

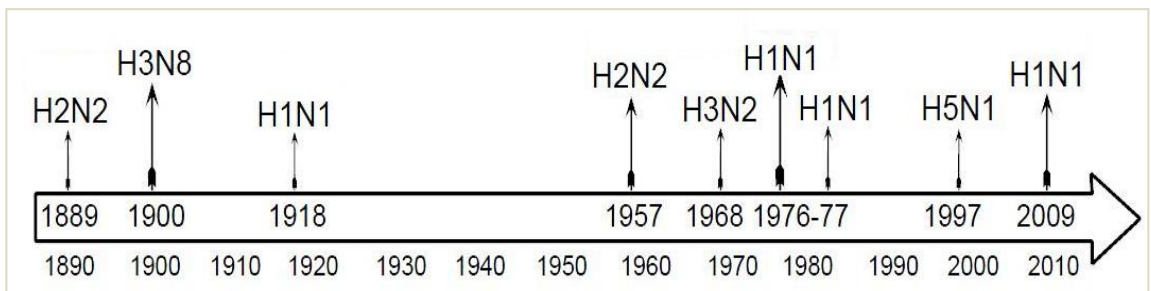
## **ANTECEDENTES**

### **La Influenza a Través del Tiempo**

La influenza es una enfermedad causada por un virus, este puede ser de tres tipos, A, B y C. El B y C son exclusivamente de humanos, mientras que el virus A puede infectar a humanos pero también a otros mamíferos incluso a algunas aves (Martin y col., 2009). El virus A, es el que presenta una mayor tasa de mortalidad y es el que se relaciona con las pandemias (Newmann y col., 2009).

A través de la historia se han presentado brotes epidémicos anuales de influenza y algunas pandemias ocasionales, esto se muestra en la Figura 1 (Martin y col., 2009). Entre las pandemias del siglo XX tenemos que en 1918 surge la pandemia de influenza más devastadora que infectó cerca del 25% de la población mundial y causó la muerte de 50 millones de personas, este virus de origen aviar era del subtipo H1N1 (Belshe, 2005); posteriormente, en 1957 surge la pandemia asiática, el virus responsable de alrededor de tres millones de muertes fue un virus del subtipo H2N2; finalmente, el responsable de la conocida como gripe de Hong Kong, fue un virus H3N2, esto ocurrió entre 1968 y 1970. Debido a que las pandemias anteriores se habían presentado con intervalos de 30 a 50 años, se esperaba que para principios del siglo XXI se presentara una nueva pandemia (Martin y col., 2009).

En febrero de 2009, en el municipio de La Gloria, Veracruz en México se presenta el primer caso registrado de un nuevo brote de una enfermedad tipo influenza, para principios del mes de Abril ya se tenían en el país un gran número de casos, en los que en su mayoría se presentaba fiebre, tos, dolor de garganta, en algunos diarrea y/o vómito; en los casos más severos se presentaba dificultad respiratoria, neumonía e incluso la muerte. El Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos reporta el 15 de abril



**Figura 1.** Distribución de casos de influenza A, a través del tiempo, se presenta el virus responsable de cada brote.

Fuente: Talledo y Zumaeta, 2009

en San Diego, California un caso en el que se identifica un virus similar al reportado por la WHO. El 21 de Abril la CDC informa de una nueva cepa de virus influenza A H1N1, a los dos días que se identifica esta nueva cepa, el 23 de abril la Agencia de Salud Pública de Canadá identifica un virus influenza de origen porcino A H1N1 en muestras recibidas de México, debido a esto, la WHO el 24 de abril informa un nuevo brote de influenza, es solo 5 días después el 29 de abril que entonces se declara una alerta pandémica de fase 5 (Dawood y col., 2009). La dimensión de esta pandemia fue tal que para el día 21 de mayo, 41 países ya habían reportaron 11,034 casos y 85 muertes. En junio del mismo año, se declara la alerta pandémica de fase 6 y esta se mantiene durante catorce meses. En agosto de 2010, la WHO declara el inicio de la fase postpandémica con un recuento de más de 18,000 muertos a nivel mundial (Agencia noticiosa CNN, 2010).

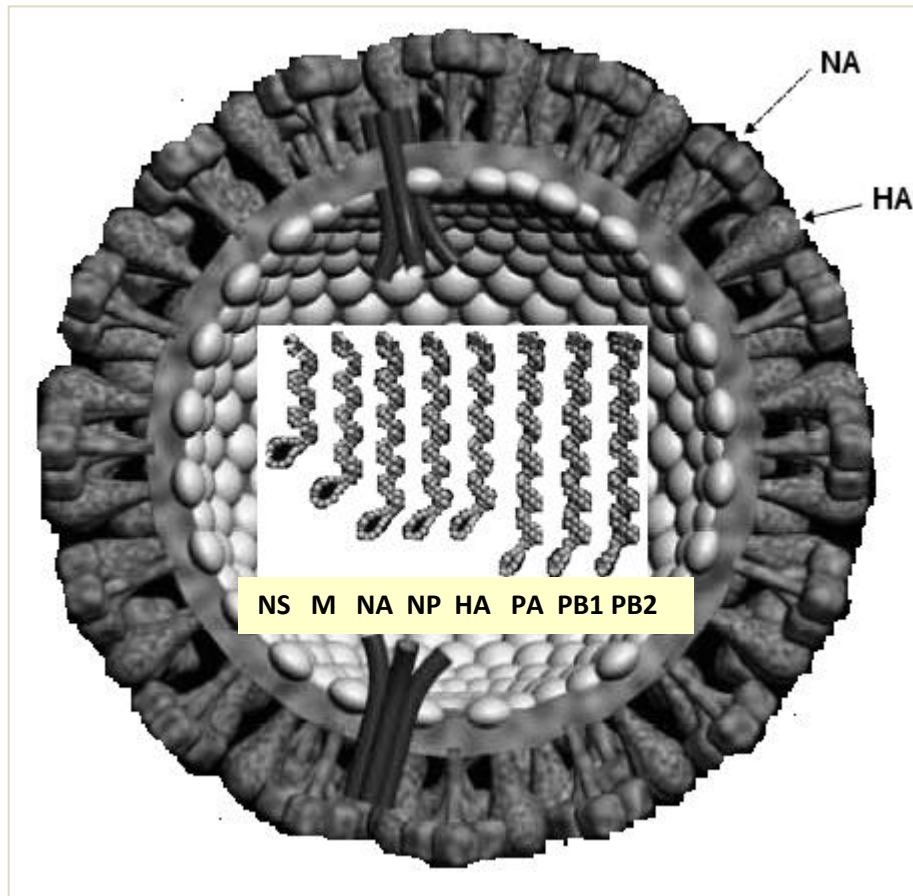
La situación en México muestra que para el 25 de Junio de 2009 se habían reportado 9,028 casos en todo el país y un total de 119 defunciones; los estados del centro y sur de la república fueron los que presentaron un mayor número de casos, siendo el Distrito Federal el más afectado con 2,085 casos, seguido por Yucatán y Chiapas que presentaron 913 y 657 casos respectivamente. Los síntomas más frecuentes fueron: fiebre, tos, y dificultad respiratoria (Secretaría de Salud, 2009). Se presentaron tres olas epidémicas en el país a lo largo del 2009, la primera fue la ola de primavera, que se presentó entre el 1 de abril y el 20 de mayo, la ola de verano se presentó del 21 de mayo al 1 de agosto, y la ola de otoño del 2 de agosto al 31 de diciembre.

## **Virus Influenza**

Es un virus de RNA, de polaridad negativa, perteneciente a la familia Orthomyxoviridae, tiene un genoma de 8 segmentos, que codifica para 12 proteínas (Bhounik y Hughes, 2010), algunos de los segmentos codifican para dos proteínas. Posee una envoltura, que consiste de una bicapa lipídica, en el exterior de la envoltura se encuentran las proteínas HA y NA y en el interior una capa formada por la proteína matriz, y más internamente encontramos la nucleocápside helicoidal formada por siete segmentos de RNA en el caso de los virus C y ocho segmentos en los virus A y B; este virus es pleomórfico (Vega y Reyes, 2007), tiene un diámetro que va de 50 a 120 nm, y se divide en 3 tipos serológicamente diferentes, A, B y C (Figura 2) (Martin y col., 2009).

El virus influenza tipo B, ocasiona enfermedades en el humano; el tipo C, se ha encontrado en humanos y en cerdos; pero el tipo A, que es el responsable de todas las pandemias de las que se tenga registro, se ha logrado aislar en cerdos, caballos, perros, aves acuáticas, aves de corral, humanos y otros mamíferos (Talledo y Zumaeta, 2009). Esto permite su recombinarse con facilidad y generar nuevas cepas. El cerdo es considerado el principal huésped intermediario para que se lleve a cabo la diseminación del virus influenza interespecies, esto es debido a que posee receptores tanto para los virus aviares como para los de mamíferos (Vaqué y col., 2009).

Los virus influenza A, son clasificados en subtipos dependiendo de las proteínas HA y NA. Se han descrito 17 tipos de HA y 9 tipos de NA (Salomon y Webster, 2009). En las aves acuáticas por coexistir los 16 tipos de HA y los 9 de NA pueden presentarse hasta 144 combinaciones (Talledo y Zumaeta, 2009).



**Figura 2.** Representación esquemática del virus influenza. Se pueden observar las proteínas de la superficie viral, así como los segmentos del genoma viral.

Fuente: Newmann y col., 2009

Además de los antígenos de superficie, el genoma viral codifica para otras diez proteínas, que son polimerasa básica 1 (PB1), polimerasa básica 2 (PB2), polimerasa ácida (PA), proteína de la nucleocápside (NP), proteína de la matriz 1 (M1), proteína de la matriz 2 (M2); tanto M1 como M2 son codificadas por el mismo segmento de RNA pero con diferente marco de lectura, lo mismo sucede con la proteína no estructural 1 (NS1) y la proteína no estructural 2 (NS2) (Rovid, 2009). La proteína PB1-F2, es una proteína proapoptótica que se presenta en algunas cepas de los virus influenza. Recientemente se ha descubierto la proteína N40, la cual es una proteína no estructural de función desconocida (Medina y García, 2011), a pesar de que la proteína NS2 se consideraba una proteína no estructural, se ha descubierto que solamente la proteína NS1 y la N40 son proteínas no estructurales, mientras que el resto se encuentran formando parte del virion de influenza.

### **Proteínas Virales**

La Tabla I, muestra las principales funciones de cada una de las proteínas virales, estas son características generales de todos los virus influenza A. De todas las proteínas que se describen, las que actúan como los principales marcadores antigénicos, y de las cuales depende tanto el ingreso a la célula infectada como la liberación del virión, son la hemaglutinina y la neuraminidasa (Abed y col., 2002).

**Tabla I.** Descripción de la función de las proteínas de los virus influenza A.

| Segmento | Función  | Abreviatura |
|----------|--|-------------|
| 1        | Participa en la iniciación de la transcripción, se une al Cap-I de los RNAPre-m, es señalado como responsable del clivaje endonucleolítico de los RNA pre-m celulares.   | PB2         |
| 2        | Forma parte del complejo de la RNA polimerasa, y es la encargada de la elongación del RNAm viral sintetizado, así como también la elongación del templado de RNA y de la síntesis de RNA viral.  | PB1         |
| 3        | Se asocia con la replicación del RNAv y se sabe que puede producir proteólisis tanto de proteínas del huésped como virales.  | PA          |
| 4        | Es una glicoproteína que contiene de 2 a 3 sitios de glicosilación, forma homotrimeros durante su maduración permite la adsorción viral a receptores celulares que contienen ácido siálico; de esta manera es introducido a la célula en una vesícula por endocitosis, la posterior acidificación de esta vesícula conlleva a un cambio en la conformación de la HA e induce la fusión del manto viral con la membrana endocítica y la liberación del contenido de la membrana en el citoplasma. La HA tiene afinidad por ciertos receptores dependiendo de su origen, es decir, la HA de virus aviáres se unen al ácido siálico en la conformación SA $\alpha$ 2,3Gal, mientras que los virus de influenza humanos se unen preferencialmente al ácido siálico ligado a galactosa en uniones SA $\alpha$ 2,6Gal. La tasa de mutación de esta proteína es muy alta de alrededor de una sustitución de bases por cada generación viral | HA          |
| 5        | Se asocia al RNA viral y a las polimerasas formando la nucleocápside helicoidal, además junto a la proteína M1 forma el antígeno profundo que permita clasificar a los virus influenza en tipo A, B o C  | NP          |
| 6        | Es una sialidasa que cataliza las uniones glicosídicas con el ácido siálico, acción que interviene en la liberación de viriones fuera de las células infectadas y previene la agregación de los mismos, esto es mediado por el sitio catalítico que se encuentra en la cabeza de la enzima. La NA se encuentra formando un homotetrámero, y tiene regiones altamente conservadas en su sitio activo con respecto a otros virus A y B, no se encuentran en todo el virión, sino concentrados en parches de la envoltura, rompe los enlaces de ácido N-acetil-neuramínico del mucus para que el virus pueda establecerse en el aparato respiratorio superior, y se encuentra en una cantidad 4 veces menor a la HA, y al igual que esta la NA se asocia con la patogenicidad viral   | NA          |

**Tabla I.** Descripción de la función de las proteínas de los virus influenza A.  
(Continuación)

| Segmento | Función   | Abreviatura |
|----------|---|-------------|
| 7        | La proteína M1 forma la matriz, es la proteína más abundante en el virión, la proteína M2 actúa como un canal iónico que mantiene estable el pH en el endosoma  | M1, M2      |
| 8        | Solo la proteína NS1 no se detecta en el virión pero si se presenta en altas concentraciones en las células infectadas, la NS1 es un inmunomodulador, inhibe el interferón de tipo I, la NS2 junto con la M1 está implicada en la exportación de las ribonucleoproteínas genómicas, también se le conoce como NEP | NS1, NS2    |

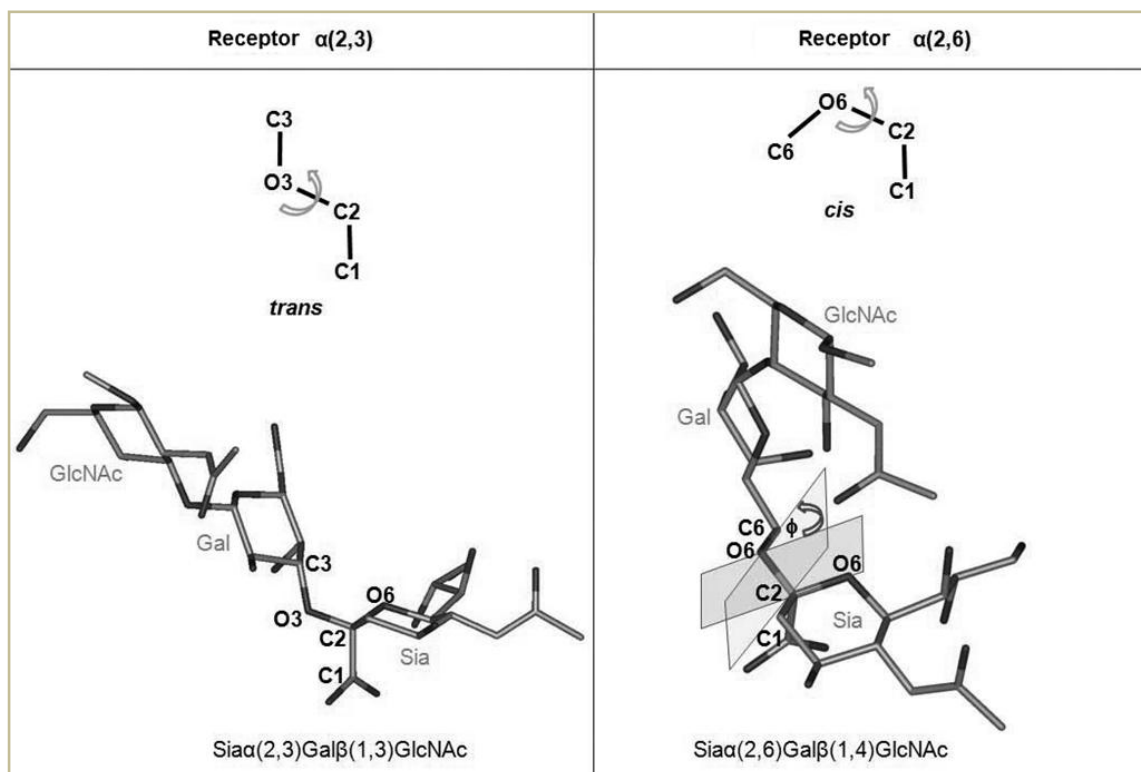
(Luchsinger, 2009; Webster y col., 1992; Gulsah y col., 2008; Salomón y col., 2009; Fodor y col., 2002; Akarsu y col., 2003; Ma y col., 2001; Plotkin y col., 2002; Kawaoka, 2006; Newmann y col., 2009; Talledo y Zumaeta, 2009; Vega y Reyes, 2007; Li y col., 2010; Banks y col., 2001; Garten y col., 2009).



## Hemaglutinina y Afinidad por el Receptor de Ácido Siálico

La hemaglutinina es una glicoproteína homotrimerica de forma cilíndrica, la cabeza globular se encuentra formada por hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$ , en la que cada monómero está formado por dos subdominios, HA1 y HA2. HA1 es la parte responsable del contacto con la membrana celular, HA2 participa en la fusión entre membranas, esto se da cuando el virus se encuentra en un endosoma en el interior de la célula infectada, el ambiente ácido del endosoma produce cambios estructurales en la proteína, que al fusionar la membrana viral con la membrana endosomal libera el ARN viral en el interior de la célula (Wei, 2010a). La hemaglutinina consiste en un tallo formado por hélices  $\alpha$  insertado en la membrana viral y que en su extremo contiene un dominio globular con tres sitios de unión para el ácido siálico, uno por monómero, es la proteína más abundante de la superficie viral, aproximadamente 80% de las proteínas expresadas (Das y col., 2010b).

El receptor celular al que se une la hemaglutinina es una cadena pentasacárida, la primera unidad sacárida es glucosa, seguida por galactosa, N-acetilglucosamina, galactosa y el ácido siálico, este receptor puede presentar las conformaciones SA $\alpha$ 2, 3 Gal y SA $\alpha$ 2, 6 Gal, estas estructuras se muestran en la Figura 3 (Jongkon y col., 2009). Los receptores SA $\alpha$ 2, 6 Gal se presentan mayormente en el epitelio respiratorio humano, mientras que los receptores SA $\alpha$ 2, 3 Gal se encuentran en el epitelio gastrointestinal de aves, en los cerdos se encuentran tanto receptores SA $\alpha$ 2, 6 Gal como SA $\alpha$ 2, 3 Gal, por lo que pueden ser infectados tanto por virus aviares como por virus humanos, presentando una buena oportunidad para la recombinación de estos virus y el surgimiento de nuevos virus recombinantes (Wei, 2010a).



**Figura 3.** Conformación de los receptores que contienen ácido siálico.

Fuente: Tomado de Jongkon y col., 2009.

De los 17 subtipos de hemaglutinina, 16 han sido aislados de aves acuáticas, los subtipos que más predominan en aves salvajes son H3, H4, y H6, los subtipos altamente patogénicos H5 y H7 se encuentran en aves domesticas, los subtipos que se diseminan con facilidad en humanos son H1, H2 y H3 (Talledo y Zumaeta, 2009).

La afinidad de la hemaglutinina por un tipo de receptor que contiene ácido siálico, es dada por ciertos residuos aminoacídicos presentes en el sitio de unión al receptor; por ejemplo, la glutamina en la posición 226, así como la glicina en la posición 228 de H2 y H3 confieren afinidad por receptores SA $\alpha$ 2, 3 Gal, mientras que leucina y serina en esas posiciones confieren afinidad por receptores SA $\alpha$ 2, 6 Gal. El ácido aspártico en la posición 190 y en la posición 225 se han encontrado en H1 de virus humanos, mientras que glutamina en la posición 190 y glicina en la posición 225 se han encontrado en H1 de virus aviares. En virus H5N1 cambios en los aminoácidos de las posiciones 133, 138, 186, 192 y 227 confieren reconocimiento por el receptor SA $\alpha$ 2, 6 Gal (Newmann y col., 2009).

## **Tratamiento y Prevención**

Para la prevención de la influenza se utiliza la vacunación como método primario. La vacuna se elabora con virus inactivados, o atenuados, las vacunas normalmente contienen HAs de tres tipos: dos de virus A y una de B. Los virus se cultivan en huevos embrionados de pollo y posteriormente se purifican y se inactivan haciendo que pierdan su infectividad (Newmann y col., 2009). Las vacunas pueden cambiar periódicamente dependiendo de los virus que se presenten en una región (Rovid, 2009); por lo que la vacunación debe ser anual. La elaboración de una vacuna para un virus emergente tarda de 3 a 6 meses (Bridges y col., 2002).

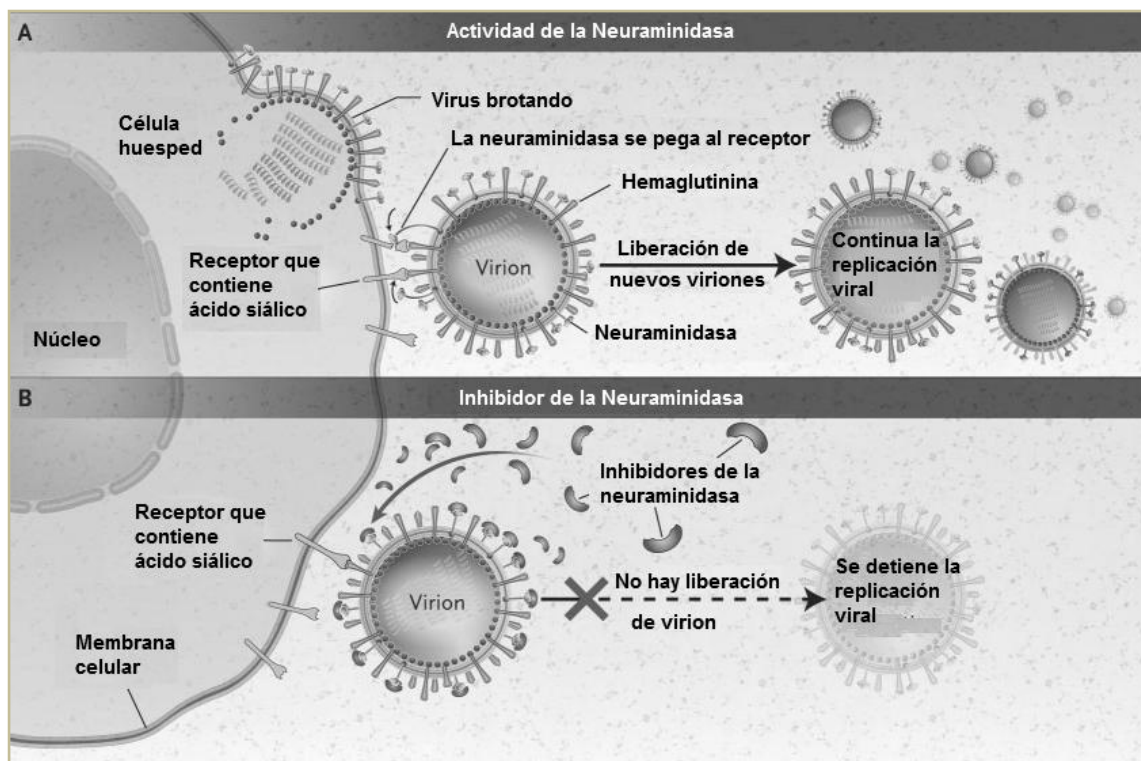
Una vez que la enfermedad se presenta, se cuenta con dos tipos de drogas antivirales, los amantanos y los inhibidores de la neuraminidasa (Dawood y col., 2009). Dentro de los amantanos están la amantadina y la rimantadina que bloquean el canal iónico formado por la proteína M2, y de esta manera evitan el paso de iones hidrogeno a la vesícula endocítica, previniendo la acidificación, que es necesaria para se lleve a cabo la disociación de la proteína M1 y la liberación del complejo ribonucleoproteico (Piñón y col., 2005). Sin embargo, el uso de los amantanos se ha restringido debido a que tienen algunos efectos tóxicos, no tienen efectividad contra los virus de influenza B y la mayor parte de los virus humanos H1N1, H3N2, así como en los virus aviares H5N1, y los porcinos H1N1, H3N2 y H1N2, al igual que el A/H1N1, han generado resistencia a este tipo de antivirales (Bridges y col., 2002).

### **Inhibidores de la Neuraminidasa**

Los inhibidores de la neuraminidasa son el zanamivir y el oseltamivir; debido a que la neuraminidasa tiene la función de cortar las uniones del ácido siálico y la hemaglutinina, estas drogas se mimetizan con el sustrato e interfieren con la liberación de la progenie viral (Gubareva, 2004), de esta manera evitan que los viriones puedan invadir nuevas células (Figura 4). Por lo que previenen la digestión del ácido neuramínico del mucus y reduce la habilidad del virus de colonizar el epitelio respiratorio (Democratis y col., 2006). A diferencia de los adamantanos, los inhibidores de la neuraminidasa son poco tóxicos y el desarrollo de resistencia es lento; el zanamivir es un derivado deshidratado del ácido siálico, este antiviral debe inhalarse, y el oseltamivir es un profármaco oral del carboxilato de oseltamivir que es el compuesto activo, contiene en su estructura un anillo ciclohexano (Moscona, 2005a). En la Figura 5, se observan las similitudes estructurales de los inhibidores de la neuraminidasa con el ácido siálico.

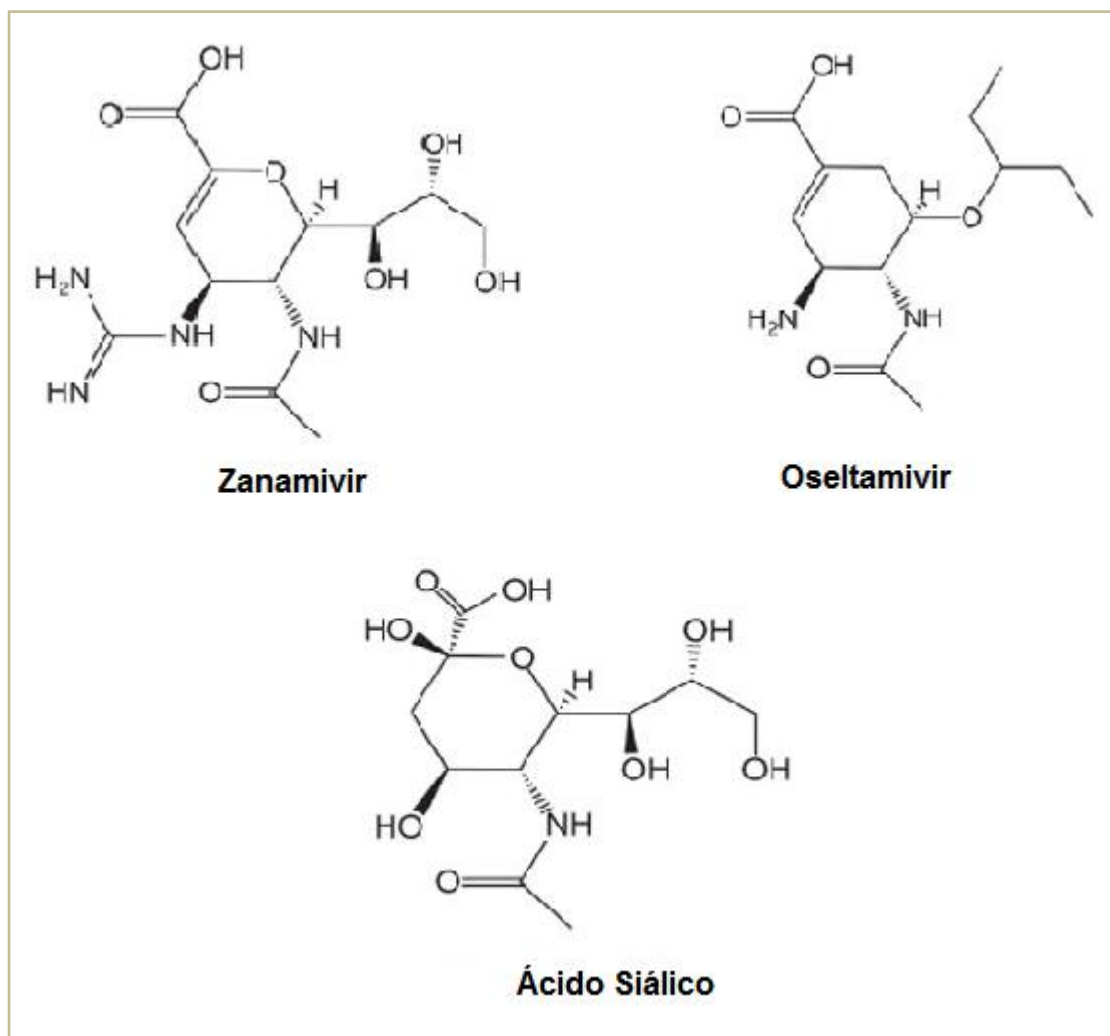
El zanamivir tiene una biodisponibilidad de 10% a 20%, es decir que del total de la dosis, del 10 al 20% se va a al sistema circulatorio; el 90% de la dosis inhalada es eliminada en la orina. Se sabe que la vida media en plasma es de 2.5 a 5.1 horas, la dosis es de 10 mg dos veces al día por 5 días iniciando dentro de las 48 horas de presentarse síntomas, las dosis para niños son las mismas (Tanaka y col., 2009). Como efectos adversos se ha relacionado con broncoespasmos (Democratis y col., 2006), por lo que normalmente es utilizado como segunda opción de tratamiento.

El oseltamivir, es hidrolizado por el hígado a carboxilato de oseltamivir, la biodisponibilidad de este es del 2%, tiene una vida media de 6 a 10 horas, la dosis en adultos es de 75 mg, dos veces al día por 5 días; en niños, la dosis es de 2 mg/kg, dos veces al día por 5 días (Tanaka y col., 2009).



**Figura 4.** Mecanismo de acción de los inhibidores de la neuraminidasa.

Fuente: Adaptado de Moscona, 2005a.



**Figura 5.** Estructuras del ácido siálico y los inhibidores de la neuraminidasa, zanamivir y oseltamivir.

Fuente: Adaptado de Das y col., 2010a.

Como efectos adversos se observa leve incomodidad intestinal; este antiviral es utilizado como primera opción de tratamiento de influenza, esto puede contribuir a la resistencia que ha sido reportada, mientras que la resistencia para zanamivir se ha presentado en menor cantidad.

### **Mutaciones Asociadas con la Resistencia a Oseltamivir**

La resistencia a los antivirales se genera por mutaciones que se presentan en el virus influenza (Democratis y col., 2006). Todas las variantes resistentes a oseltamivir de los virus influenza contienen mutaciones específicas en la neuraminidasa que le permiten la sobrevivencia del virus pero que no inactiva la función de la enzima (R118K, R371K, E227D, D151E, R152K, R224K, E276K). Para la unión de oseltamivir a la neuraminidasa, esta última tiene que reorganizarse formando una cavidad, mientras que para la unión de zanamivir no se requiere ninguna modificación en la estructura de la proteína, este puede ser un factor del por qué se ha desarrollado una mayor resistencia a oseltamivir, ya que algunas mutaciones evitan el rearrreglo proteico disminuyendo la capacidad de unión. El ácido glutámico de la posición 276 debe rotar y unirse con la arginina de la posición 224 para la formación de la cavidad, pero se ha visto que las mutaciones R292K, N294S y H274Y inhiben esta rotación y evitan la formación. Por otro lado, la mutación E119V es una mutación que confiere resistencia a oseltamivir y que no está implicada en la formación de la cavidad (Moscona, 2005b).

La mutación H274Y, llamada así cuando se presenta en la N2, es conocida como H275Y en la N1, es la que se ha relacionado principalmente con la resistencia a oseltamivir (Hauge y col., 2009). Se ha observado que esta mutación reduce la capacidad de replicación y transmisión eficiente del virus, esta mutación se había encontrado en virus europeos que estuvieron circulando en 2007 y 2008 (Carr y col., 2008), y en algunos casos del virus A H1N1 de



2009 se ha reportado resistencia (Memoli y col., 2010), y esta en su mayoría se ha debido a la mutación H275Y (Wang y col., 2010), aun así esta resistencia ha sido muy limitada y el virus se sigue considerando susceptible a oseltamivir.

Existe un balance funcional entre las proteínas hemaglutinina y neuraminidasa, que es necesario para la supervivencia de los virus en las células huésped, una de estas proteínas es la encargada de la unión y penetración del virión en la célula, mientras que la otra se encarga de romper esas uniones para la liberación de un virión recién sintetizado, es por esto que cuando una de estas proteínas sufre un cambio, como podría ser una mutación que confiera resistencia en el caso de la neuraminidasa y que esto afecte su actividad, la hemaglutinina la compensa con mutaciones que modulen la unión al receptor que contiene ácido siálico (Wei, 2010b); de esta manera cuando la actividad de la neuraminidasa como sialidasa se disminuye, también puede disminuirse la afinidad de la hemaglutinina por el receptor de ácido siálico (Gulati y col., 2009).