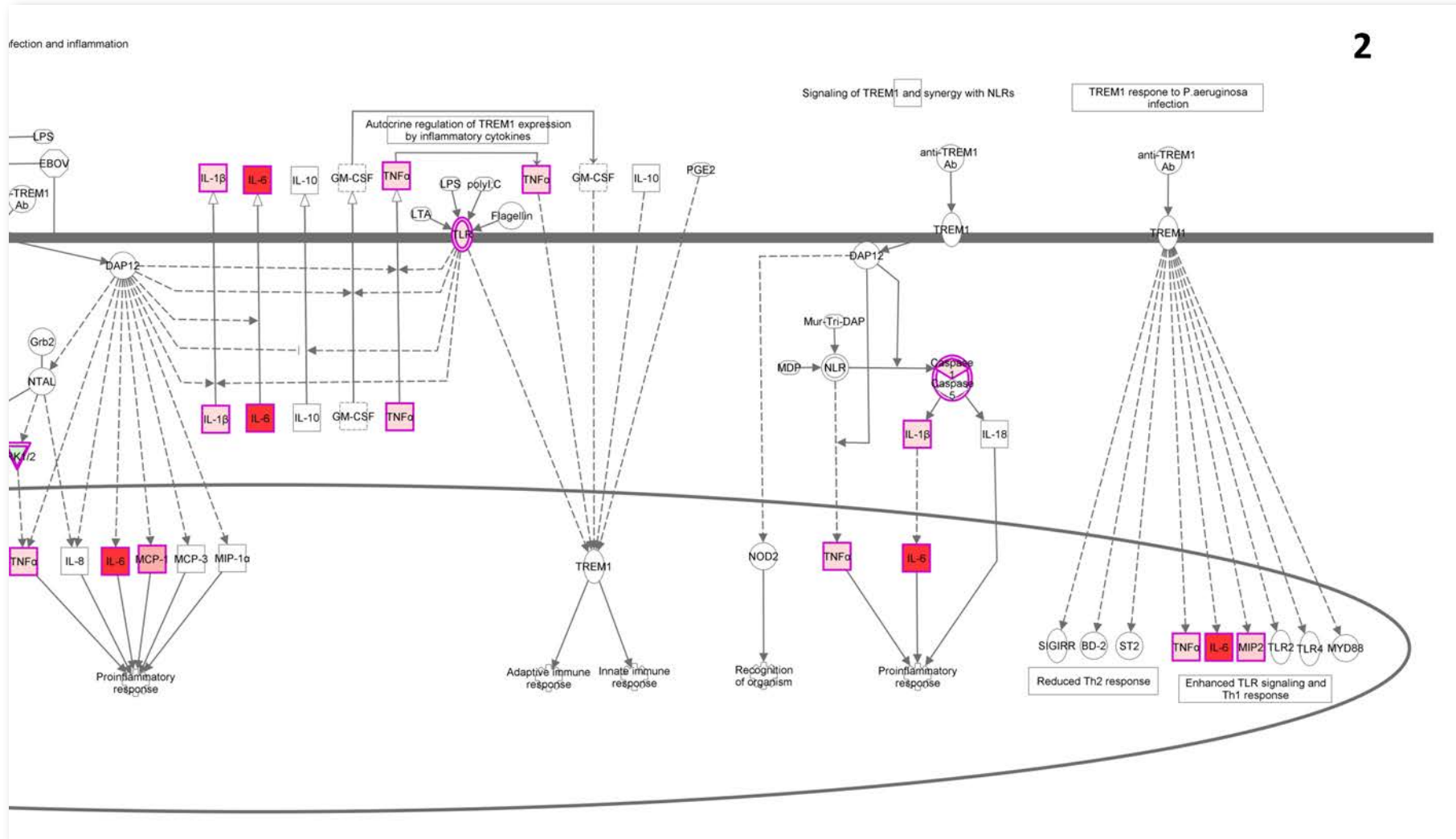


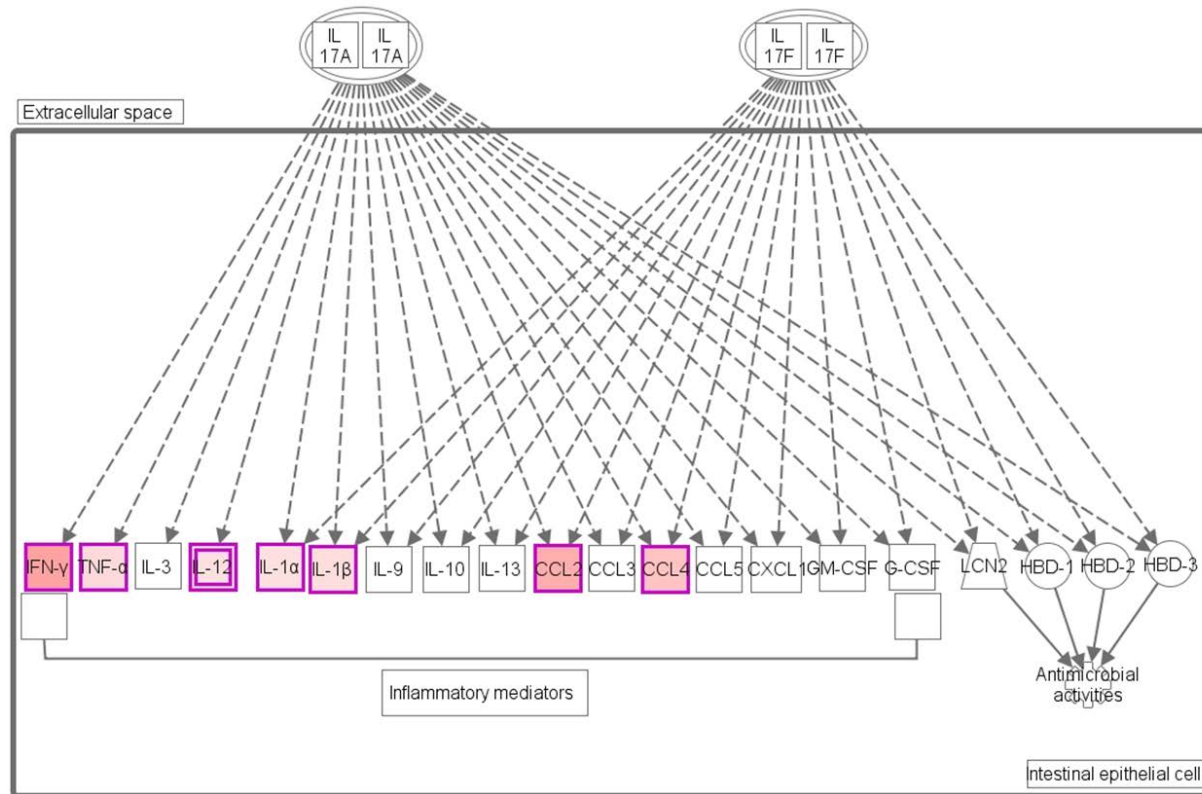
Figura 60: Ruta 6 – Sección 2 de 2

Tabla 17: Genes de la ruta 6

Símbolo del gen	Nombre del gen	Log Ratio
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	-2.279
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase	2.968
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	10.716
CD83	CD83 molecule	2.795
CD86	CD86 molecule	3.579
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	6.183
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	2.974
IL6	interleukin 6	86.593
IL1B	interleukin 1, beta	4.419
IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	-2.397
MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3	-2.700
Tlr13	toll-like receptor 13	2.571
TNF	tumor necrosis factor	4.820

Ruta 7: Regulación diferencial de la producción de citocinas en células epiteliales intestinales por la IL-17A e IL-17F

Differential Regulation of Cytokine Production in Intestinal Epithelial Cells by IL-17A and IL-17F



1. Mouse knockout studies indicate that both IL-17A and IL-17F are important for host defense against *S. aureus* and *C. rodentium* infection
2. While there is redundancy in the role of IL-17A and IL-17F in host defense against *S. aureus* infection, IL-17F seems to play a more significant role than IL-17A in host defense against *C. rodentium* infection

Figura 61: Ruta 7 completa

Tabla 18: Genes de la ruta 7

Símbolo del gen	Nombre del gen	Log Ratio
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	10.716
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	7.854
IFNG	interferon, gamma	12.286
IL12B	interleukin 12B	4.080
IL1A	interleukin 1, alpha	3.755
IL1B	interleukin 1, beta	4.419
TNF	tumor necrosis factor	4.820

Ruta 8: Adhesión de granulocitos y diapedesis

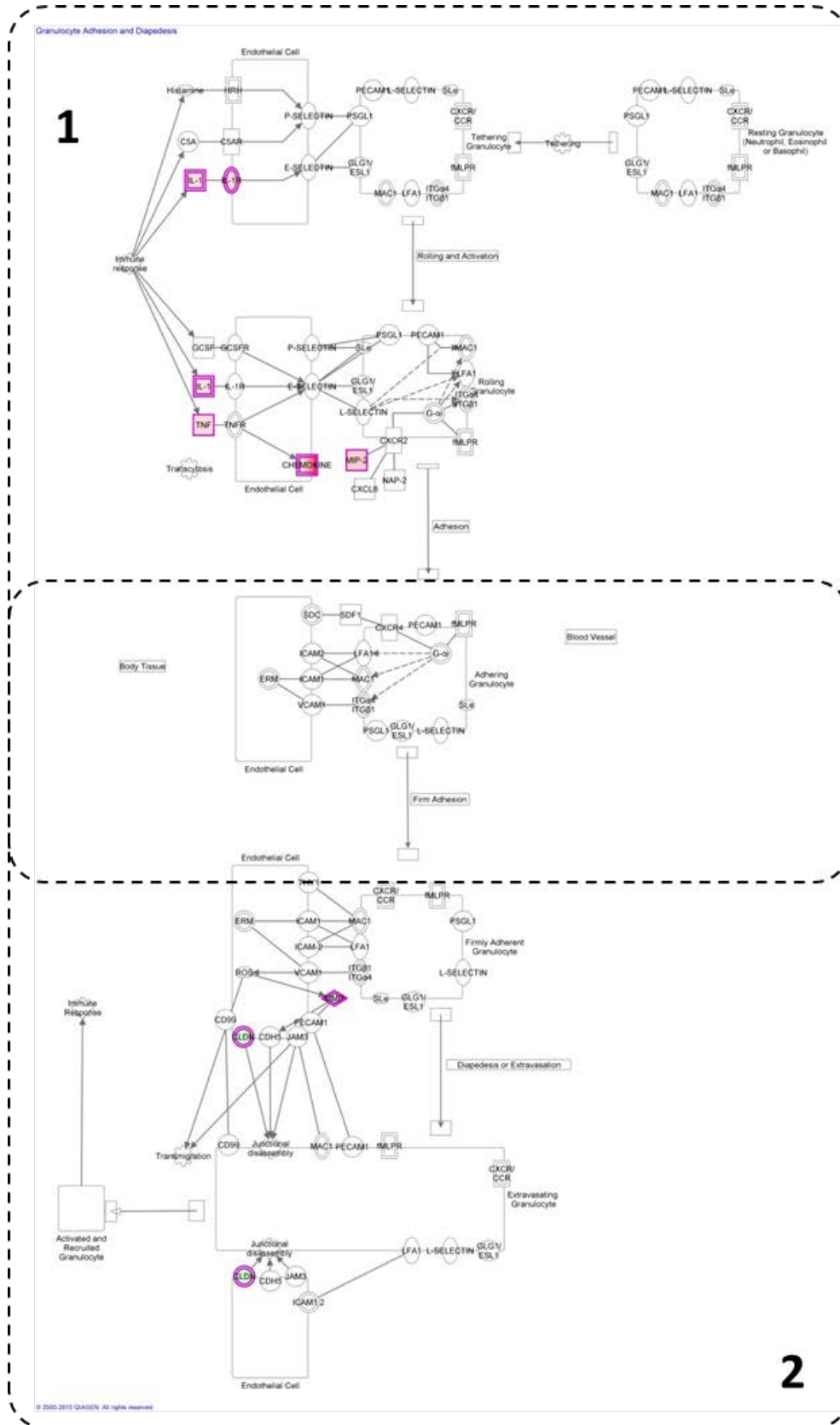


Figura 62: Ruta 8 Completa

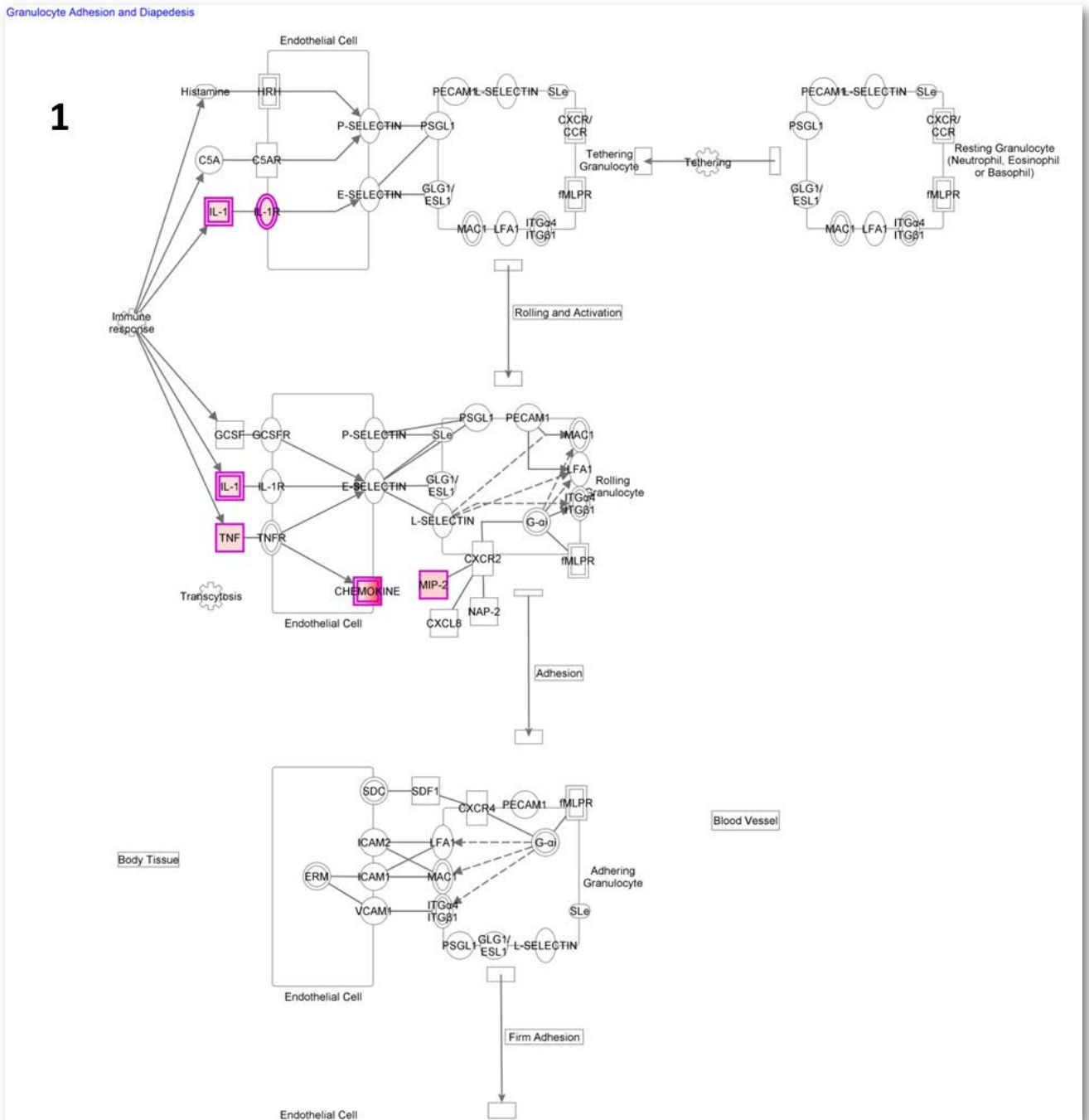


Figura 63: Ruta 8 – Sección 1 de 2

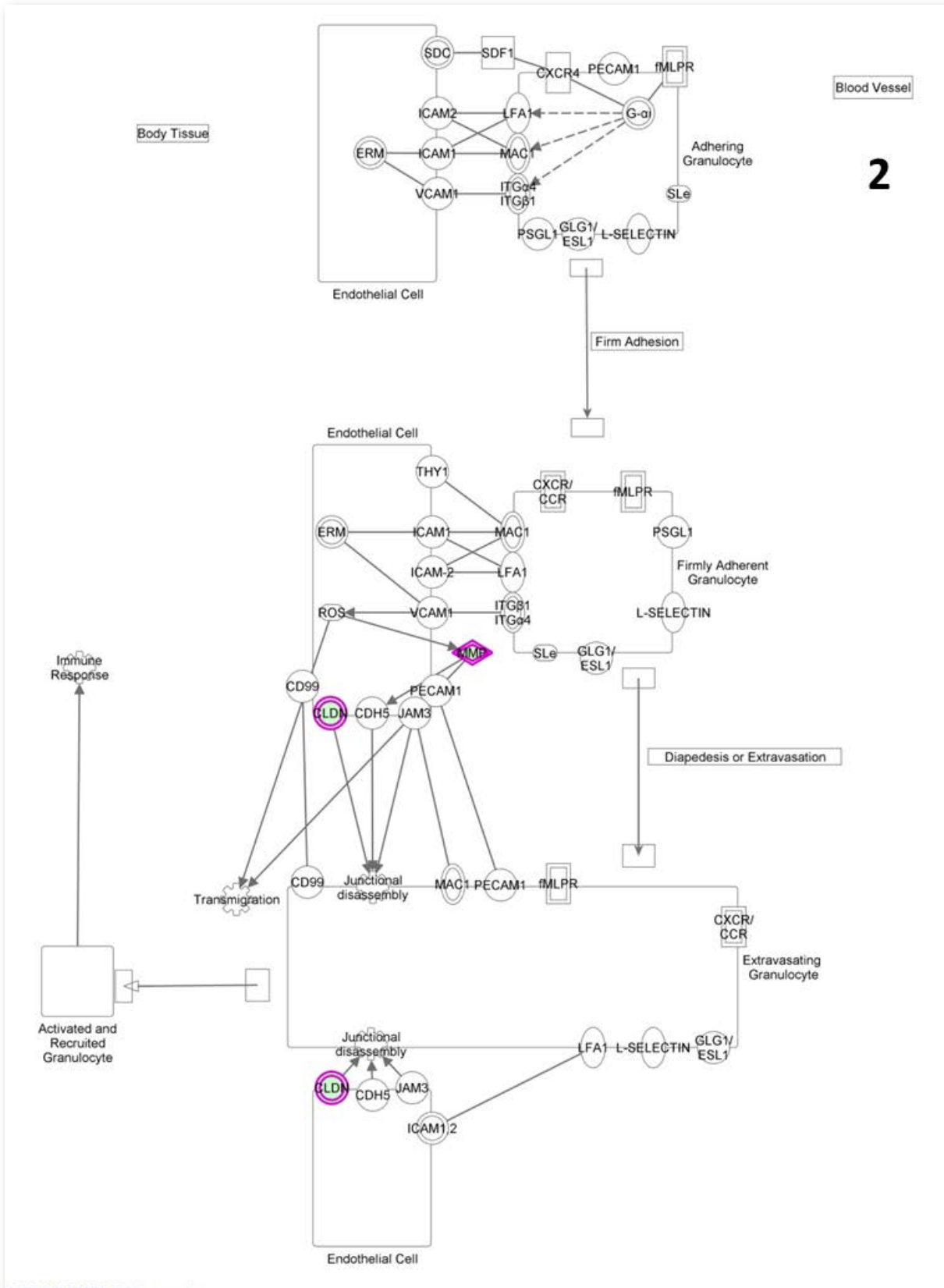
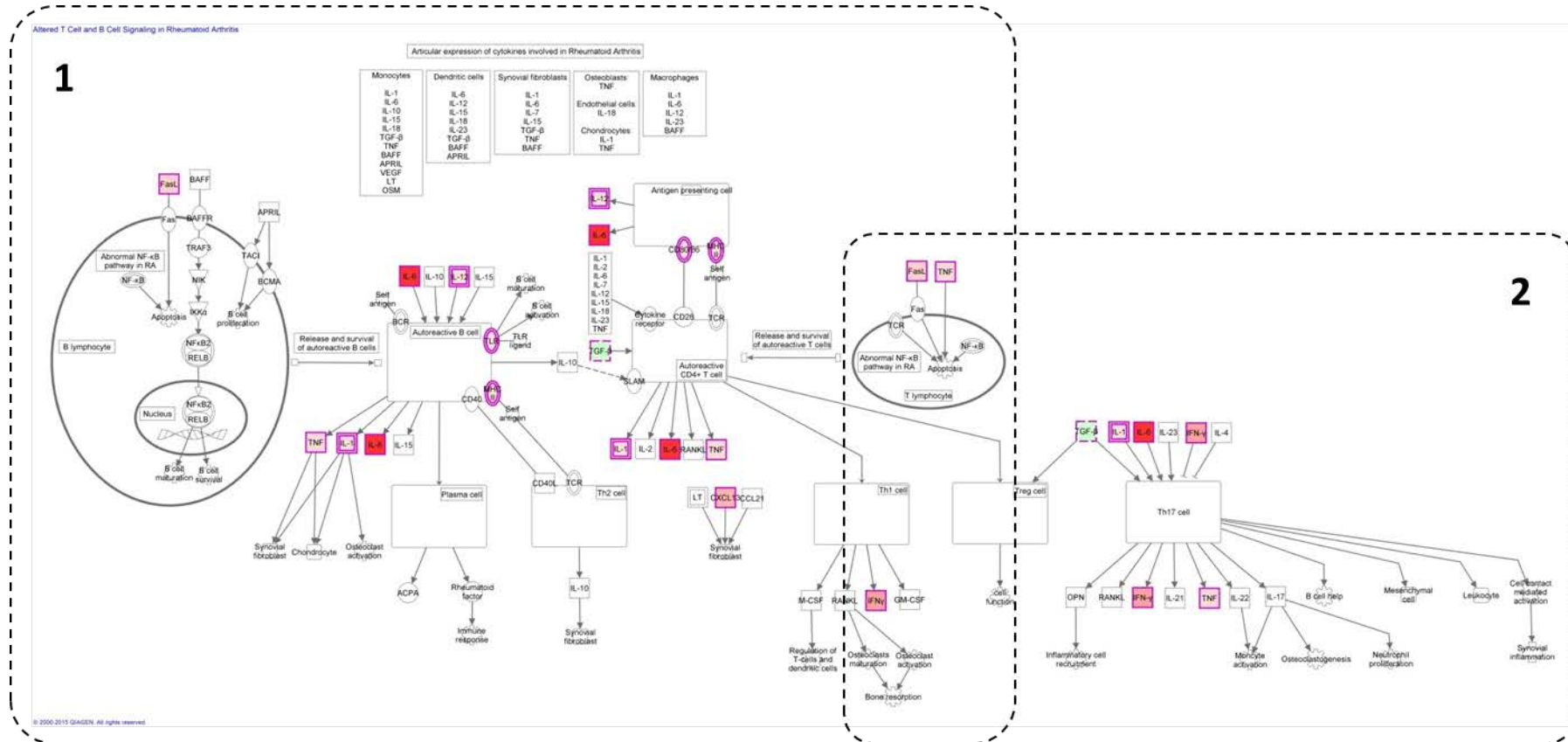


Figura 64: Ruta 8 – Sección 2 de 2

Tabla 19: Genes de la ruta 8

Símbolo del gen	Nombre del gen	Log Ratio
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	10.716
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	22.767
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	7.854
Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	17.583
Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8	4.707
CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	7.930
CLDN23	claudin 23	-2.553
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	17.150
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	6.183
CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6	13.017
Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	21.490
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	43.306
CXCL13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	9.946
IL1A	interleukin 1, alpha	3.755
IL1B	interleukin 1, beta	4.419
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	4.595
MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	3.128
MMP15	matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	-3.009
TNF	tumor necrosis factor	4.820
XCL1	chemokine (C motif) ligand 1	7.081

Ruta 9: Señalización celular en la artritis reumatoide. Alteración de las células T y B.



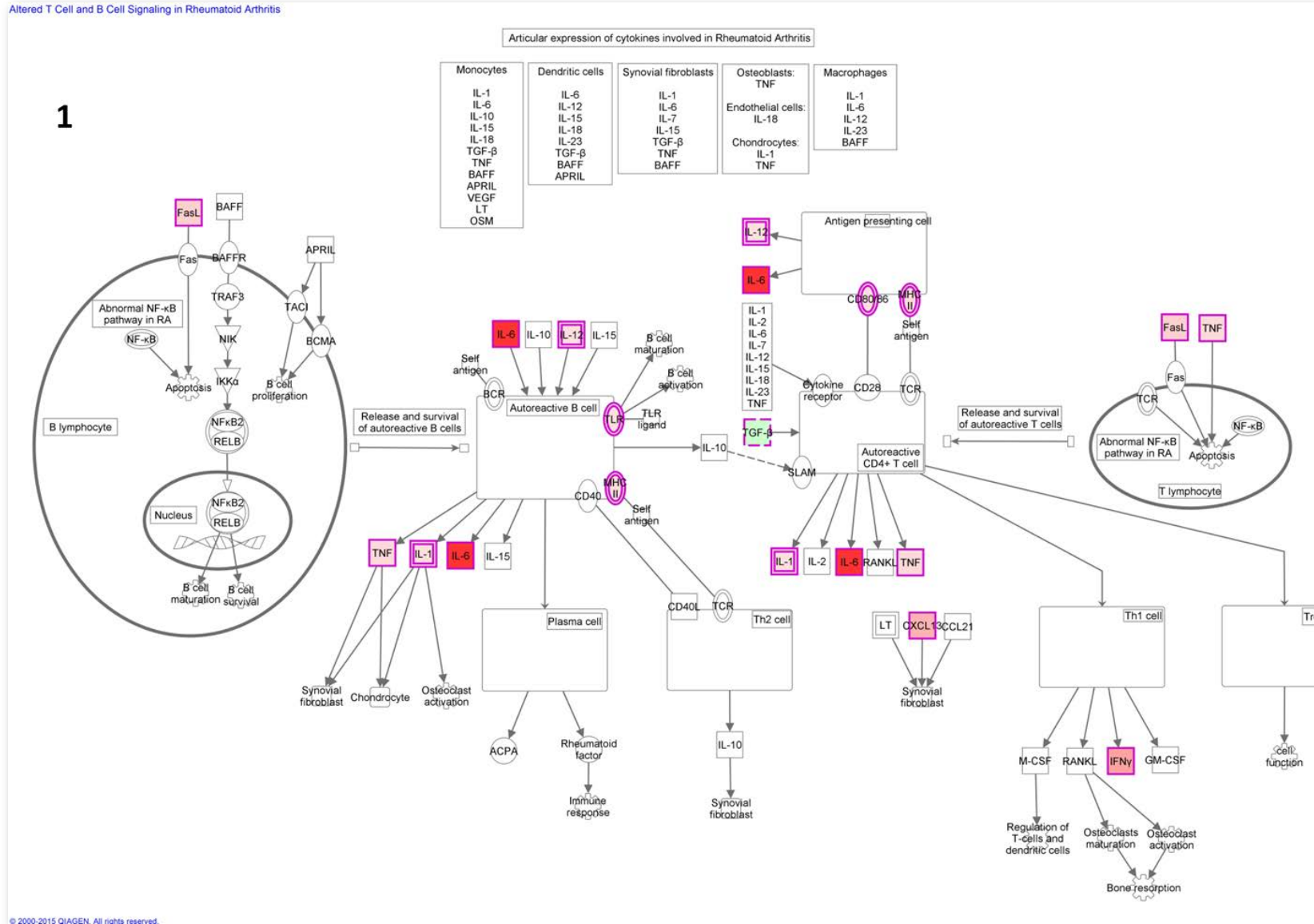


Figura 66: Ruta 9 – Sección 1 de 2

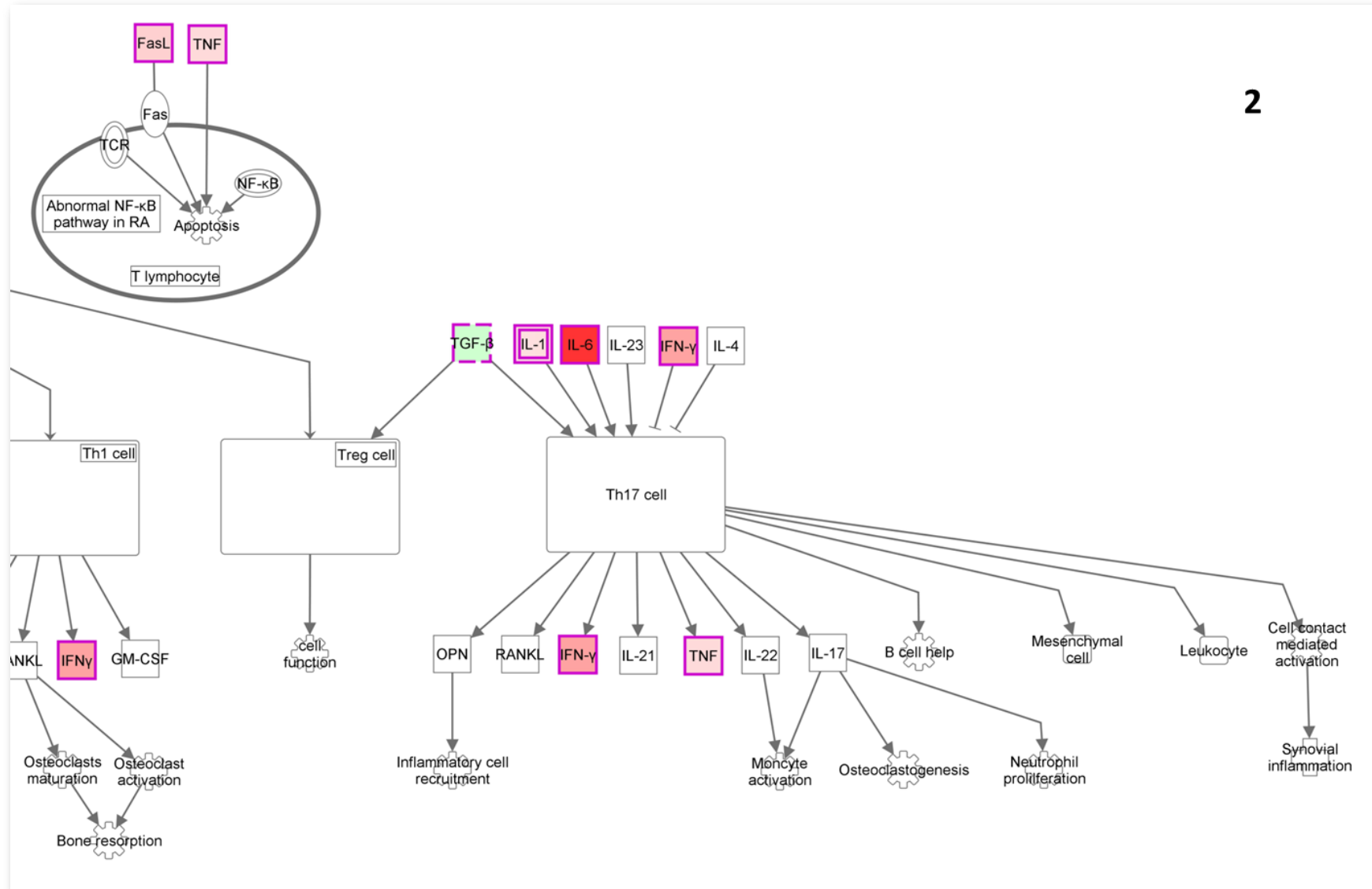


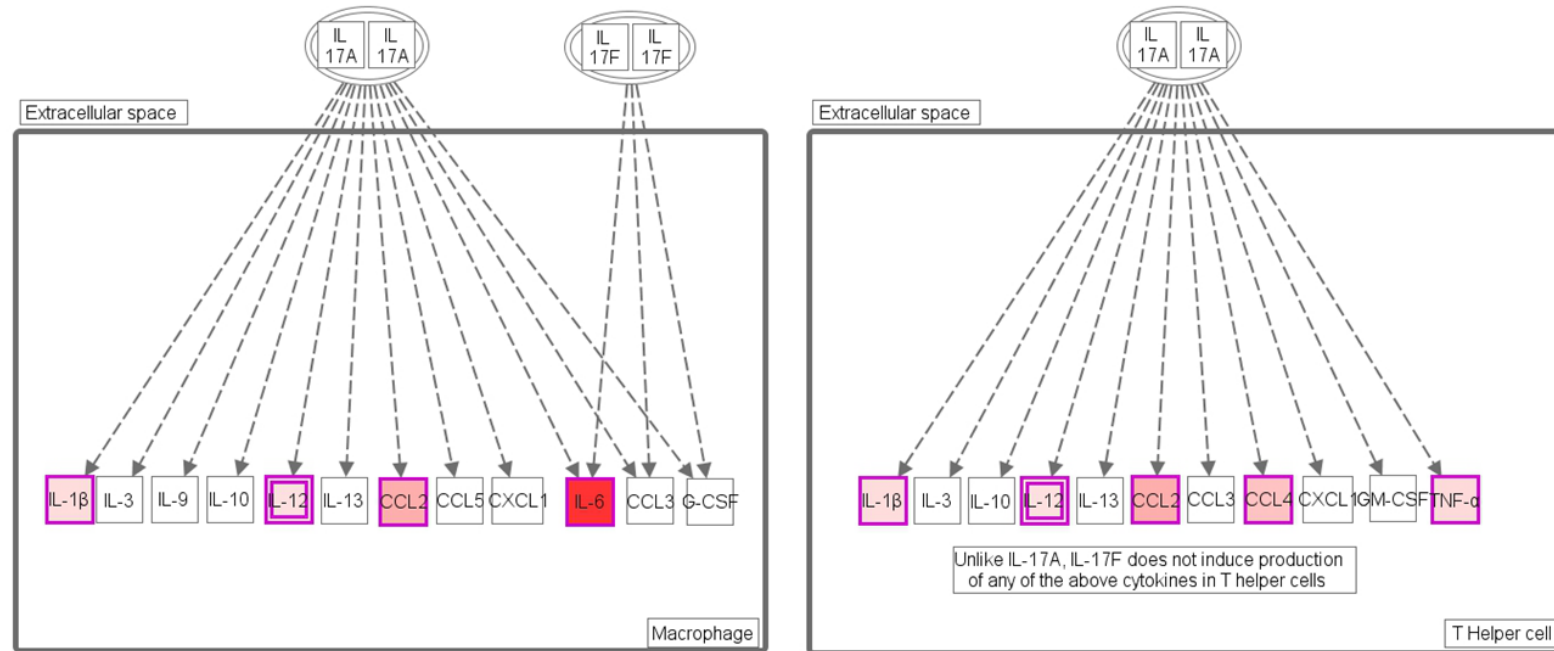
Figura 67: Ruta 9 – Sección 2 de 2

Tabla 20: Genes de la ruta 9

Símbolo del gen	Nombre del gen	Log Ratio
CD80	CD80 molécula	2.878
CD86	CD86 molécula	3.579
CXCL13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	9.946
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	6.134
H2-Eb2	histocompatibility 2, class II antigen E beta2	4.552
IFNG	interferon, gamma	12.286
IL6	interleukin 6	86.593
IL12B	interleukin 12B	4.080
IL1A	interleukin 1, alpha	3.755
IL1B	interleukin 1, beta	4.419
TGFB1	transforming growth factor, beta 1	-2.463
Tlr13	toll-like receptor 13	2.571
TNF	tumor necrosis factor	4.820

Ruta 10: Regulación diferencial de la producción de citocinas en los macrófagos y las células T auxiliares por la IL-17A e IL-17F

Differential Regulation of Cytokine Production in Macrophages and T Helper Cells by IL-17A and IL-17F



Unlike IL-17F, IL-17A plays a critical role in the development of:

1. Delayed-type hypersensitivity
2. Contact hypersensitivity
3. Experimental autoimmune encephalitis (EAE)
4. Collagen-induced arthritis

The low cytokine-inducing activity of IL-17F in immune cells is thought to be responsible for lack of involvement of IL-17F in autoimmune responses

Figura 68: Ruta 10 completa

Tabla 21: Ruta Genes de la ruta 10

Símbolo del gen	Nombre del gen	Log Ratio
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	10.716
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	7.854
IL6	interleukin 6	86.593
IL12B	interleukin 12B	4.080
IL1B	interleukin 1, beta	4.419
TNF	tumor necrosis factor	4.820

Ruta 11: Papel de la IL-17F en las enfermedades alérgicas inflamatorias de las vías respiratorias

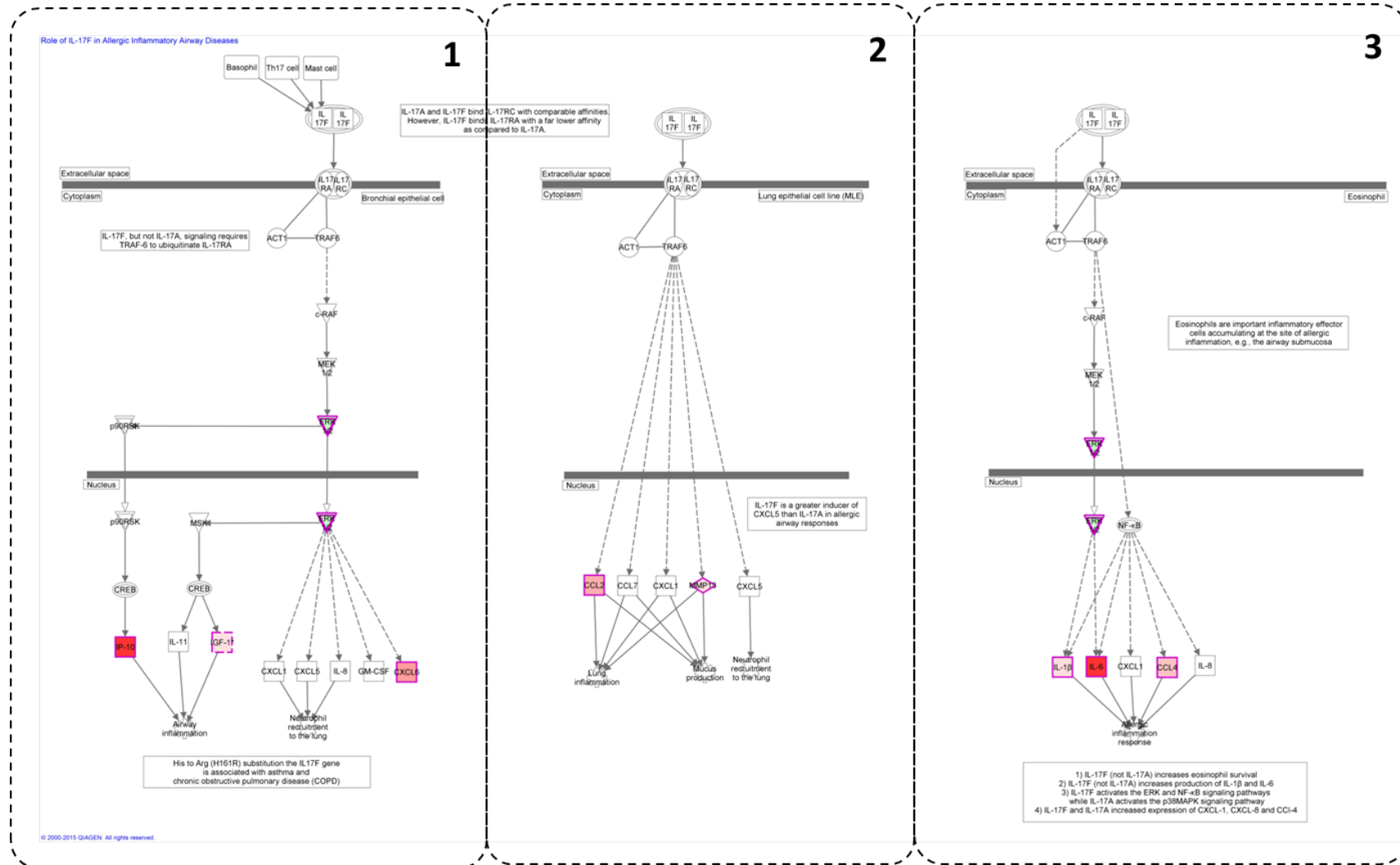


Figura 69: Ruta 11

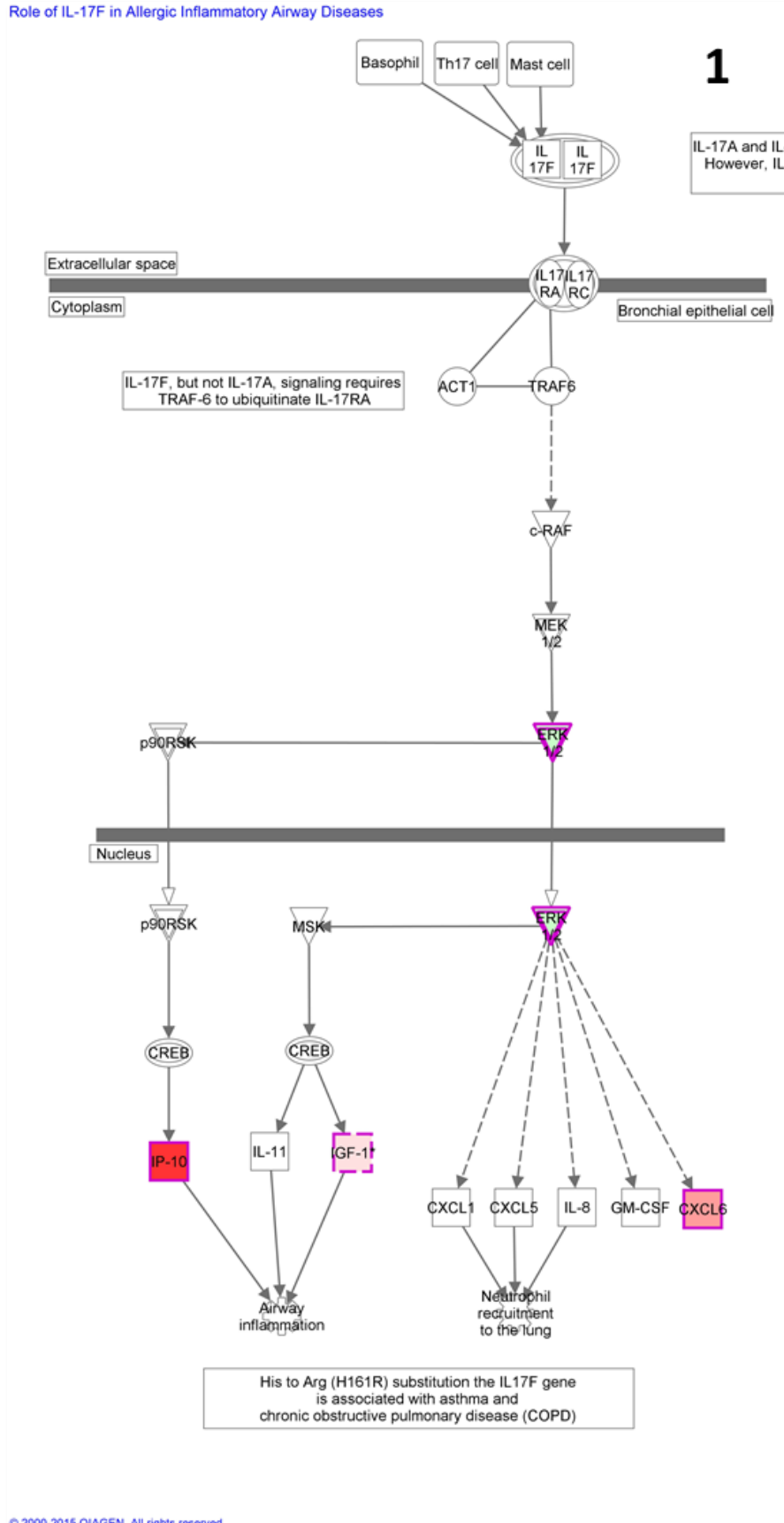


Figura 70: Ruta 11 – Sección 1 de 3

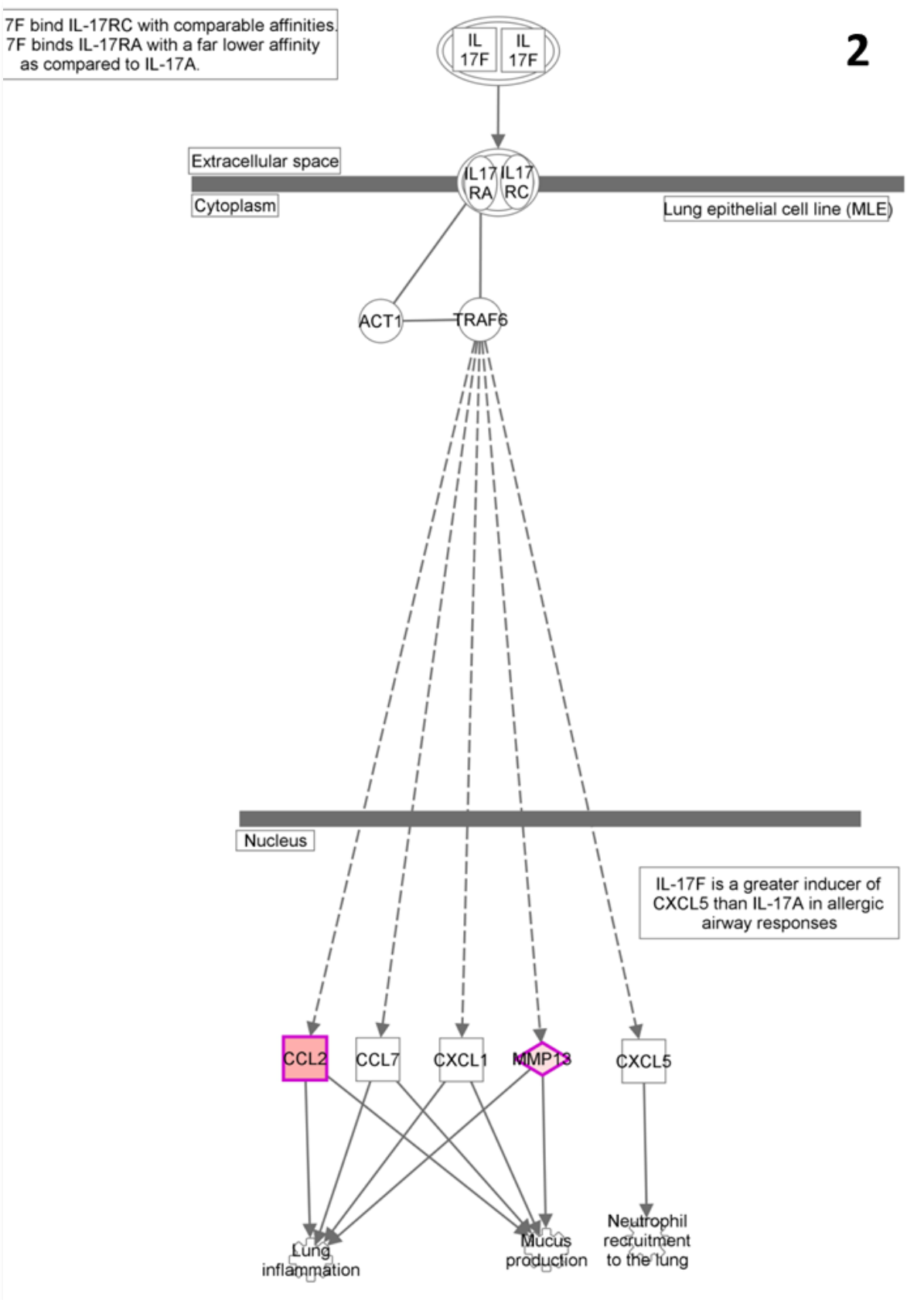


Figura 71: Ruta 11 – Sección 2 de 3

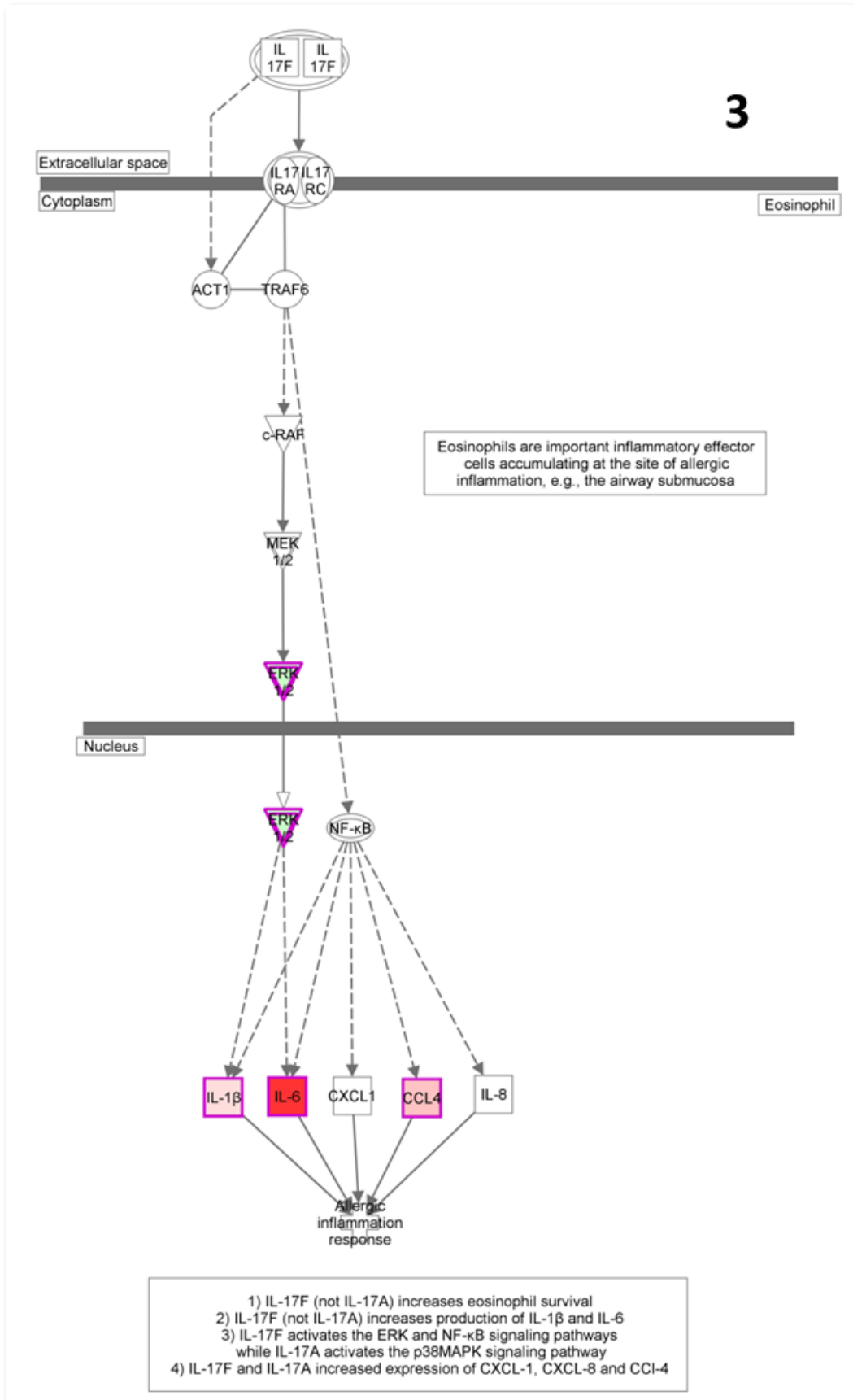


Figura 72: Ruta 11 – Sección 3 de 3

Tabla 22: Genes de la ruta 11

Símbolo del gen	Nombre del gen	Log Ratio
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	10.716
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	7.854
CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6	13.017
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	43.306
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	3.535
IL6	interleukin 6	86.593
IL1B	interleukin 1, beta	4.419
MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3	-2.700
MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	3.128

5 DISCUSIÓN

La gripe pandémica causó una gran morbilidad durante la temporada 2009-2010, y en determinados pacientes en edades medias de la vida, causó neumonía viral primaria que en algunos casos requirió de ingreso en la UCI. Nuestro grupo de investigación objetivó, en los pacientes más graves (aquellos que necesitaban de ventilación mecánica), niveles elevados de citocinas y quimiocinas pro y anti-inflamatorias en plasma, acompañando a la presencia de los infiltrados neumónicos observados en las exploraciones radiológicas (Bermejo-Martin y cols, 2009; Bermejo-Martin y cols, 2010). Los niveles de estas citocinas y quimiocinas correlacionaban de forma directa con la carga viral secretada a nivel nasofaríngeo (Almansa y cols, 2011).

Por razones obvias, al no poder realizar biopsias pulmonares a un paciente que presentaba una insuficiencia respiratoria aguda, no se pudo comprobar cuáles fueron los correlatos de esta respuesta sistémica a nivel pulmonar. Es por ello que en un segundo tiempo, propusimos desarrollar un modelo murino de infección por virus de la gripe pandémica para poder realizar estudios histológicos y, sobre todo, de expresión génica, sobre tejido pulmonar.

Este trabajo fue posible gracias a la colaboración multidisciplinar del laboratorio de Virología del Hospital Clínic de Barcelona (el cual cedió una cepa de virus pandémico procedente de un paciente infectado), del “Centre de Reserca en Salut Animal, CRESA” de la Universidad Autònoma de Barcelona (donde se realizaron los ensayos de infección sobre modelo de ratón), y la Unidad de Investigación Médica en Infección e Inmunidad (IMI) del Hospital Clínic Universitario de Valladolid, donde se realizaron y analizaron los estudios de expresión génica.

La expresión génica es una técnica muy útil para la obtención de una visión global de la respuesta inmunológica en sangre o tejidos en el contexto de múltiples enfermedades de base inmunológica y también en la infección grave (Chaussabel y Banchereau, 2010). El grupo en el que se ha desarrollado este trabajo (IMI) tiene experiencia en el desarrollo de estudio de expresión génica en Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SRAS) causado por el nuevo Coronavirus surgido en 2003 en Vietnam y que afectó al sudeste asiático y a Canadá (Cameron y cols, 2007). También participó en 2006 en el desarrollo de estudios sobre modelo de hurón infectado por virus de la gripe aviar H5N1 en colaboración con el grupo del Dr David

Kelvin de la University of Health Network de Toronto (Cameron y cols, 2008). Además, recientemente ha publicado los resultados de una gran cohorte de pacientes sépticos en los que se evaluaron los perfiles de expresión génica en sangre periférica en función de la gravedad. En todos estos estudios, la utilización de los microarrays de expresión génica permitió descifrar importantes claves de la fisiopatología de estas enfermedades. Como ya se ha comentado en esta tesis, el modelo murino es un modelo bien establecido y ampliamente utilizado para el estudio de la infección por virus de la gripe. En este sentido, el grupo de la Dra. María Montoya en el CRESA ha conseguido inducir con éxito en ratones C57BL6 la aparición de neumonía tras infectar con virus de la gripe pandémica de 2009.

Con estos antecedentes, gracias a la financiación del proyecto INMUNOFLU (GR09/0021) del Programa de Investigación sobre Gripe Pandémica del Instituto de Salud Carlos III, se decidió evaluar la respuesta transcriptómica a nivel pulmonar tras infección por virus de la gripe pandémica, utilizando el modelo de ratón desarrollado en el CRESA. La integración de la misma junto con los datos clínicos, virológicos e histopatológicos nos permitió modelar los eventos fisiopatológicos que siguieron a la infección por el virus de la gripe a nivel pulmonar, utilizando como comparación un grupo de ratones no infectados.

Los resultados nos mostraron que la infección por virus de la gripe produjo una ligera y transitoria pérdida de peso en los ratones en los primeros días, que se recupera sin problemas a día 10. Sin embargo, la infección por el virus de la gripe pandémica sí que tuvo un importante impacto a nivel histológico, el cual apareció de forma progresiva, alcanzando a día 5 post-infección su máxima expresión, con el desarrollo de signos histológicos de neumonía en 5 de los 6 ratones infectados. Esto nos permite confirmar que el ratón C57BL6 es un buen modelo para reproducir "in vitro" la clínica pulmonar que aparece en algunos pacientes infectados por este virus (Almansa y cols, 2012). Los ratones infectados mostraban por otra parte replicación vírica efectiva a nivel respiratorio bajo, como demuestra la presencia de carga viral detectable en pulmón hasta el día 5. Sin embargo, la replicación vírica fue así mismo transitoria, desapareciendo a día 10, coincidiendo con la desaparición de la neumonía en todos los ratones. De hecho, la pérdida de peso observada en los cinco primeros días podría responder a la presencia de dicha replicación vírica activa, recuperando los ratones su peso normal una vez que ésta se suprime y se supera la neumonía.

Una de las principales fortalezas de esta tesis doctoral ha sido el haber podido evaluar los perfiles de expresión génica a nivel pulmonar en los ratones infectados. El método utilizado para conservar los pulmones y extraer y purificar el ARN contenido en los mismos permitió obtener ARN mensajero de calidad suficiente para poder realizar el análisis de transcriptoma completo mediante microarrays. Otro punto fuerte de este trabajo fue la utilización de un paquete informático capaz de anotar y agrupar los genes por funciones y rutas de señalización intracelular (Ingenuity Pathways, IPA).

Así, los cambios más notables en la expresión génica a nivel pulmonar se dieron a día 5 post-infección, coincidiendo con la máxima afectación histológica. El estudio de las rutas canónicas de señalización intracelular alteradas por la infección por gripe a día 5 reveló la existencia de hiperexpresión de genes relacionados con la inmunidad innata acompañando dicho daño histológico y a la presencia de replicación vírica a nivel pulmonar.

Así, podemos agrupar las rutas de señalización intracelular alteradas a nivel pulmonar por la infección por el virus de la gripe en tres grandes grupos funcionales:

A) Rutas que participan en la inmunidad innata

[Papel de la hipercitoquinemia/ hiperquimioquinemia en la patogénesis de la gripe]

[Adhesión de los agranulocitos y diapédesis]

[Adhesión de los granulocitos y diapédesis]

[Regulación diferencial de la producción de citocinas en células epiteliales intestinales por la IL-17A e IL-17F]

[Señalización celular en la artritis reumatoide. Alteración de las células T y B]

[Regulación diferencial de la producción de citocinas en los macrófagos y las células T auxiliares por la IL-17A IL e IL-17F]

[Papel de la IL-17F en las enfermedades alérgicas inflamatorias de las vías respiratorias].

Los genes que mostraron mayores diferencias en sus niveles de expresión entre el grupo de ratones infectados y el de ratones no infectados precisamente juegan un papel central en la respuesta innata frente a virus: IL-6, interferón beta (perteneciente a los interferones de tipo I), interferón gamma (o interferón de tipo II) y CXCL10 (también llamado IP-10). La IL-6 es una

citocina sobre cuyo papel en la gripe pandémica existe una gran controversia. Si bien es cierto que existe un gran consenso sobre la existencia de altos niveles de IL-6 en plasma o suero en los casos de neumonía vírica primaria grave causada por el virus de la gripe pandémica (Bermejo-Martin y cols, 2009; To y cols, 2010; Hagau y cols, 2010), todavía no está claro si esta molécula juega un papel protector o deletéreo en éstos pacientes. De hecho, en el estudio realizado por Paquette y cols con ratones "*knocked out*" para IL-6 que fueron infectados utilizando el virus de la gripe pandémica, en el que nuestro grupo participó, se observó que el papel de esta citocina no era esencial para eliminar el virus, ya que su papel podía ser reemplazado por otros elementos del sistema inmune (Paquette y cols, 2012). En esta tesis se observó la persistencia a día 10 de niveles altos de expresión de IL-6, lo cual podría indicar que esta citocina juega funciones en el desarrollo de los fenómenos de reparación tisular tras la neumonía.

Por otra parte, los interferones son importantes en la regulación de la expresión de genes que tienen función antiviral. Los interferones se producen y secretan por los macrófagos y las células dendríticas plasmacitoides. Los interferones de tipo I y tipo II inducen la expresión de los denominados "genes de respuesta al interferón" o "ISGs". Entre los ISGs más relevantes se encuentran el CXCL10. La respuesta de interferones tipo I e ISGs es crucial en la respuesta frente al virus de la gripe. Si bien estas moléculas son fundamentales para eliminar el virus de la gripe, la persistencia de niveles elevados de activación de estos genes se han visto asociados a la presencia de daño pulmonar en modelos de hurón infectados por el virus H5N1 causante de la gripe aviar (Cameron y cols, 2008).

La activación de los genes presentes en la ruta [Papel de la hipercitoquinemia / hiperquimioquinemia en la patogénesis de la gripe] refuerza la existencia también a nivel local, de lo mismo que se observó a nivel sistémico en los pacientes que presentaron una neumonía vírica primaria grave causada por el virus de la gripe pandémica, esto es, la inducción de una "tormenta de citocinas" (Almansa y cols, 2012). Así, los niveles elevados de expresión a nivel pulmonar de los genes de otras citocinas que promueven la inmunidad Th1 como IL1A, IL1B, IL12B, TNF y quimiocinas como la proteína inflamatoria de macrófagos CCL3 (MIP-1 α) y CCL4 (MIP-1 β), la proteína quimiotáctica de monocitos1 (CCL2 o MCP-1) y CCR5 (receptor de CCL5 o RANTES), así lo confirman. Así, esta ruta denominada "hipercitoquinemia en la

patogénesis de la gripe", fue identificada por el programa IPA utilizado en esta tesis como la ruta más representada en nuestro trabajo, como la que mayor "peso" tenía en el análisis. Estas citocinas promueven la movilización de células blancas (neutrófilos, linfocitos, monocitos) hacia el tejido pulmonar infectado, las cuales tienen como misión eliminar las células infectadas.

La activación de los genes de las rutas "Adhesión de agranulocitos y Diapedesis", de la ruta del "Receptor expresado en células mieloides 1 (TREM1)" y de la ruta "Adhesión de Granulocitos y Diapédesis" parecen confirmar la existencia en el pulmón infectado por el virus de la gripe de un programa transcriptómico activado para inducir quimiotaxis hacia el pulmón de neutrófilos, linfocitos y monocitos. Los cortes histológicos correspondientes al mismo día 5 confirman la existencia de infiltrados celulares intensos en el pulmón.

La presencia de activación de genes pertenecientes a las rutas [Regulación diferencial de la producción de citocinas en células epiteliales intestinales por la IL-17A e IL-17F], [Regulación diferencial de la producción de citocinas en los macrófagos y las células T auxiliares por la IL-17A IL e IL-17F] [Papel de la IL-17F en las enfermedades alérgicas inflamatorias de las vías respiratorias], que es secundaria a la actuación de IL-17, podría apoyar el papel de esta citocina en la patogénesis de la gripe (Bermejo-Martin y cols, 2009; Almansa y cols, 2011). Sin embargo, en esta tesis no se evaluaron los niveles de IL-17 en sobrenadante de tejido pulmonar ni en plasma, por lo que esto no se pudo confirmar.

El problema es que, además de luchar contra la infección, los fenómenos inflamatorios inducidos tras la llegada de células mono o polimorfonucleares pueden generar daño tisular. Esto es lo que ocurre en la artritis reumatoide, una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica que afecta principalmente a la membrana sinovial, cartílago y hueso, cuya ruta de señalización principal ([Señalización celular en la artritis reumatoide. Alteración de las células T y B]) aparece representada en nuestro análisis. Esto denota la presencia de mecanismos redundantes de daño tisular en ambas situaciones (una enfermedad autoinmune) y la infección por un virus (gripe). La conexión fisiopatogénica entre la infección vírica y las enfermedades autoinmunes es bien conocida (Delogu y cols, 2011).

Así, la respuesta inflamatoria exagerada se creó que sería la causante del edema pulmonar y la hemorragia alveolar, condiciones asociadas con la necrosis y la destrucción del tejido observadas en los pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda por gripe. Autores como de Jong MD y cols observaron que la presencia de hipercitoquinemia correlacionaba con la carga viral excretada a nivel respiratorio alto y con la presencia de daño pulmonar extenso (de Jong y cols, 2006). Nuestro grupo observó lo mismo en pacientes con neumonía grave secundaria a la infección por el virus de la gripe pandémica (Almansa y cols, 2011). La desaparición de la activación de la gran mayoría de estos genes a día 10 post-infección coincidió de hecho con la desaparición por una parte de la replicación del virus, y por otra de la neumonía.

B) Ruta "puente" entre la inmunidad innata-adaptativa

[Comunicación entre las células de la respuesta inmune innata y adaptativa]

La activación de los genes de estas rutas (B2M, IFNG, IL1A, IFNB1, CD83, IL6, CXCL10, CCL4, CD80, CCL3L3, IL12B, CD86, Tlr13, IL1B, TNF) promueve el paso de la inmunidad innata a la adaptativa. La respuesta inmune a una infección se puede dividir en la fase innata y adaptativa, las cuales actúan sinérgicamente para eliminar los agentes patógenos. La activación de la respuesta inmune innata da como resultado la detección de antígeno para la rápida eliminación de patógenos (Almansa y Bermejo-Martin, 2011). En contraste, la respuesta inmune adaptativa se desarrolla después de un tiempo, pero resulta en la activación de células que son altamente específicas y eficaces en la eliminación del patógeno. La calidad y la magnitud de la respuesta inmune adaptativa dependen de la respuesta inmune innata. Las células implicadas en la respuesta inmune innata incluyen células asesinas naturales (NK), las células dendríticas y los macrófagos. Muchas células inmunes innatas poseen receptores de reconocimiento de patrones (PRRS), tales como los receptores tipo toll (TLR) que detectan huellas moleculares de patógenos lo que da lugar al reconocimiento y presentación de antígeno. Después del reconocimiento de antígeno, las células del sistema inmune innato se activan recíprocamente entre sí, así como a las células del sistema inmune adaptativo como los linfocitos T y B. Las células dendríticas son consideradas como la relación entre la respuesta inmune innata y adaptativa. En sus estados inmaduro, las células dendríticas son buenos detectores de antígeno, pero pobres presentadores de antígeno a las células T y células B. Sin

embargo, después de la detección del antígeno a través de TLRs, las células dendríticas maduras son células eficaces que secretan varias citocinas tales como interferones de tipo I, IL-12, IL-15 y quimiocinas tales como IL-8 y la proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP1). Estos mediadores solubles, así como las interacciones célula-célula dan como resultado la activación de linfocitos T y B y por lo tanto el desarrollo de células y de respuesta inmune adaptativa humoral. La activación de respuestas T CD8 (respuesta citotóxica) y de producción de anticuerpos específicos frente a la gripe desde células plasmáticas diferenciadas desde células B, se traduce en la resolución de la infección por el virus de la gripe (Almansa y Bermejo-Martin, 2011). En esta ruta podemos resaltar la presencia de TLR13, un gen cuya participación en la patogénesis de la infección grave por gripe no había sido descrita hasta este momento. TLR13 es un receptor expresado por las células de la inmunidad innata en ratón pero no en humanos, y su ligando es el ARN ribosomal 23S bacteriano (Oldenburg y cols, 2012).

C) Rutas que participan en la remodelación/fibrosis

[Fibrosis hepática / Activación de las células estrelladas hepáticas]

El programa de análisis de rutas de señalización intracelular utilizado en esta tesis (IPA), clasifica los genes por funciones según la evidencia existente en la bibliografía. Así, el análisis demuestra la presencia de la ruta denominada [Fibrosis hepática / Activación de las células estrelladas hepáticas], que participa en la génesis de fibrosis en el contexto de la cirrosis. Esta ruta tiene un papel importante en la infección grave por virus de la gripe, como denota el segundo lugar que ocupa la misma entre las rutas identificadas por IPA. La activación de los genes de esta ruta (IFNG, CCR5, IL1A, LHX2, MMP13, IL6, IL1R2, CXCL3, CCL2, IGF1, TIMP1, IL1B, TNF, FASLG) induce un ambiente pro-inflamatorio que estimula la secreción de proteínas de la matriz extracelular (colágeno, elastina, fibrina) por parte de células como los fibroblastos (Sanchez-Antolín y cols, 2015), lo cual puede contribuir a la reparación de tejidos dañados. La desaparición de la activación de esta ruta a día 10 post-infección en el modelo de ratón presentado en esta tesis, coincidiendo con la resolución de la neumonía, apoyan su desactivación como fenómeno necesario para resolver los fenómenos de inflamación-reparación que se desencadenan a consecuencia de la infección por el virus. La otra ruta que podría estar involucrada en fenómenos de reparación es la de "Señalización de Wnt / β -

catenina". Los genes de esta ruta promueven fenómenos como la diferenciación celular, la polaridad celular, la proliferación celular y la generación de tejido. A día 5, esta ruta está básicamente "apagada" comparada con el control sano. La desactivación de esta ruta podría ser importante para limitar el daño inflamatorio tras la infección por el virus de la gripe, pero su papel no está claro.

Comparación con otros modelos animales de infección con virus de la gripe pandémica

No existe mucha bibliografía evaluando los perfiles de expresión génica en pulmón en modelos animales infectados por virus de la gripe pandémica de 2009. El trabajo de esta tesis confirma lo ya demostrado por Paquette S y cols para IL-6, autores que encontraron que la infección por virus de la gripe pandémica (A/Mexico/4108/2009) inducía también en el pulmón de ratones infectados, niveles elevados de expresión de esta citocina pro-inflamatoria, así como de los genes asociados a su ruta de señalización intracelular (Paquette y cols, 2012). Rowe T y cols, utilizando un modelo de hurón infectado con virus H1N1 A/California/07/2009, de forma similar a lo observado en esta tesis, evidenciaron que la infección indujo la hiperexpresión temprana en pulmón de las quimiocinas CCL2, CCL8, CXCL7 y CXCL10, junto con la de genes de respuesta al interferón, coincidiendo con la aparición de patología pulmonar (Rowe y cols, 2010). La expresión de estos genes disminuyó de forma abrupta a día 7 post-infección, coincidiendo con la activación de genes de inmunidad adaptativa y con la eliminación del virus. En los resultados de nuestro modelo, la eliminación del virus también coincide con la desactivación de la expresión de genes de quimiocinas, aunque no se pudo demostrar la activación de genes de la inmunidad adaptativa. El uso de un modelo distinto (ratón frente a hurón), o el diferente diseño temporal de la toma de muestras (día 7 en el estudio de Rowe y cols, día 10 en nuestro estudio), puede explicar esta diferencia. De hecho, Go T y cols demostraron que la infección por el virus influenza A/California/04/2009 induce diferencias importantes en los perfiles de expresión génica en pulmón dependiendo de la especie animal utilizada (ratón, cerdo, macaco) (Go y cols, 2012). Estos autores encontraron que, de los 4118 genes comunes entre las tres especies, solamente 53 presentaron modificaciones en sus niveles de expresión en las tres especies tras la infección por virus de la gripe, aunque estos genes participaban sobre todo en la respuesta inflamatoria, con CXCL10 / IP-10 presente en

los tres modelos animales, tal y como ocurre en nuestro modelo. El modelo murino desarrollado por Go T y cols encontró además representada en el análisis de los perfiles de expresión génica en pulmón los genes la ruta de señalización intracelular [Fibrosis hepática / Activación de las células estrelladas hepáticas], la cual fue identificada también en nuestro trabajo. El modelo porcino compartió también esta ruta con el nuestro. Tanto el modelo de macaco como el porcino compartieron con nuestro modelo la ruta [Comunicación entre las células de la respuesta inmune innata y adaptativa].

Comparación con otros estudios de expresión génica en pacientes con neumonía causada por el virus de la gripe pandémica

Gracias al mismo proyecto INMUNOFLU que financió el trabajo de esta tesis doctoral, nuestro grupo, en colaboración con el grupo del Dr. David Kelvin de la UHN Toronto, pudo realizar a principios de 2010 un estudio de los perfiles de expresión génica en sangre periférica en pacientes infectados por el virus de la gripe pandémica de 2009 ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos españolas (Bermejo-Martin y cols, 2010). Como ocurrió en el estudio mostrado en esta Tesis, así como en el trabajo de Paquette S y col, los pacientes más graves (aquellos que necesitaron de ventilación mecánica), presentaron hiperexpresión de la IL-6. Por contra, estos pacientes mostraron depresión de varias rutas relacionadas con la función de las células T, evidenciando la existencia a nivel periférico de una profunda deficiencia de la inmunidad adaptativa. Como se discutirá más adelante en esta memoria, esto podría deberse a que la mayoría de estos pacientes presentaron comorbilidades de base que podían comprometer su inmunidad. Además no se debe olvidar la distinta naturaleza de las muestras analizadas (sangre) respecto a las analizadas en esta tesis (procedentes de pulmón). No obstante, la ausencia de evidencia de depresión de la expresión de genes participantes en la función T en pulmón en esta tesis podría explicar la recuperación total de los ratones tras la infección.

Por otra parte, Parnell G y cols observaron en leucocitos circulantes de pacientes con gripe pandémica grave la presencia de alteraciones en el programa transcriptómico que regula el ciclo celular, que implicaba la presencia de replicación aberrante de ADN en la fase G1/S y retardo en la progresión de la fase G2/M, cambios que podrían comprometer el desarrollo de una respuesta inmune correcta frente al virus (Parnell y cols, 2011). El análisis de rutas de

expresión génica en pulmón realizado en nuestro trabajo no demostró la presencia de tales alteraciones, si bien es cierto que todos los ratones infectados se recuperaron al final del periodo de observación, lo cual podría indicar puntos de partida diferentes en los dos escenarios evaluados.

Modelo integrador de la fisiopatología de la infección grave por gripe pandémica

La generación de modelos integradores de la clínica, la respuesta inmune y la replicación vírica es una herramienta útil para desentrañar la fisiopatología de la infecciones graves por virus respiratorios (Cameron y cols, 2008; Bermejo-Martin y cols, 2010).

Estos antecedentes arriba expuestos animaron al desarrollo de esta tesis doctoral, la cual ha de necesariamente concluir con la generación de un modelo temporal que integra todos los resultados obtenidos en este trabajo. Éste modelo muestra que la infección por el virus de la gripe genera cambios físicos (pérdida de peso), histológicos (neumonía), y transcriptómicos a nivel pulmonar (activación de la inmunidad innata) que son máximos a día 5 post-infección. Dichos cambios se producen en paralelo a la existencia de replicación viral activa hasta día 5, y se normalizan a día 10 post-infección coincidiendo con la desaparición de la replicación vírica y la resolución de la neumonía (Figura 73).

El análisis de este modelo permite intuir que la persistencia de la activación de la inmunidad innata a largo plazo, más allá del día 5, podría resultar en falta de resolución de la neumonía y por tanto en la persistencia de la insuficiencia respiratoria que algunos pacientes presentan y que en algunos casos termina en un desenlace fatal. Los datos del seguimiento de la cohorte de pacientes del proyecto INMUNOFLU apoyan esta idea, ya que los pacientes con peor pronóstico presentaron una activación persistente de la ruta de la IL6 en sangre periférica (Bermejo-Martin y cols, 2010). Otros antecedentes también apoyan este concepto, ya que la persistencia de respuestas desreguladas de la inmunidad innata parecen estar en la base de la persistencia de la neumonía en el Síndrome Respiratorio agudo Severo (SRAS) causado por el nuevo Coronavirus surgido en 2003 (Cameron y cols, 2007) y aquella causada por el virus de la gripe aviar H5N1 (Cameron y cols, 2008).

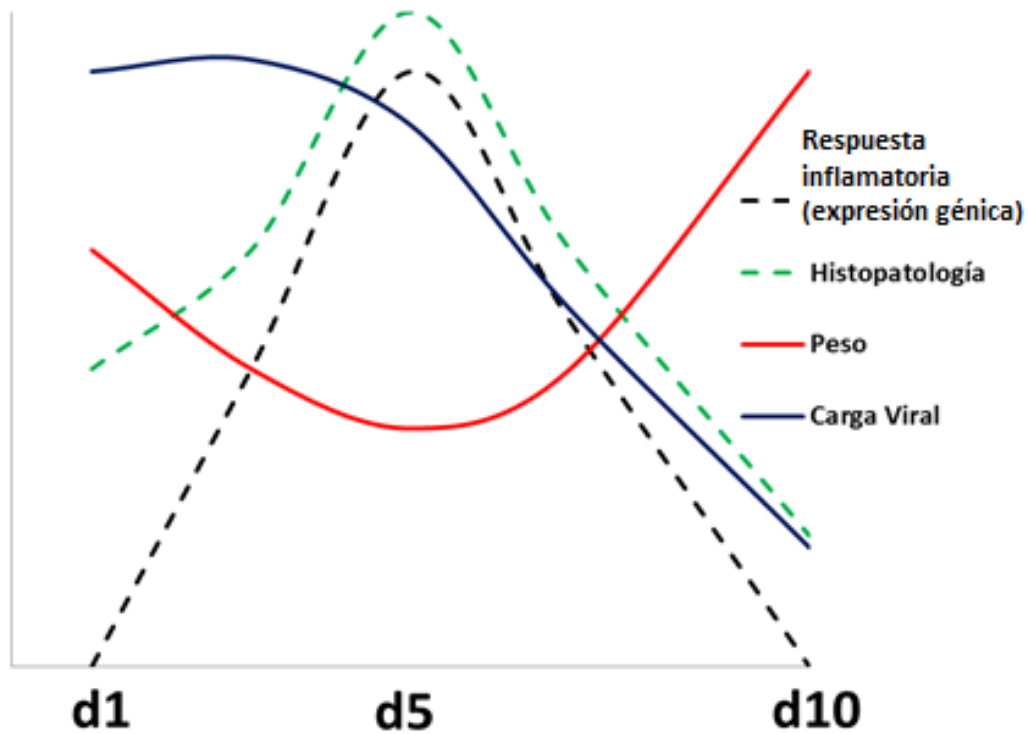


Figura 73: Modelo de gripe A, H1N1 pandémica en ratón

El uso de terapias inmunomoduladoras para tratar la inflamación persistente o exagerada en la gripe es una propuesta ya clásica que sin embargo no ha demostrado beneficio evidente hasta ahora (Viasus y cols, 2011). Probablemente la respuesta vendrá de la combinación de terapias inmunomoduladoras + antivirales de forma precoz. No obstante, trabajos como el desarrollado en esta tesis ayudan a conocer mejor las vías de señalización particulares y el "timing" de activación de las mismas, lo cual puede ayudar a desarrollar terapias inmunomoduladoras más dirigidas.

Líneas futuras

Sería muy interesante poder descubrir los mecanismos que llevan a controlar la inflamación desencadenada por la infección por el virus de la gripe, los mecanismos que por tanto contribuyen a la homeostasis de dicha respuesta, que inducen su terminación en el momento apropiado. La terminación de la respuesta innata antes de tiempo podría traducirse en un escape del virus, por falta de eliminación de la replicación del mismo. La terminación tardía de la respuesta innata puede llevar a la aparición de fenómenos indeseados como la fibrosis pulmonar, la cual puede terminar en distress respiratorio con insuficiencia respiratoria aguda refractaria a oxigenoterapia. La regulación de la respuesta innata es probablemente mediada

por mecanismos epigenéticos en los cuales participan por ejemplo los ARNs cortos (microARNs) (Wu y cols, 2013). Los leucocitos de sangre periférica (por ejemplo las células T reguladoras) podrían jugar también un importante papel en la terminación de la inflamación a nivel respiratorio. El desarrollo de modelos que estudien en paralelo las respuestas transcriptómicas en leucocitos de sangre periférica y a nivel pulmonar tras la infección por gripe ayudará a dilucidar este particular. El desarrollo de trabajos de citometría de flujo evaluando el inmunofenotipo de los linfocitos T en sangre periférica a lo largo del tiempo sería también de gran ayuda.

Por otra parte, los ratones utilizados en esta tesis son ratones inmunocompetentes, mientras que los pacientes que sufrían formas graves de gripe presentaron en un alto porcentaje enfermedades que podían comprometer su respuesta inmune frente a una infección vírica. En el futuro, sería importante reproducir los trabajos desarrollados en esta memoria utilizando ratones que presentaran deficiencias en la inmunidad mediada por células T, las cuales son esenciales para eliminar la infección por virus de la gripe. De hecho, en nuestro modelo, los ratones infectados no deberían presentar ningún problema para desarrollar una respuesta inmune adaptativa correcta tras la activación de la respuesta innata, lo cual podría no acontecer en ratones inmunosuprimidos de base.

Finalmente, sería interesante estudiar los correlatos existentes a lo largo del tiempo entre los perfiles de expresión génica a nivel local y sistémico y la aparición de anticuerpos y células T específicas frente al virus de la gripe pandémica.

Consideraciones finales

Este trabajo ha permitido identificar las vías moleculares más relevantes que se alteran a nivel pulmonar coincidiendo con la aparición de la neumonía causada por el virus de la gripe pandémica, confirmando lo encontrado a nivel sistémico en humanos durante los estudios de investigación clínica que se desarrollaron durante la pandemia de 2009, y que apuntaban a la presencia, en los pacientes graves, de una respuesta exacerbada de la respuesta innata tras la infección por el nuevo virus. Conocer mejor el papel de cada una de estas rutas en la fisiopatología de la infección causada por este virus podrá ayudar en el futuro a diseñar terapias inmunomoduladoras que puedan prevenir o disminuir la gravedad de la neumonía

post-gripal. La generación de ratones KO ("Knocked- out") para genes representativos de estas rutas puede ayudar a este objetivo.

6 CONCLUSIONES

- 1.- La infección por virus de la gripe pandémica de 2009 en modelo de ratón C57BL6 induce cambios histológicos similares a los que aparecen en los pacientes con formas graves de la enfermedad causada por este virus, cambios caracterizados por la presencia de neumonía cinco días después de la infección, coincidiendo con la existencia de pérdida de peso y replicación viral activa.
- 2.- La infección por este virus indujo cambios importantes en la expresión génica a nivel pulmonar a día 5 post-infección, coincidiendo con la máxima afectación histológica.
- 3.- Este trabajo ha identificado las rutas de señalización intracelular que se alteran a nivel transcriptómico en el pulmón tras la infección por el virus, permitiendo realizar una “dissección molecular” de los eventos fisio-patogénicos que acompañan a la infección a nivel respiratorio. Dichos cambios en la expresión génica se caracterizaron por la presencia de una activación importante de rutas relacionadas con la inmunidad innata y con procesos de reparación/fibrogénesis.
- 4.- Los genes cuya expresión fue inducida de forma más clara fueron IL-6, interferón beta 1 y CXCL10/IP-10, tres genes típicamente implicados en la defensa antiviral.
- 5.- Nuestro trabajo reproduce en pulmón lo ya observado a nivel sistémico en pacientes con neumonía vírica primaria causada por este virus, los cuales presentaron niveles elevados de citocinas y quimiocinas de la inmunidad innata en plasma.
- 6.- La resolución de la neumonía en los ratones infectados se acompañó de la normalización de los perfiles de expresión génica, con desaparición de los fenómenos pro-inflamatorios, cese de la replicación vírica a nivel pulmonar y normalización del peso.
- 7.- La generación de un modelo temporal integrando los resultados de esta Tesis Doctoral, sugiere que la inducción de esta respuesta inflamatoria tan marcada que sigue a la infección por el virus de la gripe pandémica podría contribuir a la patogénesis de la neumonía, pero al mismo tiempo, parece ser necesaria para eliminar la replicación del virus a nivel pulmonar.

- 8.- La expresión de IL-6 no se normalizó al desaparecer los infiltrados neumónicos, indicando que su persistencia podría ser necesaria para no solo superar la infección sino también para reparar los daños causados por el virus.
- 9.- Entender mejor el papel de las rutas de señalización identificadas en este trabajo podría contribuir a lograr, mediante el uso de inmunomoduladores, una correcta regulación de esta respuesta inflamatoria que podría ayudar a prevenir o disminuir la gravedad de la neumonía, sin afectar a la eliminación del virus.

7 BIBLIOGRAFÍA

Agency EM. Pandemrix. 2009.

Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol.* Sep 2000; 74(18):8709-8719.

Almansa R, Anton A, Ramirez P, Martin-Loeches I, Banner D, Pumarola T, et al. Direct association between pharyngeal viral secretion and host cytokine response in severe pandemic influenza. *BMC Infect Dis.* 2010;11:232.

Almansa R, Bermejo, Jesús F. Viral Infection, Adaptive Immunity, and COPD. *Clinical Pulmonary Medicine.* 2011.

Almansa R., Bermejo-Martín J.F. y Lejarazu Leonardo R.O. Immunopathogenesis of 2009 pandemic influenza. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012 Oct;30 Suppl 4:18-24

Almansa, R., Socias, L., Ramirez, P., Martin-Loeches, I., Vallés, J., Loza, A., et al. (2011). Imbalanced pro- and anti-Th17 responses (IL-17/granulocyte colony-stimulating factor) predict fatal outcome in 2009 pandemic influenza. *Critical Care (London, England)*, 15(5), 448.

Andersen-Nissen E, Heit A, McElrath MJ. Profiling immunity to HIV vaccines with systems biology. *Current opinion in HIV and AIDS.* 2012;7(1):32-7.

Antonelli, A., Ferrari, S. M., Giuggioli, D., Ferrannini, E., Ferri, C., y Fallahi, P. (2014). Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 13(3), 272-280.

Avalos RT, Yu Z, Nayak DP. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol.* Apr 1997; 71(4):2947-2958.

Barbado J, Martin D, Vega L, Almansa R, Gonçalves L, Nocito M, Jimeno A, Ortiz de Lejarazu R, Bermejo-Martin JF. (2012). MCP-1 in urine as biomarker of disease activity in Systemic Lupus Erythematosus. *Cytokine.* 2012 Nov;60(2):583-6. doi: 10.1016/j.cyto.2012.07.009. Epub 2012 Aug 3.

Baskin CR, Garcia-Sastre A, Tumpey TM, et al. Integration of clinical data, pathology, and cDNA microarrays in influenza virus-infected pigtailed macaques (*Macaca nemestrina*). *J Virol.* Oct 2004; 78(19):10420-10432.

Baumgartner et al. Incidence of influenza-associated mortality and hospitalizations in Argentina during 2002–2009. *Influenza and Other Respiratory Viruses.* 2012.

Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, Uyeki TM, et al. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med.* 2010;362:1708-19.

Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* Apr 2005; 6(4):353-360.

Belshe RB. The Origins of Pandemic Influenza-Lessons from the 1918 virus. *N Engl J Med* 2005; 353:2209-2211.

Bermejo-Martín JF, Martín-Loeches I, Rello J, Antón A, Almansa R, Xu L, et al. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2010;14:R167.

Bermejo-Martín JF, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramírez P, et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2009;13:R201.

Bermejo-Martin, J. F., Martin-Loeches, I., Rello, J., Antón, A., Almansa, R., Xu, L., et al. (2010). Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Critical Care (London, England)*, 14(5), R167.

Bermejo-Martin, J. F., Ortiz de Lejarazu, R., Pumarola, T., Rello, J., Almansa, R., Ramírez, P., et al. (2009). Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Critical Care (London, England)*, 13(6), R201.

Booy R, Khandaker G, Heron LG, et al. Cross-reacting antibodies against the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in older Australians. *Med J Aust*. Jan 3, 2011; 194(1):19-23.

Both, G. W., Sleight, M. J., Cox, N. J., y Kendal, A. P. (1983). Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *Journal of Virology*, 48(1), 52–60.

Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, et al. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today*. Mar 1999; 20(3):141-151.

Brandtzaeg P. Overview of the mucosal immune system. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1989; 146:13-25.

Brown, I. H. et al. 1998. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *J. Gen. Virol.* 79:2947-2955.

Brundage J F, Shanks G D. Deaths from bacterial pneumonia during 1918-19 influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1193-9. 139.

Burioni R, Canducci F, Clementi M. Pregnancy and H1N1 infection. *Lancet*. 2009; 374:1417-8.

Butler, Declan. 2009. "Swine Flu goes Global", *Nature*, núm. 458, 29 de abril, pp. 1082–1083.

Camaño Puig R, Barrientos Vallvé M, Faus Gabandé F. El gran catharro de 1580 ¿Gripe o Pertussi? *Asclepio* 2005; 2: 45-58.

Cameron CM, Cameron MJ, Bermejo-Martin JF, et al. Gene expression analysis of host innate immune responses during Lethal H5N1 infection in ferrets. *J Virol*. Nov 2008; 82(22):11308-11317.

- Cameron, M. J., Bermejo-Martin, J. F., Danesh, A., Muller, M. P., y Kelvin, D. J.** (2008). Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Virus Research*, 133(1), 13-19.
- Cameron, M. J., Ran, L., Xu, L., Danesh, A., Bermejo-Martin, J. F., Cameron, C. M. et al.** (2007). Interferon-mediated immunopathological events are associated with atypical innate and adaptive immune responses in patients with severe acute respiratory syndrome. *Journal of Virology*, 81(16), 8692-8706.
- Cannell, J. J., Vieth, R., Umhau, J. C., Holick, M. F., Grant, W. B., Madronich, S. and Giovannucci, E.** (2006). Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiology and Infection*, 134(6), 1129–1140.
- Cao B. Li XW, Mao Y, Wang J, Lu HZ, Chen YS et al.** clinical features of the initial cases of 2009 pandemic Influenza A (H1N1) virus infection in China. *N Engl Med* 2009; 361:2507-17.
- Castrucci, M.R., Donatelli, I., Sidoli, L., Barigazzi, G., Kawaoka, Y., Webster, R.G.** 1993. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 193, 503-506.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention.** 2009a. Swine Influenza A(H1N1) infection in two children – Southern California, March-April 2009. *MMWR Morbidity Mortality Weekly Report* 2009; 58(15):400-2.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention.** 2009b. Update: swine Influenza A(H1N1) infections – California and Texas, April 2009. *MMWR Morbidity Mortality Weekly Report* 2009; 58(16):435-7.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention.** 2009c. Update: novel influenza A(H1N1) virus infection – Mexico, March-May,2009.*MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 Jun5; 58: 585-9.
- Chaussabel D, Pascual V, Banchereau J.** Assessing the human immune system through blood transcriptomics. *BMC Biol.*8:84. 2010.
- Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW.** (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med.* 2001 Dec;7(12):1306-12.
- Chiaretti, A., Pulitanò, S., Barone, G., Ferrara, P., Romano, V., Capozzi, D., y Riccardi, R.** (2013). IL-1 β and IL-6 upregulation in children with H1N1 influenza virus infection. *Mediators of Inflammation*, 2013, 495848.
- Cohen J and Enserink M.** 2009. Virus of the year. The novel H1N1 influenza. *Science* 326: 1607.
- Cohen, M., Zhang, X.-Q., Senaati, H. P., Chen, H.-W., Varki, N. M., Schooley, R. T., y Gagneux, P.** (2013). Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virology Journal*, 10, 321.

Cuevas González-Nicolás María Teresa, Ledesma Moreno Juan, Pozo Sánchez Francisco, Casas Flecha Inmaculada, Pérez-Breña Pilar. Gripe pandémica H1N1 (2009): Experiencia de la Red de Laboratorios de Gripe del Sistema de Vigilancia de la Gripe en España (SVGE). *Rev. Esp. Salud Publica* [revista en la Internet]. 2010 Oct ; 84(5): 481-495.

Damjanovic, D., Divangahi, M., Kugathasan, K., Small, C.-L., Zganiacz, A., Brown, E. G. et al. (2011). Negative regulation of lung inflammation and immunopathology by TNF- α during acute influenza infection. *The American Journal of Pathology*, 179(6), 2963-2976.

Dannevig B, Falk K, Namork R. Isolation of the causal virus of infectious salmon anemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *J gen Virol* 1995; 76:1353-9.

Daum, L. T., Shaw, M. W., Klimov, A. I., Canas, L. C., Macias, E. A., Niemeyer, D. et al. (2005). Influenza A (H3N2) Outbreak, Nepal. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1186–1191.

Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom s, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM. Emergence of novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in human. *N Engl J Med* 2009; 360:2605-2615.

Dawson, T. C., Beck, M. A., Kuziel, W. A., Henderson, F., y Maeda, N. (2000). Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *The American Journal of Pathology*, 156(6), 1951-1959.

De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov.* Dec 2006; 5(12):1015-1025.

De Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med.* 2006;12:1203-7.

Delogu, L. G., Deidda, S., Delitala, G., y Manetti, R. (2011). Infectious diseases and autoimmunity. *Journal of Infection in Developing Countries*, 5(10), 679-687.

Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., y Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(6), 313-326.

Dinareello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117(14), 3720-3732.

Diseases CNCflaR. Use of Influenza A (H1N1) 2009 Monovalent Vaccine. 2009.

Duesberg, P. (1969). Distinct subunits of the ribonucleoprotein of influenza virus. *Journal of Molecular Biology* 42, 485-499.

Echevarria-Zuno S, Mejía-Arangure JM, Mar-Obeso AJ, Grajales-Muniz C, Robles-Pérez E, González-León M, et al. Infection and death from influenza A H1N1 virus in Mexico: a retrospective analysis. *Lancet.* 2009 Nov 11.

Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus ADME. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J Virol* 2005; 79(5):2814-2822.

Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, et al. Pandemic potential of a strain of Influenza A (H1N1): early findings. *Science* 2009; 324: 1557-61.

Fritz RS, Hayden FG, Calfee DP, Cass LM, Peng AW, Alvord WG, et al. Nasal cytokine and chemokine responses in experimental influenza A virus infection: results of a placebo-controlled trial of intravenous zanamivir treatment. *J Infect Dis.* 1999;180:586-93.

Fukuyama S, Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol.* Aug 2011; 23(4):481-486.

Gao, R., Bhatnagar, J., Blau, D. M., Greer, P., Rollin, D. C., Denison, A. M., et al. (2013). Cytokine and chemokine profiles in lung tissues from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1): role of the host immune response in pathogenesis. *The American Journal of Pathology*, 183(4), 1258-1268.

Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, y cols. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science.* 2009; 325(5937):197-201).

Gaur AH, Bagga B, Barman S, et al. Intravenous zanamivir for oseltamivir-resistant 2009 H1N1 influenza. *N Engl J Med.* Jan 7 2010; 362(1):88-89.

Geiser, T. (2003). Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury--a translational approach. *Swiss Medical Weekly*, 133(43-44), 586-590.

Gentile D, Doyle W, Whiteside T, Fireman P, Hayden FG, Skoner D. Increased interleukin-6 levels in nasal lavage samples following experimental influenza A virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5:604-8.

Gerhard W, Mozdzanowska K, Furchner M, Washko G, Maiese K. Role of the B-cell response in recovery of mice from primary influenza virus infection. *Immunol Rev.* Oct 1997; 159:95-103.

Germain RN, Meier-Schellersheim M, Nita-Lazar A, Fraser ID. Systems biology in immunology: a computational modeling perspective. *Annu Rev Immunol.* Apr 23 2011; 29:527-585.

Girard, M. P., Tam, J. S., Assossou, O. M., and Kieny, M. P., *Vaccine* 28 (31), 4895 (2010).

Go, J. T., Belisle, S. E., Tchitchek, N., Tumpey, T. M., Ma, W., Richt, J. A., et al (2012). 2009 pandemic H1N1 influenza virus elicits similar clinical course but differential host transcriptional response in mouse, macaque, and swine infection models. *BMC Genomics*, 13, 627.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Academies Press - Guide-for-the-Care-and-use-of-laboratory-animals.pdf. (s. f.). Recuperado a partir de <https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>

Gutierrez, Eliana Battaglia, Li, Ho Yeh, Santos, Ana Catarina De Seixas (2001).

Effectiveness of influenza vaccination in elderly outpatients in São Paulo city, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* [online]. vol. 43, no. 6.

Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. H5 avian and H9 swine influenzavirus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. *EMBOJ* 2002;21:865-875

Hagau, N., Slavcovici, A., Gongnanou, D. N., Oltean, S., Dirzu, D. S., Brezozski, E. S., et al. (2010). Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. *Critical Care* (London, England), 14(6), R203.

Harris A, et al. 2006. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:19123–19127

Hatta M, Hatta Y, Kim J, Watanabe S, Shinya K, Nguye N, et al. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog* 2007;3:1374-1379.

Hausmann J, Kretzschmar E, Garten W, Klenk HD. N1 neuraminidase of influenza virus A/FPV/Rostock/34 has haemadsorbing activity. *J Gen Virol* 1995; 76: 1719-28.

Hayden FG y Palese P. Influenza virus. In richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds.): *Clinical Virology*. New York: Churchill Livingstone; 1997. p911.

Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., et al (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature*, 434(7036), 1035-1040.

Huang KJ, Su IJ, Theron M, Wu YC, Lai SK, Liu CC, et al. An interferon-gammarelated cytokine storm in SARS patients. *J Med Virol.* 2005;75:185-94.

Huerta García A, González Sánchez N, Torres Martí A. Influenza A (H1N1): manifestaciones clínicas e indicaciones profilácticas y terapéuticas. *Arch Bronconeumol* 2010; 46:19-23.

Hurt AC, Ernest J, Deng YM, Iannello P, Besselaar TG, Birch C, et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Res.* 2009;83:90-3.

Husseini RH, Sweet C, Collie MH, Smith H. Elevation of nasal viral levels by suppression of fever in ferrets infected with influenza viruses of differing virulence. *J Infect Dis.* Apr 1982; 145(4):520-524.

Ibricevic, A. et al., *J Virol* 80 (15), 7469 (2006).

Ichikawa, A., Kuba, K., Morita, M., Chida, S., Tezuka, H., Hara, H., et al. (2013). CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(1), 65-77.

- Ilyushina NA, Hoffmann E, Salomon R, Webster RG, Govorkova EA.** Amantadine-oseltamivir combination therapy for H5N1 influenza virus infection in mice. *Antivir Ther.* 2007; 12(3):363-370.
- Inglis SC, Lamb RA, Carroll AR, Mahy BWJ.** Polypeptides specified by the influenza virus genome. I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. *Virology* 1976;74:489-503
- Inoue M, Barkham T, Leo YS, et al.** Emergence of oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus within 48 hours. *Emerg Infect Dis.* Oct 2010; 16(10):1633-1636.
- Iwasaki A, Medzhitov R.** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* Oct 2004; 5(10):987-995.
- Iwasaki, A., y Pillai, P. S.** (2014). Innate immunity to influenza virus infection. *Nature Reviews. Immunology*, 14(5), 315-328.
- Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, et al.** Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med.* Nov 12 2009; 361(20):1935-1944.
- Jamieson DJ, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DL, Biggerstaff MS, et al.** H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet.* 2009;374:451-8.
- Jefferson T, Jones M, Doshi P, Del MC.** Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2009;339:b5106.
- Jenner E.** An Inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western countries of England, particularly Gloucestershire and known by the name of the Cow Pox. London, S Low, 1798.
- Jhung M. A., Swerdlow D., Olsen S. J., Jernigan D., Biggerstaff M., Kamimoto L., Kniss K., Reed C., Fry A., Brammer L., Gindler J., Gregg W. J., Bresee J. and Finelli L.,** 'Epidemiology of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the United States', *Clin Infect Dis*, 52 (2011), Suppl 1, S13-26.
- Johnson SB, Lissauer M, Bochicchio GV, Moore R, Cross AS, Scalea TM.** Gene expression profiles differentiate between sterile SIRS and early sepsis. *Ann Surg.* Apr 2007; 245(4):611-621.
- Julkunen I, Melen K, Nyqvist M, Pirhonen J, Sareneva T, Matikainen S.** Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine.* Dec 8 2000; 19 Suppl 1:S32-37.
- Kawada J, Kimura H, Kamachi Y, et al.** Analysis of gene-expression profiles by oligonucleotide microarray in children with influenza. *J Gen Virol.* Jun 2006; 87(Pt 6):1677-1683.
- Kilbourne E.D.** 1979, Swine flu: The virus that vanished, *Human Nature* 2:68-73
- Kilbourne E.D.** 1987 E.D. Kilbourne, C.P. Cerini, M.W. Khan, J.W. Mitchell Jr., P.O. Ogra Immunologic response to the influenza virus neuraminidase is influenced by prior experience

with the associated viral hemagglutinin. *Studies in human vaccines J. Immunol.*, 138 (1987), p. 3010

Kobasa D, Rodgers ME, Wells K, Kawaoka Y. Neuraminidase hemadsorption activity, conserved in avian influenza A viruses, does not influence viral replication in ducks. *J Virol* 1997; 71: 6706-13.

Kolata, G. B. (2001). *Flu: The story of the great influenza pandemic of 1918 and the search for the virus that caused it.* New York: Farrar, Straus and Giroux.

Korteweg, C., y Gu, J. (2008). Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans. *The American Journal of Pathology*, 172(5), 1155-1170.

Krug RM. Clues to the Virulence of H5N1 Viruses in Humans. *Science* 2006; 311:1562-1563.

Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell B. Host Species Barriers to Influenza Virus Infections. *Science* 2006; 312:394-397.

Kumar A, Zarychanski R, Pinto R, Cook DJ, Marshall J, Lacroix J, et al. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *JAMA*. 2009;302:1872-9.

Kuper C.F, Koornstra P. J., Hameleers D. M., Biewenga J., Spit B. J., Duijvestijn A. M., Van Breda Vriesman and T. Sminia P. J., 'The role of nasopharyngeal lymphoid tissue', *Immunol Today*, 13 (1992), 219-24.

La Gruta NL, Kedzierska K, Stambas J, Doherty PC. A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection. *Immunol Cell Biol.* Feb-Mar 2007; 85(2):85-92.

La Gruta, N. L., y Turner, S. J. (2014). T cell mediated immunity to influenza: mechanisms of viral control. *Trends in Immunology*, 35(8), 396-402.

Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ, et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill.* 2008;13.

Lamb RA and Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Virology*, 3rd edition. New York: Lippincott-Raven Press; 1996. p. 1353-1395.

Lamb RaK, RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology.* Lippincott Williams & Wilkins. 2001:1487-1531.

Lamb, R.A. and Choppin, P.W. Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription. *Virology.* 1976; 74: 504-519

Lauder, S. N., Jones, E., Smart, K., Bloom, A., Williams, A. S., Hindley, J. P., et al. (2013). Interleukin-6 limits influenza-induced inflammation and protects against fatal lung pathology. *European Journal of Immunology*, 43(10), 2613-2625.

- Le Goffic R, Balloy V, Lagranderie M, et al.** Detrimental contribution of the toll-like receptor (Tlr)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog* 2006; 2: e53.
- Lee SM, Chan RW, Gardy JL, et al.** Systems-level comparison of host responses induced by pandemic and seasonal influenza A H1N1 viruses in primary human type I-like alveolar epithelial cells in vitro. *Respir Res.*11:147. 2010.
- Leung GM, Nicoll A.** Reflections on pandemic (H1N1) 2009 and the international response. *PLoS Med.* Oct 2010; 7(10).
- Levy, D. E., Marié, I. J., y Durbin, J. E.** (2011). Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Current Opinion in Virology*, 1(6), 476-486.
- Levy, D. E., y Darnell, J. E.** (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(9), 651-662.
- Liang M, Lye DC, Chen MI, et al.** New influenza A (H1N1) 2009 in Singapore: the first ten adult imported cases. *Singapore Med J.* Jun 2009; 50(6):581-583.
- Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM.** Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol.* Feb 1995; 69(2):1099-1106.
- Liu, M., Guo, S., Hibbert, J. M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N. O., y Stiles, J. K.** (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(3), 121-130.
- Louten J, Boniface K, De Waal Malefyt R.** Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:1004-11.
- Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P** (2007) Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. *PLoS Pathog* 3(10): e151.
- Luo, L., Tully, T., White, K.** (1992). Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *Appl* gene. *Neuron* 9(): 595-605.
- Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, et al.** Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A (H1N1) Influenza viruses in ferrets and mice. *Science* 2009; 325: 484-7.
- Malakhov MP, Aschenbrenner ML, Smee KF, Wandersee MK, Sidwell RW, Gubareva LV, Mishin VP, Hayden FG, Kim DH, Ing A, Campbell ER, Yu M and Fang F.** Sialidase Fusion Protein as a Novel Broad-Spectrum Inhibitor of Influenza Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(4):1470-1479.
- Masihi KN, Schweiger B, Finsterbusch T, Hengel H.** Low dose oral combination chemoprophylaxis with oseltamivir and amantadine for influenza A virus infections in mice. *J Chemother.* Jun 2007; 19(3):295-303.
- Mathieu-Rivet E, et al.** (2010) The Anaphase Promoting Complex activator CCS52A, a key factor for fruit growth and endoreduplication in Tomato. *Plant Signal Behav* 5(8):985-7

- Matlin KS, Reggio H, Helenius A, Simons K.** Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol.* Dec 1981; 91(3 Pt 1):601-613.
- Matrosovich, M. N. et al.,** *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (13), 4620 (2004).
- Mauad T, Haijar LA, Callegari GD, et al.** Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 72-9.
- Menéndez A., Peña B., Hernández E.** Aspectos clínicos y virológicos útiles en la implementación de un modelo de Influenza A en líneas de ratones Balb/C; *Acta Farm. Bonaerense* 2005, 24 (3): 395-401.
- Meunier J, Pillet S, Simonsen JN, Von MV.** Influenza pathogenesis: lessons earned from animal studies with H5N1, H1N1 Spanish and pandemic H1N1 2009 influenza. *Crit Care Med* 2009.
- Ministerio de Salud y Política Social.** (s. f.). Casos humanos de infección por el nuevo virus de la gripe A(H1N1). Evolución de la infección en España', (2009).
- Mittrucker HW, Kaufmann SH.** Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur J Immunol.* Feb 2004; 34(2):306-312.
- Moghadas SM, Bowman CS, Rost G, Fisman DN, Wu J.** Post-exposure prophylaxis during pandemic outbreaks. *BMC Med.* 2009;7:73.
- Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS.** The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *N Engl J Med.* 2009; 361:225-9.
- Moscona A.** Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med.* Sep 29 2005; 353(13):1363-1373.
- Mount, D.R., D.D. Gulley, J.R. Hockett, T.D. Garrison and J.M. Evans,** 1997. Statistical models to predict the toxicity of major ions to *C. dubia*, *Daphnia magna* and *Pimephales promelas* (Fathead Minnows). *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 2009-2019.
- Nalbandian A, Crispin JC, Tsokos GC.** Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin Exp Immunol.* 2009;157:209-15.
- Napoli C, Fabiani M, Rizzo C, Barral M, Oxford J, Cohen JM, Niddam L, Goryński P, Pistol A, Lionis C, Briand S, Nicoll A, Penttinen P, Gauci C, Bounekkar A, Bonnevey S, Beresniak A.** Assessment of human influenza pandemic scenarios in Europe. *Euro Surveill.* 2015;20(7)
- Narasaraju, T., Ng, H. H., Phoon, M. C., y Chow, V. T. K.** (2010). MCP-1 antibody treatment enhances damage and impedes repair of the alveolar epithelium in influenza pneumonitis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(6), 732-743.
- Newman, A. P., Reisdorf, E., Beinemann, J., Uyeki, T. M., Balish, A., Shu, B., et al.** (2008). Human Case of Swine Influenza A (H1N1) Triple Reassortant Virus Infection, Wisconsin. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9), 1470–1472.

- Nguyen JT, Hoopes JD, Smee DF, et al.** Triple combination of oseltamivir, amantadine, and ribavirin displays synergistic activity against multiple influenza virus strains in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* Oct 2009; 53(10):4115-4126.
- Nicholls, J. M.** (2013). The battle between influenza and the innate immune response in the human respiratory tract. *Infection & Chemotherapy*, 45(1), 11-21.
- Nicholson KG, Wood JM, Zambon M.** Influenza. *Lancet.* Nov 22 2003; 362(9397):1733-1745.
- Oldenburg, M., Krüger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., et al.** (2012). TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), 1111-1115.
- OMS.** Enfermedades respiratorias agudas con tendencia epidémica y pandémica. Prevención y control de la infección en establecimientos de salud. Guía abreviada 2008.
- OMS.** Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic H1N1 2009 Influenza and Other Influenza Viruses. 2009b.
- OMS.** Pandemic A (H1N1) Update 60. 2009a.
- OMS.** Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2006–2007 influenza season WHO report 14 de febrero de 2006.
- Otte A, Gabriel G:** 2009 pandemic H1N1 influenza A virus strains display differential pathogenicity in C57BL/6 J but not BALB/c mice. *Virulence* 2011, 2:563–566.
- Pang, I. K., y Iwasaki, A.** (2012). Control of antiviral immunity by pattern recognition and the microbiome. *Immunological Reviews*, 245(1), 209-226.
- Paquette SG, Banner D, Zhao Z, Fang Y, Huang SS, Leomicronn AJ, et al.** Interleukin-6 Is a Potential Biomarker for Severe Pandemic H1N1 Influenza A Infection. *PLoS One.* 2012;7:e38214.
- Parnell, G., McLean, A., Booth, D., Huang, S., Nalos, M., y Tang, B.** (2011). Aberrant cell cycle and apoptotic changes characterise severe influenza A infection--a meta-analysis of genomic signatures in circulating leukocytes. *PLoS One*, 6(3), e17186.
- Patel M, Dennis A, Flutter C, Thornton S, D'Mello O, Sherwood N.** Pandemic (H1N1) 2009 influenza: experience from the critical care unit. *Anaesthesia.* 2009;64:1241-5.
- Pennings JL, Kimman TG, Janssen R.** Identification of a common gene expression response in different lung inflammatory diseases in rodents and macaques. *PLoS One.* 2008; 3(7):e2596.
- Perez MS.** Introducción a la Inmunología Humana. Síntesis. 1997
- Perez P y Casas I.** Infecciones producidas por los virus de la gripe aviar A (H5N1) en las poblaciones de aves del sudeste asiático y en la especie humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(7): 412-8.

Perez Padilla R, De la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in México. *N Engl J Med* 2009; 361: 680-9. 137.

Perez-Padilla R, De la Rosa Z, Ponce de León S, Hernández M, Quinones-Falconi F, Bautista E, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med.* 2009;361:680-9.

Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell.* May 1 1992; 69(3):517-528.

Plennevaux E, Sheldon E, Blatter M, Reeves-Hoche MK, Denis M. Immune response after a single vaccination against 2009 influenza A H1N1 in USA: a preliminary report of two randomised controlled phase 2 trials. *Lancet.* Jan 2 2010; 375(9708):41-48.

Polpitiya AD, McDunn JE, Burykin A, Ghosh BK, Cobb JP. Using systems biology to simplify complex disease: immune cartography. *Crit Care Med.* Jan 2009; 37(1 Suppl):S16-21.

Prevention CfDca. Update on Influenza A (H1N1) 2009 Monovalent Vaccines. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2009.

Pyle GF. The diffusion of Influenza patterns and paradigms. New Jersey: Ravan&Littlefield 1986.

Radigan, K. A., Misharin, A. V., Chi, M., y Budinger, G. S. (2015). Modeling human influenza infection in the laboratory. *Infection and Drug Resistance*, 8, 311-320.

Rambaut A, Pybus OG, Nelso MI, et al. The genomic and epidemiological dynamics of human Influenza A virus. *Nature* 2008; 453: 615-9.

Ramilo O, Allman W, Chung W, et al. Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections. *Blood.* Mar 1 2007; 109(5):2066-2077.

Ramos, I., y Fernandez-Sesma, A. (2015). Modulating the innate immune response to influenza A virus: potential therapeutic use of anti-inflammatory drugs. *Immunotherapies and Vaccines*, 361.

Reed M J y Muench H. 1938. A simple method for estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.

Reina J. Factores de virulencia y patogenicidad en las cepas gripales (virus de la gripe A) aviarias y humanas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20(7): 346-53.

Renegar, K. B., *Lab Anim Sci* 42 (3), 222 (1992).

Rio Cd. The 2009 influenza A (H1N1) pandemic: What have learned in the past 6 months. *Transactions of the american clinical and climatological association.* 2010; 121.

Rodríguez A. La amenaza de la gripe pandémica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998; 16(3): 107-9.

Rott R, Klenk HD, Nagai Y, Tashiro M. Influenza viruses, cell enzymes, and pathogenicity. *Am J Respir Crit Care Med.* Oct 1995; 152(4 Pt 2):S16-19.

Rowe, T., León, A. J., Crevar, C. J., Carter, D. M., Xu, L., Ran, L., et al. (2010). Modeling host responses in ferrets during A/California/07/2009 influenza infection. *Virology*, 401(2), 257-265.

Sakata T, Winzeler EA. Genomics, systems biology and drug development for infectious diseases. *Mol Biosyst.* Dec 2007; 3(12):841-848.

Salazar MI, López-Ortega O, León-Ávila G, Ramírez- González JE, Castro-Mussot ME. El origen de la variabilidad genética de los virus de influenza. *Gac Méd Méx.* 2010;146 (3):199-207.

Sanchez-Antolín, G., Almohalla-Alvarez, C., Bueno, P., Almansa, R., Iglesias, V., Rico, L., et al. (2015). Evidence of Active Pro-Fibrotic Response in Blood of Patients with Cirrhosis. *PLoS One*, 10(8), e0137128.

Sanders CJ, Doherty PC, Thomas PG. Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. *Cell Tissue Res.* Jan 2011; 343(1):13-21.

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., y Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1813(5), 878-888.

Schmidt J. The influenza viruses and influenza. Kilbourne Ed (ed) Academic Press. New York-San Francisco-London 1975; 17:498

Scholtissek, C., Burger, H., Kistner, O., Shortridge, K.F., 1985. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* 147, 287-294.

Sethu, S., y Melendez, A. J. (2011). New developments on the TNF α -mediated signalling pathways. *Bioscience Reports*, 31(1), 63-76.

Sharon D, Chen R, Snyder M. Systems biology approaches to disease marker discovery. *Dis Markers.* 28(4):209-224. 2010.

Shek L P-C, Lee B-W. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics, *Paediatric Respiratory Reviews*, Volume 4, Issue 2, June 2003, Pages 105-111, ISSN 1526-0542,

Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* Jun 2002; 2(6):389-400.

Shinde, Vivek and Bridges, Carolyn B. and Uyeki, Timothy M. et al. Triple-Reassortant Swine Influenza A (H1) in Humans in the United States, 2005–2009. *N Engl J Med* 2009; 360:2616-2625 June 18, 2009

Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. (2006). Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature.* 2006 Mar 23;440(7083):435-6.

Shortridge KF. The next pandemic influenza virus? *Lancet* 1995; 346: 1210-12.

Shun-Shin M, Thompson M, Heneghan C, Perera R, Harnden A, Mant D. Neuraminidase inhibitors for treatment and prophylaxis of influenza in children: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2009;339:b3172.

Simonsen L., Fukuda K., Schonberger L. B. and Cox N. J. 'The impact of influenza epidemics on hospitalizations', *J Infect Dis*, 181 (2000), 831-7.

Singh N, Agrawal S, Rastogi AK. Infectious diseases and immunity: special reference to major histocompatibility complex. *Emerg Infect Dis*. Jan-Mar 1997; 3(1):41-49.

Skehel JJ, Bizebard T, Bullough PA, et al. Membrane fusion by influenza hemagglutinin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1995; 60:573-580.

Skoner DP, Gentile DA, Patel A, Doyle WJ. Evidence for cytokine mediation of disease expression in adults experimentally infected with influenza A virus. *J Infect Dis*. 1999;180:10-4.

Smith AE, Helenius A. How viruses enter animal cells. *Science*. Apr 9 2004; 304(5668):237-242.

Smith F., Palese P. (1989). Variation in influenza virus genes: epidemiological, pathogenic and evolutionary consequences. In *The Influenza Viruses*, pp. 319-350. Edited by R. M. Krug. New York: Plenum Press.

Stegmann T, Booy FP, Wilschut J. Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *J Biol Chem*. Dec 25 (1987a); 262(36):17744-17749.

Stegmann T, Morselt HW, Scholma J, Wilschut J. Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochim Biophys Acta*. Nov 2 (1987 b); 904(1):165-170.

Strauss, J., and E. Strauss. 2008. Minus-strand RNA viruses, 5 *Viruses and human disease*, Second ed, vol. 4. Elsevier, Oxford, UK, p. 137-17

Suárez DL, Perdue ML, Cox N, Rowe T, Bender C, Huang J, Swayne DE. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J Virol* 1998; 72: 6678-88.

Suzuki C, et al. (2000) Lethal effect of the expression of a killer gene SMK1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Eng* 13(2):73-6.

Tamura S, Kurata T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn J Infect Dis*. Dec 2004; 57(6):236-247.

Tanaka, T., y Kishimoto, T. (2014). The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunology Research*, 2(4), 288-294.

Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., y Shaw, S. (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature*, 361(6407), 79-82.

Thacker E. and Janke B. Swine Influenza Virus: Zoonotic Potential and Vaccination Strategies for the Control of Avian and Swine Influenzas *J Infect Dis.* (2008) 197 (Supplement 1): S19-S24

Thacker, S. B. (1986). The persistence of influenza A in human populations. *Epidemiologic Reviews* 8, pp. 129–142. Thompson, W. W., et al. (2009). Estimates of US influenza-associated deaths made using four different methods. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 3 (1), pp. 37–49.

Thickett, D. R., y Perkins, G. D. (2008). IL1 may be elevated but is it all bad in ARDS? *Thorax*, 63(8), 750-751; author reply 751.

Tiwari, N., Kapoor, P., y Dhole, T. N. (2014). Antibody and inflammatory response-mediated severity of pandemic 2009 (pH1N1) influenza virus. *Journal of Medical Virology*, 86(6), 1034-1040.

To, K. K. W., Hung, I. F. N., Li, I. W. S., Lee, K.-L., Koo, C.-K., Yan, W.-W. et al.(2010). Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(6), 850-859.

Treanor J J. Influenza virus. En: Mandell G L, Bennett J E, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Sixth edition, Elsevier, 2005, p. 2061-85.

Treanor JJ, Campbell JD, Brady RC, Keitel Wa, Drame M, Jain VK, Innis BL. Rapid licensure of a new, inactivated influenza vaccine in the United States. *Hum Vaccin* 2005; 1:239-44.

Vahlenkamp TW, Tompkins MB, Tompkins WA. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol.* Oct 18 2005; 108(1-2):219-225.

Vaillant L, La Ruche G, Tarantola A, Barboza P. Epidemiology of fatal cases associated with pandemic H1N1 influenza 2009. *Euro Surveill.* 2009;14.

Valdez Aguilar R. Pandemia de gripe. *Elementos* 2002; 47:37-43.

Viasus D, Pano-Pardo JR, Pachon J, et al. Factors associated with severe disease in hospitalized adults with pandemic (H1N1) 2009 in Spain. *Clin Microbiol Infect.* May (2011a); 17(5):738-746.

Viasus, D., Paño-Pardo, J. R., Cordero, E., Campins, A., López-Medrano, F., Villoslada, A. et al. Novel Influenza A (H1N1) Study Group, Spanish Network for Research in Infectious Diseases. (2011). Effect of immunomodulatory therapies in patients with pandemic influenza A (H1N1) 2009 complicated by pneumonia. *The Journal of Infection*, 62(3), 193-199.

Viboud C, Alonso WJ, Simonsen L (2006) Influenza in Tropical Regions. *PLoS Med* 3(4): e89.

- Voeten JTM, Brands R, Palache AM, van Scharrenburg GJM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, et al.** Characterization of high-growth reassortant influenza A viruses generated in MDCK cells cultured in serum-free medium. *Vaccine* 1999;17:1942–50
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., y Scheurich, P.** (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation*, 10(1), 45-65.
- Weber, A., Wasiliew, P., y Kracht, M.** (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science Signaling*, 3(105), cm1.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al.** Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56: 152-79.
- Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC.** Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*. Jun 2 1988;333(6172):426-431.
- White, D.O. and F.J. Fenner,** 1994. *Medical Virology*. 4th Edn., Academic Press Inc., San Diego.
- Williams, A. E., y Chambers, R. C.** (2014). The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 306(3), L217-230.
- Wilschut J.** *La gripe*. Mosby, Elsevier. 2005.
- Wong SY, Yuen K.** Avian Influenza Virus Infections In Humans. *Chest*. 2006;129(1):156-168.
- Wright, P.F. and Webster, R.G.** Orthomyxoviruses. In *Fields Virology*, D.M. Knipe, et al., eds. (Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkens) 2001; pp. 1533-1580.
- Wu, Z., Hao, R., Li, P., Zhang, X., Liu, N., Qiu, S., et al.** (2013). MicroRNA expression profile of mouse lung infected with 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *PloS One*, 8(9), e74190.
- Wyde PR, Wilson MR, Cate TR.** Interferon production by leukocytes infiltrating the lungs of mice during primary influenza virus infection. *Infect Immun*. Dec 1982; 38(3):1249-1255.
- Yamada, S. et al.** 2006. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444, 378-382
- Yan Q.** 2012. Immunoinformatics and systems biology methods for personalized medicine. *Methods Mol Biol*.662:203-220.
- Yang XX, Du N, Zhou JF, et al.** Gene expression profiles comparison between 2009 pandemic and seasonal H1N1 influenza viruses in A549 cells. *Biomed Environ Sci*. Aug; 23(4):259-266. 2010.
- Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, Tsang DNC, Que TL, Shortridge KF, Cheung WKTo, Ho ETF, Sung R, Cheng AFB, and members of the H5N1 study group.** Clinical features and

rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998; 351: 467-71.

Zhang H, Su YA, Hu P, et al. Signature patterns revealed by microarray analyses of mice infected with influenza virus A and *Streptococcus pneumoniae*. *Microbes Infect.* Jul 2006; 8(8):2172-2185.

Zhang Y, Li J, Zhan Y, Wu L, Yu X, Zhang W, et al. Analysis of serum cytokines in patients with severe acute respiratory syndrome. *Infect Immun.* 2004 Aug;72:4410-5.

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;44:562-70.