

Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 83-110

Sesiones

**Nuevos datos acerca del virus causante
de la pandemia de gripe de 1918-19
y su relación con los de la gripe aviar.
Datos recientes relativos a éstos (*)**

JOSÉ ANTONIO CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO
*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Catedrático Emérito de la Universidad de Salamanca*

RESUMEN

La horrible pandemia de gripe o influenza de 1918-19 (impropiamente denominada «gripe española») originó una mortandad superior a los 20 millones. El conocimiento acerca del virus causante de la misma ha avanzado notablemente en la última veintena de años, por dos motivos: 1.º El hecho de disponerse de nuevas técnicas analíticas mucho más sensibles y específicas que las precedentes, las cuales han podido ser aplicadas al estudio de muestras humanas conservadas bajo tierra a temperaturas inferiores a 0° C o después de haber sido sometidas a tratamientos fijadores y mantenidas en bloques de parafina. 2.º La aparición en los últimos años de brotes epidémicos en aves, ocasionados por virus con algunas características similares a las que se ha deducido tuvo el virus de 1918, causante de dicha pandemia.

Las mutaciones de algunos pocos aminoácidos del sitio activo de la hemaglutinina de aquél pudieron modificar la especificidad de la unión de ésta con los receptores de la célula hospedadora (constituidos por residuos terminales de ácido *N*-acetilneuramínico), adquiriendo algún virus de procedencia aviar la propiedad de unirse a células de otras especies (cerdo, seres humanos) y resultando inmune a los anticuerpos anteriormente formados. Las características (genéticas, estructurales, etc.) de la hemaglutinina y de la neuraminidasa (= sialidasa) de dicho virus

(*) Un extracto de este trabajo se expuso oralmente en la Real Academia Nacional de Farmacia el día 18 de noviembre de 2004, con el título: «La gripe española de 1918 y su conexión con la gripe aviar. Avances actuales».

humano de 1918 parecen indicar su vinculación con ambos orígenes (aviar y porcino), aunque aún faltan por ser precisados algunos aspectos.

Palabras clave: Gripe (1918-19).—Gripe aviar.—Hemaglutinina.—Neuraminidasa (= sialidasa).

ABSTRACT

The horrible influenza pandemic (erroneously named «Spanish influenza») resulted in more than 20 million deaths. Knowledge about the virus that caused this pandemic has improved remarkably in about the last twenty years due to two factors: 1. The availability of new analytical techniques, more sensitive and specific than previous procedures, that have been used to study human samples maintained in permafrost or kept in formalin-fixed, paraffin-embedded blocks; 2. The occurrence in the last few years of influenza outbreaks in birds, caused by viruses with certain characteristics similar to those considered as typical of the 1918-19 influenza virus. The mutations of few aminoacids in the virus hemagglutinin active site could modify the binding specificity with receptors (*N*-acetylneuraminic acid terminal residues) of the host cell. Thus, certain avian viruses may have achieved the property of binding to cells of different species (pigs, humans) and may have become immune to previously formed antibodies. The genetic, structural, etc., characteristics of hemagglutinin and neuraminidase (= sialidase) of the 1918-19 virus seem to show their connection with both avian and porcine viruses, although some features should receive further study.

Key words: Influenza (1918-19).—Avian influenza.—Hemagglutinin.—Neuraminidase (= sialidase).

1. INTRODUCCIÓN

Algunos estudios iniciados hacia 1950 y trabajos experimentales más profundos realizados desde mediados de la década de 1990 han permitido en los últimos meses avanzar notablemente en el conocimiento del virus de la famosa gripe que asoló prácticamente a todo el mundo en 1918-19, causando una cifra de muertos comprendida entre los 20 y los 40 millones: Fue la impropriadamente denominada «gripe española».

Dos motivos han influido en el renovado interés por este estudio: uno de ellos ha sido el hecho de que se ha podido disponer, desde

hace aproximadamente una veintena de años, de técnicas analíticas sensibles y específicas, de las que antes se carecía, que han podido aplicarse a muestras procedentes de víctimas de aquella pandemia, cuya conservación (por haberse mantenido a temperaturas inferiores a 0° o haberseles aplicado tratamientos previos, etc.) podría considerarse como esencialmente aceptable para estos fines. El otro motivo lo constituye la reaparición de brotes epidémicos vinculados a virus de procedencia aviaria, cuya caracterización permite deducir que se hallan estrechamente emparentados con el causante de la mencionada pandemia.

Cuestiones que han podido replantearse últimamente y empiezan a estar esclarecidas, al menos en parte, son las siguientes:

- a) *¿Por qué recibió el calificativo de «española»?*
- b) *¿Fue producida por un virus de procedencia aviaria similar a algunos que, en los últimos años, se han detectado en aves, especialmente en el pollo?*
- c) *¿Tuvo el cerdo un papel importante en esta transmisión?*
- d) *El paso de los virus desde las aves a los humanos, ¿pudo hacerse directamente o necesitó del intermediario porcino?*
- e) *¿A qué se debió la enorme patogenicidad y la extraordinaria difusión de dicha pandemia?*

Brevemente, quizá convenga resumir algunos aspectos acerca de las grandes epidemias/pandemias de gripe anteriores a la del período de 1918-19, así como algunas características de los virus causantes de los brotes epidémicos recientes en relación con ella.

1.1. Denominaciones y antecedentes históricos

El nombre de influenza parece ser que se usó en la ciudad de Florencia ya en el siglo xiv —concretamente por Villani en 1358—, por considerar que la enfermedad en cuestión era debida a la «*influenza di freddo*» o «*di stelle*» (1, 2); es decir, al frío —factor que, sin duda, favorece su aparición (aun cuando también se padece en climas tropicales)—, o a las estrellas (aspecto este atribuible a las arrai-

gadas teorías astrológicas vigentes en aquellos años, e incluso en épocas muy posteriores).

Ya en 1742, Sauvage habló de la «grippe». Los términos «*gripper*» (francés), «*to grip*» (inglés) o «*greifen*» (alemán) significan «agarrar, atrapar». Quizá la forma brusca de presentarse en muchas ocasiones esta enfermedad haya justificado tal nombre, que en español se escribía «*grippe*» hasta el año 1925 como mínimo, y luego con una sola pe.

Por otro lado, aunque actualmente las palabras *influenza* y *gripe* son sinónimas, en manuales de Patología Médica del año 1947 aún se reservaba el nombre de influenza sólo para la forma de tipo pandémico (3). Otras denominaciones, de carácter vulgar, como «trancazo» y, anteriormente, «el soldado de Nápoles» (por la coincidencia de su aparición en el tiempo con la divulgación de este número musical de una zarzuela) también han sido de uso corriente.

Descripciones de epidemias/pandemias que muy probablemente fueron de gripe, a juzgar por las síntomas con que aparecen descritas (generalmente con mayor claridad y detalle a medida que son menos lejanas), son las indicadas, remotamente por Hipócrates, y desde el Renacimiento en los años: 1510, 1580, 1675, 1693, 1729-1733, 1742-1743, 1762, 1768, 1789-1790, 1799-1800, 1803, 1830, 1836-1837 y 1889-1890 (1).

De dichas descripciones, se deduce que, *en general, tales epidemias/pandemias tienen en común el haber sido originarias de países lejanos de Oriente (China), pasando por Rusia, etc., antes de llegar a Europa Occidental.*

En lo referente a las de los años 1889-1890 y 1918-1919 en Madrid y Salamanca, se dispone de una monografía vinculada a esta Real Academia Nacional de Farmacia (2). En lo relativo a las de los años 1957 y 1968, datos tanto epidemiológicos como acerca de la composición de los virus causantes de ellas se hallan en una publicación fácilmente accesible (4), además de en obras de la especialidad. Y en lo concerniente a los brotes epidémicos recientes de origen aviario, algunas monografías actuales recogen sus aspectos esenciales (1, 5, 6).

Es curioso observar que, a diferencia del «aprovechamiento literario» de temas vinculados a epidemias como las de peste («Il

Decamerone», de Bocaccio; «La peste», de Camus), o las de fiebre amarilla («The narrative of Arthur Gordon Pym», de Poe), *tanto episodios de las epidemias de gripe del siglo XIX como de la pandemia de 1918-19 no han sido apenas objeto de descripciones noveladas o realistas por parte de los escritores; y ello, lo mismo en España que en el extranjero.*

¿Pudo ser la coincidencia en el tiempo —meses finales y terminación— de la terrible guerra mundial primera con las etapas de mayor mortandad de dicha pandemia lo que contribuyó al deseo de no insistir más en la evocación de tantos padecimientos, y así favorecer un deliberado olvido?

1.2. Datos relativos a la gripe de 1918-19 recogidos en la Enciclopedia Espasa

Dado el prestigio del que ha venido gozando en el mundo español e hispanoamericano la famosa Enciclopedia Espasa, el examen de lo en ella recogido en relación con la pandemia de 1918-19 puede ser un criterio útil para interpretar cómo se fue aceptando (en la cultura general española), primeramente el origen vírico de la enfermedad y después la adecuación de los posibles remedios para combatirla, sin perder de vista el aspecto de la injustificada y desafortunada denominación de «gripe española», con la que se la ha venido conociendo, sobre todo fuera de España.

Solamente un breve comentario acerca de estas cuestiones es lo que se intenta resumir a continuación:

- En el año 1925 (tomo XXVI, págs. 1348-50), aparecen descritos por primera vez en esta obra los signos clínicos y formas de la «grippe», y se incluye un mapa con indicación de los numerosos países que la sufrieron en 1918.
- En el suplemento del año 1931 (ocupando sólo la mitad de la pág. 1192), además de los datos de tipo clínico de la gripe (ya escrita con una sola pe), se señala el uso del llamado «nucleinato sódico» en inyecciones para su remedio.
- Por otro lado, ni en la publicación de 1925 ni en la de 1931 —ni en las de años siguientes— se menciona a esta gripe

como «gripe española». Y en el intervalo comprendido entre 1931-1941, no figura ninguna reseña sobre ella en los suplementos correspondientes a los años 1934, 1936-39 y 1940-41.

- En el período de 1942-44 (pág. 921), en el escaso espacio de 1/4 página, se indica por primera vez que: «Andrews admite en su etiología un virus básico y una serie de exaltaciones y mutaciones» (recuérdese que el origen vírico de esta enfermedad quedó demostrado ya en 1931, para el cerdo, y en 1933 para los humanos). En cuanto al tratamiento, se advierte que «los sueros y vacunas inspirados en las asociaciones bacterianas están hoy abandonados»; y que «se prescribe la estricnina, las inhalaciones de oxígeno, los arsenicales, salicilatos y la sangría»...
- Pero el origen vírico, como único responsable de la enfermedad, no sería del todo admitido hasta 1945-48, aunque confusamente, cuando en su página 1292 (ocupando modestamente la reseña sólo 1/5 de la página) se lee: «Gripe. Producida por un virus al que se unen las acciones de bacterias que son las que determinan el genio patógeno de la afección y la razón de las complicaciones; de ahí el valor terapéutico de las sulfamidas y la penicilina».
- Hay que llegar al tomo correspondiente a los años 1949-52 para que, en el breve espacio de 1/6 de la página 1190, se indiquen la forma y dimensiones de los tipos A y B y hasta se mencione al tipo C del virus de la gripe. También, en contra de lo recogido en 1945-48, se señala que «las vacunas sólo crean inmunidad frente a las epidemias originadas por el tipo de virus inyectado»; y que «todos los antibióticos han fracasado en el tratamiento».
- A diferencia del suplemento de 1953-54, en que nada se incluye acerca de la gripe, en el de 1955-56 (págs. 477-478) se utilizan los datos de una revisión hecha por G. Cateigne, que es una adecuada síntesis del estado de la cuestión, incorporando el dato de la existencia en el virus de la enzima RDE (= «Receptor Destroying Enzyme»), que es la actualmente conocida como sialidasa o neuraminidasa. Asimismo,

se resumen los «resultados satisfactorios» producidos por la vacunación, aunque se estima que la vacuna «resulta muy costosa».

- Nada se publica en el suplemento de 1957-58 en relación con la gripe; y en el de 1959-60, en las diez líneas de su página 770, únicamente se indica que virus atenuados se emplean como vacuna en la URSS.
- En los suplementos bienales del amplio período comprendido entre 1961-62 y 1997-98 nada aparece acerca de la gripe, a pesar de que en ese intervalo hubo una pandemia tan importante como la de 1968 (tampoco anteriormente se había mencionado la de 1957).
- Ya en 1999-2000, en la página 1022, se recomienda la vacunación y se comentan los aspectos esenciales del nuevo fármaco antigripal Oseltamivir, aunque nada se dice de su análogo denominado Zanamivir.
- Finalmente, en el tomo correspondiente a 2001-2002, que es el último publicado, nada se incluye acerca de la gripe.

De la lectura de los párrafos anteriores, se podría deducir que: a) *escaseó en España información generalizada* —tomando como fuente a dicha enciclopedia— *acerca de la gripe, entre 1918 y 1955, como mínimo*; b) *con notable lentitud se fue abriendo camino la teoría del origen vírico de esta enfermedad*; c) *pueden considerarse como empíricos e inadecuados los remedios preconizados para combatirla, hasta épocas no tan lejanas como el año 1949*; d) *ni una sola vez se refieren los autores de las reseñas de dichos años (1925-2000) a ella como «gripe española»*. Cabe preguntarse, en relación con este último punto: ¿Por qué se la ha denominado así por los autores extranjeros? En el apartado siguiente se resumen algunas interpretaciones al respecto.

2. ¿POR QUÉ SE DENOMINÓ «GRIPE ESPAÑOLA» A LA PANDEMIA DE 1918-19, Y TODAVÍA SE LA SIGUE ASÍ LLAMANDO POR ALGUNOS AUTORES?

Aun con las limitaciones antes apuntadas, acertadamente la Enciclopedia Espasa nunca ha utilizado la desafortunada denominación de «gripe española» para referirse a la pandemia gripal de 1918-19.

Tampoco, en una enciclopedia reciente (de 1998) como es la de «Microsoft® Encarta® 99» se habla de «gripe española» en la página dedicada a este tema.

Además de una interesante reseña sobre la gripe en general, con toda precisión sí se señala en la «Gran Enciclopedia de España» (en el tomo 10 del año 1994, pág. 4835), que «aunque es denominada “gripe española”, se originó en China, de donde pasó a Filipinas y a EE.UU. [y] posteriormente se extendió a Europa». También allí se indica que fueron los soldados estadounidenses que combatieron en la I Guerra Mundial «uno de los principales canales de difusión».

Ahora bien, el especialista norteamericano R. G. Webster (7) recoge en su publicación del año 2001 el dato de J. S. Oxford, según el cual: «los archivos médicos militares (mantenidos largo tiempo en secreto) revelan que hubo un gran número de muertos de infección respiratoria en los campos bélicos de Francia en 1916»; y recuerda que los EE.UU. no entraron en guerra hasta abril de 1917...

Otras hipótesis son las siguientes: «Habiéndose detectado durante la primavera de 1918 los primeros casos de gripe entre los soldados ingleses que se hallaban en Francia, cerca de Rouen (Normandía), la enfermedad se propagó pronto a otros países vecinos (Inglaterra, Italia, España) y a otros más lejanos (EE.UU.) como consecuencia de los desplazamientos de las tropas. [...] Parece ser que los periodistas franceses la habían llamado inicialmente «gripe americana»; pero la circunstancia de ser los soldados norteamericanos sus aliados en el conflicto bélico aconsejaba no asignarles tal vinculación; y existiendo también casos de gripe en España, se optó por generalizar el uso de esta expresión, que más tarde fue asumido por alemanes y otros» (2).

Cabe, asimismo, la posibilidad de que la enfermedad se hubiera extendido a partir de más de un punto de origen.

El especialista francés C. Hannoun (8) acepta la idea de que «la llegada regular de trabajadores chinos a África y a Europa, a lo largo de aquellos años, podría haber sido el origen de una introducción anterior» [a la coincidente con la guerra]. Y muy verosímil resulta su interpretación de que la circunstancia de que la Familia Real española y los ministros españoles padecieran la gripe, hacia el mes de mayo de 1918, pudo contribuir a esta injustificada denominación; aunque dicha «enfermedad ciertamente no comenzó en España» (8), ni aquí fue donde produjo relativamente más víctimas, a pesar de que muchísimas familias perdieron a alguno de sus componentes, generalmente entre los jóvenes, calculándose que hubo unos 300.000 muertos como mínimo.

Es sabido que la propagación del virus se facilitó por los transportes de tropas, tanto marítimos como terrestres. En este caso, se detectaron focos en zonas contiguas a las estaciones ferroviarias, concretamente en las de la línea que desde Irún llevaba de regreso soldados portugueses a su país, atravesando el territorio español.

Por último, aunque todavía en algunas revistas prestigiosas extranjeras se habla en el año 2000 y siguientes de la «“Spanish” influenza», son muchos los autores que evitan tal denominación y acertadamente se refieren a ella como la «pandemia de gripe de 1918-19».

3. ALGUNAS CARACTERÍSTICAS, ESPECIALMENTE DE LA HEMAGLUTININA Y LA SIALIDASA DEL VIRUS DE LA GRIPE, EN RELACIÓN CON EL OBJETO DE ESTE ESTUDIO

Para mejor comprender lo que se expondrá en los apartados siguientes, se considera aconsejable resumir algunos datos relativos a estas dos glicoproteínas existentes en la envoltura del virus de la gripe (tipos A y B), así como mencionar a otros componentes de dicho virus.

La hemaglutinina, HA, es una glicoproteína de forma alargada constituida por un trímero, cada uno de cuyos monómeros termina en una parte redondeada. Se halla repartida uniformemente en la cubierta vírica, a diferencia de la distribución irregular (arracimada) en que lo está la sialidasa. Su estructura tridimensional fue determinada por Wiley, Skehel y Wilson en 1981, siendo ésta una valiosa información que ha facilitado el conocimiento de las interacciones virus-célula hospedadora que aseguran la introducción del virus en la célula (2, 6). «Cada monómero es procedente de un precursor de 550 aminoácidos, que es escindido después de su inserción en la membrana del retículo endoplasmático, formándose los componentes HA₁ y HA₂, que están unidos entre sí por un enlace —S—S—. Cada monómero tiene un vástago o pedúnculo alargado y una cabeza globular. [...] El virus entra en la célula mediante la unión de la hemaglutinina trimérica con las moléculas receptoras que contienen ácido siálico en la superficie celular. La molécula de hemaglutinina lleva en su superficie cuatro epitopos (determinantes antigénicos) separados. Sin embargo, el sitio del enlace con el ácido siálico, localizado en una depresión de la superficie molecular, es una invariante. El virus así unido es llevado a los endosomas celulares, siendo transferido el complejo vírico transcriptasa-ácido nucléico desde los endosomas al citoplasma, y de aquí al núcleo, donde el ARN es replicado y transcrito. La fusión del virus con las membranas celulares es mediada por la hemaglutinina en las condiciones de acidez de los endosomas» (9).

Como se detalla en el apartado siguiente, «*se requiere solamente una pequeña distorsión estructural de la molécula de hemaglutinina, modificación asociada con la sustitución de un aminoácido, para producir un cambio antigénico que permite al virus escapar de la neutralización por un anticuerpo monoclonal. [...] Otro importante hallazgo es el de la influencia de la fracción glucídica de la molécula de la hemaglutinina en la modulación de la actividad antigénica*» (10). *Glucosamina, manosa, galactosa y fucosa son los cuatro monosacáridos componentes de dicha fracción tanto en la hemaglutinina como en la sialidasa, constituyendo el 16-24 por 100 de la primera y el 46 por 100 de la segunda. De los 15 subtipos conocidos de hemaglutinina, HA, abreviadamente denominados con una H, sólo tres se han hallado en la especie humana.*

La sialidasa (impropiamente llamada asimismo neuraminidasa), NA, es también una glicoproteína, pero con actividad enzimática (EC 3.2.1.18) de tipo hidrolítico. *Se conocen nueve subtipos de esta enzima en dicho virus, aunque sólo dos se han encontrado en los humanos, indicados como N1 y N2* (6).

La estructura tridimensional de la N2 se estableció en 1983 por Varghese, Laver y Colman. Se halla formada por 469 aminoácidos (2). Es un homotetrámero (formado por subunidades de M_r 60.000) que se sabe *contribuye a la liberación de los recién formados viriones, evitando la aglomeración y retención de éstos en la superficie de la dañada célula hospedadora*. Para su actividad se requiere dicha estructura tetramérica. «Aunque las sialidasas de cepas diferentes de virus tipos A y B son distinguibles antigénicamente, su sitio activo es una invariante en todas las cepas hasta ahora caracterizadas» (9).

Otros datos acerca de la sialidasa y de la *O*-acetilesterasa (EC 3.1.1.53), ésta propia del tipo C del virus de la gripe y no del A ni del B, pueden hallarse en publicaciones fácilmente accesibles (2, 4, 6, 11-14). (En el tipo C existe una proteína peculiar, la HEF, con actividades hemaglutinante, esterásica y de fusión.)

En los tipos A y B, además de la sialidasa y de la hemaglutinina, «otros componentes de la envoltura vírica son la bicapa lipídica (procedente de la célula hospedadora), y las proteínas M (que integran la matriz de dicha envoltura), siendo la actividad de la M2 la de *facilitar el paso de los protones acidificando el medio*. En el interior se hallan las proteínas no estructurales NS1 y NS2, así como las nucleoproteínas NP y el ARN; éste, precisamente de polaridad negativa, en forma de ocho segmentos (en los tipos A y B, y siete en el tipo C). También hay tres polimerasas (la PA, ácida, la PB, básica y la PB2). [...] Son la nucleocápsida (formada por las nucleoproteínas NP y el ARN, al que envuelven helicoidalmente) y la proteína M, antígenos internos que permiten distinguir los tres tipos de virus de la gripe: A, B y C. Pero son los antígenos de su superficie (hemaglutinina y sialidasa = neuraminidasa) los que definen los subtipos propios del A y no distinguibles en el B ni el C» (2, 6).

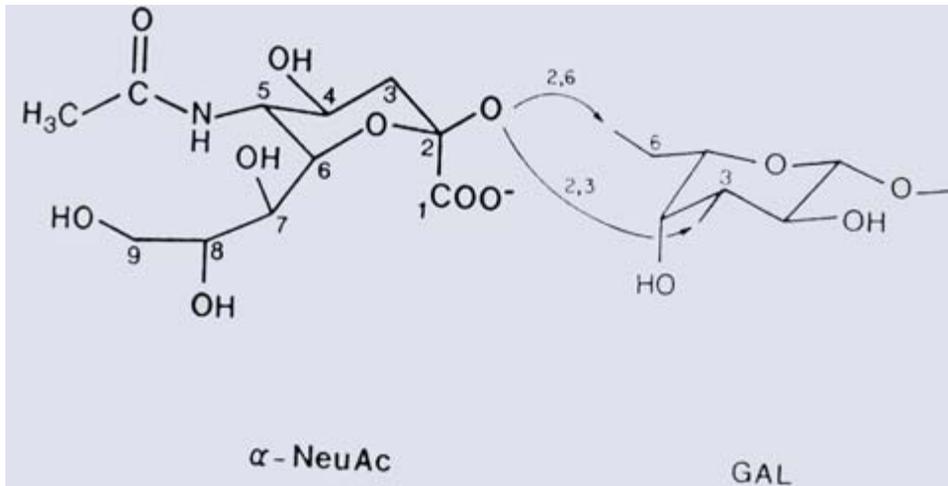
4. REPERCUSIÓN DE CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DE LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA GRIPE EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ÉSTE EN MAMÍFEROS Y EN AVES

Desde que en la década de 1980 se estableció la estructura tridimensional de esta glicoproteína, se ha avanzado notablemente en el conocimiento de las relaciones estructura-función propias de la misma. Además, se ha logrado valiosa información sobre otros aspectos vinculados a ella, concernientes tanto a virus de procedencia humana como aviar.

En 1984, Naeve *et al.* dedujeron que «*virus recombinantes de gripe aviar conteniendo hemaglutinina de virus de gripe humana [tipo A] no se replican en patos. [Pero] dos mutaciones en el sitio receptor de la hemaglutinina [del virus de la gripe] humana, en los residuos [de los aminoácidos números] 226 y 228 permiten la replicación en los patos. Estas mutaciones tienen como resultado una secuencia del sitio de enlace del receptor idéntica a las secuencias conocidas del virus de gripe aviar*» (15).

¿Qué aminoácidos son el número 226 y el número 228? ¿Qué aminoácidos resultan de estas mutaciones? ¿Con qué ácido(s) siálico(s) se realiza la unión? ¿Cuál es el tipo de unión del ácido siálico con el monosacárido contiguo en su secuencia?

He aquí las contestaciones: *El aminoácido número 226, que es la leucina, muta a glutamina; el número 228, que es la serina, muta a glicocola. El ácido siálico implicado es precisamente (entre la cuarentena larga de ácidos siálicos conocidos) el N-acetilneuramínico (α -NeuAc); el cual tiene a la galactosa (GAL) como monosacárido contiguo en la secuencia estructural oligosacarídica. Ahora bien, así como las moléculas de hemaglutinina conteniendo leucina reconocen las uniones α 2, 6 del ácido N-acetilneuramínico con la galactosa de los glicoconjugados implicados, las moléculas de hemaglutinina que llevan glutamina en dicha posición 226 (como resultado de la mutación producida) reconocen la estructura ácido N-acetilneuramínico α 2, 3 galactosa (no a la α 2, 6). Véase el esquema siguiente:*



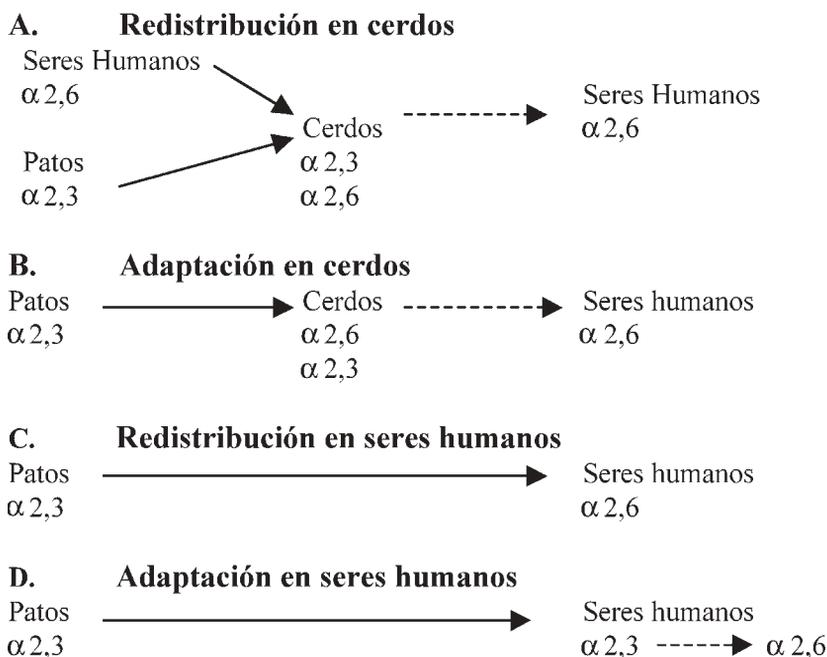
Se estima que estas mutaciones alteran la conformación de la hemaglutinina y su antigenicidad, evitando el bloqueo por anticuerpos. Los cambios de leucina a glutamina y de serina a glicocola permitirían al virus atravesar el tracto digestivo de los patos (caracterizado por su fortísima acidez) y realizar su replicación, etc. Se cambia, por tanto, el neumotropismo del virus de la gripe humana por un enterotropismo típico del virus de las aves.

Los resultados de Naeve *et al.*, antes comentados, han sido confirmados por otros autores. Sauter *et al.*, en 1989, han averiguado, mediante la técnica de resonancia magnética nuclear, que «el ácido siálico es el único componente que contacta con la proteína; [y que] la hemaglutinina que sufre cambio conformacional inducido a pH bajo mantiene su capacidad para unirse al ácido siálico» (16).

En 1998, Ito y cols. (entre ellos el mencionado Webster) corroboran que «aunque los virus tipo A de la gripe reconocen uniformemente oligosacáridos de la superficie celular con ácido siálico terminal, su especificidad respecto al receptor varía. La mayor parte de los virus de gripe aviar se unen *preferentemente* a N-acetilneuramínico- α 2,3 galactosa (NeuAc α 2,3 Gal) de los oligosacáridos, mientras los virus de la gripe humana *prefieren* los del enlace NeuAc α 2,6 Gal» (17). El aporte principal de estos autores ha sido demostrar, además, que *el cerdo puede servir como «crisol» para generación de recombinantes de virus de gripe humana-aviar. ¿Cómo?:* Mediante la

posibilidad de actuar de receptor para ambos tipos de enlace (α 2,3 y α 2,6) en células de su tráquea (mientras en la tráquea humana sólo sería esto factible para los α 2,6).

Los siguientes **modelos de generación de cepas** (que pudieron ocasionar las pandemias de gripe del siglo xx: la de 1918-19, la asiática de 1957, la de Hong Kong de 1968 y, la más leve, de Rusia de 1977), podrían ser (17):



Asimismo, dichos autores señalan que «la generación de cepas pandémicas de virus tipo A de gripe es un proceso complejo que requiere combinaciones críticas de genes aviáres y humanos o mutaciones que afectan a la molécula de la hemaglutinina» (17).

También en 1998, Weis y cols. (entre ellos Skehel y Wiley) (18) han determinado, mediante técnicas de rayos X, la estructura de un mutante del receptor que se enlaza a la hemaglutinina en comparación con la estructura de la forma no mutada; y, además, ambas estructuras formando complejos con el trisacárido sialil-lactosa (que es un análogo estructural del receptor normal). Sus resultados

muestran que los ácidos siálicos se unen a los aminoácidos tirosina (n.º 98) y triptófano (n.º 153) que, con otros aminoácidos, forman una depresión o pequeña cavidad bien conservada que actúa como receptor del virus.

En una revisión del año 2000, Skehel y Wiley (19) dan a conocer resultados relativos al enlace con la hemaglutinina y a la fusión que permite la entrada del virus en la célula. Mediante la técnica de rayos X (resolución de 3 Å) determinan las estructuras: del precursor HA₀ (escrito también como HAO), de la conformación metaestable a pH neutro encontrada sobre el virus, y de la conformación inducida por el pH en la fusión. Detallan la estructura y orientación del complejo formado y deducen, por ejemplo, que la serina número 136, formando un puente de hidrógeno, se enlaza con el grupo carboxilato del ácido siálico; la tirosina 98, con el grupo hidróxilo de dicho ácido; la leucina 194, mediante fuerzas de Van der Waals, con el grupo hidroxilo-7, etc. Otros estudios, efectuados mediante resonancia magnética nuclear, son concordantes con éstos.

De acuerdo con los datos ya establecidos sobre especificidad, proponen estos autores que «en los primeros años de las pandemias de gripe asiática [1957] y de Hong Kong [1968], que probablemente fueron causadas por la introducción de virus conteniendo hemaglutininas aviarias en la población humana, se identificaron virus con especificidad de reconocimiento tanto α 2,6 como α 2,3; lo cual sugeriría un cambio gradual en la especificidad» (19).

Respecto a la variación antigénica, «los anticuerpos antihemaglutinina neutralizan la capacidad de infección del virus. Como consecuencia, se requieren cambios en la estructura de la hemaglutinina (que impidan la unión con el anticuerpo) para la generación de virus con el potencial suficiente para causar nuevas epidemias. [...] Las sustituciones [de aminoácidos] que son mantenidas pueden haber sido seleccionadas para impedir el reconocimiento por los anticuerpos. [...] [A su vez], *el componente oligosacárido aporta dos mecanismos para evadir la respuesta inmune, siendo ambos observables en la hemaglutinina*: El primero corresponde a las porciones de la superficie de la hemaglutinina cubiertas por las cadenas laterales glucídicas, que son sintetizadas por las enzimas celulares y, por ello, «autoantigénicas» y no inductoras de anticuerpos; el segundo [es el

de] las sustituciones de aminoácidos, durante la deriva antigénica, que pueden crear nuevos sitios de engarce para oligosacáridos en las regiones de unión con los anticuerpos, generando resistencia a la unión con anticuerpos. [...] [Por otro lado], bajos valores de pH y altas temperaturas pueden disparar la actividad de fusión» (19). Finalmente, tanto la proteína HEF (con actividad hemaglutinante, esterásica y de fusión), propia del tipo C del virus de la gripe, como la hemaglutinina del tipo A, pueden haber sido ensambladas a partir de dominios preformados y, tal vez, son vestigios «de una estructura de una proteína de membrana ancestral» (19).

En el año 2000, Matrosovich *et al.* (20) han publicado sus resultados acerca de las alteraciones más tempranas que se producen en las propiedades del receptor de mamíferos en cuanto a la unión con la hemaglutinina de virus de gripe de patos salvajes.

Partiendo de lo ya establecido por otros autores en cuanto a que las «cepas de virus tipos A y B de gripe humana y de cerdo se unen preferentemente con receptores que contienen residuos terminales de 6'sialil(N-acetil-lactosamina) (Neu5Ac α 2-6 Gal β 1-4GlcNAc) mientras que los virus aviares y equinos lo hacen escasamente con este oligosacárido y lo realizan preferentemente con 3'sialilgalactosa (Neu5Ac α 2-3 Gal)» (20), averiguan que «las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 190 [ácido glutámico] y 225 [glicocola] en la secuencia [de la hemaglutinina] del virus aviar están también presentes en la hemaglutinina H1 de los virus humanos, incluyendo los virus que circularon en 1918, sugiriendo que las sustituciones en estas posiciones son importantes en la generación de cepas [conteniendo hemaglutininas] H1 humanas causantes de pandemias. Estos resultados muestran que la especificidad de unión con el receptor de la hemaglutinina es tempranamente alterada después de la transmisión del virus a humanos y cerdos y, por ello, puede ser un requisito previo para una replicación altamente eficaz y la difusión que caracteriza las cepas epidémicas» (20).

Finalmente, en 2002, Ha y Stevens (en colaboración con los ya citados Skehel y Wiley) recuerdan que hay 15 subtipos de la gripe A por la índole de la hemaglutinina (H1-H15), «todos los cuales se encuentran en especies de aves. Tres causaron pandemias en el siglo pasado: H1 en 1918 (y en 1977), H2 en 1957 y H3 en 1968. En 1997 un H5, y en 1999

un H9, causaron brotes de enfermedad respiratoria en Hong Kong» (20). Habiendo determinado estos investigadores las estructuras tridimensionales de la hemaglutinina H5 aviar (de pato) y de la H9 de cerdo [...] y comparado con la H3 que causó la pandemia de 1968 y con la HEF del virus de la gripe tipo C, «las comparaciones de la estructura y la secuencia sugieren que los subtipos de hemaglutinina pueden haberse originado por diversificación de las propiedades que afectan la metaestabilidad de las hemaglutininas, requerida para sus actividades de fusión con la membrana y la infección vírica» (21).

5. ASPECTOS GENÉTICOS DE LA HEMAGLUTININA, DE LA SIALIDASA (= NEURAMINIDASA) Y DE OTROS COMPONENTES VÍRICOS EN RELACIÓN CON LA PANDEMIA DE 1918-19

Con posterioridad al año 1950, un nuevo enfoque se ha intentado aplicar al esclarecimiento de las peculiaridades del virus de la gripe que produjo la pandemia de 1918-19. Probablemente uno de esos primeros intentos fue el de E. Murray, F. Davenport y M. Hilleman (22), quienes en septiembre de 1950 se desplazaron hasta Nome, en Alaska (EE.UU.), con la intención de extraer muestras (previo acuerdo con los esquimales allí residentes) de personas fallecidas en 1918 y enterradas en sitios mantenidos a muy bajas temperaturas. Sin embargo, la circunstancia de no poderse garantizar el haberse mantenido de modo constante tales temperaturas por debajo de 0° impidió obtener resultados válidos.

Tampoco pudo J. Hultin (de la norteamericana Universidad de Iowa), en 1951, averiguar datos de interés en Alaska igualmente, aunque repetiría su intento en años posteriores, cuando se disponía de técnicas analíticas más perfeccionadas.

Ya en la década de 1990, la doctora K. Duncan, de la Universidad de Windsor (en Ontario, Canadá), intentó investigar en los cadáveres de 11 mineros (de hulla) fallecidos por aquella gripe en la isla de Spitsberg (en Noruega), cerca del polo norte, los cuales se habían contagiado en el barco que los transportaba. Pero sus resultados, parece ser, no han sido publicados.

En 1997, Taubenberger *et al.* aplicaron con éxito las técnicas de la transcriptasa inversa y la reacción en cadena de la polimerasa a muestras de tejido pulmonar que habían sido fijadas por el formol y conservadas en bloques de parafina, en Washington, en un hospital militar. «*Nueve fragmentos de ARN vírico fueron secuenciados de las regiones que codifican la hemaglutinina, la sialidasa, nucleoproteínas, proteína matriz 1, y proteína matriz 2. Las secuencias son congruentes con un nuevo virus de gripe H1N1 que pertenece al subgrupo de cepas que infectan a humanos y cerdos, no al subgrupo aviar*» (23).

Otros aspectos importantes se indican en este artículo: *a)* Que la cepa H1N1 pudo proceder de un reservorio existente en aves acuáticas salvajes, surgido antes de 1918. *b)* Que la secuencia de la hemaglutinina aparece como estructuralmente relacionada con las cepas primitivas de gripe de cerdo, corroborándose así datos serológicos de los años 1930. *c)* «*Los análisis filogenéticos de todos los genes de los virus de la gripe apuntan firmemente hacia un antepasado común para los linajes (humano y porcino) de virus H1N1*» (23).

En febrero de 1999, los antes citados Taubenberger, Reid y Fanning (en colaboración en este trabajo con Hultin, también ya mencionado) (24), confirmaron y ampliaron resultados anteriores. En esta ocasión estudiaron muestras de dos procedencias: de un hospital militar de Washington, los tejidos pulmonares de dos varones, uno de veintiún y otro de treinta años, ambos fallecidos a causa de la gripe en septiembre de 1918; y de víctimas de dicha enfermedad enterradas en una fosa de Brevig Mission (Alaska) y mantenidas en tierra helada permanentemente («permafrost») desde 1918.

Determinaron la *secuencia completa del gen de la hemaglutinina del virus de la gripe de 1918* y dedujeron que *dicho gen, «aunque más estrechamente relacionado con la secuencia de cepas aviares que el de otros mamíferos, es de mamíferos y puede haber ido adaptándose a los humanos antes de 1918»* (25).

De todos modos, igualmente en febrero de 1999, en opinión del también prestigioso especialista norteamericano R. G. Webster (25), y como comentario al trabajo de Taubenberger *et al.* (24), los secretos sobre el origen y peculiaridades del virus de la gripe de 1918 aún

«permanecían huidizos». No obstante, Webster concluía su publicación diciendo que «se puede esperar que estudios futuros de heces de aves y tejidos animales procedentes de tierra helada contribuirán a desvelar [tales] secretos» (25).

Otro avance decisivo en estos estudios se lograba, en el año 2000, gracias al trabajo de Reid, Fanning, Janczewski y Taubenberger (26), al caracterizar *el gen de la* otra glicoproteína de la superficie del virus de la gripe de 1918: la *neuraminidasa* (o, más exactamente denominada, *sialidasa*, enzima EC 3.2.1.18). Así, prosiguiendo sus investigaciones anteriores, los análisis de muestras de la misma procedencia que la indicada por ellos en 1999, les permitieron deducir que «*la neuraminidasa de 1918 comparte muchas características de secuencia y estructurales con las cepas aviarias*, incluyendo el sitio activo conservado, la longitud del pedúnculo [de la molécula de neuraminidasa] del virus tipo salvaje, sitios de glicosilación, y sitios antigénicos. *Filogenéticamente, el gen de la neuraminidasa de 1918 parece ser intermedio entre mamíferos y aves*, sugiriendo que fue introducido en los mamíferos justo antes de la pandemia de 1918» (26). *La gravedad de la pandemia de 1918-19 en comparación con otras, como la de 1957 (en que hubo también reemplazamiento tanto de hemaglutinina como de neuraminidasa), o la de 1968 (en que sólo hubo sustitución de hemaglutinina), podría explicarse, según estos autores, porque «hemaglutinina y neuraminidasa fueron antigénicamente nuevas, y a que el virus no había circulado ampliamente entre la población humana antes de la primavera de 1918»* (26).

A su vez, una «inhabitual función de la neuraminidasa» sería, en opinión de Goto y Kawaoka (27), la de unirse al plasminógeno y secuestrarlo, lo que favorecería indirectamente un incremento de la actividad de la hemaglutinina. (Tal interpretación no es asumida por otros autores.)

En 2001, el especialista del Instituto Pasteur de París C. Hannoun señalaba que la neuraminidasa de 1918 es la «antepasada de la de todas las cepas de virus porcinos y humanos ulteriores. *El virus pandémico parece haber tomado tanto su neuraminidasa como su hemaglutinina de un virus aviar, mientras que el resto de su secuencia es de origen humano*» (8). En cuanto al momento en que dicho

virus recombinante se introdujo en los mamíferos (cerdo u hombre), estima que esto pudo tener lugar «algún tiempo antes o justo antes de la pandemia» [de 1918] (8). Asimismo, coincidiendo con lo expresado por otros autores, especialmente Webster (7), considera Hannon que es verosímil que *la virulencia sea un carácter poligénico*, y que pequeños cambios en nucleótidos dispersos en el genoma, afectando no sólo a la hemaglutinina, hayan contribuido a tan intensa virulencia.

No obstante, Laver y Garman (28), también en 2001, escribían que era aún desconocido si la recombinación del gen de la hemaglutinina fue «el disparador» que causó el efecto que ocasionara que el agente fuera tan virulento.

En paralelismo con otros trabajos antes comentados, J. Oxford y cols. han intentado realizar en el año 2002 estudios en muestras de diez personas fallecidas en Twickenhan (cerca de Londres) a causa de la pandemia en 1918 y que fueron enterradas en ataúdes de plomo, hallándose los restos de una joven en mejor estado de conservación que los de los otros. Sus resultados no se han divulgado.

Prosiguiendo su línea de investigación anterior, Fanning *et al.*, en 2002 (29), después de analizar *muestras* (conservadas en etanol del 70 por 100), *procedentes de aves acuáticas salvajes capturadas en 1917*, que habían sufrido infección por otros virus del mismo subtipo de hemaglutinina que el causante de la pandemia de 1918, encontraron que las hemaglutininas de las aves de 1917 y las de las aves actuales son más cercanas entre sí que las hemaglutininas de las aves de 1917 respecto a la de la pandemia de 1918. De ello han deducido «que hubo poca deriva en las secuencias aviares en los últimos 83 años, y que *el virus de la pandemia de 1918 no adquirió su hemaglutinina directamente de las aves*» (29).

En 2002 asimismo, Tumpey, García-Sastre (éste, antiguo discípulo y colaborador de E. Villar y J. A. Cabezas), Mikulasova, Taubenberger, Swayne, Palese y Basler (30), basándose en los datos ya conocidos sobre secuencias nucleotídicas, *lograron reconstruir los genes de la hemaglutinina, de la neuraminidasa y de la proteína M del virus de 1918, y consiguieron obtener virus de gripe recombinantes portadores de segmentos de dicha hemaglutinina, neuraminidasa y*

proteína M. Estos virus recombinantes fueron *sensibles* a los inhibidores de la neuraminidasa *zanamivir* y *oseltamivir*, así como a los inhibidores de la proteína M2 *amantadina* y *rimantadina* (véase el trabajo de la referencia 6). De ello se deduce que estos agentes serían de utilidad ante la temida probabilidad de que surjan virus de propiedades similares al causante de la pandemia de 1918.

Reid *et al.* (Fanning..., Taubenberger) (31), prosiguiendo sus trabajos anteriores (especialmente el correspondiente a la referencia 29), han confirmado en el año 2003 sus resultados relativos a la hemaglutinina aviaria, ampliándolos a otros componentes víricos como la *nucleoproteína*, *NP*, deduciendo que «las secuencias NP aviares de 1917 están estrechamente relacionadas con las secuencias de las aves modernas y [son] distintas de las de los mamíferos de 1918» (31).

Ya en el año 2004, Harvey *et al.* (32) han hallado que dos mutaciones simultáneas en el sitio receptor de la unión («receptor binding site») de la hemaglutinina aviar del subtipo H5 producen en ella un patrón similar al que muestran los virus humanos.

En febrero de 2004, Gamblin *et al.* (entre ellos Wiley y Skehel) (33) han determinado las estructuras de la hemaglutinina del virus de la gripe de 1918 y de las hemaglutininas estrechamente relacionadas con ella (la humana de 1934 y la porcina de 1930) formando complejos con análogos estructurales del receptor. Confirmando hallazgos sobre la especificidad de las uniones de las hemaglutininas (α 2,3 para las aviares, α 2,6 y α 2,3 para las porcinas), deducen que «la hemaglutinina [humana] de 1918, reteniendo los aminoácidos del sitio receptor característicos de una hemaglutinina precursora aviar, es capaz de unirse a receptores humanos, y como consecuencia de ello el virus es capaz de difundirse en la población humana» (33).

Ahora bien, «el mecanismo que los virus humanos han utilizado para lograr estos cambios parecen ser diferentes según los distintos subtipos. Para las hemaglutininas de virus humanas H2 y H3 [se requiere] un mínimo de dos cambios en los aminoácidos del sitio de unión: [La sustitución de] glutamina 226 por leucina y de glicocola 228 por serina se correlaciona con el cambio brusco («shift») producido de aviario a humano. Por el contrario, la hemaglutinina de

virus H1 adquiere la capacidad de unirse a receptores humanos manteniendo la glutamina 226 y la glicocola 228» (33). Es decir, el asunto es más intrincado de lo que pudiera inicialmente esperarse, y faltan por esclarecerse algunos aspectos relacionados.

También en el mismo número de la revista *Science*, en que se ha publicado el trabajo inmediato anterior aparece otro, con él vinculado, de Stevens *et al.* (entre ellos Taubenberger y Palese) (34), relativo a la «*estructura de la hemaglutinina humana H1, no escindida, del extinguido virus de la gripe de 1918*». Después de ensamblar el gen de la hemaglutinina a partir de fragmentos de ARN de muestras tomadas de tejido pulmonar de 1918 conservadas en formol, llegan a la conclusión de que ciertas características encontradas («sitio del receptor similar al aviar, dos nuevos componentes con histidina, un bucle de menor superficie expuesto al sitio de escisión [de la hemaglutinina] que activa la fusión vírica) *revelan aspectos estructurales hallados en virus aviares que pueden haber contribuido a la extraordinariamente elevada capacidad de infección y mortalidad observada en 1918» (34).*

Holmes, en un trabajo titulado «1918 and All That» (35), que comenta las dos inmediatamente antes indicados, confirma que «*la epidemia de 1918 no ha entregado todavía sus secretos. Un enigma que continúa es si la pandemia se inició tan pronto como el virus saltó desde las aves a los humanos, o si hubo un período pre-pandémico durante el cual el virus se difundió en otras especies de mamíferos (quizá el cerdo)*».

En octubre de 2004, la investigación publicada en *Nature* por Kobasa [...] Kawaoka (36) se refiere a sus resultados sobre la obtención artificial de virus recombinantes de gripe conteniendo los genes de la hemaglutinina y la neuraminidasa de la cepa de 1918, los cuales mostraron elevada patogenicidad en ratones, por inducir *la producción excesiva de citoquinas que ocasionarían procesos inflamatorios y hemorragias graves*. Recuérdese que las citoquinas son generalmente proteínas o glicoproteínas que actúan como señales intercelulares, implicadas en la regulación y la proliferación celular. En este caso, un descontrol de la producción normal de las mismas, al ser ésta excesiva, resultaría no beneficioso sino altamente perjudicial para la célula hospedadora.

Un trabajo simultáneo de Siren *et al.* (37) también concluye que los macrófagos infectados por virus de la gripe tipo A (o por virus Sendai) activan células asesinas por la vía de las *citoquinas* y la producción de γ -interferón.

6. DATOS RECIENTES RELATIVOS A LOS VIRUS DE LA GRIPE AVIAR

El interés y la preocupación que suscita el riesgo de aparición de brotes epidémicos —que podrían derivar en pandemia— a partir del virus de la gripe de aves o por implicación de mamíferos distintos de los humanos, se observa también en las numerosas publicaciones que han visto la luz en los diez primeros meses de 2004 relativos a estos virus.

Seguidamente, se intentará hacer aquí sólo un breve resumen de algunos de los aspectos considerados como más destacados. Así: El análisis de la secuencia del genoma del virus aviar H5N1 aislado de pollos en Tailandia (38); «la evolución de los virus de gripe H5N1 de patos salvajes en el sur de China» (39); los estudios de la proteína matriz (M) de aves acuáticas (40); la redistribución al azar de los genes de virus de gripe tipo A en patos salvajes de Canadá, sugiriendo los autores que *los genes de los constituyentes víricos «PB2 y PA pueden ser utilizados como marcadores de virus con potencial para cruzar la barrera de la especie», al poder pasar al cerdo* (41); las «limitaciones a la adaptación de la hemaglutinina H5 de un virus [aviar] al hospedador humano» (42); la «*glicosilación adicional de la cabeza de la neuraminidasa [que] contribuyó a la elevada virulencia del virus H5N1*», confirmándose también «que las actividades de la hemaglutinina y de la neuraminidasa se hallan funcionalmente ligadas» (43) y, paralelamente (aunque no en relación con el virus de la gripe aviar), el «efecto de la adición de oligosacáridos sobre las actividades biológicas y la antigenicidad de la hemaglutinina del virus de la gripe H3N2» (44).

Por otro lado, se ha demostrado recientemente que animales de especies consideradas como resistentes al virus de la gripe H5N1, tales como a la que pertenecen los *gatos domésticos*, una vez inoculados intratraquealmente con ese virus, han sido infectados, por

lo que pueden contribuir a la transmisión de dicho virus (45); y en septiembre de 2004 ya se publicó que lo mismo ha sucedido con los *tigres*, tal vez por haber sido éstos alimentados en algún zoo con pollos infectados (46).

Análogamente, «los genes de la hemaglutinina y de la neuraminidasa de virus porcinos de gripe A (H9N2) aislados en China probablemente provenían de los de gripe aviar A (H9N2)», pudiendo pasar de no patógenos a patógenos en los cerdos (47). Asimismo, la secuencia del genoma de un recombinante del virus porcino chino resultó similar a las de virus de gripe prevaletentes en pollos y patos del sur de China (48).

En una publicación del mes de julio de 2004, en *Nature*, Li [...], Webster y cols., destacan que *los patos domésticos del sur de China tuvieron en el brote epidémico de 2003-04 un papel importante «en la generación y mantenimiento de este virus [el H5N1], y que las aves salvajes pueden haber contribuido a la amplia difusión creciente del virus en Asia. [...] Los virus H5N1 con potencial pandémico han llegado a ser endémicos en la región y no son fácilmente erradicables [...] por lo que se necesita aplicar medidas de control a largo plazo»* (49). Algunos de estos autores (en colaboración con otros) (50, 51) habían ya señalado en mayo de 2004 al virus H5N1 como una amenaza de causa de pandemia; y también lo han sugerido otros investigadores, en fechas casi coincidentes, en la revista *Science* (52).

Ya en agosto de 2004 eran nueve los países asiáticos que oficialmente habían reconocido (46) haber sufrido muertes (26 personas) por el virus H5N1, según se indica en la tabla que se adjunta (Tabla 1).

TABLA 1. *Subtipos del Tipo A del virus de la gripe aislados de varias especies de aves y mamíferos*

<i>Año</i>	<i>Lugar</i>	<i>Subtipo</i>	<i>Especie</i>	<i>Peculiaridades</i>
1983	EE.UU.	H5N2	Pollos	Hubo que sacrificar 17 millones, con pérdidas de 61 millones de \$
1997	Holanda	H7N7	Pollos	Sacrificio de 20 millones de pollos + un veterinario muerto
1997	HongKong	H5N1	Pollos + humanos	18 personas enfermas. 6 muertas
1998	—	H5N1	Ídem	El virus, de pollos a humanos directamente
1998	—	H7N7	Pavos + Humanos	—
1999	—	H5N1	Humanos	El virus, de humanos a humanos directamente (confirmado en 2003)
1999	—	H5N1	Pollos	Hospedadores intermedios
1999	HongKong	H9N2	Humanos	2 enfermos
2000	Siberia	H5N1, H2N2, H3N2, H9N2, H7N7	Patos salvajes	Precursores de pandemias futuras
2001	—	H9N2	Cerdos	El virus, de aves a cerdos. En humanos, cocirculación de H3N2
2002	—	—	—	Riesgo: Infección simultánea de virus aviarios y humanos
2003	—	—	Patos + Codornices	El virus, de patos salvajes a codornices
2004	—	Varios	Humanos	En Japón, Laos, Taiwán, Camboya, Corea del Sur, Vietnam, Pakistán, Tailandia y (desde agosto de 2004) Malasia

Datos relativos a otro subtipo aviar, el H7N7, han sido publicados también en 2004 (53, 54); y, asimismo, referentes al tipo humano B, en relación con una infección que se produjo en peregrinos a La Meca (55), o a la redistribución genética y evolución de virus de la gripe humanos tipos A y B (56).

Por otro lado, progresos notables se han producido recientemente en los *métodos analíticos* destinados a la mejor caracterización del virus de la gripe, adaptando y perfeccionando técnicas como la de la reacción en cadena de la polimerasa, etc. (57, 58).

Finalmente, medidas dirigidas al control del subtipo aviar H5 han sido revisadas (59), y diversos trabajos se han publicado en relación con el uso de *vacunas* de muy diversas características (recombinantes, de virus atenuados, etc.) con objeto de proteger a las aves de granjas (60-63), aunque al parecer no siempre con resultado satisfactorio (64), ya que también su elaboración plantea más problemas (hasta de índole jurídica, por la protección patentada de procedimientos, etc.) que la de las vacunas para uso humano (65).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HANNOUN, C. (1995). *La grippe et ses virus*. Presses Universitaires de France. París.
- (2) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (1990). *Datos sobre las pandemias de gripe de 1889-90 y 1918-19 en Madrid y Salamanca, y estudios sobre la sialidasa de los virus de la gripe A y B y la esterasa del virus C*. Discurso de recepción (R. Acad. Farm.) Madrid.
- (3) BAÑUELOS, M. (1947). *Manual de Patología Médica*. Editorial Científica Médica. Barcelona. Tomo I, págs. 6-30.
- (4) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A., y HANNOUN, C. (1990). *Inv. Ciencia* 159: 61-69.
- (5) GROUPE ECRIR (2000). *La grippe: aspects actuels*. Flammarion. París.
- (6) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (2004). *Datos sobre el virus de la gripe de patos salvajes y de pollos, y virus de la gripe tipo C. Agentes antigripales*. Reales y Nacionales Academias de Medicina y de Farmacia (sesión monográfica).
- (7) WEBSTER, R. G. (2001). *Science* 293: 1773-1774.
- (8) HANNOUN, C. (2001). *Virologie* 5: 45-52.
- (9) KENDREW, Sir J., ed. (1995). *The encyclopedia of Molecular Biology*. Blackwell. Oxford, págs. 467, 468, 544, 545.
- (10) KILBOURNE, E. D. (1987). *Influenza*. *Plenum Med. Co.* New York, NY, págs. 46, 47.

- (11) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (1978). *An. R. Acad. Farm.* 44: 493-509.
- (12) GARCÍA-SASTRE, A.; VILLAR, E.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C., CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (1992). *Biochem. J.* 273: 435-441.
- (13) MUÑOZ-BARROSO, I.; GARCÍA-SASTRE, A.; VILLAR, E.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C., CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (1992). *Virus Res.* 25: 145-153.
- (14) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A.; CALVO, P.; EID, P.; MARTÍN, J.; PÉREZ, N.; REGLERO, A., HANNOUN, C. (1998). *Biochim. Biophys. Acta.* 616: 228-238.
- (15) NAEVE, C. W.; HINSHAW, V. S., WEBSTER, R. G. (1984). *J. Virol.* 51: 567-569.
- (16) SAUTER, N. K.; BEDNARSKI, M. D.; WURZBURG, B. A.; HANSON, J. E.; WHITESIDES, G. M.; SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. (1989). *Biochem.* 28: 8988-8394.
- (17) ITO, T.; NELSON, J.; COUCEIRO, S. S.; KELM, S.; BAUM, L. G.; KRAUSS, J.; CASTRUCCI, M. R.; DONATELLI, I.; KIDA, H.; PAULSON, J. C.; WEBSTER, R. G., KAWAOKA, Y. (1998). *J. Virol.* 71: 7367-7373.
- (18) WEIS, W.; BROWN, J. H.; CUSAK, S.; PAULSON, J. C.; SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. (1998). *Nature* 333: 426-431.
- (19) SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. (2000). *Annu. Rev. Biochem.* 69: 531-569.
- (20) MATROSOVICH, M.; TUZIKOV, A.; BOVIN, N.; GAMBARYAN, A.; KLIMOV, A.; CASTRUCCI, M. R.; DONATELLI, I., KAWAOKA, Y. (2002). *J. Virol.* 74: 8502-8510.
- (21) HA, Y.; STEVENS, D. J.; SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. (2002). *EMBO J.* 21: 865-875.
- (22) MANUGUERRA, J.-C. (1996). Groupe d'Etude et d'Information sur la Grippe (Reunión en Lisboa).
- (23) TAUBENBERGER, J. K.; REID, A. H.; KRAFFT, A. E.; BIJWAARD, K. E., FANNING, T. G. (1997). *Science* 275: 1793-1796.
- (24) REID, A. H.; FANNING, T. G.; HULTIN, J. K., TAUBENBERGER, J. K. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1561-1556.
- (25) WEBSTER, R. G. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1164-1166.
- (26) REID, A. H.; FANNING, T. G., JANCZEWSKI, TAUBENBERGER, J. K. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6785-6790.
- (27) GOTOM, H., KAWAOKA, Y. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10224-10228.
- (28) LAVER, G., GARMAN, E. (2001). *Science* 293: 1776-1777.
- (29) FANNING, T. G.; SLEMONS, R. D.; REID, A. H.; JANCZEWSKI, T. A.; DEAN, J., TAUBENBERGER, J. K. (2002). *J. Virol.* 76: 7860-7862.
- (30) TUMPEY, T. M.; GARCÍA-SASTRE, A.; MIKULOSOVA, A.; TAUBENBERGER, J. K.; SWAYNE, D. E.; PALESE, P., BASLER, C. F. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13849-13854.
- (31) REID, A. H.; FANNING, T. G.; SLEMONS, R. D.; JANCEWSKI, T. A.; DEAN, J.; TAUBENBERGER, J. K. (2003). *Avian Dis.* 47: 921-925.
- (32) HARVEY, R.; MARTIN, A. C.; ZAMBON, M., BARCLAY, W. S. (2004). *J. Virol.* 78: 502-507.
- (33) GAMBLIN, S. J.; HAIRE, L. F.; RUSSELL, R. J.; STEVENS, D. J. M.; XIAO, B.; HA, Y.; VASISHT, N.; STEINHAUER, D. A.; DANIELS, R. S.; ELLIOT, A.; WILEY, D. C., SKEHEL, J. J. (2004). *Science* 303: 1838-1842.
- (34) STEVENS, J.; CORPER, A. L.; BASLER, C. F.; TAUBENBERGER, J. K.; PALESE, P., WILSON, I. A. (2004). *Science* 303: 1866-1870.
- (35) HOLMES, E. C. (2004). *Science* 303: 1787-1788.
- (36) KOBASA, D. [...], KAWAOKA, Y. (2004). *Nature* 431: 703-707.

- (37) SIREN, J. [...], MATIKAINENE, S. (2004). *J. Gen. Virol.* 85: 2357-2364.
- (38) VISESHAKUL, N. [...], POOVORAWAN, Y. (2004). *Virology* 328: 169-176.
- (39) CHEN, H. [...]; WEBSTER, R. G., YU, K. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 10452-10457.
- (40) WIDJAJA, L. [...], WEBSTER, R. G. (2004). *J. Virol.* 78: 8771-8779.
- (41) HATCHETTE, T. F. [...], WEBSTER, R. G. (2004). *J. Gen. Virol.* 85: 2227-2237.
- (42) HARVEY, R. [...]; BARCLAY, W. S. (2004). *J. Virol.* 78: 502-507.
- (43) HULSE, D. J., WEBSTER, R. G. [...] (2004). *J. Virol.* 78: 9954-9964.
- (44) ABE, X. [...], HONGO, S. (2004). *J. Virol.* 78: 9605-9611.
- (45) KUIKEN, T. [...], OSTERHAUS, A. (2004). *Science* 306: 241.
- (46) ENSERINK, M., KAISER, J. (2004), *Science* 305: 138.
- (47) GUO, Y. J. [...], GUO, J. F. (2004). *Zhonghua Shi Yan* 18: 7-11.
- (48) XU, C. [...], ZHAO, H. (2004). *Microbes Infect.* 6: 919-925.
- (49) LI, K. S. [...]; WEBSTER, R. G., PEIRIS, J. S. M. (2004). *Nature* 430: 209-213.
- (50) GUAN, Y. [...]; WEBSTER, R. G., PEIRIS, J. S. M. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8156-8109.
- (51) PEIRIS, J. S. [...], GUAN, Y. (2004). *Lancet* 363: 617-619.
- (52) NORMILE, D., ENSERINK, M. (2004). *Science* 305: 321.
- (53) FOUCHIER, R. A. M. [...], OSTERHAUS, A. D. M. E. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1356-1361.
- (54) MATROSOVICH, M. N. [...], KLENK, H. D. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4620-4624.
- (55) BALKHY, H. H. [...], ALMUNEEF, M. A. (2004). *J. Travel. Med.* 11: 82-86.
- (56) XU, X. [...]; SUBBARAO, K.; COX, N. J., KLIMOV, A. (2004). *Virus Res.* 103: 55-60.
- (57) LAU, L. T. [...], YU, A. C. H. (2004). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 336-342.
- (58) TEMPLETEN, K. E. [...], CLAAS, E. C. (2004). *J. Clin. Microbiol.* 42: 1564-1569.
- (59) CAPUA, I., ALEXANDER, D. J. (2004). *Avian Pathol.* 33: 393-404.
- (60) WOOD, J. M., ROBERTSON, J. G. (2004). *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 842-847.
- (61) ELLIS, T. M. [...], PEIRIS, M. J. S. (2004). *Avian Pathol.* 33: 405-412.
- (62) CEE, C. N. [...], SUÁREZ, D. L. (2004). *Vaccine* 22: 3178-3181.
- (63) STEPHENSON, I. [...], KATZ, J. M. (2004). *Lancet Infect. Dis.* 4: 499-509.
- (64) LEE, C. W. [...], SUÁREZ, D. I. (2004). *J. Virol.* 78: 8372-8381.
- (65) NORMILE, D. (2004). *Science* 303: 609.

Nota añadida en las pruebas de imprenta:

Otros trabajos relevantes relacionados con los temas de este artículo son los siguientes:

- TUMPEY, T. M. *et al.* (2004). *J. Viral.* **18**: 9499-9511.
- UNGCHUSAK, K. *et al.* (2005). *N. Engl. J. Med.* **352**: 333-340.
- STÖHR, K. (2005). *N. Engl. J. Med.* **352**: 405-407.
- PTAUBENBERGER, J. K. *et at.* (2005). *Scient. Am, Jan*: 48-57.