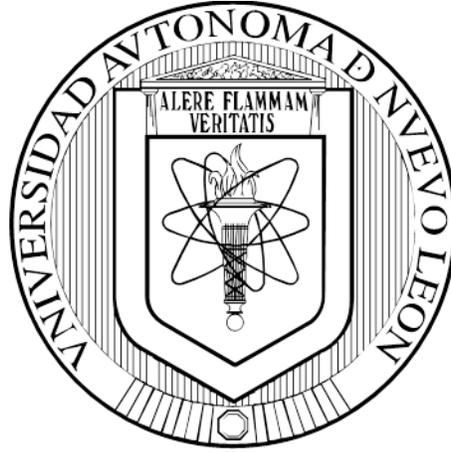


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**Identificación de subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T
en pulmones de pacientes fallecidos por influenza A H1N1**

PRESENTA

MVZ. HEIDI GISELLE RODRÍGUEZ RAMÍREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA**

JULIO 2014

Identificación de subpoblaciones de Macrófagos y Linfocitos T en pulmones de pacientes fallecidos por Influenza A H1N1

Presentado por: Heidi Giselle Rodríguez Ramírez

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Adrián Geovanni Rosas Taraco y la co-dirección del Dr. Mario César Salinas Carmona, con el apoyo de CONACYT SS/IMSS/ISSSTE 2009 126595) y PAICYT .

Dedicatoria

A todos mis colegas y futuros colegas.

Agradecimientos

Al Dr. Adrián G. Rosas Taraco por aceptarme como su alumna, por enseñarme pacientemente y exigirme de mí misma en medida que él es capaz de dar.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona por abrirme las puertas de su departamento y darme la oportunidad de desarrollarme en éste.

A los miembros de la comisión de tesis, la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, la Dra. Luz Isabel Pérez Rivera y la Dra. Gloria González González por su escrutinio de este trabajo, su apoyo y sus valiosas aportaciones.

A los profesores del Departamento de Inmunología por compartir su conocimiento conmigo.

A la Dra. Oralia Barboza Quintana, el Dr. Luis Ángel Ceceñas Falcón, el Dr. Américo Melo de la Garza y la técnica Hilda por su importante colaboración en este proyecto. Sin ustedes no habría sido posible.

A CONACyT por la beca de manutención 251547 y el apoyo financiero al proyecto con la clave No. 126595, así como a al PAICyT por el apoyo financiero SA319-10 y SA667-11.

A los alumnos de posgrado que llegaron antes de mí: Francisco, Irene, Pili. De observarlos también pude aprender. A los nuevos alumnos de posgrado, Flora y Armando, por su compañía y empatía.

A los químicos Alan Martínez, Azalia Martínez, José Ramírez, Diana Domínguez, M.C.P. Alberto Rodríguez, M.C. Ivonne Vázquez y M.C. Martha Rodríguez por su ayuda, compañía, amistad y sobretodo mucha paciencia para enseñarle a este M.V.Z. en un ambiente completamente desconocido.

Al M.V.Z. Javier Valdés por estar siempre pendiente de mí y de ayudarme a mantener el optimismo a pesar de que no estamos cerca. Al M.C. Pablo Villarreal por todos sus consejos y sus historias personales que me ayudaron a sobrevivir.

A la Dra. Diana Díaz y la bióloga Ale Navarro por ofrecerme su amistad en momentos difíciles para mí.

A los estudiantes de servicio social, becarios y pre-becarios: Mariana, Karla, Lucero, Marisol, Atilano, Zabala, Humberto, Chuy, Mine, Oscar, Mara. Muy particularmente a Andrea Mata porque me aguantó en el laboratorio y me aguanta fuera de él.

A mi familia por su apoyo incondicional y por su amor. A mi **mamá** y a **Melany** por ayudarme a cuidar de Alejandra y mantenerme al tanto del mundo fuera del laboratorio. A mi **papá** por su amor y su preocupación por mí.

A mi marido **Israel Martínez** y a mi hija **Ale** por apoyarme en medida de sus posibilidades y amarme a pesar de todo y a pesar de mí.

Contenido

	Página
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Propiedades del virus	1
1.1.1 Genoma y estructura	1
1.1.2 Clasificación y nomenclatura	1
1.1.3 Ciclo de replicación	3
1.1.4 Rango de hospederos	4
1.1.5 Tropismo tisular	4
1.2 Epidemiología, manifestaciones clínicas e importancia histórica del virus de la influenza A	5
1.2.1 Epidemiología	5
1.2.2 Características clínicas	6
1.2.3 Importancia histórica del virus de la influenza	7
1.2.4 Influenza A H1N1 pandémico de 2009	8
1.3 Respuesta inmune contra el virus de la influenza	9
1.3.1 Respuesta inmune innata contra el virus de la influenza A	9
1.3.2 Macrófagos	12
1.3.3 Macrófagos alveolares	13
1.3.4 Respuesta inmune adquirida contra el virus de la influenza A	14
1.3.5 Linfocitos T cooperadores	15

1.3.6 Linfocitos T citotóxicos	17
1.3.7 Distrés respiratorio agudo	18
Capítulo 2. Justificación	19
Capítulo 3. Hipótesis	20
Capítulo 4. Objetivo	21
Capítulo 5. Material y métodos	22
5.1 Obtención de las muestras	22
5.2 Recuperación de RNA de tejido embebido en parafina	23
5.3 Identificación y cuantificación de la carga viral en muestras de pulmón	24
5.4 Determinación del daño pulmonar	24
5.5 Determinación de las subpoblaciones celulares	25
5.5.1 Recuperación de células para citometría de flujo	25
5.5.2 Inmunofenotipificación	26
5.5.3 Inmunohistoquímica	28
5.6 Determinación de citocinas	29
5.6.1 Expresión génica de citocinas	29
5.6.2 PCR array	30
5.6.3 Detección de la producción de citocinas mediante la técnica de Inmunohistoquímica	31
5.6.4 Recuperación de proteínas del tejido embebido en parafina	32
5.6.5 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	33

5.6.6 Determinación de la concentración de citocinas	34
5.7 Análisis estadísticos	34
Capítulo 6. Resultados	35
6.1 Obtención y clasificación de las muestras	35
6.1.1 Cuantificación de la carga viral	35
6.1.2 Características clínicas y demográficas de los pacientes con neumonía	36
6.1.3 Determinación del daño tisular	37
6.2 Identificación de poblaciones celulares en los diferentes grupos de estudio	37
6.2.1 Citometría de flujo	37
6.2.2 Determinación in situ de poblaciones celulares	44
6.3 Citocinas	50
6.3.1 Expresión génica	50
6.3.2 Elevada presencia de citocinas inflamatorias en pulmón de los diferentes grupos de estudio	53
6.3.3 Concentración de citocinas relacionadas con las subpoblaciones celulares	59
6.3.4 Expresión génica diferencial por PCR arrays	60
Capítulo 7. Discusión	64
7.1 Recuperación de RNA de tejido embebido en parafina y detección del virus de la influenza A	64
7.2 Características de los pacientes	65
7.3 Poblaciones celulares presentes en pulmón de	

pacientes con neumonías	67
7.4 Niveles de citocinas	70
Capítulo 8. Conclusiones	75
Capítulo 9. Perspectivas	76
Referencias	77
Resumen curricular	90

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Imágenes representativas de hallazgos microscópicos en secciones de pulmón sin infección.	23
Figura 2. Curva estándar empleada para determinar la carga viral de influenza A utilizando la expresión del gen M1 del virus.	35
Figura 3. Curva estándar empleada para determinar la carga viral de influenza A utilizando la expresión del gen N1 del virus	36
Figura 4. Evidencia de daño tisular en los grupos de influenza A (H1N1)pdm09 y estacional	38
Figura 5. Identificación de poblaciones de macrófagos de tipo M1 y de tipo M2.	41
Figura 6. Identificación de poblaciones de linfocitos de tipo Th1, Th2, Th17, Tc1 y Tc17.	42
Figura 7. Identificación de poblaciones de linfocitos de tipo T regulatorios.	43

Figura 8. Células positivas para CD14 están elevadas en todos los grupos de neumonías.	45
Figura 9. El porcentaje de células positivas para CD206 diferencia entre neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09 y A estacional.	46
Figura 10. Las células positivas para CD4 estuvieron elevadas en los casos de neumonías por influenza y coccidioidomicosis.	47
Figura 11. Las células positivas para Foxp3 se encontraron elevadas solo para el grupo de coccidioidomicosis y neumonías bacterianas.	48
Figura 12. CD8 se encontró sin diferencias entre los grupos de estudio, excepto para las neumonías bacterianas, donde se encontró disminuido.	49
Figura 13. Expresión génica relativa de las citocinas relacionadas con las diferentes subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T.	51
Figura 14. Expresión génica relativa de las citocinas relacionadas con las diferentes subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T.	52
Figura 15. IL-4 se encontró aumentada para todos los grupos de neumonías, excepto la de tipo bacteriano.	54
Figura 16. No se encontró diferencia significativa en las cuentas de células positivas para IL-10 entre los diferentes grupos de estudios	

comparados con el control sin infección.	55
Figura 17. IL-17 se encontró aumentada para ambos grupos de influenza A y el grupo de neumonías de origen bacteriano.	56
Figura 18. IFN γ se encontró aumentado en todos los grupos de estudio.	57
Figura 19. TNF α se encontró aumentado solo para los grupos de influenza A.	58
Figura 20. Concentración de citocinas en tejido pulmonar de casos fatales de neumonías.	60
Figura 21. Regulación de la expresión de genes de la respuesta inmune innata y adquirida para el virus de la influenza A H1N1 (pdm)09.	61
Figura 22. Genes regulados negativamente en el grupo de influenza A estacional.	62
Figura 23. Genes sobre-expresados en el grupo de influenza A estacional.	63

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Segmentos y productos codificados por el genoma del virus	2
Tabla 2. Criterios evaluados para determinar el daño tisular.	25
Tabla 3. Anticuerpos empleados para citometría de flujo.	27
Tabla 4. Listado de anticuerpos empleados en inmunohistoquímica para la determinación de las poblaciones celulares	29
Tabla 5. Listado de primers y sondas	30
Tabla 6. Listado de anticuerpos empleados en inmunohistoquímica para la determinación de la producción de citocinas y mediadores inmunológicos.	32
Tabla 7. Volumen y concentraciones empleados para preparar los estándares de la curva.	33
Tabla 8. Características demográficas de los pacientes con neumonía.	37
Tabla 9. Evaluación del daño tisular	39

M.V.Z. Heidi G. Rodríguez Ramírez

Fecha de Titulación Julio 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Trabajo: Identificación de subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T en pulmones de pacientes fallecidos por influenza A H1N1.

Número de páginas:

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Inmunología

Área de Estudio: Inmunología

Resumen

La infección por el virus de la influenza es un problema de salud pública por su rápida diseminación y alta morbilidad. Los casos graves de infección por éste virus presentan hipercitocinemia, la cual se ha asociado a una respuesta inmune adquirida desfavorable y un mal pronóstico para el paciente. Se han realizado hasta ahora experimentos en suero de pacientes o en tejido pulmonar en modelos de animales, sin embargo, no se tienen reportes del microambiente en el pulmón de pacientes fallecidos por el virus de la influenza. **Objetivo:** Determinar las subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T y su correlación con el daño tisular en pulmón de pacientes fallecidos por influenza A H1N1 y otras enfermedades respiratorias. **Material y Métodos:** Se identificó y cuantificó el virus de influenza A H1N1 (pdm)09 e influenza A estacional por qRT-PCR, así como se determinó los niveles de citocinas y marcadores de macrófagos por qRT-PCR (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23, IFN- γ , TGF β , TNF α , Arg1, Retnlb e iNOS). Se realizaron tinciones de HyE para la determinación del daño tisular. Por otra parte, se realizaron tinciones de inmunohistoquímica para analizar las poblaciones celulares CD14+, CD206+, CD4+, CD8+, FOXP3+ y citocinas (IL-4, IL-10, IL-17 e IFN- γ) *in situ*. **Resultados:** Se determinó la presencia del virus de la influenza A en 10 muestras, de las cuales 4 fueron H1N1 (pdm)09. Además, se obtuvieron 5 muestras de neumonía por *Coccidioides spp.*, y 6 de neumonías de origen bacteriano. No existe diferencia en el daño causado por el virus de la influenza A H1N1 (pdm)09 e influenza A estacional a nivel histopatológico. Las células CD14+ y CD4+ se encontraron aumentadas para todos los grupos de neumonías sin importar el agente etiológico, excepto CD4 para las neumonías bacterianas. Las células que expresaron Foxp3 solo se encontraron aumentadas en el grupo de coccidioidomicosis y neumonías bacterianas. No se encontró diferencia significativa entre los grupos de estudio para las células CD8+, excepto para las neumonías bacterianas. La expresión génica relativa de IL-6 se encontró aumentada 3000 veces la expresión génica en el grupo de influenza pandémica A H1N1 (pdm)09, mientras en influenza estacional se encontró una disminución de 0.08 veces de su expresión. INOS se encontró con expresión disminuida 0.5 veces para los grupos de influenza pandémica, influenza estacional y coccidioidomicosis. La expresión génica de IL-10 se encontró solamente para el grupo de influenza A H1N1 (pdm)09 ($P=0.01$). Resistin Like Beta se encontró con expresión disminuida solo para el grupo de influenza A H1N1 (pdm)09. Existe un aumento de células positivas para IL4 en todos los grupos, excepto neumonías bacterianas. No se encontró diferencia significativa de células positivas para IL-10 en los grupos de estudio. Existe un aumento de células positivas para IL-17 en influenza A H1N1p/2009, influenza A y neumonías bacterianas. IFN γ se encontró aumentado en los grupos de neumonía comparados con el control. **Conclusiones:** Ambos grupos de neumonías por influenza A se caracterizan por daño tisular y un exacerbado ambiente inflamatorio; solamente CD206 es capaz de diferenciar entre influenza A H1N1(pdm)09 e influenza estacional.

Dr. C. Adrián G. Rosas Taraco
Director de Tesis

Listado de abreviaturas

(pdm)09	Pandémico de 2009
µg	microgramo
µL	microlitro
ARDS	Síndrome de distrés respiratorio agudo
ASB	Albúmina sérica bovina
C.	Coccidioides
CA	California
CCR	Receptor de quimiocina con motivo CC
CD	Cluster de diferenciación
cDNA	DNA complementario
<i>csf2</i>	Factor estimulador de colonia 2
<i>cxcr3</i>	Receptor de quimiocina con motivo CXC tipo 3
Cq.	Ciclo umbral
DAB	Diaminobenzidina
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EEUU	Estados unidos de América
FAM	5-carboxifluoresceína
<i>faslg</i>	Fas ligando
FMVZ	Facultad de medicina veterinaria y zootecnia
Foxp3	Forkhead box P3
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
<i>gata3</i>	Proteína de unión GATA3

H ₂ O	Agua
HA	Hemaglutinina
HA1	Subunidad 1 de la hemaglutinina
HA2	Subunidad 2 de la hemaglutinina
HLA-E	Antígeno leucocitario humano tipo E
HyE	Tinción de hematoxilina y eosina
IFN γ	Interferón gamma
<i>ifnar1</i>	Receptor de Interferón alfa 1
<i>ifngr1</i>	Receptor de Interferón gamma 1
IHC	Inmunohistoquímica
IKK	I κ B quinasa
IL	Interleucina
IL-17RA	Receptor para IL-17
<i>il1r1</i>	Receptor 1 de Interleucina 1
IMF	Intensidad media de fluorescencia
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IRAK	Quinasa asociada a receptor de IL-1
<i>irak1</i>	Quinasa asociada a receptor de IL-1 tipo 1
<i>irf7</i>	Factor regulador de Interferón 7
IRN	Intermediarios reactivos de nitrógeno
IRO	Intermediarios reactivos de oxígeno
LYZ	Lisozima
M	Molar
M ϕ	Macrófago
M ϕ 1	Macrófago activado clásicamente o de tipo 1
M ϕ 2	Macrófago activado alternativamente o de tipo 2

M1	Proteína de matriz tipo 1
M2	Proteína de canal iónico
MAPK1	Proteína quinasa activada por mitógenos 1
<i>mb12</i>	Lectina de unión a manosa tipo 2
MD	Maryland
<i>mda5</i>	Proteína asociada a diferenciación de melanoma 5
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Mm	Milimolar
<i>mpo</i>	Mieloperoxidasa
mRNA	RNA mensajero
<i>myd88</i>	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF- κ B	Factor nuclear κ B
ng	Nanogramo
NK	Célula asesina natural
NOD	Dominio de oligomerización de nucleótidos
<i>nos2</i>	Sintasa de óxido nítrico inducible (gen)
NP	Nucleoproteína
<i>nrlp3</i>	NLR family, pyrin domain containing 3
NS	Proteína no estructural
No.	Número
NY	Nueva York
OMS	Organización mundial de la salud
OK	Oklahoma
<i>P</i>	Valor p
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Polimorfo nuclear
PRR	Receptor de reconocimiento de PAMP
qRT-PCR	Retrotranscripción cuantitativa
<i>rag1</i>	Gen activador de la recombinación 1
<i>retnlb</i>	Resistina-like beta
RIG-1	Gen inducible de ácido retinoico 1
RLR	Receptores tipo RIG
RNA	Ácido ribonucleico
<i>rorc</i>	Receptor huérfano C relacionado a RAR
ROX	5-carboxi-X-rodamina, succinimidil éster
rpm	Revoluciones por minuto
SCL11A1	Solute carrier family 11, member 1
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SSA	Secretaría de Salud
<i>ssp.</i>	Especies
STAT	Transductor de señal y activado de la transcripción
<i>t-bet</i>	T-box expresado en células T
<i>tbx1</i>	T-box 1
Tc	Linfocito T citotóxico
Tc1	1 Linfocito T citotóxico tipo 1
Tc17	Linfocito T citotóxico tipo 17
TGFβ	Factor de crecimiento transformador beta
Th	Linfocito T cooperador
Th1	Linfocito T cooperador de tipo 1

Th2	Linfocito T cooperador de tipo 2
Th17	Linfocito T cooperador de tipo 17
TLR	Receptor tipo Toll (Toll like receptor)
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocito T regulatorio
<i>trif</i>	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
Tx.	Texas
UK	Reino Unido
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Propiedades del virus de la influenza

1.1.1 Genoma y estructura

Los virus de la influenza pertenecen a la familia Orthomixoviridae, los cuales son un grupo de virus con envoltura lipídica. Poseen un genoma de cadena sencilla de tipo RNA que contiene 8 segmentos separados, los cuales poseen un sentido negativo; estos segmentos en total codifican para 11 proteínas (1,2). Los ocho segmentos del genoma incluyen tres segmentos que forman la polimerasa (PB1, PB2 and PA), dos segmentos para las glicoproteínas de superficie que son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), el segmento de la nucleoproteína (NP), el de la proteína de matriz (M), y el segmento de la proteína no estructural (NS) (Tabla 1). El virus forma partículas esféricas de 80 a 120 nm de diámetro, aunque también es capaz de formar partículas filamentosas (3–5).

1.1.2 Clasificación y nomenclatura

Los diferentes tipos de virus de la influenza poseen diferencias antigénicas entre su nucleoproteína y la proteína de matriz 1, lo cual da lugar a la clasificación en los tipos A, B y C. De estos, solo los de tipo A y B son de importancia clínica para el hombre y los animales domésticos, a su vez solo los de tipo A representan un riesgo de infección zoonótica y tienen el potencial de producir una pandemia (6–8). Por otra parte, basándose en la antigenicidad de las glicoproteínas de la superficie

de los virus estos se pueden clasificar en base a la combinación de los subtipos de HA (H1-H17) y NA (N1-N9) que presentan (8–10).

Existe un sistema estándar para la nomenclatura de los virus de la influenza donde se incluye la siguiente información en el mismo orden que se presenta: tipo, hospedero, origen geográfico, número de cepa y año de aislamiento. La descripción antigénica de la HA y NA se debe proporcionar entre paréntesis solo para el tipo A. Cuando el hospedero de origen es un humano, no se especifica la especie de donde proviene (11,12), por ejemplo: A/Hong Kong/03/1968 (H3N2).

Tabla 1. Segmentos y productos codificados por el genoma del virus

Segmento	Tamaño en nucleótidos	Producto codificado	Función
1	2341	Proteína básica de la polimerasa 2 (PB2)	Componente del complejo de la RNA transcriptasa
2	2341	Proteína básica de la polimerasa 1 (PB1)	Componente del complejo de la RNA transcriptasa
3	22331	Proteína ácida de la polimerasa (PA)	Componente del complejo de la RNA transcriptasa
		PB1-F2	Relacionada con la inducción de apoptosis
4	1778	Hemaglutinina (HA)	Glicoproteína de superficie que se une al receptor en la superficie celular. Tiene una función de fusión de la envoltura bajo un pH ácido.
5	1565	Nucleoproteína (NP)	Relacionado con el complejo RNP
6	1413	Neuraminidasa (NA)	Glicoproteína de superficie. Tiene como función evitar que los nuevos viriones al salir no se unan al ácido siálico de la membrana celular.
7	1027	Proteína de matriz (M1)	Es el principal componente del virión.
		Proteína de canal iónico (M2)	Permite la entrada de protones dentro de la partícula viral.
8	890	Proteína no estructural (NS)	Evita la unión de mRNA precursor. Inhibe activación de Interferón.
		Proteína de exportación nuclear	Tiene un papel en la exportación del complejo RNP viral.

Adaptado de Lamb, 2010 (13).

1.1.3 Ciclo de Replicación

La infección por el virus inicia al unirse éste a través de la hemaglutinina al ácido siálico en la superficie de las células del epitelio respiratorio, después el virus es internalizado en la célula por vía endocitosis. La partícula viral es transportada por una vía mediada por clatrina, de modo que pasa por las diferentes fases de endosoma temprano hasta endosoma tardío, en este último existe un ambiente más ácido. Una vez que el virus se encuentra dentro del endosoma la proteína M2 funciona como un canal de iones para permitir la entrada de protones al interior de la partícula viral; el pH ácido da lugar al cambio conformacional de la HA, la cual se divide en sus subunidades HA1 y HA2, siendo HA2 la responsable de la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma, esto produce el desnudamiento parcial del virus, conservando aún su nucleocápside; ésta penetrará el núcleo celular, donde el RNA de cadena negativa sirve como plantilla para la RNA polimerasa y produce RNA de cadena positiva, a su vez esta última funciona como un mRNA que será traducido a las proteínas necesarias para ensamblar nuevos viriones y como plantilla para la producción de nuevo RNA viral. Una vez ensamblados los nuevos viriones, éstos se liberan hacia el exterior por gemación, adquiriendo así su envoltura y la capacidad de infectar otras células.

1.1.4 Rango de hospederos

El virus de la influenza A se ha aislado de una enorme variedad de animales de sangre caliente, entre ellos cerdos, aves, caballos, perros, gatos, focas, ballenas, entre otros (14). En la naturaleza el virus de la influenza A tiene como principal reservorio a las aves acuáticas migratorias; estas aves pueden mantenerse con una infección asintomática y portar al virus tanto en el tracto digestivo, así como en las vías respiratorias (6). Durante la época de migración, las aves portadoras pueden llevar el virus hasta las granjas de explotación pecuaria y transmitir el virus a los animales de abasto o a diferentes animales de sangre caliente a través de sus excretas. La infección de las aves y cerdos domésticos de corral para consumo humano es la principal forma de transmisión de virus altamente patógenos hacia el ser humano mediante el contacto con los aerosoles provenientes de los animales infectados. Por otra parte, la infección de cerdos con el virus de la influenza A tiene una especial importancia para la generación de nuevos virus emergentes que afectan al humano, ya que tanto los virus aviares como aquellos de origen humano poseen tropismo por las células del epitelio del tracto respiratorio del cerdo (9,15), lo cual lo convierte en potencial receptor y es en esa especie donde se favorece la recombinación de cepas virales capaces de generar virus altamente patógenos con la capacidad de replicarse eficientemente en el humano(16,17).

1.1.5 Tropismo tisular

La hemaglutinina reconoce residuos de ácido siálico unido a oligosacáridos, esta proteína puede reconocer entre dos tipos de ácido siálico: 1) aquel unido a

galactosa por un enlace α 2,3; y 2) aquel unido a la galactosa por un enlace α 2,6. Las diferentes cepas del virus tienen predisposición por la unión a enlaces de tipo α 2,3 o α 2,6, esto determina la especificidad del hospedero. El ácido siálico con enlaces de tipo α 2,6 se expresa principalmente en el epitelio respiratorio de seres humanos, mientras el tipo α 2,3 es expresado en el intestino de las aves. En el caso de los cerdos, el epitelio de la tráquea expresa ambos tipos de receptores (6), lo cual lo convierte en un hospedero de especial importancia para la formación de nuevos virus pandémicos.

1.2 Epidemiología, manifestaciones clínicas e importancia histórica del virus de la influenza A

1.2.1 Epidemiología

La influenza es una enfermedad de importancia mundial con altos índices de morbi-mortalidad, afecta principalmente a niños y ancianos. Reportes han descrito condiciones de riesgo a la infección tales como cardiopatías crónicas, inmunodeficiencias o desordenes metabólicos tales como la diabetes (18). Cada año, alrededor del mundo se presentan entre 3 a 5 millones de casos graves que requieren hospitalización y entre 250 y 500 mil decesos a causa del virus (18). El virus se dispersa principalmente a través de aerosoles producidos al toser, estornudar y al hablar (19,20).

Existen dos formas de la presentación de los casos de esta enfermedad, una es como enfermedad estacional, cuyo mayor número de casos se encuentran en los

meses de noviembre a marzo en el hemisferio norte y de abril a septiembre en el hemisferio sur, para los países de climas templados, por otra parte en los países de climas tropicales se espera que los casos se presenten durante todo el año (6). Es posible encontrar también brotes pandémicos, los cuales ocurren cuando un nuevo virus aparece entre la población y la mayoría de ella carece de inmunidad contra este nuevo virus (21); durante estos periodos se espera encontrar una mayor morbi-mortalidad comparada con los casos de influenza estacional. Una pandemia se definen por la presencia de casos de infección por el nuevo virus en al menos dos países en una misma región de la OMS y un país de otra región (22).

1.2.2 Características clínicas.

Los pacientes infectados con el virus de la influenza pueden cursar con una infección asintomática, o con una infección sintomática después de un periodo de incubación de 1 a 4 días caracterizada principalmente por tos, fiebre, disnea, dolor de garganta, rinorrea, cefalea y mialgia (23–26), entre otros. En el caso de los pacientes con infección por el virus de la influenza, estos pueden presentar algunos factores de riesgo asociados con la gravedad de la infección como el tabaquismo, la diabetes, el sobrepeso y el embarazo (26–29). Esos factores predisponen a los pacientes a desarrollar una condición conocida como **síndrome de distrés respiratorio agudo**, un proceso inflamatorio localizado en el pulmón caracterizado por colapso alveolar e hipoxemia (30,31), esta situación es un indicador de mal pronóstico para el paciente. El estado inmunológico y la cepa del

virus infectante son importantes factores para determinar si un paciente pasará de un estado asintomático a grave.

1.2.3 Importancia histórica del virus de la influenza

Durante el siglo XX se suscitaron tres grandes pandemias a causa de infección por el virus de la influenza A. La primera tuvo inicio en marzo de 1918, la cual es conocida como la “Influenza española”, esta se asoció a una anormalmente elevada mortalidad en la población de adultos jóvenes sanos. Durante esta pandemia el agente causal fue un virus de tipo A H1N1(6). Las muertes a causa de esta pandemia se contabilizaron en al menos 50 millones alrededor del mundo(32,33).

La segunda pandemia tuvo lugar en febrero de 1957 con origen en el sur de China, en esta ocasión a causa de un virus de tipo A H2N2. Este virus se esparció por el continente asiático y en el mes de julio del mismo año se realizaron los primeros aislados del virus en Estados Unidos América (EEUU) y en el Reino Unido. Durante esta pandemia, el rango de edad donde se concentraron los casos fatales (>50%) se encontraban entre los 5 a 19 años de edad. A su término las muertes se contabilizaron en 69,800 solo en EEUU (6).

Por otra parte, en julio de 1968 un virus de tipo A H3N2 se distribuyó empezando por Hong Kong. La mayor mortalidad durante esta pandemia se encontraba en los pacientes de 10-14 años de edad. La mortalidad estimada a causa de este virus fue de 33 800, solo en EEUU. El descenso en la fatalidad de este virus se atribuye principalmente a que la población ya se encontraba inmunizada contra el antígeno

N2 de la oleada pasada (6,34); aunque esto no se encuentra confirmado para la pandemia de 1968, el fenómeno de reacción cruzada se ha documentado antes para otros virus de la influenza A (17,35).

1.2.4 Influenza A H1N1 pandémico de 2009

En abril del año 2009, la Secretaría de Salud (SSA) de México confirmó la aparición de un brote de infecciones respiratorias a causa de un nuevo virus influenza de tipo A H1N1 de origen porcino, cuyo mayor número de casos se situaron en los meses de septiembre y octubre del mismo año (36,37). En las cifras oficiales de la SSA se registró un total de 72,548 casos confirmados, de los cuales 1,316 fueron fatales, todos ellos hasta el 19 de julio de 2010, fecha en que se confirmó en México la transición a etapa post-pandémica. El mayor número de casos se encontraron en pacientes de 10 a 19 años de edad cuyo número fue de 20,464, de estos solo 74 fueron fatales lo que representa solo un 5.7% de mortalidad en el grupo. Por otra parte, en el grupo de pacientes de 30 a 39 años se presentaron un total de 7,967 casos y fue el grupo con mayor número de defunciones, 304 representando un 23% de mortalidad en el grupo (38). Del total de los pacientes fallecidos, el 60% presentaban antecedentes patológicos, principalmente diabetes mellitus (12.3%), obesidad (9%), hipertensión arterial (6.6%), insuficiencia renal (2.6%) y tabaquismo (1.4%), asma bronquial (1.2%) y EPOC (1%) (36). Según reportes estatales y a nivel nacional mencionan no se encontró diferencia en la distribución de los casos entre género (38).

En cuanto al ambiente internacional, el 17 de abril de 2009 la CDC había confirmado la existencia de dos casos de influenza A H1N1 de origen porcino en pacientes de EEUU (37). Rápidamente, el 25 de abril se declaró una emergencia de salud pública de carácter internacional por parte de la OMS, pasando a fase 4 dos días después, posteriormente el día 29 de abril se había alcanzado la fase 5. A principios del mes de mayo la OMS distribuyó 3 millones de tratamientos de medicamento antiviral a 72 países. Con 30,000 casos confirmados de influenza A H1N1 en 74 países, la fase 6 o pandémica fue declarada el 11 de junio. El pico mayor de actividad a nivel mundial de la influenza A H1N1 se alcanzó en el mes de octubre de 2009 (39). En agosto de 2010, la dirección general de la OMS declaró que la influenza H1N1 había pasado a un periodo post-pandémico (40). Alrededor del mundo las muertes a causa del virus pandémico se contabilizaron en al menos 16,455 (40).

1.3 Respuesta inmune contra el virus de la influenza A

1.3.1 Respuesta inmune innata contra influenza A

El virus de la influenza puede ser reconocido por las células del epitelio respiratorio, macrófagos y células dendríticas en primer instancia a través de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs por su siglas en inglés) (41,42), de éstos los más estudiados hasta ahora son los Receptores tipo Toll (TLR), Receptores tipo RIG-I (RLR), Receptores tipo NOD (NLR) y receptores de DNA citosólico (43). Los PRRs se encargan de reconocer estructuras moleculares

altamente conservados en los diferentes agentes patógenos, conocidos como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs); en el caso del virus de la influenza, el principal PAMP reconocido es el RNA que contiene grupos trifosfatos en su extremo 5' y en menor grado dsRNA (44).

Los TLRs son los PRRs más estudiados y comprenden una familia de 10 proteínas transmembranales (en el humano), de las cuales TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se expresan en compartimientos endocíticos y son capaces de reconocer ácidos nucleicos (43)(44). TLR3 y TLR7 tienen un papel importante en el reconocimiento de los PAMPs del virus de la influenza (45). La señalización a través de TLR está mediada por proteínas adaptadoras que contienen un dominio TIR, principalmente MyD88, solo para el caso de TLR3 esta es mediada por la proteína TRIF. La unión del TLR a su ligando activa el reclutamiento de moléculas adaptadoras y a su vez éstas se asocian a proteínas de la familia IRAK, las cuales tienen función de serin-treonin cinasas y son activadas por autofosforilación (46), éstas posteriormente fosforilan al complejo IKK y permiten la liberación de la subunidad NF- κ B; esta subunidad es un factor de transcripción regulador de la expresión de genes de citocinas proinflamatorias e interferones de tipo I (46)(47).

Por otra parte, la familia de receptores tipo RIG posee tres miembros: RIG-I, MDA5 y LGP2 (48). Estos tienen actividad de helicasa y reconocen RNA viral, tanto de doble cadena como de cadena sencilla unido a un grupo trifosfato en su extremo 5' (43)(48). De forma similar a los TLRs, los RLR dan inicio a la producción de interferones tipo I, así como a la activación de la subunidad NF- κ B,

su principal diferencia radica en que éstos se encuentran dispersos en el citosol. De los tres miembros de la familia de los RLR, RIG-I es el más estudiado en la respuesta inmune ante el virus de la influenza y ha demostrado tener un importante rol en el inicio de la respuesta antiviral (45)(49). El reconocimiento de PAMPs por parte de RIG-I da lugar a cambios conformacionales que exponen su dominio CARD, el cual interactúa con el dominio CARD de la proteína IPS-1. La proteína IPS-1 se encuentra en las mitocondrias así como en los peroxisomas y se encarga de activar la cinasa relacionada a IKK TBK1/IKKi, para dar lugar a la activación de IRF3/IRF7; esta última activa la transcripción de interferones de tipo I a través de TRAF3 (43).

Las vías para dar inicio a la respuesta inmune innata son complejas y existen muchas diferentes; una vez reconocido el virus da lugar a la producción de citocinas inflamatorias, tales como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α , MIP-1 e interferones de tipo I, algunas células serán reclutadas al lugar de la infección como neutrófilos (PMN), células asesinas naturales (NK), macrófagos y células dendríticas por acción de algunas de las citocinas anteriormente mencionadas (50). PMN y NK tienen un papel en la primera línea de defensa al producir mediadores que lisan a las células infectadas (51). Macrófagos y células dendríticas además de producir mediadores de la respuesta inmune, son células presentadoras de antígeno, sin embargo, solo las células dendríticas son capaces de migrar al ganglio linfático más cercano para llevar a cabo la presentación a células T y dar inicio a una respuesta específica contra el virus (52–54).

1.3.2 Macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas con diversas funciones, entre ellas el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs). Poseen en su superficie el marcador celular CD14. Se han descrito dos subpoblaciones principales de macrófagos: los activados clásicamente y los activados de modo alternativo. Los macrófagos activados clásicamente, llamados también M ϕ 1, se consideran pro-inflamatorios y se caracterizan por la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno (IRN) y oxígeno (IRO), además de la producción de citocinas pro-inflamatorias como son, IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF α (55,56) Estos macrófagos son potentes efectores en contra de múltiples patógenos y tumores, sin embargo, la acumulación de macrófagos y una prolongada producción de citocinas inflamatorias contribuye a la formación de daño tisular especialmente en pulmón (57), lo cual se ha reportado que ocurre en los casos graves de infección por virus de la influenza A. Por otro lado, los macrófagos activados alternativamente, llamados también M ϕ 2, se han asociados con la reparación tisular y respuesta en la matriz extracelular. De la subpoblación M ϕ 2 se han descrito al menos 3 subpoblaciones: los M ϕ 2a inducidos por IL-4/IL-13; los M ϕ 2b inducidos por complejos inmunes y agonistas de TLRs y/o receptores de IL-1; y los M ϕ 2c (inmunosupresores) inducidos por IL-10 y glucocorticoides (58)[1]. Otra importante función de los macrófagos es la activación de linfocitos T , mediante la presentación de antígenos y el tipo de respuesta dependerá del microambiente propiciado por las citocinas y demás mediadores inmunológico (42). Un estudio demostró el incremento de la capacidad

fagocítica y la producción de citocinas en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica infectados con el virus de la influenza A aumenta su producción de citocinas (59), sin embargo, ésta producción de citocinas no permite distinguir si éstos pertenecen a la población M ϕ 1 o M ϕ 2 (59).

1.3.3 Macrófagos alveolares

El pulmón es un órgano en constante contacto con el medio ambiente a través de la respiración, por tanto se ve continuamente recibiendo estímulos potenciales que desencadenen una respuesta inflamatoria y a pesar de ello se encuentra en un estado quiescente (41). Los macrófagos alveolares son la principal población de células fagocíticas en el pulmón en ausencia de infección, estos tienen un importante papel en mantener la homeostasis de este órgano y poseen una baja capacidad de producción de citocinas inflamatorias (60). Los macrófagos alveolares presentan un fenotipo principalmente regulatorio negativo de la inflamación debido a que producen IL-10 y TGF- β , suprimiendo tanto la respuesta inmune innata como adquirida, al menos de forma localizada (61). Por otra parte, el exceso de polarización a M ϕ 2 durante un proceso patológico en el pulmón puede favorecer el depósito de matriz extracelular y conducir a la pérdida de la estructura alveolar (62), esto se traduce en una disminución del área para intercambio gaseoso.

Existen reportes en que se ha observado que la depleción de los macrófagos alveolares conduce a procesos inflamatorios que no pueden ser controlados

(63,64), donde se reconoce que el principal mecanismo es la falta de regulación del proceso inflamatorio (65). Además de esto, diferentes grupos de investigadores han reportado la importancia de los macrófagos alveolares durante la respuesta al virus de la influenza A, ya que en modelos animales, el virus de la influenza induce la eliminación los macrófagos alveolares (66) y por otra parte, la reconstitución de la población de macrófagos alveolares, en ratones, les permite resistir a la infección por el virus de la influenza A y controlar el proceso inflamatorio (64), comparados con aquellos que carecen de esta población.

1.3.4 Respuesta inmune adquirida contra influenza A

Las células presentadoras de antígeno tienen como función principal el procesamiento de antígenos para después llevar a cabo la activación antígeno-específica de la respuesta inmune adquirida mediante la presentación del antígeno en el contexto de MHC I o MHC II (67). Estas células pueden adquirir el virus de dos formas diferentes, una al ser propiamente infectadas por el virus, la segunda es por endocitosis de material proveniente de una célula infectada. Se acepta que las células capaces de presentar antígeno a linfocitos T son los macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, sin embargo solo las células dendríticas (DC) son capaces de migrar hasta el ganglio linfático. Después del reconocimiento del virus de la influenza, las células dendríticas aumentan su expresión de moléculas del MHC, así como moléculas coestimuladoras, tales como CD80 y CD86 (41), las cuales permiten la interacción con linfocitos T, además de estas moléculas, la DC aumenta también su expresión de CCR7, lo cual permite su migración hacia el ganglio linfático (53,68).

Los linfocitos T son células que tienen un papel importante en la respuesta inmune adquirida de tipo celular contra el virus de la influenza, estos tienen en común la presencia del antígeno CD3, y a su vez se dividen en linfocitos T CD4+ o cooperadores (Th) y linfocitos T CD8+ o citotóxicos (Tc). Los primeros son activados en el contexto del MHC II (69) y su función consiste en orquestar la respuesta inmune mediante la producción de citocinas, por otra parte, el segundo grupo es activado en el contexto de MHC I y su papel principal consiste en la eliminación de células infectadas por el virus (67).

1.3.5 Linfocitos T cooperadores

Esta población de linfocitos tiene un importante papel al regular diferentes procesos mediante la producción de citocinas, entre ellos, la función y polarización de los macrófagos, mantienen la respuesta de linfocitos T citotóxicos y colaboran en la estimulación de los linfocitos B para que logren llevar a cabo la producción de anticuerpos, incluso son mediadores de la memoria inmunológica (70). Existen diferentes subpoblaciones de linfocitos T cooperadores, cada una de ellas tiene una producción de citocinas en particular, lo cual las caracteriza. A continuación se describen las principales subpoblaciones.

Los linfocitos Th1 se caracterizan por su importante producción de IFN γ , así como de TNF α e IL-12 (71). La polarización a Th1 se encuentra controlada por el factor de transcripción T-bet, el cual pertenece a la familia T box (70,71). TNF α e IL-12 son citocinas inflamatorias que favorecen la respuesta de tipo celular. Por otra

parte, los interferones tienen una potente actividad antiviral, activando una cascada de señalización involucrada en la producción de proteínas anti-virales (44,72). En un modelo animal con trasfondo genético que favorece la producción de IFN γ y TNF α se observó una mejor supervivencia de los animales cuando fueron retados contra el virus de la influenza A, comparados con aquellos sobreproductores de IL-6 (73).

Los linfocitos Th2 son productores de IL-4, IL-5 e IL-13 (74); estas citocinas colaboran en la producción de una respuesta inmune de tipo humoral contra antígenos (74). Un mecanismo importante durante la respuesta antiviral es la producción de anticuerpos neutralizantes. En pacientes con infección grave ocasionada por el virus de la influenza A H1N1(pdm)09 tuvieron una favorable recuperación cuando fueron tratados con suero hiperinmune de otros pacientes que previamente se recuperaron de la infección (75).

Los linfocitos Th17 son productores de IL-17 e IL-23, ambas citocinas consideradas inflamatorias, las cuales no son producidas por los linfocitos Th1 ni Th2 (70). En el caso del virus de la influenza A, se ha caracterizado el importante papel de IL-17 en la producción del daño tisular, ya que es una citocina que induce la liberación de factores quimioattractantes de neutrófilos(76–78), los cuales liberan en el sitio de la infección el contenido de sus gránulos, constituido principalmente por enzimas proteolíticas (51).

Treg poseen como marcador de superficie CD25, sin embargo, éstas tienen como marcador característico el factor de transcripción Forkhead box P3 (Foxp3) (70). Éstas tienen un papel previniendo daño tisular causado por respuestas inflamatorias en diferentes modelos de infecciones (79), por esta misma razón, pueden favorecer la persistencia del patógeno. Se ha reportado el papel de células Foxp3+ en la infección por el virus de la influenza favoreciendo la proliferación de células T foliculares, mediante la producción de IL-2 (80) en un modelo animal. En otros estudios se demostró el aumento de linfocitos Treg posterior a la inmunización de animales contra el virus de la influenza A (81), comparados con aquellos no inmunizados; el mismo fenómeno se observa en aquellos pacientes vacunados anualmente contra el virus de la influenza A(82), sin embargo, su papel no se encuentra claramente definido.

1.3.6 Linfocitos T citotóxicos

Los linfocitos T citotóxicos (Tc) son los principales efectores de la respuesta inmune contra tumores, así como la respuesta inmune antiviral, éstos reconocen antígenos en el contexto de MHC I. Los Tc desempeñan sus funciones mediante la producción de citocinas, además de la producción de moléculas citolíticas tales como granzimas y perforinas. Se han descrito de estos linfocitos dos poblaciones principales:

Los linfocitos Tc1 expresan principalmente IFN γ y perforinas; se ha encontrado un papel protector contra el virus de la influenza A H1N1 (pdm)09 por parte de estas

células, su presencia se correlaciona con la supervivencia de los pacientes y la disminución de la gravedad de los síntomas (83). Por otra parte, en modelos animales se ha descrito su papel mediando la lisis de células infectadas por el virus de la influenza pandémica (78). Los linfocitos Tc17 no producen perforinas ni granzimas, a pesar de ello su papel protector ante el virus de la influenza se ha probado en modelos de ratones (85). Contrario a lo que ocurre con la población Th17, las Tc17 se asocian a un pronóstico favorable en diferentes modelos en ratón(85,86).

1.3.7 Distrés respiratorio agudo

Cuando la respuesta inflamatoria no puede controlarse se produce una condición clínica conocida como Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS). El pulmón es particularmente susceptible a daños por SIRS, este daño se conoce como distrés respiratorio agudo (ARDS); consiste en un síndrome de inflamación pulmonar aguda y persistente acompañado de una activación de la coagulación. El ARDS se produce debido al daño ocurrido en el endotelio, el cual es mediado por neutrófilos, los cuales liberan en el sitio de la infección enzimas que causan destrucción del epitelio alveolar y permite el escape fluidos al espacio alveolar (31,87), reduciendo así el espacio necesario para llevar a cabo el intercambio gaseoso. Se ha reportado que la producción de IL-17 es uno de los mecanismos no traumáticos asociados con el desarrollo de ARDS (87), ya que, como se mencionó anteriormente, es una potente quimioattractante para neutrófilos.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

A la fecha, el estudio de mediadores inmunológicos de la respuesta inmune innata y adquirida en casos ocasionados por el virus de la influenza A H1N1 (pdm)09 se han realizado en muestras de suero, plasma y lavados broncoalveolares. Sin embargo, no existen reportes en la literatura acerca del microambiente y subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T en el tejido pulmonar de pacientes fallecidos por infección de influenza A H1N1(pdm)09, así como tampoco existe un biomarcador de diferenciación entre influenza A H1N1(pdm)09 e influenza estacional en dicho tejido humano u otro tipo de muestras. Debido a lo anterior, la realización de este trabajo es pertinente, ya que generará nueva información con respecto a la inmunopatogenia de la infección ocasionada por el virus de la influenza A H1N1(pdm)09.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

Las subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T, así como sus citocinas relacionadas son diferentes entre influenza A H1N1 (pdm)09 e influenza estacional, en tejido pulmonar de casos fatales de neumonías.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar las subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T y su correlación con el daño tisular en pulmón de pacientes fallecidos por influenza A H1N1(pdm)09 y otras enfermedades respiratorias.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar y cuantificar la carga viral de influenza A H1N1 (pdm)09 en tejido pulmonar.
- Determinar el daño pulmonar en pacientes fallecidos por influenza A H1N1 (pdm)09 y otras infecciones respiratorias.
- Identificar las subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T presentes en pulmón de los grupos de estudio.
- Determinar los niveles de las citocinas relacionadas con las subpoblaciones de linfocitos y macrófagos en los grupos de estudio.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Obtención de las Muestras

Las muestras se obtuvieron del Servicio de Anatomía Patología del Hospital Universitario “José E. González”. Estas muestras constaron de tejido pulmonar procesado con la técnica histológica de inclusión en parafina. Las muestras incluidas en el estudio presentaron las siguientes características:

- Provinieron de pacientes mayores de 18 años de edad
- Fueron obtenidas entre los meses de abril a diciembre de 2009, para el caso de influenza A H1N1. El resto de las otras muestras se obtuvieron en el periodo comprendido desde agosto de 2004 hasta agosto de 2012.
- Tenían un diagnóstico clínico de neumonía por Influenza A H1N1, Influenza no A H1N1, *Coccidioides immitis*, neumonías bacterianas, así como tejido pulmonar no infectado como control negativo (clínica e histológicamente sano, ver figura 1).

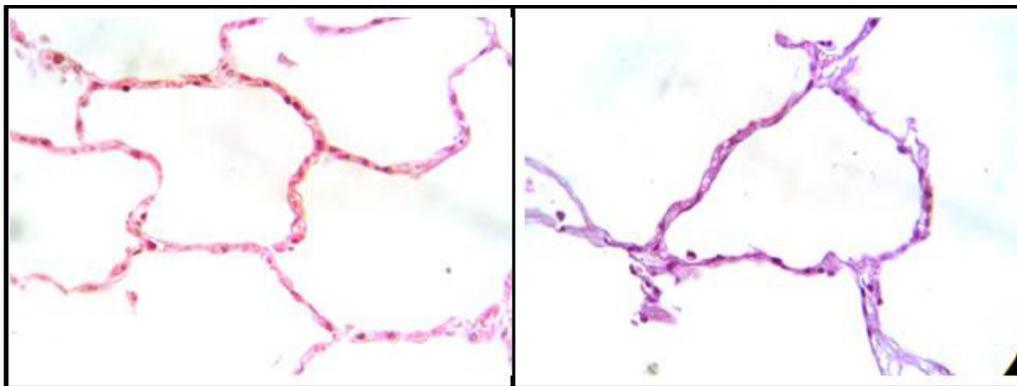


Figura 1. Imágenes representativas de hallazgos microscópicos en secciones de pulmón sin infección (40X).

5.2 Recuperación de RNA de tejido embebido en parafina

El RNA total fue aislado de las muestras de tejido pulmonar embebido en parafina mediante el uso de un kit comercial RecoverAll™ total nucleic acid isolation kit (Austin, Tx, EE.UU., Ambion, no. de catálogo AM1975) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Fueron realizados diez cortes de 10 µm de grosor de cada una de las muestras, los cuales se colocaron en microtubos estériles de 1.5ml, libres de RNasas. Las muestras fueron desparafinadas agregando 1ml de xilol (St. Louis, Mo, EE.UU., Sigma-Aldrich, no. de catálogo 18556-6) durante 3 minutos a 50°C, este paso se repitió en 2 ocasiones. El xilol se removió realizando 2 lavados con etanol absoluto de grado molecular (St. Louis, Mo, EE.UU., Sigma-Aldrich, no. de catálogo E7023-500ML). Posteriormente, las muestras se incubaron con proteinasa K (Austin, Tx, EEUU, Ambion, incluida en el kit) a 55°C durante toda la noche. La proteinasa K se inactivó incubando las muestras a 80°C durante 15 minutos para después centrifugar a 16,000 g durante 3 minutos para remover el tejido no digerido, después de esto la solución recuperada se pasó por una columna de sílice siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA residual se digirió incubando con DNasa (Austin, Tx, EE.UU. Ambion, incluida en el kit) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se lavó la columna para eliminar la DNasa y finalmente, la concentración de RNA de cada muestra fue obtenida realizando la medición a 280 nm utilizando un espectrofotómetro SmartSpec™Plus de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

5.3 Identificación y cuantificación de la carga viral en muestras de pulmón

Los virus de la influenza A H1N1 (pdm)09 e influenza estacional se detectaron en las muestras de RNA mediante qRT-PCR, empleando el Kit for Swine H1N1 Influenza Human Pandemic Strain (H1N1-swine) (PrimerDesign Ltd., Southampton, UK) que contiene primers con sondas Taqman conjugadas con FAM. Las condiciones de la qRT-PCR empleada fue la sugerida por el fabricante: 55°C por 10 minutos, 95°C por 8 minutos, y 50 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, con una alineación y amplificación a 60° por 60 segundos; estas condiciones son las mismas que emplea el protocolo de la CDC para la detección del virus. Las reacciones se realizaron utilizando 400ng de RNA total y 10 µL de 2X Brilliant III Ultra-Fast QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies, La Jolla, CA) en un volumen final de 20 µL por reacción y empleando el termociclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

5.4 Determinación del daño pulmonar

El tejido pulmonar se procesó mediante la técnica histológica estándar en un equipo automatizado, hasta obtener el tejido embebido en parafina, del cual se obtuvieron cortes de 5 µm. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina y eosina para el análisis histopatológico.

Los criterios tomados para llevar a cabo la medición del daño tisular fueron los reportados por Longhi y colaboradores (53), los cuales consisten en parámetros indicativos de inflamación pulmonar y se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios evaluados para determinar el daño tisular.

Criterio valorado	Valores mínimo y máximo
Evidencia de hemorragia	0 a 3
Infiltración leucocitaria	0 a 5
Agregados linfoides perivasculares	0 a 4
Fibrosis	0 a 1
Valor histológico total	0 a 13

5.5 Determinación de las subpoblaciones celulares

5.5.1 Recuperación de células para citometría de flujo

A partir del bloque de tejido embebido en parafina se obtuvieron de 3 a 5 cortes de 50 µm de grosor, que se colocaron en tubos de ensayo. El tejido se desparafinó empleando 3 ml de xilol en tres ocasiones, para posteriormente incubar en EZ-Dewax (BioGenex, San Ramón, CA, EE.UU. no. de catálogo HK584-5K) en dos ocasiones. El tejido se rehidrató con etanol a concentraciones decrecientes (100%, 70%, 30%) y agua destilada durante 5 minutos en cada uno de las soluciones. Una vez rehidratado el tejido, el desenmascaramiento antigénico se realizó empleando 3ml de buffer de citrato (10Mm Ácido cítrico, 0.5% Tween 20) y baño maría a una temperatura de 80°C durante 80 minutos. Las muestras se

enfriaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró y se realizó un lavado con solución salina amortiguadora de fosfato 10mM, pH 7.3 (PBS).

El tejido se digirió con colagenasa (St. Louis, Mo, EE.UU. Sigma-Aldrich, no. de catálogo C7657) durante 30 minutos en baño maría a una temperatura de 37°C. Transcurrido el tiempo se adicionó una solución para bloquear la acción de la colagenasa (3% de albúmina sérica bovina (BSA), 0.05% de Tween 20/PBS) y se realizaron 2 lavados con PBS (10mM, pH 7.3).

El tejido se maceró por pipeteo en el tubo de ensayo, para después ser macerado sobre el tamiz celular de 40µm colocado en una caja de Petri estéril. El filtrado se recuperó y las células se contaron en una cámara de Neubauer.

5.5.2 Inmunofenotipificación

Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^5 - 1×10^6 en 100µL de PBS. Se adicionó una mezcla de anticuerpos (presentados en tabla 3) contra los marcadores de superficie para cada una de las subpoblaciones de nuestro interés en un volumen de 200µl y las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron con 1ml de staining buffer y se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 minutos, descartando posteriormente el sobrenadante. Las células se permeabilizaron y fijaron utilizando 1ml del buffer de fijación. Del mismo modo, una mezcla del anticuerpo intracelular se adicionó en un volumen de 200 µl y las muestras se incubaron a 4°C durante 30 minutos en oscuridad. Las

muestras se lavaron en dos ocasiones empleando buffer de permeabilización 1x, posteriormente se resuspendió en 500 μ L de PBS (10mM, pH 7.3). Al menos 50,000 células se adquirieron en un citómetro FACS Canto II (BD bioscience, San José, CA) y analizadas empleando el software Cell Quest Pro, por un experto en citometría de flujo.

Tabla 3. Anticuerpos empleados para citometría de flujo.

Anticuerpo	Dilución	Clona	Fluorocromo	Compañía	No. De Catálogo
De superficie					
Anti-CD14	1 μ g	61D3	FITC	eBioscience	11-0149-42
Anti-CD16	0.06 μ g	eBioCB16	PE	eBioscience	12-0168-42
Anti-CD3	2 μ g	OKT3	PerCP	Abcam	ab86884
Anti-CD4	1 μ g	RPA-T4	FITC	eBioscience	11-0049-42
Anti-CD8	0.06 μ g	OKT8	PE	eBioscience	12-0086-73
Anti-CD4/CD25	1 μ g/ 0.125 μ g	RPA-T4/BC96	FITC/APC	eBioscience	22-0425-71A
Anti-Foxp3	0.25 μ g	PCH101	PE	eBioscience	12-4776-71A
Intracelulares					
Anti-IL-4	0.125 μ g	8D4-8	APC	eBioscience	17-7049-82
Anti-IL-17A monoclonal de ratón	0.06 μ g	eBio64DEC17	APC	eBioscience	17-7179-42
Anti-IFNγ monoclonal de ratón	0.125 μ g	4S.B3	APC	eBioscience	17-7319-82
Anti-TNFα	0.125 μ g	MAb11	APC	eBioscience	17-7349-82

5.5.3 Inmunohistoquímica

La detección *in situ* de las subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T se llevó a cabo empleando cortes de 5 µm de las muestras de tejido pulmonar embebido en parafina y montados en portaobjetos recubiertos con polilisina, Polysine® (Thermo Scientific, Portsmouth, New Hampshire, no. de catálogo P4981-001). Se desparafinó el tejido empleando dos lavados con EZ-Dewax (BioGenex, San Ramón, CA, no. de catálogo HK584-5K), de 10 minutos cada uno. El tejido se rehidrató con etanol a concentraciones decrecientes (100%, 70%, 30%) y agua destilada durante 5 minutos en cada uno de las soluciones. Una vez rehidratado el tejido, el desenmascaramiento antigénico se realizó empleando de buffer de citrato (10Mm Ácido cítrico, 0.5% Tween 20) en un baño maría a una temperatura de 80°C durante 80 minutos. Posterior a esto, el tejido se enfrió durante 10 minutos y se colocó en un portalaminillas Sadon Coverplate™ (Thermo Scientific, Ref. 72110017). Las secciones se prepararon usando un protocolo de estándar de inmunohistoquímica (IHC): Éstas se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario contra los marcadores de superficie de nuestro interés (Tabla 4). Después se incubaron las muestras con un anticuerpo secundario biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión específica de antígeno-anticuerpo se amplificó mediante el uso de un sistema ABC (Vector Lab, Burlingame, CA, no. de catálogo PK-4001, PK-4002, PK-4005) durante 30 min a temperatura ambiente. Después del paso de amplificación las laminillas se incubaron por 3 minutos con el substrato cromógeno de peroxidasa 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Vector Lab, Burlingame, CA, no. de catálogo SK-4105). Finalmente las laminillas se contratiñeron usando hematoxilina (Vector Lab,

Burlingame, CA, no. de catálogo H-3401) y montadas usando VectaMount™ (Vector Lab, Burlingame, CA, no. de catálogo H-5000).

Tabla 4. Listado de anticuerpos empleados en inmunohistoquímica para la determinación de las poblaciones celulares.

Anticuerpo	Dilución	Compañía	No. De catálogo
Anti-CD14 policlonal de cabra	1µg	Abcam	Ab45870
Anti-CD206 policlonal de cabra	5µg	R&D Systems	AF2534
Anti-CD4 policlonal de cabra	5µg	R&D Systems	AF2534
Anti-CD8 monoclonal de ratón (Clona 5F10)	1:50	Santa Cruz	Sc70794
Anti-Foxp3 policlonal de conejo	1:400	Santa Cruz	Sc28705

5.6 Determinación de citocinas

5.6.1 Expresión génica de citocinas

A partir de RNA total recuperado, se determinó la expresión génica relativa de citocinas y mediadores inmunológicos relacionados con la polarización de macrófagos empleando primers y sondas Taqman conjugadas con FAM y VIC (Tabla 5); se empleó como gen normalizador el GAPDH. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento y extensión a

60°C por 60 s. El cambio relativo en la expresión de mRNA se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (89). Todas las reacciones se realizaron con un volumen de 2 μ L de RNA total (400 ng) y 10 μ L de Brilliant III Ultra-Fast QRT-PCR Master Mix 2X (Agilent Technologies, La Jolla, CA, EE.UU., no de catálogo 600884) en un termociclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Se empleó agua DEPC para completar un volumen de 20 μ L por reacción.

Tabla 5. Listado de primers y sondas.

Gen	Fluorocromo	Número de producto (Applied biosystems)
GAPDH	FAM	Hs02758991_g1
NOS2	FAM	Hs01075529_m1
IL-2	FAM	Hs00174114_m1
IL-4	FAM	Hs00174122_m1
IL-6	VIC	Hs00985639_m1
IL-10	FAM	Hs00961622_m1
IL-12	VIC	Hs01011518_m1
IL-17	VIC	Hs00174383_m1
IL-23	FAM	Hs00372324_m1
TNFα	FAM	Hs00174128_m1
Arginase 1	VIC	Hs00968979_m1
IFNγ	VIC	Hs00989291_m1
TGFβ	VIC	Hs01649771_s1
RETNLB	VIC	Hs00395669_m1

5.6.2 Arreglos de PCR

En 10 μ L de agua MilliQ se reconstituyó RNA desecado en tubos RNAsable (Biomatrix, San Diego, CA, EE.UU., no. de catálogo 93220-001) y se procedió a sintetizar cDNA a partir de 400 ng de RNA, empleando el kit RT² PreAMP cDNA Synthesis (Sabioscience, Frederick, MD, no. de catálogo 330451) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se eliminó el DNA residual en un termociclador T100

Thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) a 42°C durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó la retrotranscripción en el mismo termociclador a 42°C durante 30 minutos. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso. El arreglo empleado fue Innate and Adaptive Immune Response PCR Array (Sabioscience, Frederick, MD, no. de catálogo PAHS-0527) en un formato de 384 pocillos y las sondas de tipo SYBR Green/ROX (Sabioscience, Frederick, MD, no. de catálogo 330522). Una vez realizadas las mezclas de cDNA y el RT² PreAMP PCR Master Mix (incluido en el kit de síntesis) para llevar a cabo las reacciones, éstas fueron pipeteadas en las placas de 384 pocillos por el sistema de automatización epMotion 5075® (Eppendorf, Hauppauge, NY, EE.UU.). Las condiciones de la qPCR empleada fue la sugerida por el fabricante: 95°C por 10 minutos, y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, con una alineación y amplificación a 60° por 60 segundos. Todas las reacciones se realizaron en un volumen total de 10 µL en un termociclador ViiA™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.)

5.6.3 Determinación de la producción de citocinas mediante la técnica de inmunohistoquímica

La determinación *in situ* de citocinas se llevó a cabo en cortes histológicos de 5µm de las muestras de tejido pulmonar embebido en parafina y se montaron en portaobjetos recubiertos con polilisina (Polysine®, Thermo Scientific, cat.# P4981-001). El procedimiento que se realizó es igual al descrito previamente para la detección de marcadores de poblaciones celulares. El listado de los anticuerpos

empleados se muestra en la tabla 6. La cuenta de células positivas se realizó en diez campos a un aumento de 40X y se tomó en cuenta el promedio de los 10 campos para cada muestra.

Tabla 6. Listado de anticuerpos empleados en inmunohistoquímica para la determinación de la producción de citocinas y mediadores inmunológicos.

Anticuerpo	Dilución	Compañía	No. De catálogo
Anti-IL-4 policlonal de conejo	0.25µg	Peprotech	500-P20
Anti-IL-10 policlonal de conejo	2.5µg	Peprotech	500-P24
Anti-IL-17 policlonal de conejo	1:100	Santa Cruz	Sc7927
Anti-IFNγ policlonal de conejo	1:100	Santa Cruz	Sc8308
Anti-TNFα policlonal de conejo	1:400	Abcam	Ab9739

5.6.4 Recuperación de proteínas del tejido embebido en parafina

El protocolo usado para la recuperación de células del tejido fue empleado también para las proteínas, solo hasta el paso de desenmascaramiento antigénico en baño maría a 80°C durante 80 minutos. Posteriormente, las muestras fueron maceradas con un homogenizador de tejidos (Tissue tearor, Biospec products inc., Bartlesville, OK) durante un minuto a velocidad alta. Las muestras se centrifugaron

1500rpm durante 10 minutos para recuperar solo el sobrenadante conteniendo las proteínas y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

5.6.5 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Las proteínas recuperadas de cada muestra fueron cuantificadas por el método de Bradford. Para lo anterior, se preparó una curva estándar empleando albúmina sérica bovina de la siguiente manera:

Tabla 7. Estándares empleados para la curva de concentración de proteínas.

Estándares	ASB (1 mg/ml) 1:50	H₂O MiliQ	Reactivo de Bradford	Concentración de proteínas
Blanco	-----	750 µl	750 µl	0 µg/ml
1	75 µl	225 µl	750 µl	2 µg/ml
2	225 µl	375 µl	750 µl	6 µg/ml
3	375 µl	525 µl	750 µl	10 µg/ml
4	525 µl	675 µl	750 µl	14 µg/ml
5	675 µl	75 µl	750 µl	18 µg/ml

Para la cuantificación de proteínas, se prepararon tres diluciones de las muestras (1:10, 1:50, 1:100) en agua MilliQ, con un volumen final de 1ml cada una. Se colocaron volúmenes de 200 µl de los estándares y de las muestras en placas de ELISA (Costar, Corning, NY, no. de catálogo 2591) por duplicado para llevar a cabo la lectura de su absorbancia a 595nm en el lector de placas (iMark Microplate Reader y Microplate Software Manager6, Bio-Rad, Hercules, CA).

5.6.6 Determinación de la concentración de citocinas

Se llevó a cabo la determinación de las concentraciones de ocho citocinas y mediadores inmunológicos (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ y TNF α), mediante el uso de un kit de perlas magnéticas Bio-Plex® Precision Pro™ Assays Human Cytokine 10-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA, no. de catálogo 171-A1001P) siguiendo las instrucciones del fabricante. La determinación se realizó en un volumen de 50 μ l de homogenizado de pulmón. El resultado se leyó en un Bio-Plex200 system de Bio-Rad.

5.7 Análisis estadísticos

Para llevar a cabo la comparación de niveles en el daño tisular, niveles de expresión génica, células inmunofenotipificadas, células positivas a las diferentes inmunotinciones, así como niveles de citocinas entre los diferentes grupos de estudio se empleó la prueba estadística U de Mann Whitney. Se determinó la existencia de correlación entre la carga viral y el grado de daño tisular, así como con la expresión génica de citocinas y la presencia de células positivas a la tinción para las diferentes citocinas, mediadores inmunológicos y marcadores de superficie mediante el análisis de correlación de Pearson. Se tomó como valor de significancia una $P < 0.05$. Se empleó el programa Graph-pad Prism 5 para llevar a cabo los análisis estadísticos

6. RESULTADOS

6.1 Obtención y clasificación de las muestras

6.1.1 Cuantificación de la carga viral

Se revisó un total de 580 reportes de autopsia, de los cuales en 110 casos presentaban neumonía. Se detectaron 4 muestras positivas para influenza A H1N1 (pdm)09, con un rango de copias del virus de 3 a 90 por cada 400ng de RNA (Figura 2); por otra parte, se detectaron 7 muestras positivas para influenza A, con un rango de copias de 2 a 138 por cada 400ng de RNA (Figura 3).

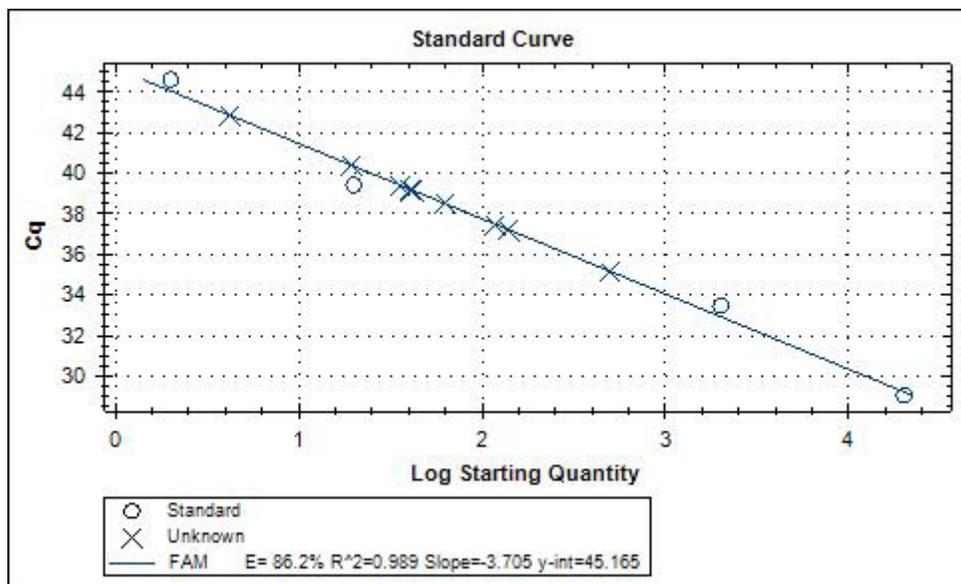


Figura 2. Curva estándar empleada para determinar la carga viral de influenza A utilizando la expresión del gen M1 del virus.

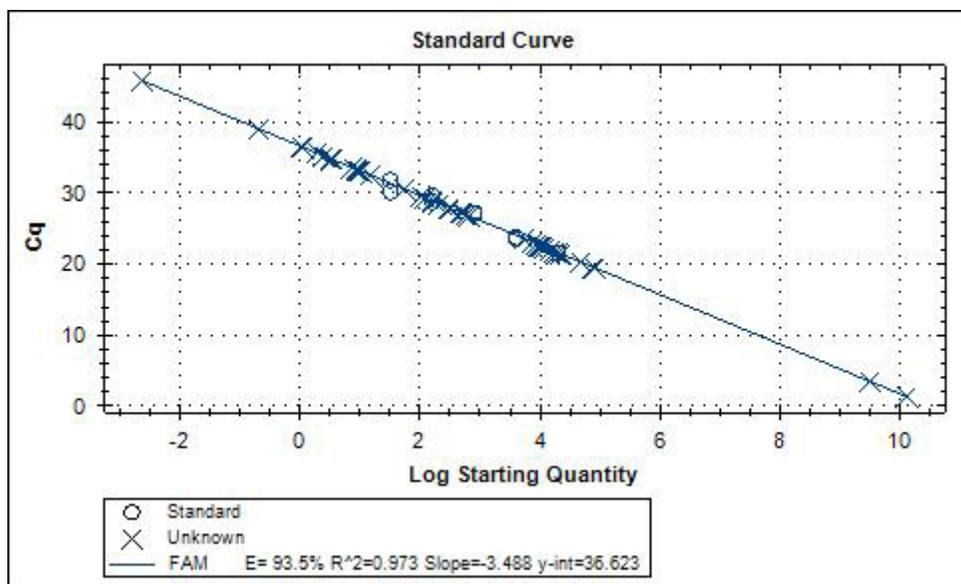


Figura 3. Curva estándar empleada para determinar la carga viral de influenza A H1N1 (pdm)09 utilizando la expresión del gen N1 del virus.

6.1.2 Características clínicas y demográficas de los pacientes con neumonía

Se obtuvieron los expedientes clínicos de cada paciente con neumonía para analizar la información clínica a la llegada a la sala de urgencias. La edad media de los pacientes fue de 31.7 ± 8.75 años para el caso de influenza A H1N1 (pdm)09, 37.8 ± 34.2 años para el grupo de influenza estacional, 47.6 ± 20.6 en el caso de coccidioidomicosis, 54.5 ± 22.5 en el caso de las neumonías bacterianas, y 41.8 ± 23.3 años para los controles sin infección. En la tabla 7 se resumen las características demográficas de los pacientes.

Tabla 8. Características demográficas de los pacientes con neumonía.

Identificación del paciente	Edad	Sexo	Comorbilidades
Pacientes con influenza A (H1N1)pdm			
4814	37	Femenino	Desconocidos
4823	23	Masculino	Tabaquismo
4826	35	Masculino	Obesidad mórbida
N-13-09	31	Masculino	Tabaquismo
Pacientes con influenza A estacional			
4555	29	Femenino	Hepatitis
4586	72	Femenino	Cardiopatía crónica
4798	36	Masculino	Tabaquismo/Obesidad
4807	24	Femenino	Tabaquismo/Diabetes
4817	29	Femenino	Desconocidos
4824	37	Femenino	Diabetes mellitus
N-03-14	80	Femenino	Diabetes mellitus/ Cardiopatía crónica
Pacientes con neumonía por <i>Coccidioides spp.</i>			
4480	35	Femenino	Lupus
4487	54	Femenino	Tuberculosis
4835	35	Masculino	VIH/SIDA
4912	78	Femenino	Diabetes mellitus
4964	27	Masculino	VIH/SIDA
N-01-13	57	Femenino	Diabetes mellitus
Pacientes con neumonías de origen bacteriano			
4955	77	Femenino	DM/Alcoholismo
4979	57	Femenino	HTA
N-26-12	62	Masculino	Cardiopatía crónica
N-41-12	72	Femenino	DM/HTA
N-46-12	48	Femenino	DM/HTA
N-50-12	78	Masculino	DM/HTA
N-58-12	32	Femenino	Puerperio
N-66-12	35	Masculino	No relevantes

6.1.3 Determinación del daño tisular

El daño tisular se cuantificó mediante observación de cortes histológicos al microscopio de luz, teñidos con hematoxilina y eosina. Debido a que las características histopatológicas de la neumonía por *Coccidioides spp.*, y neumonías bacterianas difieren de aquellas de las neumonías virales, no fue posible hacer una comparación entre estos dos grupos contra el daño causado por el virus de la influenza. No se encontró diferencia significativa entre el daño tisular ocasionado por influenza A estacional e influenza A H1N1 ($P>0.05$). Sin embargo, el daño es estadísticamente significativo en ambos grupos de influenza comparado con el control no infectado ($P<0.05$), tabla 5 y figura 3.

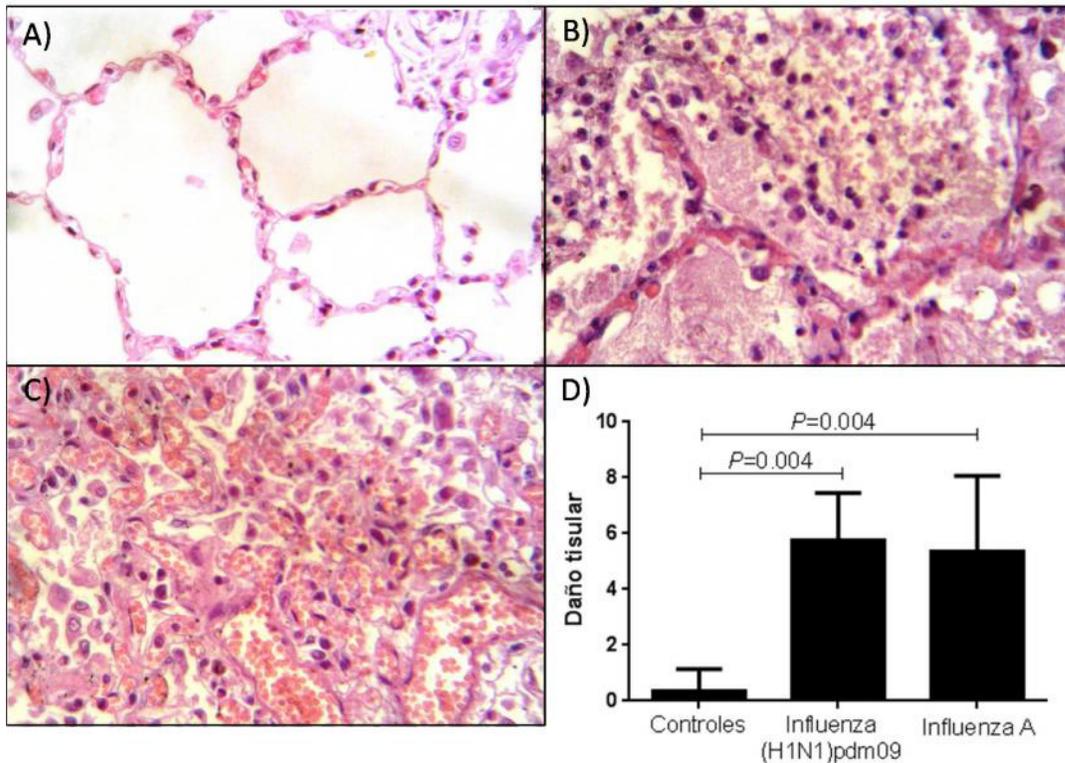


Figura 4. Evidencia de daño tisular en los grupos de influenza A H1N1 (pdm)09 y estacional. Las fotomicrografías se tomaron a un aumento de 40X y son representativas de: A) controles sin infección, B) neumonía por influenza A H1N1(pdm)09, y C) Neumonía por influenza estacional. D) Representa el daño tisular tomando en cuenta los criterios reportados por Longhi et al (88)

Tabla 9. Evaluación del daño tisular.

Identificación de muestra	Hemorragia	Infiltración leucocitaria	Agregados perivasculares	Fibrosis	Daño tisular total
Controles					
4830	0	0	0	0	0
4834	0	0	0	0	0
4838	0	0	0	0	0
4850	0	0	0	0	0
4928	1	1	0	0	2
4830	0	0	0	0	0
Influenza A H1N1 (pdm)09					
4814	3	2	1	0	6
4823	2	1	2	0	5
4826	2	2	0	0	4
N-13-09	1	3	3	1	8
Influenza A					
4555	3	2	0	0	5
4586	0	1	0	0	1
4798	3	4	0	0	7
4807	2	2	0	0	4
4817	3	3	0	0	6
4824	3	4	2	0	7

6.2 Identificación de poblaciones celulares en los diferentes grupos de estudio

6.2.1 Citometría de flujo

Las células recuperadas de tejido pulmonar embebido en parafina se tiñeron para llevar a cabo la identificación de macrófagos de tipo M ϕ 1 y M ϕ 2, así como linfocitos T cooperadores (Th1, Th2, Th17 y Treg) y linfocitos T citotóxicos (Tc1 y Tc17). En las figuras 5-7 se muestran los dotplots obtenidos; donde se observan dificultades en la detección de las poblaciones celulares, así como, tampoco fue posible detectar alguna diferencia entre las Intensidades de Fluorescencia Media (IMF) de los diferentes grupos; por lo tanto se decidió cambiar la estrategia de identificación celular a una mediante técnicas de inmunohistoquímica.

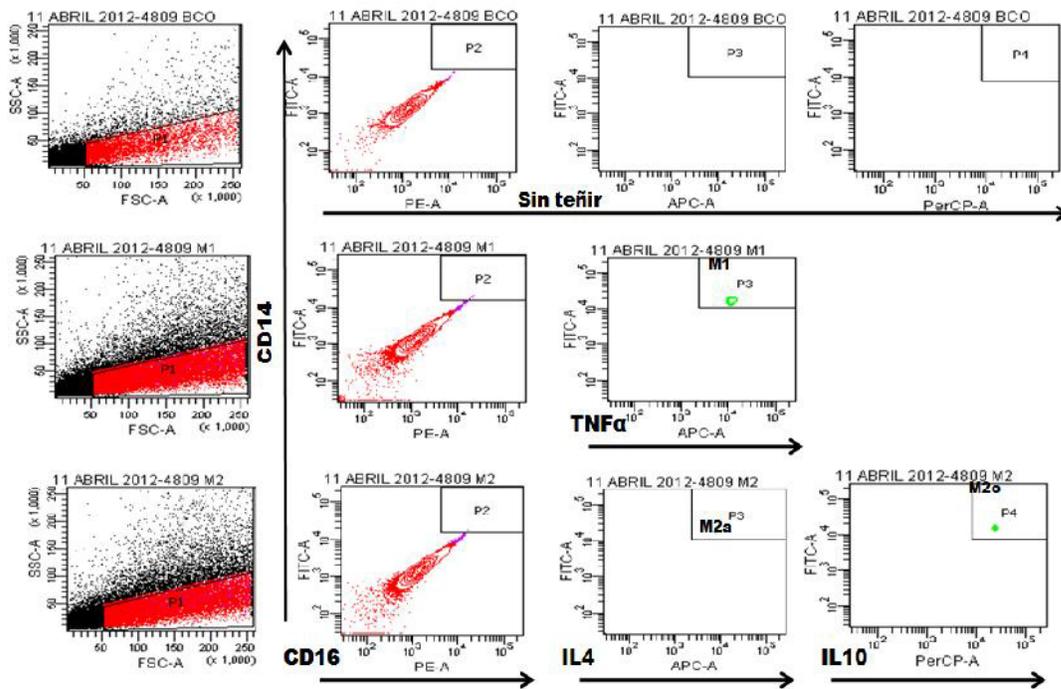


Figura 5. Identificación de poblaciones de macrófagos de tipo M ϕ 1 y de tipo M ϕ 2. Dot plots representativos de la detección de subpoblaciones de macrófagos. Se observa escasa presencia de células positivas a la tinción para todos los grupos.

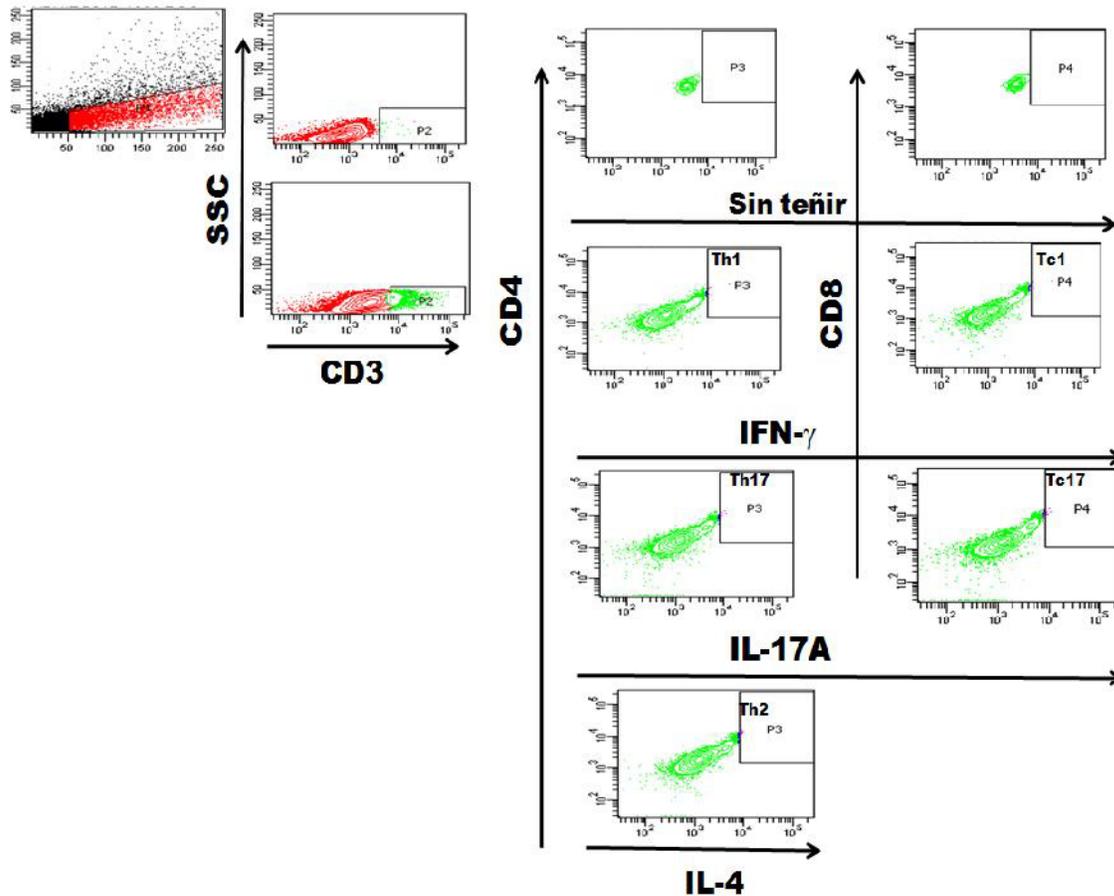


Figura 6. Identificación de poblaciones de linfocitos de tipo Th1, Th2, Th17, Tc1 y Tc17. Dot plots representativos de la detección de subpoblaciones de linfocitos. Se logró detectar fluorescencia, sin embargo, las células positivas a la tinción específica son escasas.

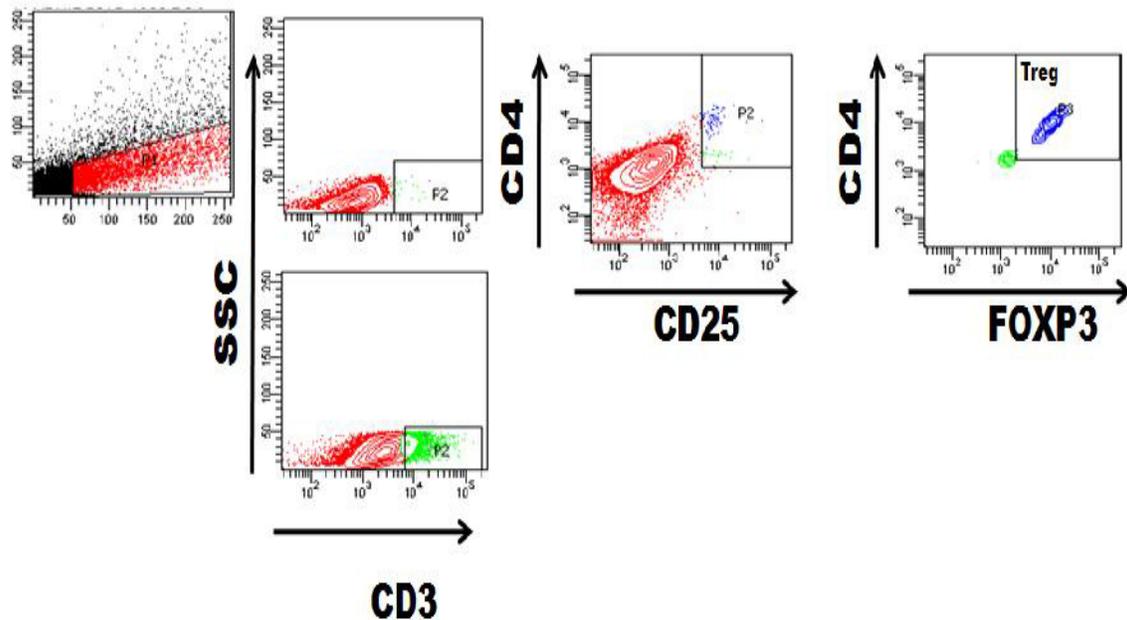


Figura 7. Identificación de poblaciones de linfocitos de tipo T regulatorios. Dot plots representativos, sin embargo, no se encontró diferencia significativa en esta población de linfocitos.

6.2.2 Detección in situ de poblaciones celulares

Para los cuatro grupos de estudio se encontraron niveles aumentados de células CD14+ comparados con el control sin infección ($P < 0.05$), figura 8. Por otra parte, solo para el grupo de influenza estacional y neumonía por *Coccidioides spp.*, se encontraron aumentadas las células CD206+ ($P < 0.05$), en el caso de influenza pandémica, éstas células se encontraron disminuidas comparadas con el grupo de influenza estacional, figura 9. Las células CD4+ se encontraron aumentadas para ambos grupos de influenza y neumonía fúngica ($P \leq 0.03$), figura 10. Las células Foxp3+ se vieron aumentadas solo en el grupo de neumonías de origen fúngico y

bacteriano ($P<0.05$), figura 11. Por otra parte, las células CD8+ fueron difícilmente contabilizadas en todos los grupos de estudio, encontrándose de manera disminuida en el grupo de neumonías bacterianas ($P<0.01$), figura 12.

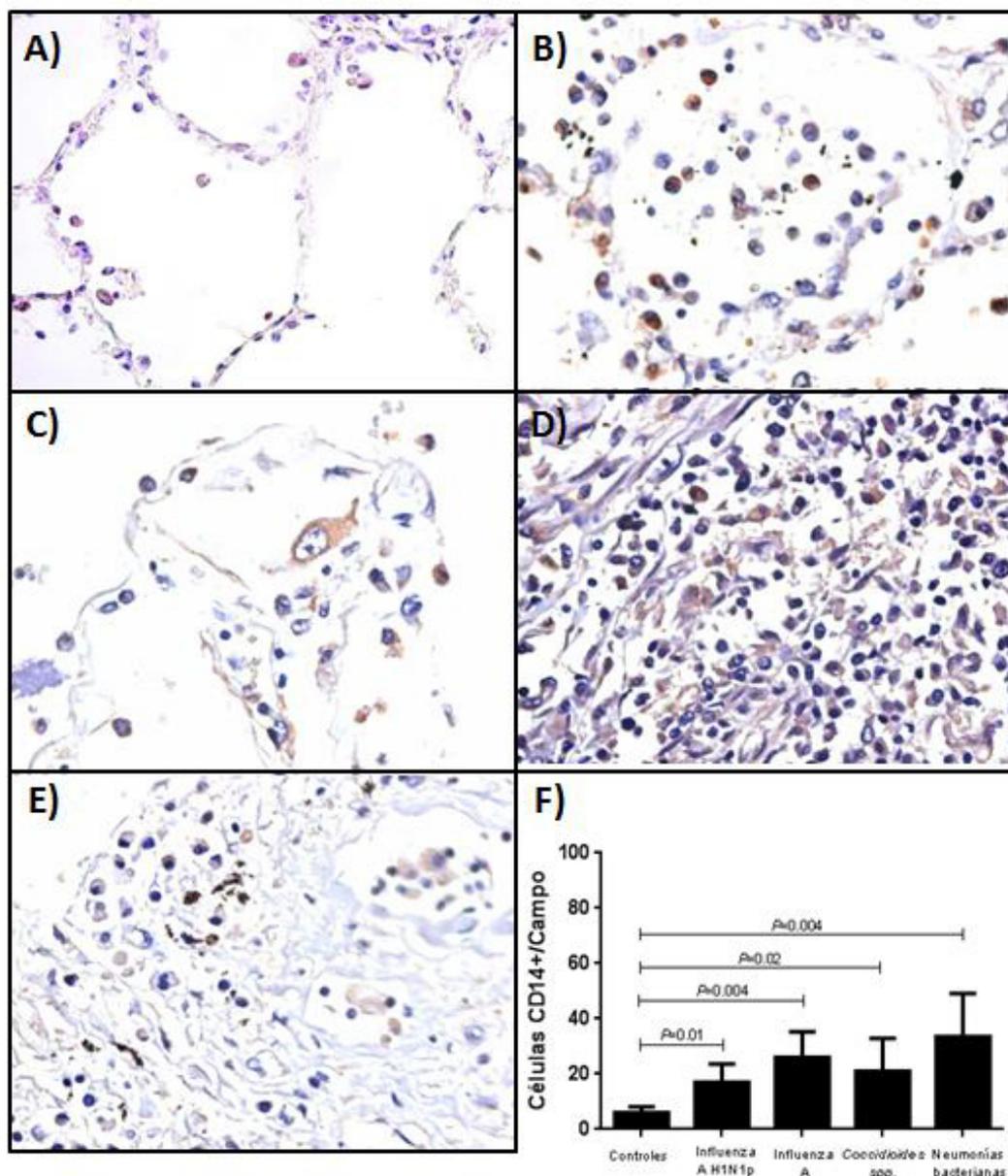


Figura 8. Células positivas para CD14 están elevadas en todos los grupos de neumonías., A) Control sin infección, B) Neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09, C) Neumonía por influenza estacional, D) Neumonía por *Coccidioides spp.* E) Neumonía bacteriana. Imágenes representativas de todas las inmunohistoquímicas contra CD14 (40X)

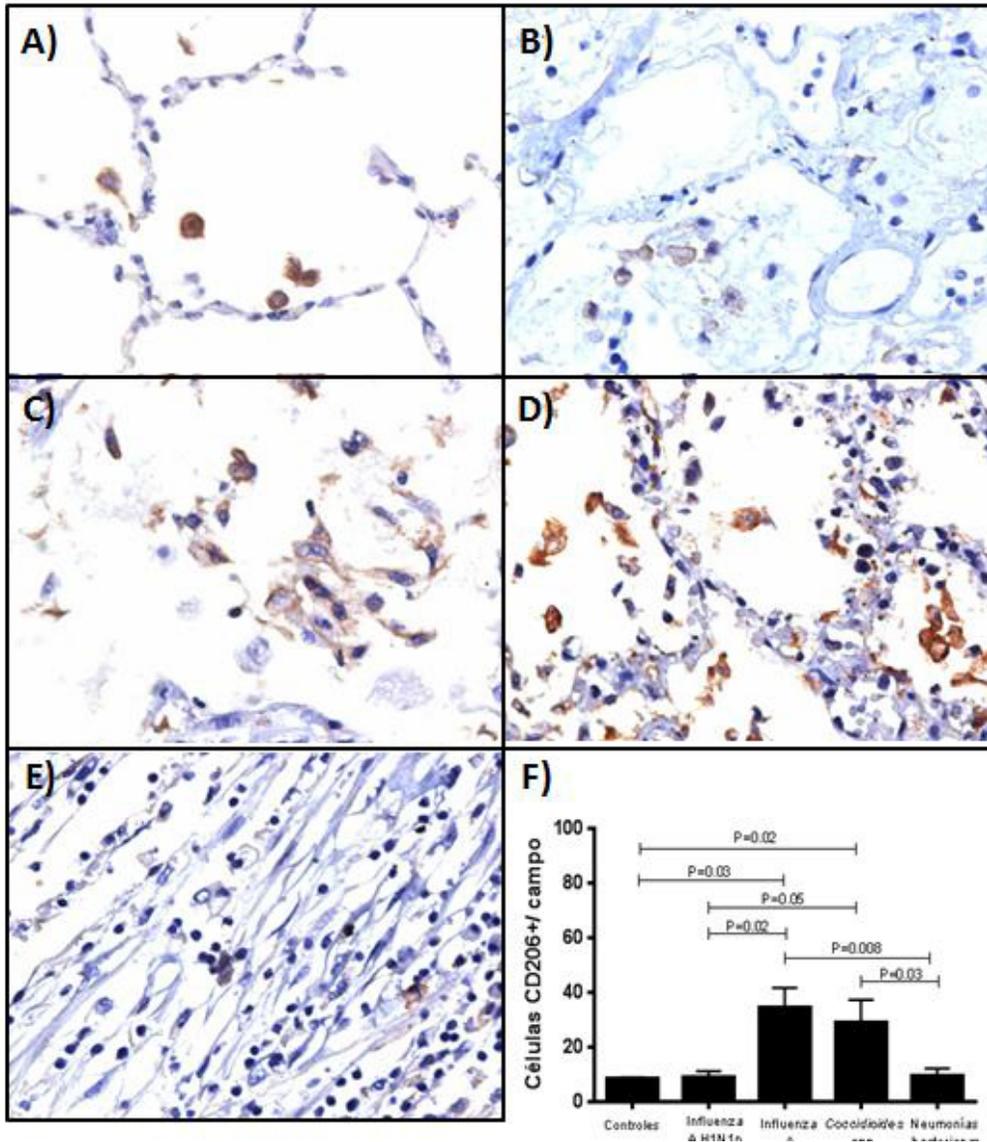


Figura 9. El porcentaje de células positivas para CD206 diferencia entre neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09 y A estacional. A) Control sin infección, B) Neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09, C) Neumonía por influenza estacional, D) Neumonía por *Coccidioides spp.* E) Neumonía bacteriana. Imágenes representativas de todas las inmunohistoquímicas contra CD206 (40X),

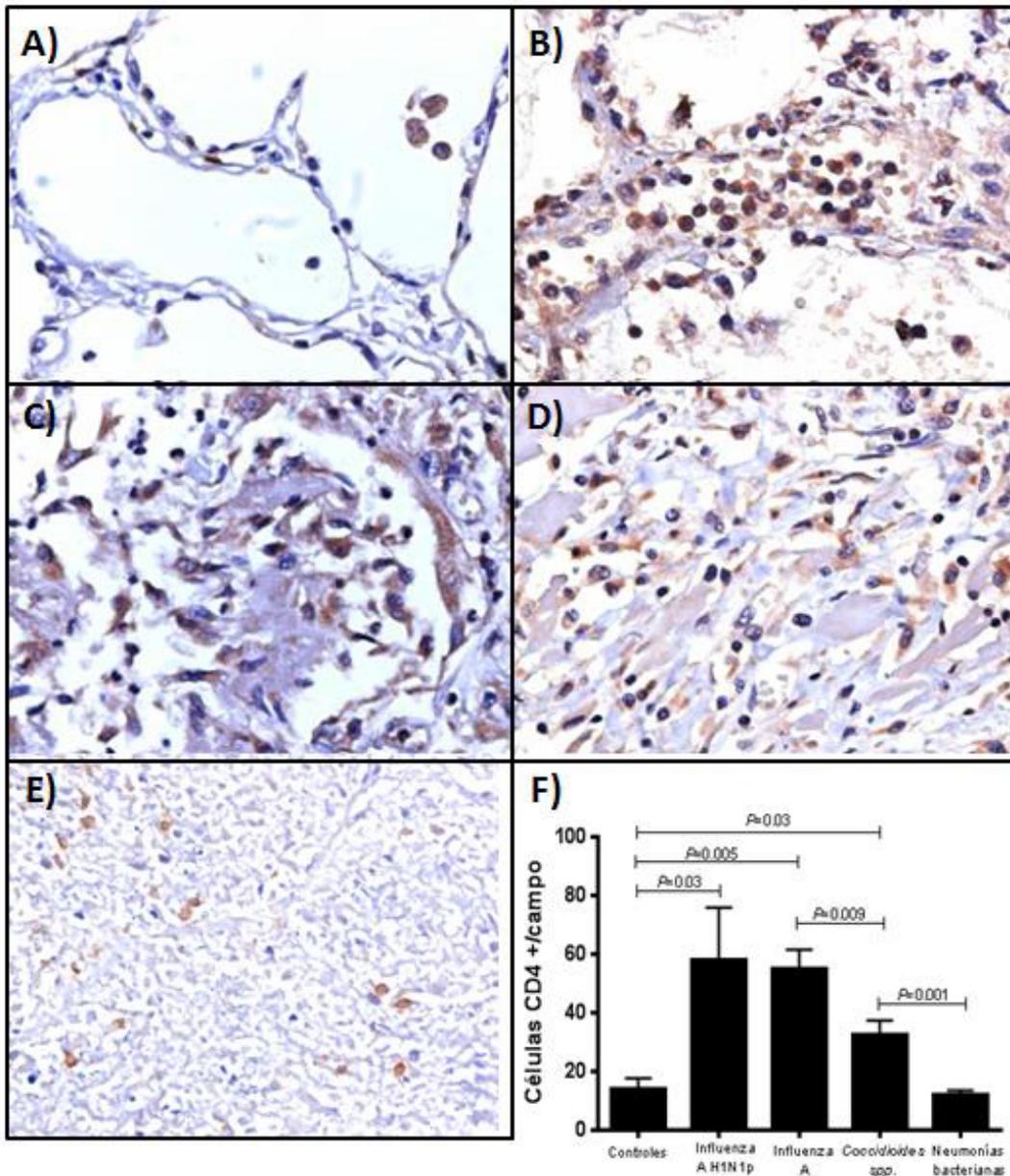


Figura 10. Las células positivas para CD4 estuvieron elevadas en los casos de neumonías por influenza y coccidioidomicosis. A) Control sin infección, B) Neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09, C) Neumonía por influenza estacional, D) Neumonía por *Coccidioides spp.* E) Neumonía bacteriana. Imágenes representativas de todas las inmunohistoquímicas contra CD4 (40X).

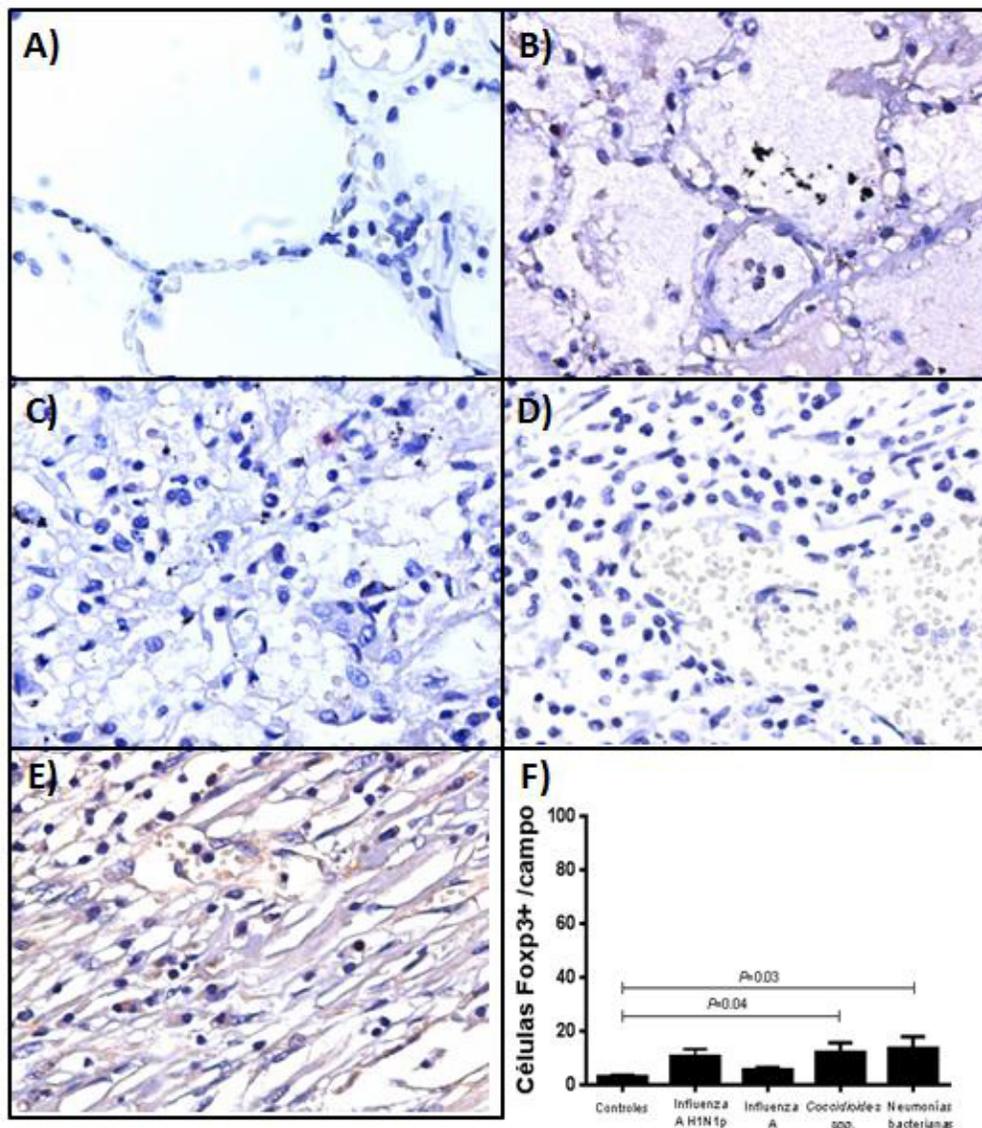


Figura 11. Las células positivas para Foxp3 se encontraron elevadas solo para el grupo de coccidioidomicosis y neumonías bacterianas. A) Control sin infección, B) Neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09, C) Neumonía por influenza estacional, D) Neumonía por *Coccidioides spp.* E) Neumonía bacteriana. Imágenes representativas de todas las inmunohistoquímicas contra Foxp3 (40X).

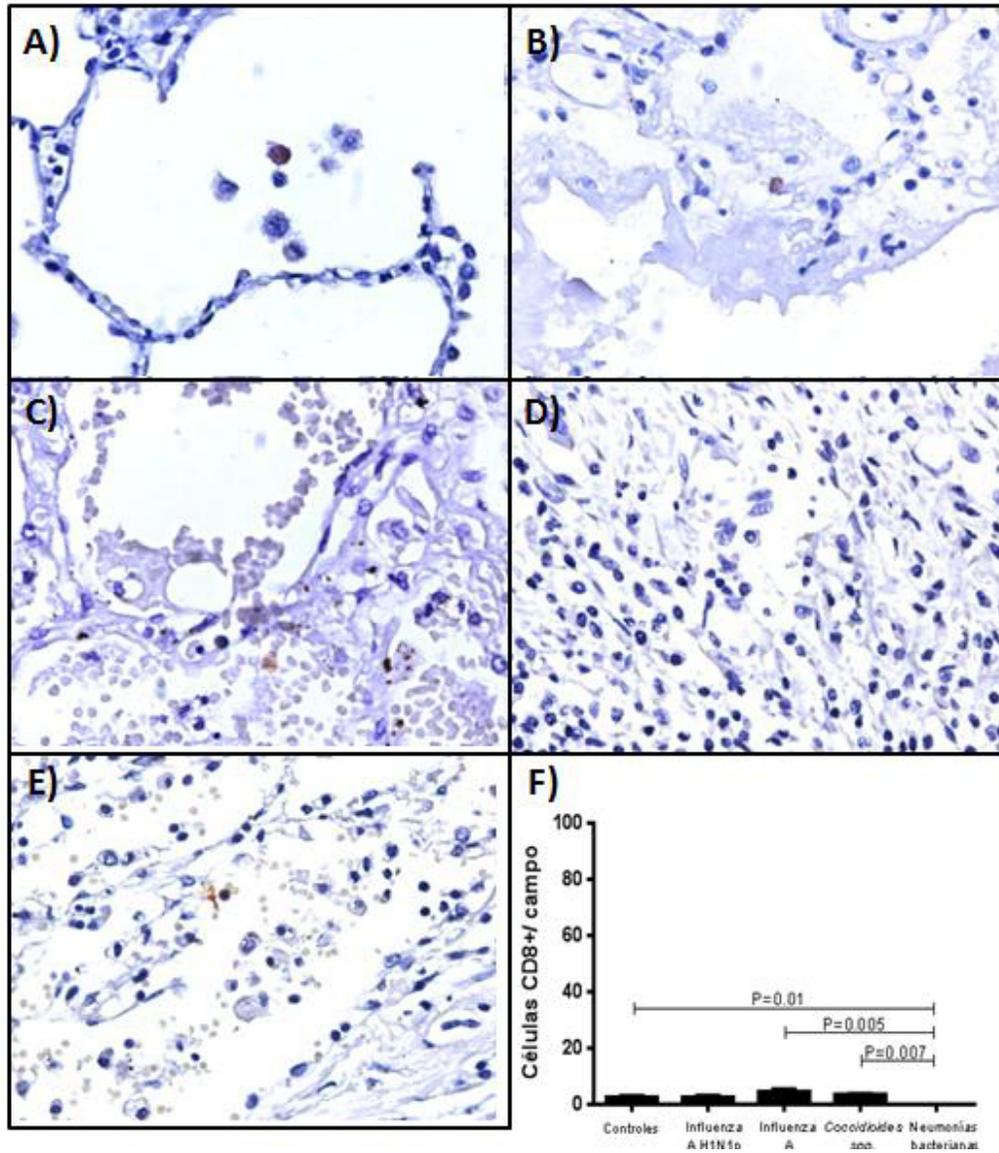


Figura 12. CD8 se encontró sin diferencias entre los grupos de estudio, excepto para las neumonías bacterianas, donde se encontró disminuido. A) Control sin infección, B) Neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09, C) Neumonía por influenza estacional, D) Neumonía por *Coccidioides spp.* E) Neumonía bacteriana. Imágenes representativas de todas las inmunohistoquímicas contra CD8 (40X)

6.3 Citocinas

6.3.1 Expresión génica

En todas las muestras fue posible detectar el gen de referencia GAPDH con un Ct promedio de 26.63 (\pm 2.1) para el caso de los controles sin infección, 27.74 (\pm 1.96) en el caso de influenza pandémica A H1N1 (pdm)09, 32.7 (\pm 11.06) para el caso de influenza estacional, 29.614 (\pm 5.06) para el grupo de coccidioidomicosis y 22.82 (\pm 2.73) para el caso de las neumonías bacterianas. Lo anterior, permitió evaluar los niveles de expresión de citocinas y factores asociados con la polarización de macrófagos. Mediadores inflamatorios como la IL-6 se encontró aumentada 3000 veces la expresión génica en el grupo de influenza pandémica A H1N1 ($P=0.01$), por el contrario para el grupo de influenza estacional se encontró una disminución de 0.08 veces de su expresión ($P=0.007$) cuando fueron comparadas con el grupo de tejido pulmonar no infectado. INOS se encontró con expresión disminuida 0.5 veces para los grupos de influenza pandémica, influenza estacional y coccidioidomicosis ($P\leq 0.01$) comparados con el control no infectado. La expresión génica de IL-10 se encontró aumentada de forma significativa solo para el grupo de influenza A H1N1 (pdm)09 ($P=0.01$), no así para el resto de los grupos de estudio. Resistine Like Beta se encontró con expresión disminuida de forma significativa solo para el grupo de influenza A H1N1 (pdm)09 ($P=0.01$). En el caso de IL-2, IL-4, IL-12, IL-17, IL-23, Arg1, TGF β , IFN γ TNF α no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, figura 13 y figura 14.

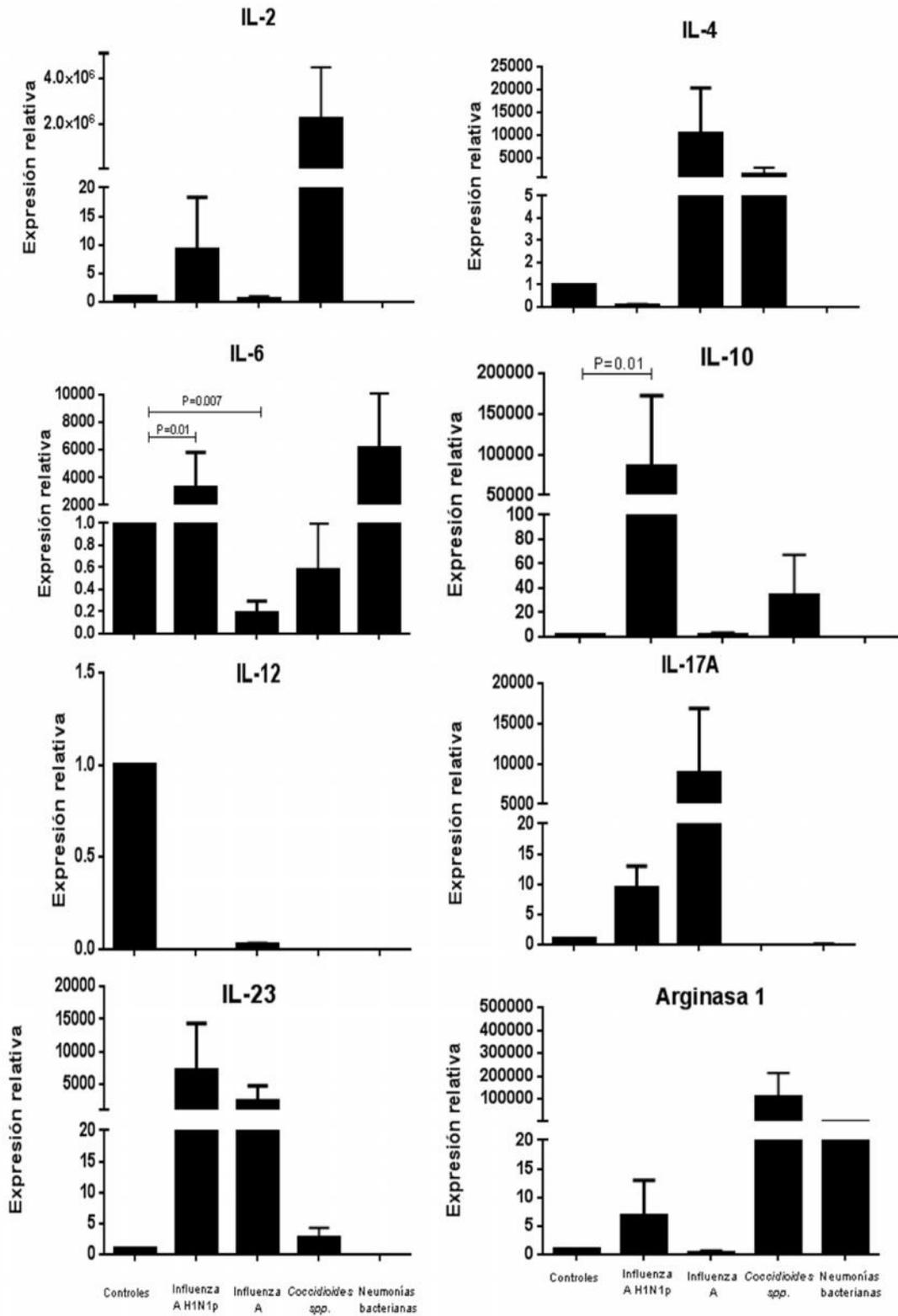


Figura 13. Expresión génica relativa de las citocinas relacionadas con las diferentes subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T.

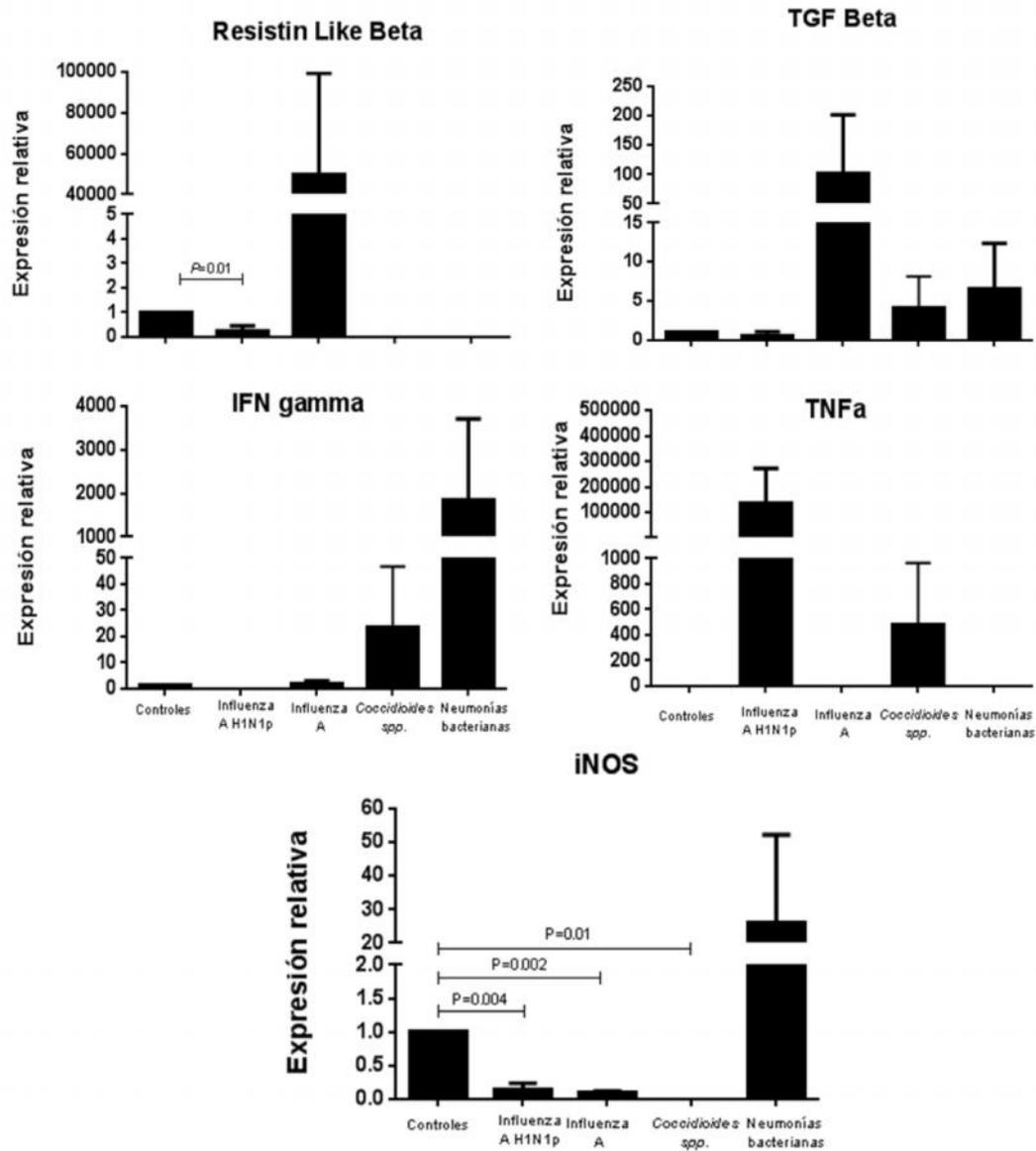


Figura 14. Expresión génica relativa de las citocinas relacionadas con las diferentes subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T.

6.3.2 Elevada presencia de citocinas inflamatorias en pulmón de los diferentes grupos de estudio

Nosotros evaluamos los niveles de citocinas en tejido de pulmón mediante inmunohistoquímica. La IL-4 se encontró elevada para todos los grupos de neumonía, excepto para las neumonías de origen bacteriano ($P < 0.05$), figura 15. No se encontró diferencias significativas entre los grupos de neumonías y el control sin infección para el caso de IL-10 ($P > 0.05$), figura 16. En el caso de IL-17 se encontró aumentada para los grupos de influenza A H1N1 (pdm)09, influenza estacional y neumonías de origen bacteriano ($P < 0.01$), figura 17. $IFN\gamma$ se encontró aumentado en todos los grupos de neumonías ($P > 0.05$), figura 18. Por último, TNF α se encontró en aumento solo para los grupos de neumonía por el virus de la influenza A H1N1 (pdm)09 y estacional ($P \geq 0.03$), figura 19.

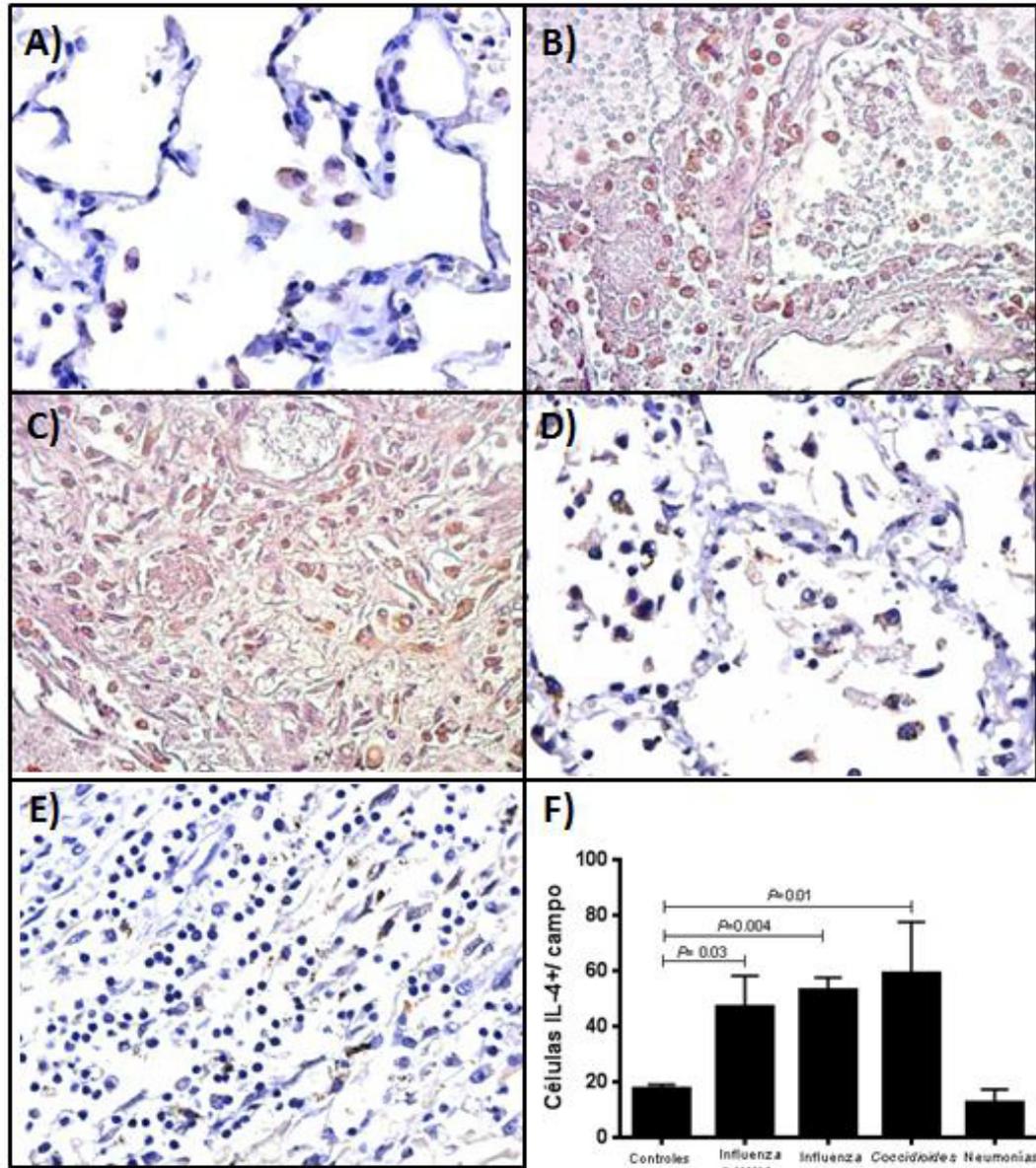


Figura 15. IL-4 se encontró aumentada para todos los grupos de neumonías, excepto la de tipo bacteriano. A) Control sin infección, B) Neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09, C) Neumonía por influenza estacional, D) Neumonía por *Coccidioides spp.* E) Neumonía bacteriana. Imágenes representativas de todas las inmunohistoquímicas contra IL-4 (40X),

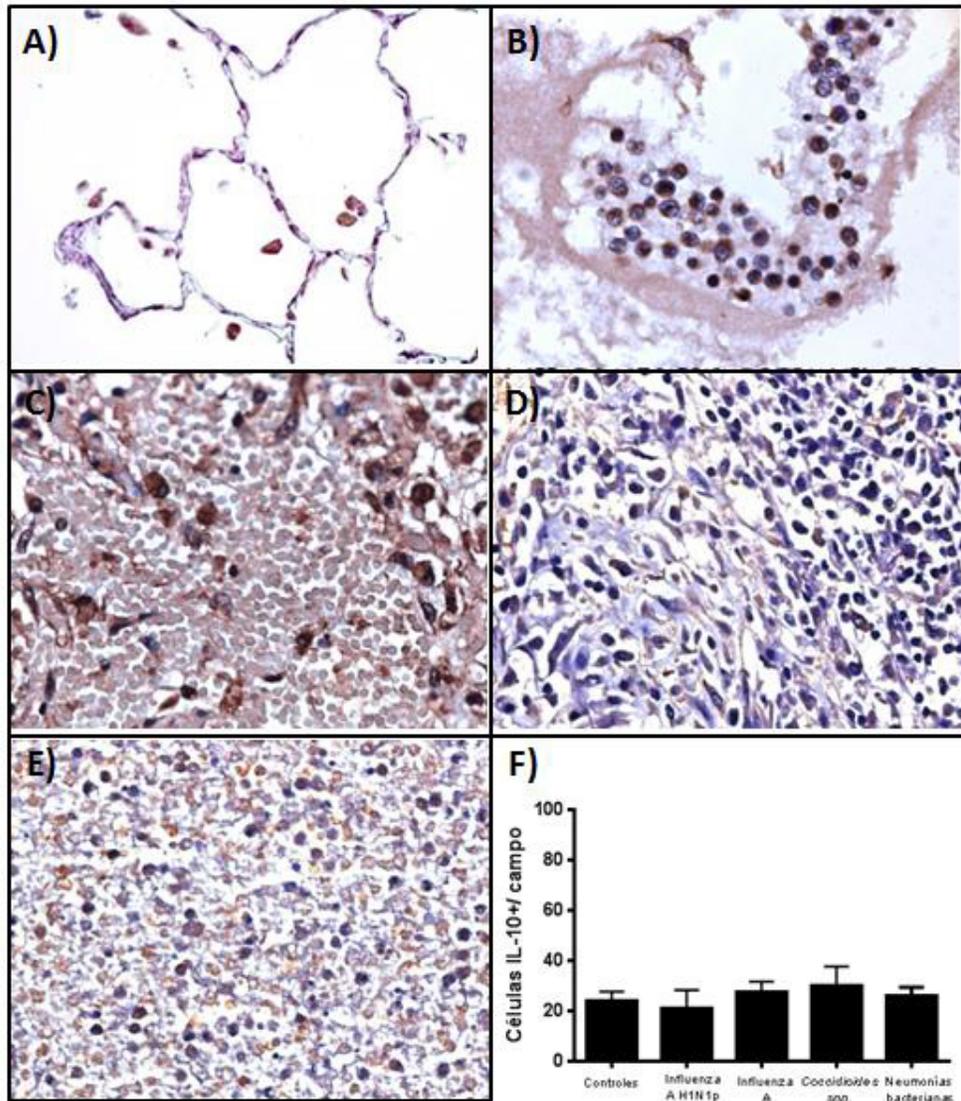


Figura 16. No se encontró diferencia significativa en las cuentas de células positivas para IL-10 entre los diferentes grupos de estudios comparados con el control sin infección. A) Control sin infección, B) Neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09, C) Neumonía por influenza estacional, D) Neumonía por *Coccidioides* spp. E) Neumonía bacteriana. Imágenes representativas de todas las inmunohistoquímicas contra IL-10 (40X)

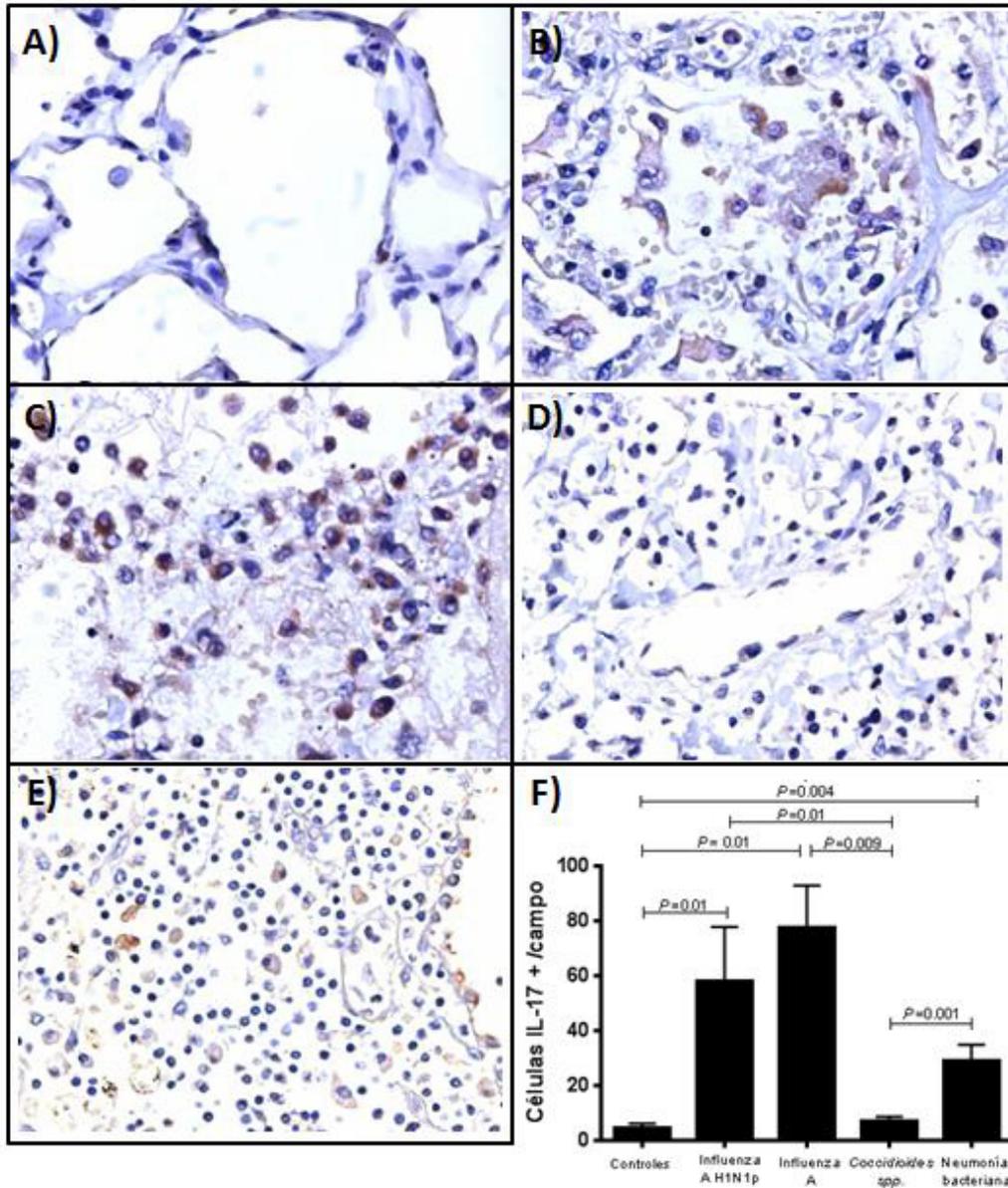


Figura 17. IL-17 se encontró aumentada para ambos grupos de influenza A y el grupo de neumonías de origen bacteriano. A) Control sin infección, B) Neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09, C) Neumonía por influenza estacional, D) Neumonía por *Coccidioides spp.* E) Neumonía bacteriana. Imágenes representativas de todas las inmunohistoquímicas contra IL-17 (40X),

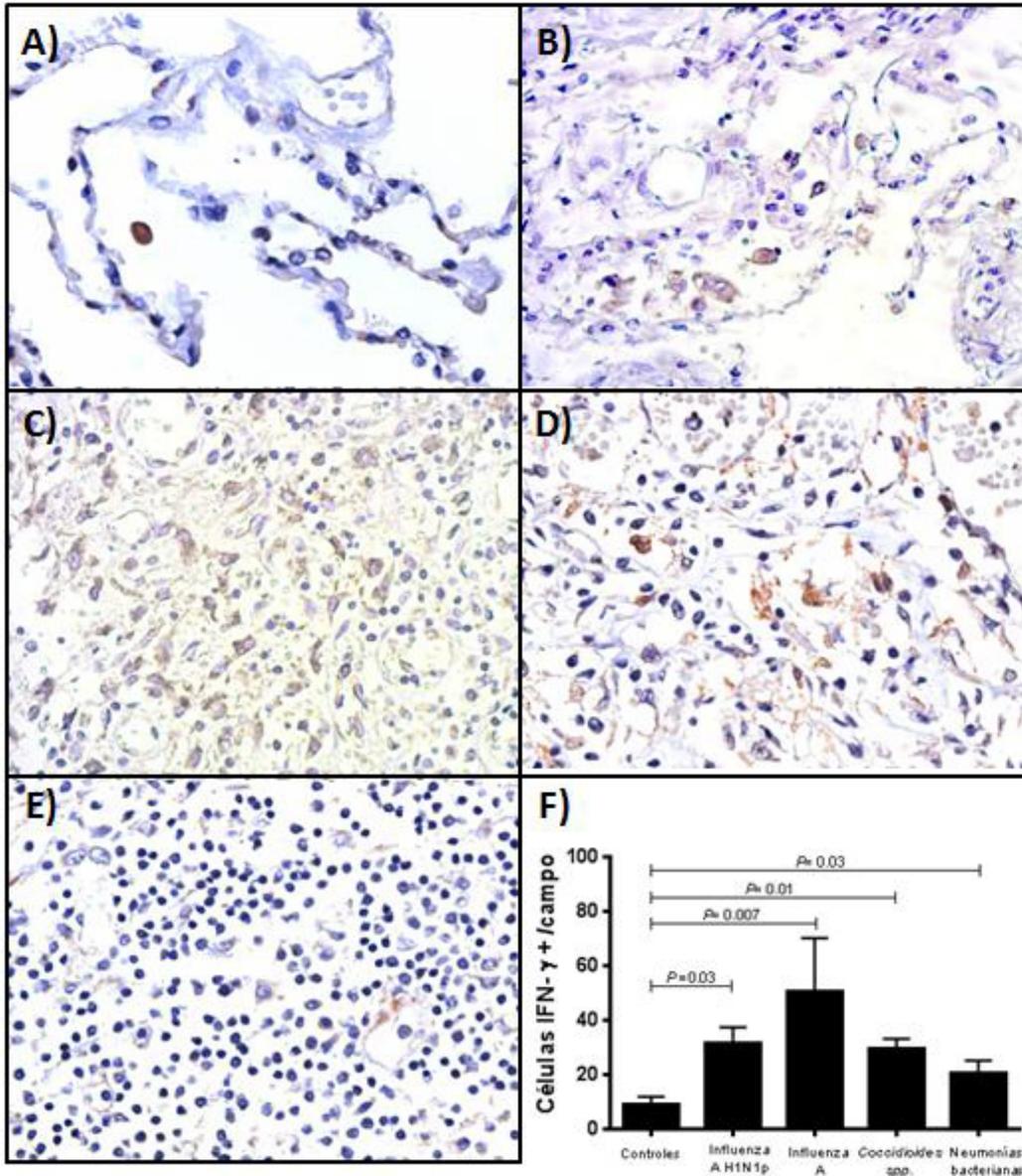


Figura 18. IFN γ se encontró aumentado en todos los grupos de estudio. A) Control sin infección, B) Neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09, C) Neumonía por influenza estacional, D) Neumonía por *Coccidioides* spp. E) Neumonía bacteriana. Imágenes representativas de todas las inmunohistoquímicas contra IFN γ (40X)

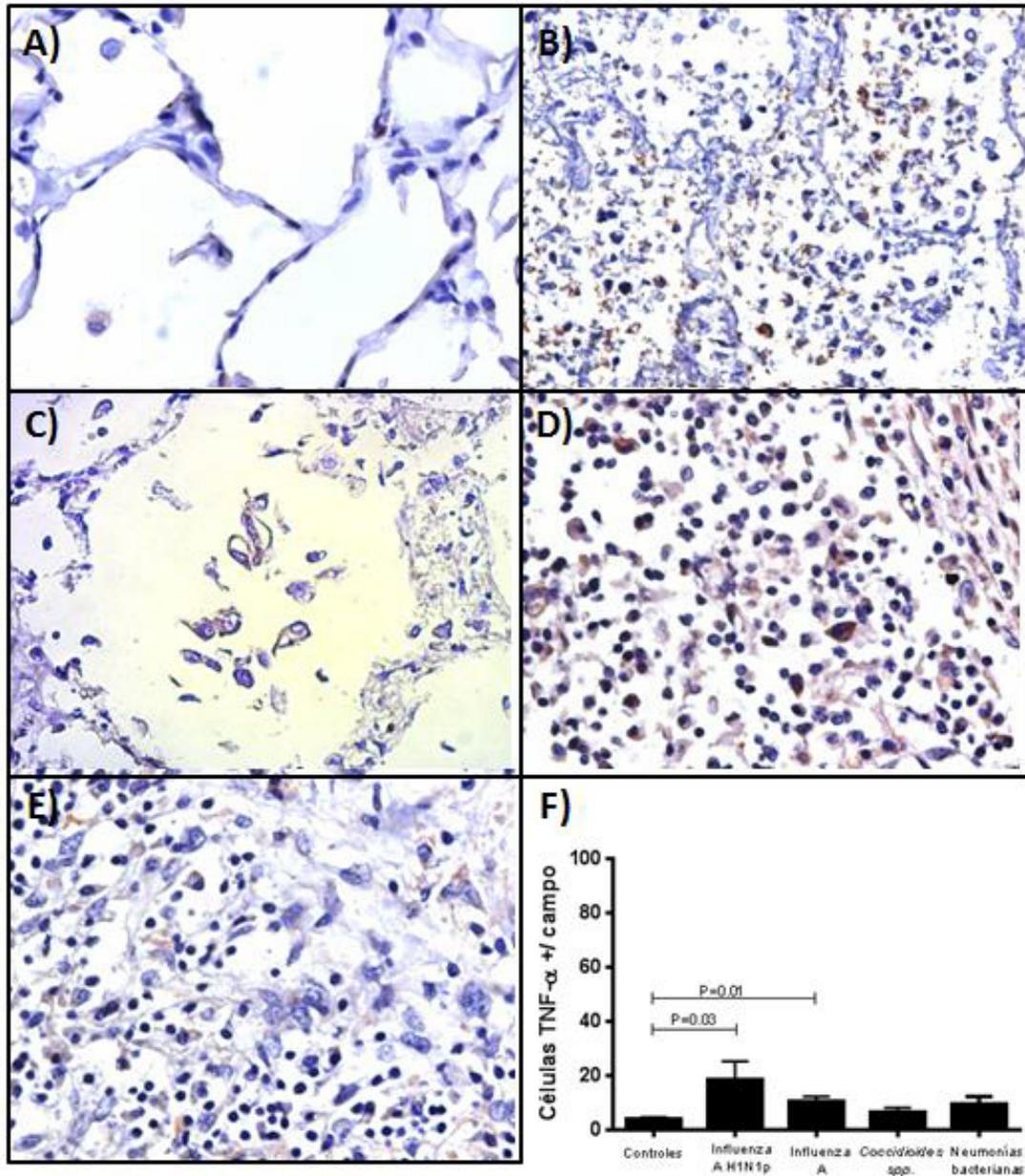


Figura 19. TNF α se encontró aumentado solo para los grupos de influenza A. A) Control sin infección, B) Neumonía por influenza A H1N1 (pdm)09, C) Neumonía por influenza estacional, D) Neumonía por *Coccidioides spp.* E) Neumonía bacteriana. Imágenes representativas de todas las inmunohistoquímicas contra TNF α (40X)

6.3.3 Concentración de citocinas relacionadas con las subpoblaciones celulares

Se logró la recuperación de homogenizado de proteínas del tejido embebido en parafina. Se encontró una mayor concentración de proteínas para el grupo de influenza A H1N1 (pdm)09. Estas muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

Una vez recuperadas las muestras de proteínas de los cuatro grupos de estudios, se corrió una primera placa para la detección múltiple de citocinas, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las diferentes citocinas estudiadas, debido a esto se decidió no proseguir con la recuperación de proteínas y el procesamiento para la detección de citocinas para el grupo de neumonías bacterianas.

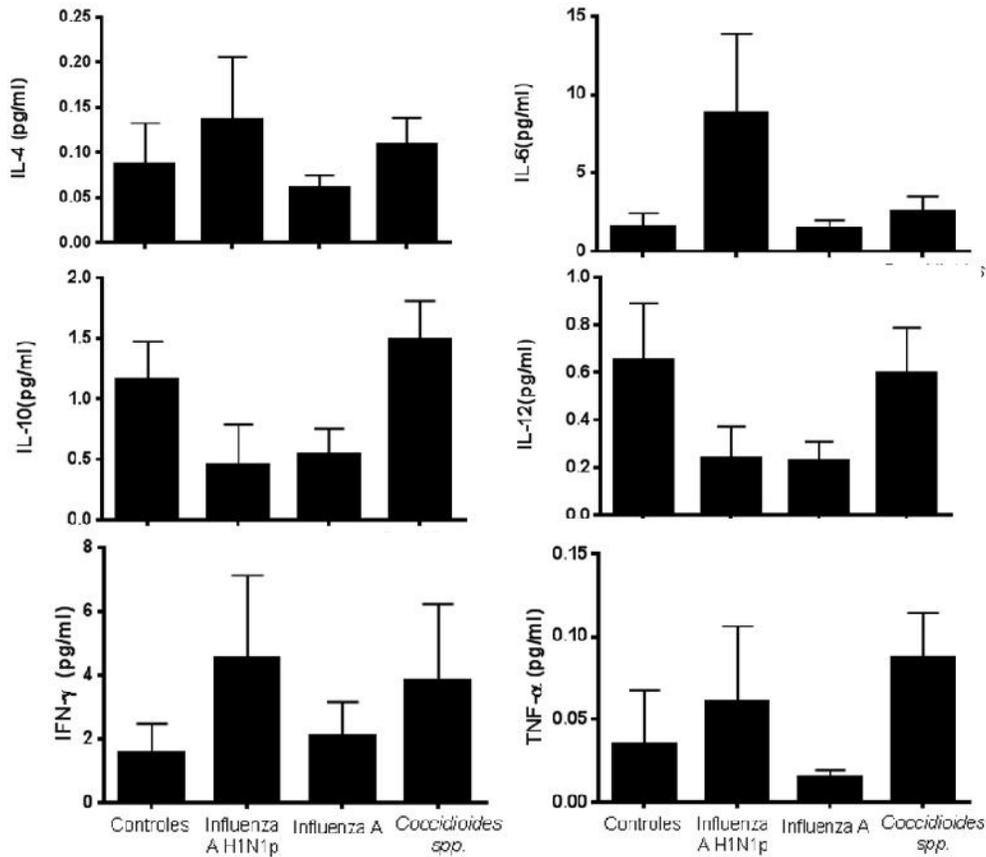


Figura 20. Concentración de citocinas en tejido pulmonar de casos fatales de neumonías.

6.3.4 Expresión génica diferencial por arreglos de PCR

Se determinó la expresión génica diferencial de 84 genes para el grupo de influenza A H1N1 (pdm)09 e influenza estacional y los controles sin infección, de los cuales se eligieron 6 genes de mayor interés para llevar a cabo una posterior validación de su expresión diferencial, los cuales fueron HLA-E, SCL11A1, CXCR3, IRF7, STAT3 e IFNGR1.

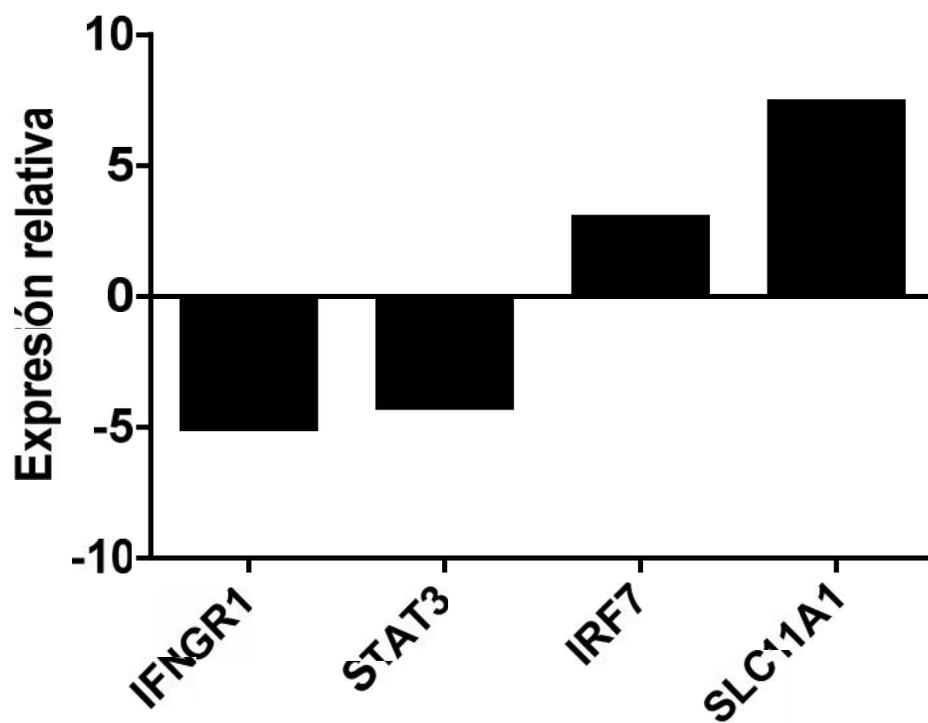


Figura 21. Regulación de la expresión de genes de la respuesta inmune innata y adquirida para el virus de la influenza A H1N1 (pdm)09.

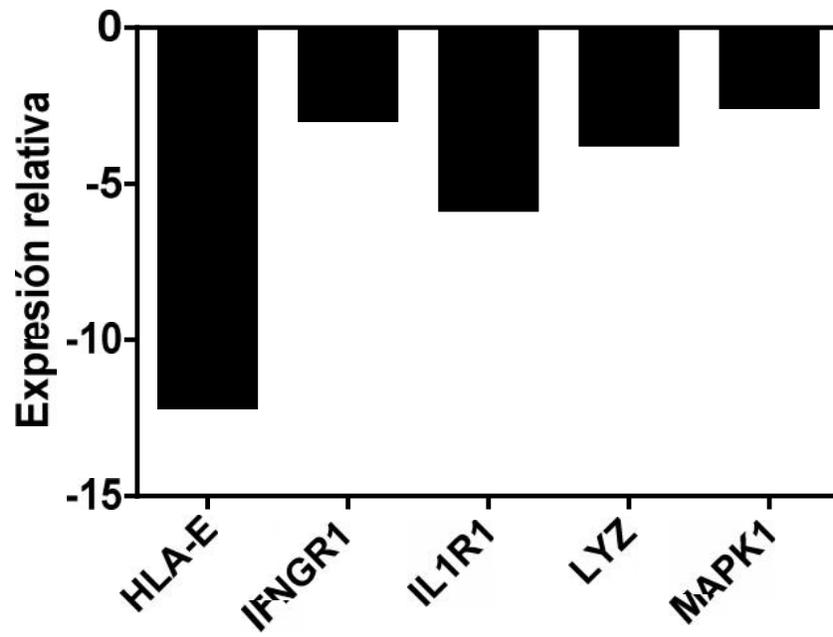


Figura 22. Genes regulados negativamente en el grupo de influenza A estacional.

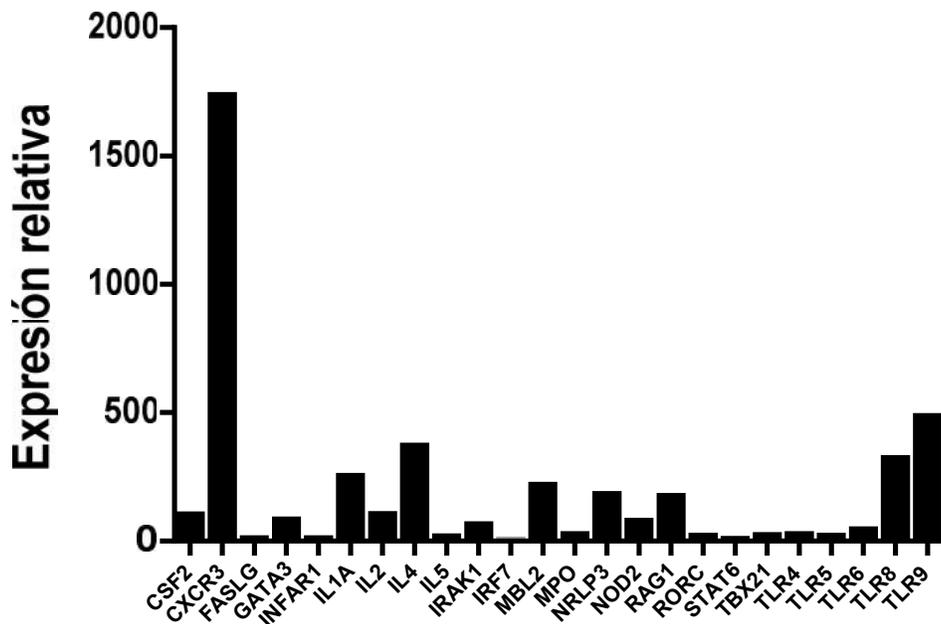


Figura 23. Genes sobre-expresados en el grupo de influenza A estacional. La mayoría de estos genes pertenecen a la repuesta inmune innata, codificando PRRs o moléculas de señalización por PRRs.

7. DISCUSIÓN

7.1 Recuperación de RNA de tejido embebido en parafina y detección del virus de la influenza A

Mantener tejidos embebidos en parafina es una forma estable y barata de conservarlos con potencial uso en investigación clínica (90), sin embargo, su uso en el diagnóstico molecular es limitado, ya que este tipo de muestra presenta varias desventajas tales como son la fragmentación de ácidos nucleicos y modificaciones químicas de macromoléculas (56,57). Estudios han reportado la recuperación de RNA de tejido embebido en parafina mediante kits comerciales y su empleo en ensayos de diagnóstico molecular y búsqueda de biomarcadores por PCR punto final y PCR en tiempo real (91–93), todos estos coinciden en la necesidad de un protocolo estándar de fijación de la muestra, el cual es uno de los factores más importantes que afectan la cantidad y calidad del RNA. En este trabajo se logró demostrar la presencia del virus de la influenza A H1N1 (pdm)09 y el virus de la influenza A estacional en muestras de tejido embebido en parafina mediante el uso de PCR en tiempo real, lo cual también ha sido reportado por otros grupos de trabajo (94,95). Estos hallazgos abren un área de oportunidad para estudiar el virus de la influenza en muestras sospechosas, así como, la patogénesis de infección y la búsqueda de biomarcadores en el tejido pulmonar humano.

7.2 Características de los pacientes

Durante un brote epidémico de influenza se esperan mayores índices de mortalidad comparados con los brotes de tipo estacional (6). Existen diversos factores que predisponen a los pacientes a generar una condición denominada distrés respiratorio agudo (ARDS) esta condición se caracteriza por insuficiencia respiratoria, cianosis e hipoxemia que no mejora con terapia de oxígeno. La obesidad, cardiopatías crónicas, enfermedades pulmonares crónicas (la más importante EPOC), embarazo y diabetes son factores descritos que predisponen a los pacientes a desarrollar ARDS. Todos los pacientes incluidos en este trabajo para ambos grupos de influenza desarrollaron ARDS y presentaron comorbilidades asociadas a ese fenómeno tales como tabaquismo, obesidad, diabetes y cardiopatías crónicas. Además, existen reportes tanto para influenza A H1N1 (pdm)09 como para influenza estacional de los factores de riesgo para desarrollar una forma grave de la infección, los cuales fueron similares a los encontrados en nuestro grupo de estudio (26,27).

Se ha reportado que de los pacientes con necesidad de hospitalización por neumonía a causa del virus de la influenza, durante la pandemia de 2009, el 50% fueron obesos (96), lo cual la coloca la obesidad como un factor de riesgo para desarrollar la forma grave de la infección (97), ya que impide la correcta función pulmonar disminuyendo la capacidad de expansión de la caja torácica (98). Otro factor de riesgo asociado con la infección por el virus de la influenza es el

tabaquismo (99). Un estudio demostró que los extractos del cigarro inhiben a RIG1, IFN- β e IP-10; todas las anteriores participan en la respuesta inmune innata ante el virus de la influenza y pudiera estar relacionado con la susceptibilidad a la infección (100).

La diabetes mellitus y la infección por VIH/SIDA fueron los factores predisponentes más comunes en el grupo de neumonía por coccidioidomicosis. La neumonía por *Coccidioides spp.* pueden ser autolimitadas o con una presentación clínica moderada (101). Sin embargo, los pacientes inmunocomprometidos tienen mayores riesgos de desarrollar complicaciones de esta infección como efusión pleural, empiema o diseminación extrapulmonar como a piel, articulaciones y meninges (102). En nuestro estudio, todos los pacientes con coccidioidomicosis poseían un factor de inmunocompromiso que influyó en el desarrollo de una forma grave de la infección.

En las neumonías de origen bacteriano las comorbilidades más frecuentes fueron diabetes mellitus e hipertensión arterial. Los pacientes diabéticos tienen retraso en la cicatrización de heridas, una deficiente respuesta inmune contra agentes infecciosos en piel. Además de ser un factor predisponente a infecciones nosocomiales (97). Nuestros hallazgos van de acuerdo a lo publicado ya que la mayoría de los casos de neumonías de origen bacteriano fueron de tipo nosocomial.

7.3 Poblaciones celulares presentes en pulmón de pacientes con neumonías

Los neutrófilos son células de la respuesta inmune innata, cuyo papel en la producción del daño en el caso de la infección por el virus de la influenza ya se encuentra bien descrito (76,77) por tanto, nosotros nos interesamos en otro tipo de células. Se evaluaron marcadores de superficie tanto para macrófagos como para linfocitos T. En ambos grupo de influenza se encontraron aumentadas las células CD14+ y CD4+, que son marcadores de macrófagos en general y linfocitos T cooperadores, respectivamente. Sorprendentemente, las cuentas de células CD206+ se encontraron en menores niveles en el grupo de influenza A H1N1 (pdm)09 comparado con influenza A estacional; nosotros estamos reportando por primera vez este hallazgo, no existen en la literatura reportes previos de la presencia o el papel de las células CD206+ en la infección por el virus de la influenza A H1N1 (pdm)09. Dada su función antiinflamatoria a través de la producción de IL-4 e IL10, este hecho podría estar relacionado con la mayor mortalidad observada en los brotes ocasionados por influenza. Por otra parte, CD4 es un marcador de linfocitos T cooperadores, el cual se encontró en mayor número en ambos casos de influenza. Los linfocitos CD4+ específicos para el virus de la influenza pueden ser reclutados al sitio de la infección (103), de estos se observó una abundante infiltración que puede ser la responsable de la alta producción de citocinas inflamatorias como IL-17. Los linfocitos CD4+ (Th1, Th2 y Th17) son productores de IFN- γ , IL-4 e IL-17, respectivamente (70); todas esas citocinas fueron encontradas en altos niveles en tejido pulmonar para ambos

grupos de influenza y podrían ser las responsables en gran medida de la inflamación encontrada en el pulmón. No se encontró diferencia entre las células CD8+ comparadas con el tejido pulmonar sin infección. Se ha reportado que las células CD8+IFN γ + son importantes efectoras en la resolución de la infección por el virus de la influenza (83); nosotros no encontramos un incremento en el reclutamiento de estas células en el sitio de la infección, lo anterior explicaría en parte la pérdida del control de la infección y el desenlace de los pacientes.

En el caso de la neumonía fúngica se encontró una alta presencia de células CD14+, CD206+ y CD4. De estas, los linfocitos Th1 son reconocidos como un factor esencial en la respuesta inmune eficiente contra *Coccidioides spp.*, a través de la producción de IFN γ (101,104). Los macrófagos inflamatorios reclutados al tejido pulmonar también median esta respuesta inmune eficiente contra *Coccidioides spp.* (105), por otro lado, los macrófagos alveolares y macrófagos activados alternativamente CD206+ juegan un papel en la reparación del tejido (106). CD206 se ha reconocido como un importante PRR que reconoce PAMPs fúngicos, específicamente mananos (107,108). Los macrófagos CD206+ son productores de IL-4 e IL-10, ambas citocinas relacionadas con un peor pronóstico para el paciente en el caso de coccidioidomicosis (109–111). Estudios previos demostraron la participación de células CD206+ en inducir la respuesta inmune celular en voluntarios sanos con inmunidad a *Coccidioides spp.* (107), sin embargo, el mecanismo aún no está bien elucidado. Por otra parte, las células CD8+ y Foxp3+ se encontraron en cuentas similares al grupo control sin infección. En modelos animales de coccidioidomicosis se ha demostrado que los linfocitos

CD8 confieren protección ante el hongo a pesar de eliminar las células CD4+ (112) . En nuestro estudio, el deceso del paciente podría estar relacionado con el bajo reclutamiento de células CD8+. En ratones inmunizados con esférulas atenuadas desarrollan niveles más altos de células Tregs (Foxp3+) al ser retados con el hongo sobreviven la infección (113), ésto y el inmunocompromiso en los casos fatales de neumonía por *Coccidioides spp.*, pueden explicar la falla en el reclutamiento de células Foxp3+ que controlen el proceso inflamatorio.

En el caso de las neumonías bacterianas se encontró aumentada la población CD14+; otros investigadores han reportado la importancia de estas células en la activación de células CD4+ en diferentes modelos de neumonía bacteriana (114,115). De forma contraria, un grupo de investigadores ha reportado que las células CD14+ son capaces de inducir apoptosis en linfocitos T, ésto en un modelo *in vitro* de infección por *Streptococcus pneumoniae*; ésto podría ayudar a explicar la baja presencia de células CD4+ en pulmón de casos fatales de neumonías bacterianas. Sin embargo, para corroborar esto es necesario realizar análisis posteriores. No existen reportes de la presencia de células CD206+ en el caso de neumonías bacterianas, ya que en estas los macrófagos suelen ser de tipo M ϕ 1. Una de las poblaciones aumentadas para el grupo de neumonías bacterianas fue Foxp3, de esto se ha descrito un potencial mecanismo de evasión de la respuesta inmune en un modelo de infección *in vitro* mediante la generación de células Foxp3+ que mantengan un ambiente inmunotolerante y por lo tanto permisivo para el patógeno (116). Para finalizar, las células CD8+ se encontraron

disminuidas, lo anterior concuerda con lo reportado donde ratones knockout para CD8 desarrollaron una infección más grave comparados con los ratones wild type (117).

7.4 Niveles de citocinas

Por medio de la técnica de PCR en tiempo real no nos fue posible detectar la amplificación de los genes de nuestro interés en algunas muestras, así como tampoco de todos los genes a estudiar y por tanto, los datos arrojados fueron variables y en pocos de ellos se logró establecer una significancia. Otros grupos de trabajo han encontrado una expresión génica alta de IL-6 e IL-10 en el caso de infección por el virus de la influenza A H1N1 (pdm)09 (25), lo cual concuerda con nuestros hallazgos, sin embargo, estos resultados provienen de células mononucleares de sangre periférica (25). Por otra parte, iNOS es una molécula expresada por los macrófagos de tipo M ϕ 1, la cual se encontró con una expresión génica disminuida en los grupos de influenza y neumonías por *Coccidioides spp.*, lo cual sugiere una falta de activación de los mecanismos microbicidas.

Recientemente, otros grupos de trabajo han sido capaces de determinar concentración de citocinas en pulmón de casos fatales de neumonía por el virus de la influenza (118), una diferencia importante es el procesamiento de la muestra, ya que ellos emplean tejido congelado, mientras en el presente estudio estaba embebidos en parafina. Lo anterior, se explica a la modificación de las proteínas causada por la fijación con formalina debido a la formación de puentes de metilo

(119), lo cual genera un problema para la detección de epítopes de las proteínas debido a que produce cambios conformacionales en ellas (120), a pesar de haber realizado un desenmascaramiento antigénico; no existen reportes del uso de técnicas de desenmascaramiento de antígenos para proteínas totales de tejido y uso posterior en ensayos de tipo ELISA y/o xMAP, es necesario llevar a cabo más pruebas para valorar su potencial uso en este tipo de experimentos.

En nuestro trabajo también se estudiaron citocinas relacionadas con las subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T mediante técnica de inmunohistoquímica. Los resultados en ambos grupos de influenza fueron similares. Altos niveles de citocinas inflamatorias tales como IL-17, IFN γ y TNF- α se encontraron en ambos grupos comparados con el control de tejido sin infección. El rol de IL-17 y el IL-17RA con respecto a la mortalidad y el daño pulmonar inducido por el virus de la influenza A ya se ha reportado con anterioridad (77). En este estudio la IL-17A se encontró elevada en los grupos de influenza, lo que sugiere que la IL-17 liberada tanto por células locales como reclutadas al pulmón contribuyen al daño agudo y al pronóstico del paciente, ya que esta citocina induce la producción de factores quimioattractante de neutrófilos (77), que son los principales efectores del daño tisular. En Brasil, otro grupo de investigadores encontró una fuerte expresión de IFN γ y TNF- α en pulmón de casos fatales de influenza A (H1N1)pdm09 (121). Del mismo modo que en nuestros resultados, altos niveles de TNF- α se encontraron en tres casos fatales de influenza A (H1N1)pdm09, aunque ellos realizaron el hallazgo en sangre; el mismo fenómeno

se reflejó en tejido pulmonar (121). Los altos niveles de IL-17, IFN γ y TNF- α son una sólida evidencia de la fuerte respuesta inflamatoria en el pulmón durante la infección por el virus de la influenza, todos estos hallazgos pueden estar involucrados en el desenlace fatal de los pacientes analizados. La IL-4 es una citocina relacionada con la polarización de macrófagos a M ϕ 2 y de linfocitos a Th2 (122), ésta se encontró elevada en ambos grupos de influenza; resultados similares se han obtenido en plasma de pacientes con infección por el virus de la influenza A H1N1 (pdm)09 y estacional (123,124). Las diferencias que existen entre estos resultados pueden deberse a que la muestra es de un tipo muy diferente, además de la cantidad disponible de muestra. Por otra parte, la IL-10 es una citocina inmunorregulatoria que contrarresta el proceso inflamatorio (27), sin embargo no se encontró diferencia significativa para ambos casos de neumonías por influenza, lo cual sugiere que aunque existe la producción de IL-10, esta no es suficiente para regular el proceso inflamatorio en el caso de las neumonías por influenza A.

A pesar de la intensa respuesta de citocinas en el tejido pulmonar de los casos fatales de influenza, el perfil de estas fue similar en influenza A (H1N1)pdm09 y estacional.

En la neumonía por *Coccidioides spp.* se encontraron altos niveles de IL-4, la cual se considera perjudicial para el paciente, ya que en modelos animales, los ratones susceptibles a la infección producen mayores cantidades de IL-4 que los resistentes (109). Por otra parte, los pacientes con coccidioidomicosis autolimitada tienen predominantemente una respuesta de tipo Th1, mientras altos niveles de

anticuerpos se ha relacionado con un peor pronóstico (125). Además, altos niveles de IFN γ se encontraron en las neumonías por *Coccidioides spp.*, del cual se ha reportado su importancia en la respuesta efectiva contra el hongo (109,126). Animales resistentes a la infección por *C. immitis* expresan mayores niveles de IFN γ comparados con aquellos que sucumben ante la infección (126), el IFN γ podría estar activando la funciones microbicidas del macrófago; a pesar de su presencia en el pulmón de casos fatales de coccidioomicosis, este no parece ser suficiente para controlar la infección o algún otro componente podría estar evitando la señalización a través del receptor de IFN γ . Para TNF α no se encontró un aumento significativo, pero interesantemente la mayor cantidad de células positivas se encontraron en la periferia de las esférulas, este fenómeno también se reflejó para IFN γ , lo cual se ha reportado previamente para el caso de IFN γ (111) .

Para las neumonías bacterianas no se encontró diferencia en la presencia de células IL-4+, comparado con el control sin infección. La vacunación contra *Acinetobacter baumannii*, así como de *Streptococcus equi* induce en modelos animales la producción balanceada de IL-4, así como de IFN γ (127,128); sin embargo, eso se ha reportado en suero y no en pulmón de pacientes. No se encontró diferencia para el caso de IL-10, con respecto a ella se ha sugerido que durante el curso de neumonías de origen bacteriano se favorece la secreción de citocinas de tipo Th1 por encima de las de tipo antiinflamatorio como IL-10 (129). Se ha propuesto por otros investigadores que altos niveles de IL-10 al inicio de la infección bacteriana impide la eliminación de la bacteria, sin embargo, es necesaria en fases más tardías donde regula negativamente la acción de los

neutrófilos en el sitio de la infección (130–132), ésto en modelos animales y cultivos de monocitos proveniente de sangre periférica.

Se encontró aumentada la positividad para IL-17; en múltiples modelos animales de neumonía bacteriana se observa la alta producción de IL-17 en pulmón (133–135), esta alta producción también ha sido observada en cultivos *ex vivo* de células provenientes de lavados broncoalveolares (136). En este trabajo se confirma la alta presencia de células IL-17+ en pulmón de casos fatales de neumonías bacterianas; de las cuales se reconoce que tienen un papel en la eliminación del patógeno y el reclutamiento de células de la respuesta inmune con acción microbicida al sitio de la infección. Se ha encontrado en suero de pacientes altos niveles de IFN γ (123), del mismo modo, nosotros encontramos aumentada esta citocina pero en el sitio de la infección. Esta citocina es capaz de polarizar macrófagos de tipo M ϕ 2 a M ϕ 1 (137), que tengan una mayor actividad microbicida. De forma parecida a IFN γ , TNF α también es una citocina inflamatoria, ésta activa la respuesta de fase aguda de la inflamación y favorece la polarización de macrófagos a un fenotipo inflamatorio (137,138). Sorprendentemente, esta citocina se encontró sin diferencia significativa en pulmón de casos fatales de neumonía bacteriana cuando se comparó con el control sin infección, sugiriendo que las cantidades producidas de esta citocina no son las necesarias para favorecer la eliminación del agente patógeno.

8. CONCLUSIONES

1. Existe un proceso inflamatorio exacerbado en las muestras de pulmón de los pacientes fallecidos por influenza, sin embargo éste no distingue entre pandémica y estacional.
2. Todos los casos fatales estudiados presentaron factores de riesgo, tales como tabaquismo, sobrepeso, diabetes mellitus, cardiopatías crónicas e hipertensión arterial.
3. El marcador de superficie de Mφ2, CD206 se encuentra disminuido en influenza A H1N1 (pdm)09 comparado con influenza A estacional. Por otro lado el CD206 se observó elevado en los pacientes con coccidioidomicosis, éste puede jugar un papel importante en la generación de un ambiente inmunológico que permite la persistencia del agente patógeno.
4. En las muestras de coccidioidomicosis se observa daño crónico e infiltración linfocitaria. El estado de inmunosupresión de estos pacientes puede ser un factor contribuyente que permite la persistencia del hongo.
5. Las neumonías bacterianas fueron principalmente de tipo nosocomial; en ellas se encontró un ambiente principalmente de células y citocinas inflamatorias.

9. PERSPECTIVAS

1. Realizar la validación de la expresión génica de los arreglos de PCR.
2. Corroborar *in vitro* la polarización de macrófagos hacia el tipo M1 o M2 mediante el estímulo con diferentes virus de la influenza.
3. Estudios que comprueben en un modelo animal la polarización de macrófagos hacia el tipo M1 o M2 mediante el estímulo con diferentes virus de la influenza.
4. Estudiar el potencial del redireccionamiento de la respuesta de macrófagos tipo M ϕ 2 a M ϕ 1 mediante el uso de fármacos.
5. Estudios en un modelo animal que permita identificar el mecanismo por el cual persiste el agente patógeno en pulmón y la participación de las células CD206+.

Referencias

1. Michael P, Brabant D. Influenza A induced cellular signal transduction pathways. *Journal of thoracic disease*. 2013;5(s2):s132–s141.
2. Schmolke M, García- Sastre A. Evasion of innate and adaptive immune responses by influenza A virus. *Cellular microbiology*. 2010;12(7):873–80.
3. Rossman JS, Leser GP, Lamb R a. Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *Journal of virology*. 2012 Oct;86(20):10950–60.
4. Vijayakrishnan S, Loney C, Jackson D, Suphamungmee W, Rixon FJ, Bhella D. Cryotomography of budding influenza A virus reveals filaments with diverse morphologies that mostly do not bear a genome at their distal end. *PLoS pathogens*. 2013 Jun;9(6):e1003413.
5. Bialas KM, Desmet E a, Takimoto T. Specific residues in the 2009 H1N1 swine-origin influenza matrix protein influence virion morphology and efficiency of viral spread in vitro. *PloS one*. 2012 Jan;7(11):e50595.
6. Cox N, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annual review of medicine*. 2000;407–21.
7. Taubenberger J, Kash J. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & microbe*. 2010;7(6):440–51.
8. Ozawa M, Kawaoka Y. Cross Talk Between Animal and Human Influenza Viruses. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2013 Jan;1(1):21–42.
9. Shi W, Lei F, Zhu C, Sievers F, Higgins DG. A complete analysis of HA and NA genes of influenza A viruses. *PloS one*. 2010 Jan;5(12):e14454.
10. Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo D a A, Chen L-M, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 Mar 13;109(11):4269–74.
11. Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Annual review of pathology*. 2008 Jan;3:499–522.
12. Memorandum WHO. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*. 1980;58:585–91.
13. Rossman JS, Lamb R a. Influenza virus assembly and budding. *Virology*. Elsevier Inc.; 2011 Mar 15;411(2):229–36.

14. Ma W, Belisle SE, Mosier D, Li X, Stigger-Rosser E, Liu Q, et al. 2009 pandemic H1N1 influenza virus causes disease and upregulation of genes related to inflammatory and immune responses, cell death, and lipid metabolism in pigs. *Journal of virology*. 2011 Nov;85(22):11626–37.
15. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *Journal of virology*. 1998 Sep;72(9):7367–73.
16. Manuscript A. Historical thoughts on influenza viral ecosystems, or behold a pale horse, dead dogs, failing fowl, and sick swine. *Influenza Other Resp Viruses*. 2011;4(6):327–37.
17. Cong Y, Wang G, Guan Z, Chang S, Zhang Q, Yang G, et al. Reassortant between human-Like H3N2 and avian H5 subtype influenza A viruses in pigs: a potential public health risk. *PloS one*. 2010 Jan;5(9):e12591.
18. WHO. Influenza (seasonal) [Internet]. 2009 [cited 2013 Sep 23]. Available from: <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs211/en/index.html>
19. Gustin KM, Katz JM, Tumpey TM, Maines TR. Comparison of the levels of infectious virus in respirable aerosols exhaled by ferrets infected with influenza viruses exhibiting diverse transmissibility phenotypes. *Journal of virology*. 2013 Jul;87(14):7864–73.
20. Bischoff WE, Swett K, Leng I, Peters TR. Exposure to influenza virus aerosols during routine patient care. *The Journal of infectious diseases*. 2013 Apr;207(7):1037–46.
21. WHO. Influenza virus infection in humans [Internet]. 2013 [cited 2013 Sep 23]. Available from: http://www.who.int/influenza/GIP_InfluenzaVirusInfectionsHumans_July13.pdf
22. WHO. Current WHO phase or pandemic alert for Pandemic (H1N1) 2009 [Internet]. 2009 [cited 2013 Sep 23]. Available from: <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/phase/en/>
23. López CDH, Roca RF, Daunis JV. Pneumonia and the acute respiratory distress syndrome due to influenza A (H1N1) virus. *Medicina intensiva*. 2009 Dec;33(9):455–8.
24. Arankalle V a, Lole KS, Arya RP, Tripathy AS, Ramdasi AY, Chadha MS, et al. Role of host immune response and viral load in the differential outcome of pandemic H1N1 (2009) influenza virus infection in Indian patients. *PloS one*. 2010 Jan;5(10).

25. Bermejo-Martin JF, Martin-Loeches I, Rello J, Antón A, Almansa R, Xu L, et al. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Critical care (London, England)*. 2010 Jan;14(5):R167.
26. Hagau N, Slavcovici A, Gongnanau DN, Oltean S, Dirzu DS, Brezozski ES, et al. Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. *Critical Care. BioMed Central Ltd*; 2010;14(6):R203.
27. Yu H, Feng Z, Uyeki TM, Liao Q, Zhou L, Feng L, et al. Risk factors for severe illness with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in China. *Clinical infectious diseases*. 2011 Feb 15;52(4):457–65.
28. Louie JK, Acosta M, Samuel MC, Schechter R, Vugia DJ, Harriman K, et al. A novel risk factor for a novel virus: obesity and 2009 pandemic influenza A (H1N1). *Clinical infectious diseases*. 2011 Feb 1;52(3):301–12.
29. Rello J, Rodríguez A, Ibañez P, Socias L, Cebrian J, Marques A, et al. Intensive care adult patients with severe respiratory failure caused by Influenza A (H1N1)v in Spain. *Critical care*. 2009 Jan;13(5):R148.
30. Decramer EM, Rossi A, Pelosi P, Brazzi L, Gattinoni L. Prone position in acute respiratory distress syndrome. *Eur Respiratory Journal*. 2002;20(3):1017–28.
31. Jabbari A et al. Lung protection strategy as an effective treatment in acute respiratory distress syndrome. *Caspian J Intern Med*. 2013;4(1):560–3.
32. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging infectious diseases*. 2006 Jan;12(1):15–22.
33. Morens DM, Fauci AS. The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century. *The Journal of infectious diseases*. 2007 Apr 1;195(7):1018–28.
34. Simonsen L. The global impact of influenza on morbidity and mortality. *Vaccine*. 1999 Jul 30;17 Suppl 1:S3–10.
35. Cho KJ, Hong KW, Kim S-H, Seok JH, Kim S, Lee J-H, et al. Insight into highly conserved H1 subtype-specific epitopes in influenza virus hemagglutinin. *PLoS one*. 2014 Jan;9(2):e89803.
36. Salud S de. Perfil epidemiológico de la pandemia de Influenza A (H1N1) 2009 en México [Internet]. México, Distrito Federal: Subsecretaría de prevención y promoción de la salud; 2011. Available from: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_PANDEMIA_INFLUENZA_A_H1N1_2009_MEXICO.pdf

37. Fajardo-Dolci G. Perfil epidemiológico de la mortalidad por influenza humana A (H1N1) en México. *Salud pública de México*. 2009;51(5):361–71.
38. Salud S de. Situación actual de la epidemia [Internet]. 2010 [cited 2013 Sep 24]. Available from: http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/influenza/situacion_actu_al_de_la_epidemia_190710.pdf
39. CDC. 2009-2010 Influenza season summary [Internet]. 2011 [cited 2013 Sep 25]. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/weekly/weeklyarchives2009-2010/09-10summary.htm>
40. WHO. Evolution of a pandemic: A(H1N1) 2009, April 2009-August 2010. 2nd ed. Rashford A, editor. Switzerland: WHO Press; 2010.
41. Kohlmeier JE, Woodland DL. Immunity to respiratory viruses. *Annual review of immunology*. 2009 Jan;27:61–82.
42. Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nature reviews. Immunology*. Nature Publishing Group; 2010 Jul;10(7):514–26.
43. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. 2011 Feb;30(1):16–34.
44. Hale B, Albrecht R, García-Sastre A. Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future microbiology*. 2010;62623:1–29.
45. Pothlichet J, Meunier I, Davis BK, Ting JP-Y, Skamene E, Von Messling V, et al. Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells. *PLoS pathogens*. 2013 Apr;9(4):e1003256.
46. Janeway C a, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002 Jan;20(2):197–216.
47. Dunne A, Neill LAJO. The Interleukin-1 Receptor / Toll-Like Receptor Superfamily. *Science´s skte*. 2003;(February):1–17.
48. Wu W, Zhang W, Booth JL, Metcalf JP. Influenza A(H1N1)pdm09 virus suppresses RIG-I initiated innate antiviral responses in the human lung. *PloS one*. 2012 Jan;7(11):e49856.
49. Wu W, Zhang W, Booth JL, Metcalf JP. Influenza A (H1N1) pdm09 Virus Suppresses RIG-I Initiated Innate Antiviral Responses in the Human Lung. *PloS one*. 2012;7(11):1–11.

50. Dienz O, Rud JG, Eaton SM, Lanthier P a, Burg E, Drew A, et al. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. *Mucosal immunology*. Nature Publishing Group; 2012 May;5(3):258–66.
51. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology*. 2012 Jan;30:459–89.
52. Guilliams M, Lambrecht BN, Hammad H. Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal immunology*. Nature Publishing Group; 2013;00(October 2012):1–10.
53. Russo E, Nitschke M, Halin C. Dendritic Cell Interactions with Lymphatic Endothelium. *Lymphatic research and biology*. 2013;11(3):172–82.
54. Lambrecht BN, Hammad H. Review Biology of Lung Dendritic Cells at the Origin of Asthma. *Immunity*. Elsevier Inc.; 2009;31(3):412–24.
55. Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *TheScientificWorldJournal*. 2011 Jan;11:2391–402.
56. Mehta A, Brewington R, Chatterji M, Zoubine M, Kinasewitz GT, Peer GT, et al. Infection-Induced Modulation of M1 and M2 Phenotypes in Circulating Monocytes: Role in Immune Monitoring and Early Prognosis of Sepsis. *Shock*. 2004 Nov;22(5):423–30.
57. Bhatia M, Zemans RL, Jeyaseelan S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2012 May;46(5):566–72.
58. Benoit M, Desnues B, Mege J-L. Macrophage polarization in bacterial infections. *Journal of immunology*. 2008 Sep 15;181(6):3733–9.
59. Hoeve M a, Nash A a, Jackson D, Randall RE, Dransfield I. Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation. *PloS one*. 2012 Jan;7(1):e29443.
60. Hoeve M a, Nash A a, Jackson D, Randall RE, Dransfield I. Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation. *PloS one*. 2012 Jan;7(1):e29443.

61. McGill J, Heusel JW, Legge KL. Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *Journal of leukocyte biology*. 2009 Oct;86(4):803–12.
62. Thevenot P, Saravia J, Giaimo J, Happel KI, Dugas TR, Cormier S a. Chronic Alcohol Induces M2 Polarization Enhancing Pulmonary Disease Caused by Exposure to Particulate Air Pollution. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2013 Nov;37(11):1910–9.
63. Thepen BT, Rooijen NVAN, Kraal G. Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immuneresponse in mice. *Journal of experimental medicine*. 1989;170(August).
64. Schneider C, Nobs SP, Heer AK, Kurrer M, Klinke G, Van Rooijen N, et al. Alveolar macrophages are essential for protection from respiratory failure and associated morbidity following influenza virus infection. *PLoS pathogens*. 2014 Apr;10(4):e1004053.
65. Reed JL, Brewah Y a, Delaney T, Welliver T, Burwell T, Benjamin E, et al. Macrophage impairment underlies airway occlusion in primary respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of infectious diseases*. 2008 Dec 15;198(12):1783–93.
66. Ghoneim HE, Thomas PG, McCullers J a. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2013 Aug 1;191(3):1250–9.
67. Cohn L, Delamarre L. Dendritic Cell-Targeted Vaccines. *Frontiers in Immunology*. 2014 May 30;5(May):1–11.
68. Campbell DJ, Kim CH, Butcher EC. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunological reviews*. 2003 Oct;195:58–71.
69. Chen K, Kolls JK. T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Annual review of immunology*. 2013 Jan;31:605–33.
70. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology*. 2010 Jan;28:445–89.
71. Lee MK, Xu S, Fitzpatrick EH, Sharma A, Graves HL, Czerniecki BJ. Inhibition of CD4+CD25+ Regulatory T Cell Function and Conversion into Th1-Like Effectors by a Toll-Like Receptor-Activated Dendritic Cell Vaccine. *PloS one*. 2013 Jan;8(11):e74698.
72. Hillesheim A, Nordhoff C, Boergeling Y, Ludwig S, Wixler V. Beta-catenin promotes the type I IFN synthesis and the IFN-dependent signaling response

but is suppressed by influenza A virus-induced RIG-I/NF-kappaB signaling. *Cell communication and signaling*. 2014 Apr 26;12(1):29.

73. Zhao G, Liu C, Kou Z, Gao T, Pan T, Wu X, et al. Differences in the pathogenicity and inflammatory responses induced by avian influenza A/H7N9 virus infection in BALB/c and C57BL/6 mouse models. *PloS one*. 2014 Jan;9(3):e92987.
74. Matsuse H, Behera a K, Kumar M, Rabb H, Lockey RF, Mohapatra SS. Recurrent respiratory syncytial virus infections in allergen-sensitized mice lead to persistent airway inflammation and hyperresponsiveness. *Journal of immunology*. 2000 Jun 15;164(12):6583–92.
75. Hung IF, To KK, Lee C-K, Lee K-L, Chan K, Yan W-W, et al. Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America [Internet]*. 2011 Feb 15 [cited 2012 Sep 27];52(4):447–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248066>
76. Sichelstiel A, Yadava K, Trompette A, Salami O, Iwakura Y, Nicod LP, et al. Targeting IL-1 β and IL-17A Driven Inflammation during Influenza-Induced Exacerbations of Chronic Lung Inflammation. *PloS one*. 2014 Jan;9(2):e98440.
77. Crowe CR, Chen K, Pociask D a, Alcorn JF, Krivich C, Enelow RI, et al. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *Journal of immunology*. 2009 Oct 15;183(8):5301–10.
78. Maroof A, Yorgensen YM, Li Y, Evans JT. Intranasal vaccination promotes detrimental Th17-mediated immunity against influenza infection. *PLoS pathogens*. 2014 Jan;10(1):e1003875.
79. Manuscript A, Development T, Acute A, Infections V. The Development and Function of Memory Regulatory T Cells After Acute Viral Infections. *J. Immunol*. 2013;189(6):2805–14.
80. Beatriz León, John E. Bradley, Frances E. Lund TDR& AB-T. FoxP3+ regulatory T cells promote influenza-specific Tfh responses by controlling IL-2 availability. *Nature communications*. 2014;5(3495).
81. Kraft ARM, Wlodarczyk MF, Kenney LL, Selin LK. PC61 (anti-CD25) treatment inhibits influenza A virus-expanded regulatory T cells and severe lung pathology during a subsequent heterologous lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Journal of virology*. 2013 Dec;87(23):12636–47.

82. Wang S-M, Tsai M-H, Lei H-Y, Wang J-R, Liu C-C. The regulatory T cells in anti-influenza antibody response post influenza vaccination. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2012 Sep;8(9):1243–9.
83. Sridhar S, Begom S, Bermingham A, Hoschler K, Adamson W, Carman W, et al. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nature medicine*. 2013 Oct;19(10):1305–12.
84. Hufford MM, Kim TS, Sun J, Braciale TJ. Antiviral CD8+ T cell effector activities in situ are regulated by target cell type. *The Journal of experimental medicine*. 2011 Jan 17;208(1):167–80.
85. Hamada H, Garcia-Hernandez MDLL, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, et al. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *Journal of immunology*. 2009 Mar 15;182(6):3469–81.
86. Sun J, Braciale TJ. Role of T cell immunity in recovery from influenza virus infection. *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V.; 2013;3(4):425–9.
87. Holloway TL, Schwacha MG. The Th-17 response and its potential role in post-injury pulmonary complications. *International journal of burns and trauma*. 2012 Jan;2(1):11–7.
88. Longhi MP, Williams A, Wise M, Morgan BP, Gallimore A. CD59a deficiency exacerbates influenza-induced lung inflammation through complement-dependent and -independent mechanisms. *European journal of immunology*. 2007 May;37(5):1266–74.
89. Livak KJ & S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402–8.
90. Arzt L, Kothmaier H, Quehenberger F, Halbwedl I, Wagner K, Maierhofer T, et al. Evaluation of formalin-free tissue fixation for RNA and microRNA studies. *Experimental and molecular pathology*. 2011 Oct;91(2):490–5.
91. Nam SK, Im J, Kwak Y, Han N, Nam KH, Seo AN, et al. Effects of fixation and storage of human tissue samples on nucleic Acid preservation. *Korean journal of pathology*. 2014 Feb;48(1):36–42.
92. Takano E a, Mikeska T, Dobrovic A, Byrne DJ, Fox SB. A multiplex endpoint RT-PCR assay for quality assessment of RNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC biotechnology*. 2010 Jan;10:89.

93. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic acids research*. 1999 Nov 15;27(22):4436–43.
94. Denison AM, Blau DM, Jost H a, Jones T, Rollin D, Gao R, et al. Diagnosis of influenza from respiratory autopsy tissues: detection of virus by real-time reverse transcription-PCR in 222 cases. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2011 Mar;13(2):123–8.
95. Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, et al. The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Japanese journal of infectious diseases*. 2010 Jan;63(1):67–71.
96. Louie JK, Acosta M, Samuel MC, Schechter R, Vugia DJ, Harriman K, et al. A novel risk factor for a novel virus: obesity and 2009 pandemic influenza A (H1N1). *Clinical infectious diseases*. 2011 Feb 1;52(3):301–12.
97. Mancuso P. Obesity and respiratory infections: does excess adiposity weigh down host defense ? *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. Elsevier Ltd; 2013 Aug;26(4):412–9.
98. Rabec C, De Lucas Ramos P, Veale D. Complicaciones respiratorias de la obesidad. *Archivos de bronconeumología. SEPAR*; 2011 May;47(5):252–61.
99. Nath KD, Burel JG, Shankar V, Pritchard AL, Towers M, Looke D, et al. Clinical factors associated with the humoral immune response to influenza vaccination in chronic obstructive pulmonary disease. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2014 Jan;9:51–6.
100. Wu W, Patel KB, Booth JL, Zhang W, Metcalf JP. Cigarette smoke extract suppresses the RIG-I-initiated innate immune response to influenza virus in the human lung. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2011. p. L821–30.
101. Magee DM, Cox R a. Interleukin-12 regulation of host defenses against *Coccidioides immitis*. *Infection and immunity*. 1996 Sep;64(9):3609–13.
102. Blair JE, Mayer AP, Currier J, Files J a, Wu Q. Coccidioidomycosis in elderly persons. *Clinical infectious diseases*. 2008 Dec 15;47(12):1513–8.
103. Kelso A. CD4+ T cells limit the damage in influenza. *Nat med*. 2011;18(2):200–2.

104. Hung C-Y, Gonzalez A, Wüthrich M, Klein BS, Cole GT. Vaccine immunity to coccidioidomycosis occurs by early activation of three signal pathways of T helper cell response (Th1, Th2, and Th17). *Infection and immunity*. 2011 Nov;79(11):4511–22.
105. Cole G, Hurtgen B, Hung C. Progress toward a human vaccine against coccidioidomycosis. *Current fungal infection reports*. 2012;6(4):235–44.
106. Kaku Y, Imaoka H, Morimatsu Y, Komohara Y, Ohnishi K, Oda H, et al. Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on Alveolar Macrophages in the Lungs of Patients with Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PloS one*. 2014 Jan 3;9(1):e87400.
107. Ampel NM, Nelson DK, Li L, Dionne SO, Lake DF, Simmons KA, et al. The Mannose Receptor Mediates the Cellular Immune Response in Human Coccidioidomycosis. *Infection and immunity*. 2005;73(4):2554–5.
108. Azad A, Rajaram M, Schlesinger L. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J Cytol Molecul Biol*. 2014;1(1):1–9.
109. Magee DM, Cox R a. Roles of gamma interferon and interleukin-4 in genetically determined resistance to *Coccidioides immitis*. *Infection and immunity*. 1995 Sep;63(9):3514–9.
110. Fierer J. IL-10 and susceptibility to *Coccidioides immitis* infection. *Trends in microbiology*. 2006 Oct;14(10):423–6.
111. Li L, Dial SM, Schmelz M, Rennels MA, Ampel NM, Mmun INI. Cellular Immune Suppressor Activity Resides in Lymphocyte Cell Clusters Adjacent to Granulomata in Human Coccidioidomycosis. *Infection and immunity*. 2005;73(7):3923–8.
112. Fierer J, Waters C, Walls L. Both CD4+ and CD8+ T cells can mediate vaccine-induced protection against *Coccidioides immitis* infection in mice. *The Journal of infectious diseases*. 2006 May 1;193(9):1323–31.
113. Loures F V, Pina A, Felonato M, Araújo EF, Leite KRM, Calich VLG. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. *Infection and immunity*. 2010 Mar;78(3):1078–88.
114. Moens L, Wuyts G, Boon L, Den Hartog MT, Ceuppens JL, Bossuyt X. The human polysaccharide- and protein-specific immune response to *Streptococcus pneumoniae* is dependent on CD4(+) T lymphocytes, CD14(+) monocytes, and the CD40-CD40 ligand interaction. *The Journal of allergy*

and clinical immunology. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*; 2008 Dec;122(6):1231–3.

115. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, Tshimbalanga N, et al. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006 Jan 1;173(1):122–9.
116. Taylor AL, Llewelyn MJ. Superantigen-induced proliferation of human CD4+CD25- T cells is followed by a switch to a functional regulatory phenotype. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2010 Dec 1;185(11):6591–8.
117. Weber S, Tian H, Pirofski L. CD8+ cells enhance resistance to pulmonary serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *The Journal of Immunology*. 2011;186(1):432–42.
118. Gao R, Bhatnagar J, Blau DM, Greer P, Rollin DC, Denison AM, et al. 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. American Society for Investigative Pathology*; 2013 Oct;183(4):1258–68.
119. Fowler C, Evers D. Antigen Retrieval Causes Protein Unfolding Evidence for a Linear Epitope Model of Recovered Immunoreactivity. *Journal of histochemistry & cytochemistry*. 2011;59(4):366–81.
120. Fowler CB, Evers DL, O’Leary TJ, Mason JT. Antigen retrieval causes protein unfolding: evidence for a linear epitope model of recovered immunoreactivity. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. 2011 Apr;59(4):366–81.
121. Al M et. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. *Respir Crit Care Med*. 2010;181(1):72–9.
122. Bot a, Holz A, Christen U, Wolfe T, Temann A, Flavell R, et al. Local IL-4 expression in the lung reduces pulmonary influenza-virus-specific secondary cytotoxic T cell responses. *Virology*. 2000 Mar 30;269(1):66–77.
123. Haran JP, Buglione-Corbett R, Lu S. Cytokine markers as predictors of type of respiratory infection in patients during the influenza season. *The American journal of emergency medicine. Elsevier Inc.*; 2013 May;31(5):816–21.
124. Yu X, Zhang X, Zhao B, Wang J, Zhu Z, Teng Z, et al. Intensive cytokine induction in pandemic H1N1 influenza virus infection accompanied by robust production of IL-10 and IL-6. *PloS one*. 2011 Jan;6(12):e28680.

125. Pappagianis D, Zimmer BL. Serology of coccidioidomycosis. *Clinical microbiology reviews*. 1990 Jul;3(3):247–68.
126. Woelk CH, Zhang JX, Walls L, Viriyakosol S, Singhania A, Kirkland TN, et al. Factors regulated by interferon gamma and hypoxia-inducible factor 1A contribute to responses that protect mice from *Coccidioides immitis* infection. *BMC microbiology*. *BMC Microbiology*; 2012 Jan;12(1):218.
127. Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, Ho T, Hujer AM, Taracila MA, Bonomo RA SB. *Acinetobacter baumannii* rOmpA vaccine dose alters immune polarization and immunodominant epitopes. *Vaccine*. 2013;31(2):313–8.
128. Figueiredo , Cadete A, Gonçalves LM, Corvo ML AA. Intranasal immunisation of mice against *Streptococcus equi* using positively charged nanoparticulate carrier systems. *Vaccine*. 2012;30(46):6651–8.
129. Costalonga M, Cleary PP, Fischer L a, Zhao Z. Intranasal bacteria induce Th1 but not Treg or Th2. *Mucosal immunology*. 2009 Jan;2(1):85–95.
130. Poe SL, Arora M, Oriss TB, Yarlagadda M, Isse K, Khare A, et al. STAT1-regulated lung MDSC-like cells produce IL-10 and efferocytose apoptotic neutrophils with relevance in resolution of bacterial pneumonia. *Mucosal immunology*. *Nature Publishing Group*; 2013 Jan;6(1):189–99.
131. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1999 Jan 1;162(1):392–9.
132. Capsoni F, Minonzio F. IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma. *Journal of leukocyte biology*. 1995;58(September):351–8.
133. Zhang Z, Clarke TB, Weiser JN. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *Journal of clinical investigation*. 2009;119(7).
134. Kimizuka Y, Kimura S, Saga T, Ishii M, Hasegawa N, Betsuyaku T, et al. Roles of interleukin-17 in an experimental *Legionella pneumophila* pneumonia model. *Infection and immunity*. 2012 Mar;80(3):1121–7.
135. Martinez PJ, Mathews C, Actor JK, Hwang S, Brown EL, Santiago HK De, et al. Impaired CD4+ and T-helper 17 cell memory response to *Streptococcus pneumoniae* is associated with elevated glucose and percent glycated hemoglobin A1c in Mexican Americans with type 2 diabetes mellitus. *Transl Res*. 2014;163(1):53–63.

136. Wright A, Bangert M, Gritzfeld J. Experimental human pneumococcal carriage augments IL-17A-dependent T-cell defence of the lung. *PLoS pathogens*. 2013 Mar;9(3):e1003274.
137. Fernando Ruweka M, Reyes JL, Iannuzzi J, Leung G, McKay DM. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PloS one*. 2014 Jan;9(4):e94188.
138. Rijnveld a W, Florquin S, Branger J, Speelman P, Van Deventer SJ, Van der Poll T. TNF-alpha compensates for the impaired host defense of IL-1 type I receptor-deficient mice during pneumococcal pneumonia. *Journal of immunology*. 2001 Nov 1;167(9):5240–6.

Resumen Curricular

Heidi Giselle Rodríguez Ramírez

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunología

Tesis: Identificación de subpoblaciones de macrófagos y linfocitos T en tejido pulmonar de pacientes fallecidos por influenza A H1N1 pandémica de 2009

Campo de estudio: Ciencias de la salud

Biografía: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 19 de agosto de 1985. Hija de Héctor Manuel Rodríguez Flores y Zulema Ramírez Sonora Casada con Israel Martínez Valdés. Madre de una hija, Alejandra Martínez Rodríguez.

Educación: Egresada de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.A.N.L., en 2008 obteniendo el reconocimiento al Mérito Académico en 2009. Realizó su servicio social en el laboratorio de Patología con el Dr. Rafael Ramírez Romero de la FMVZ. Donde se generó 1 publicación. Del doctorado en transcurso la producción hasta ahora ha sido 1 artículo enviado.

Experiencia profesional: Médico veterinario aprobado de Central de Carnes de Nuevo León durante desde septiembre de 2009 a abril de 2010.