

El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza

Ma. Isabel Salazar,^{a*} Orestes López-Ortega,^a Gloria León-Ávila,^b José Ernesto Ramírez-González^c y María Eugenia Castro-Mussot^a

Departamentos de ^aInmunología, Genética y ^bZoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México

^cLaboratorio de Genoma de Patógenos, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 20 de mayo de 2010

Aceptado: 30 de mayo de 2010

RESUMEN

Para comprender la gran variabilidad de los virus de la influenza es necesario entender no solo su configuración genética, sino las consecuencias a la que ésta conlleva en términos de la variación que provoca en las proteínas que participan en su replicación y las que constituyen la superficie de la partícula viral. El origen de los grandes cambios en estos virus se debe, en primer lugar, a su genoma segmentado que puede sufrir reasociaciones y, en segundo, a la tasa de error de la polimerasa, responsable de copiar los genes contenidos en estos segmentos. Estos dos mecanismos combinados confieren la plasticidad genética que origina con cierta frecuencia la emergencia de nuevos virus de la influenza en la naturaleza.

Palabras clave:

Virus de la influenza, variabilidad genética, genoma segmentado, error de la polimerasa

SUMMARY

To better understand the significant variability displayed by influenza viruses, we need to be aware not only of its genetic characteristics, but also of the effect this genetic makeup has on proteins associated with viral replication and antigenicity. The origin of such diversity is due first and foremost to its segmented genome that allows segment reassortment (antigenic shift) and second to the error prone viral polymerase (antigenic drift) responsible of copying the genes enclosed in these segments. These two combined mechanisms confer a genetic plasticity that often leads to the emergence of new influenza viruses in nature.

Key words:

Influenza virus, genetic variability, segmented genome, error-prone polymerase

Generalidades

Los virus de la influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, que comprende cinco géneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus* e *Isavirus*.¹ Estos virus están compuestos por aproximadamente 1 % de RNA, 70 % de proteínas, 20 % de lípidos y entre 5 a 8 % de carbohidratos.² Por lo general, las partículas virales de los *influenzavirus* son pleomórficas con un tamaño de 80 a 120 nm de diámetro, contienen una envoltura lipídica que proviene de la célula en la que el virus se ha replicado y en la que están insertadas las glucoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA).³

La clasificación de los virus de la influenza en los tipos A, B y C (Figura 1) se basa en las características antigénicas de dos de sus proteínas internas (M y NP); la posterior división en los subtipos se realiza según las características antigénicas de sus proteínas de superficie (HA y NA). En adición a

las proteínas HA y NA, cada tipo de virus contiene otra proteína membranar: los virus de la influenza A contienen M₂, los de la influenza B a la proteína MB y los virus de la influenza C contienen la proteína denominada CM2; aunque en la partícula viral se encuentra un bajo número de copias de estas últimas.⁴⁻⁶

Una de las características más sobresalientes de la superficie viral son las aproximadamente 500 espículas radiales (de 10 a 14 nm) de HA que se proyectan hacia el exterior. La otra proteína expuesta en la superficie de la partícula de los virus de la influenza A y B es la NA, ya que los virus de la influenza C solo exhiben la proteína HEF (*hemagglutinin esterase fusion protein*). En los virus que contienen ambas proteínas la relación HA/NA varía, aunque generalmente es de 4:1 o de 5:1.³ En el interior de la envoltura se ubica la proteína matriz (M₁).⁷ El centro del virión está ocupado por la ribonucleoproteína, conformada tanto por el genoma viral (RNA de polaridad negativa) como

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Ma. Isabel Salazar. Laboratorio de Inmunología Celular e Inmunopatogénesis, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prol. de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, Del. Miguel Hidalgo, 11340 México D. F., México. Tel: 5729 6000, extensión 62487. Correo electrónico: maisabelsalazar@gmail.com

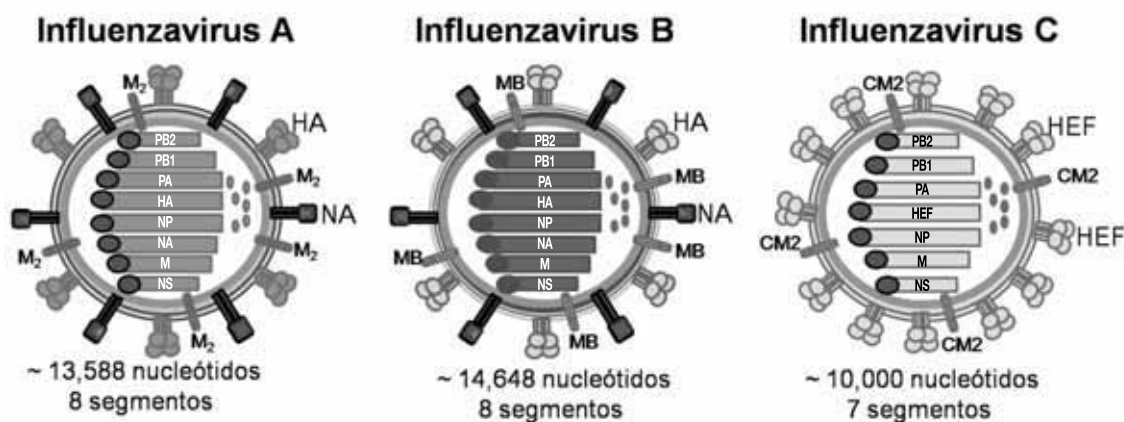


Figura 1. Esquema de la configuración genómica y estructural de las partículas virales de los influenzavirus A, B y C.

por las proteínas de la nucleocápside (NP) y por otras tres proteínas (PA, PB1 y PB2) que conforman la polimerasa encargada de copiar el material genético viral.^{7,8}

El genoma viral está dividido en siete u ocho segmentos de una sola hebra de RNA, de acuerdo con el sexo¹ (Figura 1). Esta organización génica permite el intercambio de segmentos de RNA cuando dos o más virus diferentes se multiplican en la misma célula, dando lugar a nuevas variantes que pueden exhibir cambios en la virulencia para una especie dada.⁹ Los diferentes subtipos y variantes son especie-específicos, es decir, en general atacan a una sola especie en la que producen enfermedad respiratoria.¹⁰ Lo anterior es determinado por la afinidad/especificidad de la interacción entre las proteínas de la superficie viral y el receptor celular.

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

1. Las diferencias antigénicas entre las proteínas NP y M₂.
2. El grado de variabilidad antigénica en sus glucoproteínas

de superficie (las HA y NA de los virus tipo A presentan la mayor diversidad).

3. El número de segmentos del RNA (el tipo C solo contiene siete segmentos).

Las aves migratorias son los hospederos naturales que albergan todos los subtipos reconocidos hasta la fecha del virus de la influenza A, sin causarles daño aparente. Las aves excretan los virus en las heces.¹¹ Además de que los virus de la influenza A infectan de manera natural a numerosas especies de aves, infectan también a humanos, cerdos, caballos, ballenas, lobos de mar y camellos, entre otras. Los virus de la influenza B parecen infectar de modo natural solo a los humanos y los de la influenza C se han aislado de humanos, perros y cerdos. De estos tres grupos son los virus de la influenza A (Figura 2 y Cuadro I) los que presentan la mayor variabilidad y también los de principal potencial pandémico.

La influenza se considera una enfermedad emergente por la capacidad que tienen los virus, principalmente los del grupo A, de variar antigénicamente en sus glucoproteínas externas (HA y NA) y evadir así la inmunidad adquirida por la población en infecciones previas.

El genoma viral

Cada género de influenzavirus posee sus mecanismos particulares para la codificación de sus proteínas. Los virus de la influenza A y B contienen cada uno ocho segmentos de RNA, mientras los virus de la influenza C contienen solo siete segmentos (Figura 1). En los influenzavirus A, el segmento siete contiene la información para M₁ y M₂ y el segmento ocho para NS1 y NS2, aunque los demás segmentos codifican solo para una proteína (Cuadro I).¹ Cada uno de los segmentos forma un complejo de ribonucleoproteína con la proteína NP y tiene unida la tríada PB1, PB2 y PA que constituye la RNA polimerasa viral (RpdR).^{3,8}

En los virus de la influenza como en otros virus de RNA, la replicación y la transcripción son catalizadas por una RNA

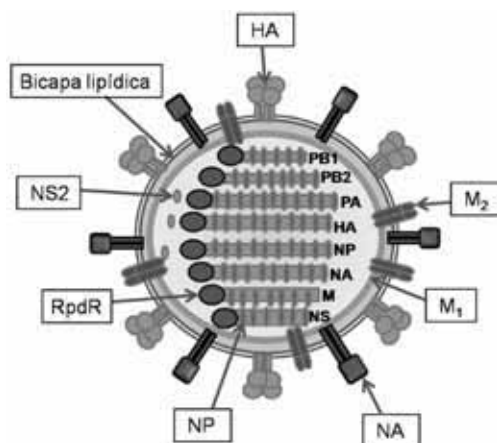


Figura 2. Esquema general de la organización en el virión de influenza A.

Cuadro I. Características generales de los segmentos génicos del virus de la influenza A

Segmento	Proteína	Tamaño del mRNA	PM (kDa)	Moléculas por virión	Funciones identificadas
1	PB2	2320 nt	85.7	30-60	RpdR: unión del cap
2	PB1	2341 nt	86.5	30-60	RpdR: actividad en elongación
3	PA	2211 nt	84.0	30-60	RpdR: actividad proteolítica
4	HA	1757 nt	61.0	~500	Hemaglutinina, reconocimiento del receptor
5	NP	1540 nt	56.0	~1000	Nucleoproteína: unión al RNA; parte del complejo transcriptasa; transporte nuclear/citoplasmático del RNA viral
6	NA	1392 nt	50.0	~100	Neuraminidasa, liberación de la partícula viral
7	M1	1005 nt	28.0	~3000	Proteína de matriz, componente principal del virión
	M2	315 nt	11.0	20-60	Proteína integral de membrana, canal iónico
8	NS1	868 nt	27.0	0	Proteína no estructural: <i>splicing</i> y traducción. Proteína antiinterferón
	NS2	395 nt	14.0	130-200	Proteína no estructural de localización nuclear y citoplasmática de función desconocida

polimerasa dependiente de RNA viral (RpdR). Para que se lleven a cabo estos eventos se requiere la acción concertada de otros factores proteicos del virus y de la célula hospedera. La actividad que realiza la RpdR no está disponible en las células de los mamíferos, por lo que esta polimerasa debe sintetizarse inmediatamente después de la infección o estar contenida en el virión, como ocurre con los virus de la influenza. Los segmentos de RNA de polaridad negativa deben ser copiados por esta RpdR en una cadena de RNA que funcionará como un RNA mensajero (mRNA). Para que este evento se complete, cada segmento de RNA viral necesita incorporar en su extremo 5' el *cap* de un mensajero celular, entonces estos segmentos son exportados al citoplasma y reconocidos por la maquinaria traduccional como mRNA propios y así se lleva a cabo la producción de las proteínas correspondientes (Figura 2). La polimerasa de los virus de la influenza es heterodimérica y una vez que es sintetizada *de novo* es empaquetada en los viriones.

Con un genoma de menos de 14 kb, el virus ha desarrollado varias estrategias para expandir la capacidad codificante de su genoma.¹² Dichas estrategias son diversas e incluyen la traducción de RNA del segmento NS, en una forma madura que sufre corte/empalme de RNA (*splicing*) y en otra que no. Mientras que los mRNA del segmento M son procesados por corte/empalme alternativo, los mRNA del segmento PB1 son bicistónicos.¹³ De los ocho segmentos de RNA viral (RNAv), el mRNA correspondiente a M₁ puede además ser procesado por corte/empalme alternativo para generar M₂ y M₃. El gen M del virus de la influenza A contiene dos sitios posibles de corte/empalme (nt 12-13 y 52-53) y la selección del sitio pudiera estar más relacionada con factores de la célula hospedera.^{14,15}

Ya que todos los segmentos de RNAv deben obtener un *cap* para sintetizar sus propios mensajeros y algunos deben someterse a corte/empalme, los segmentos de RNAv una vez dentro de la célula deben ser traslocados al núcleo, sitio donde son procesados y se forman los mensajeros correspondientes. Asimismo, es en el núcleo donde ocurren la síntesis de los nuevos genomas virales y su unión a la proteína NP, éstos son posteriormente exportados al citoplasma con la intervención de las proteínas virales M₁ y NS2; finalmente en el citoplasma se ensamblan en nuevas partículas virales.

La RpdR viral y las mutaciones

La polimerasa RpdR del virus de la influenza está constituida por tres proteínas: PB1, PB2 y PA. Esta enzima cataliza, además de la síntesis de mRNA virales, la replicación y la formación de los nuevos RNA genómicos en las células infectadas. Los tres segmentos más largos de RNA en el genoma viral codifican para las proteínas PB1, PB2 y PA, que tienen pesos moleculares de aproximadamente 96, 87 y 85 kDa, respectivamente.^{16,17}

Los iniciadores con *cap* requeridos para la síntesis de la cadena equivalente a un mRNA son producidos por la misma RpdR (Figura 3). La subunidad proteica PB2 se une específicamente a la estructura 5' *cap* de los mRNA celulares y es la PB1 la que cataliza la adición de nucleótidos durante la elongación del mRNA correspondiente a cada segmento del genoma viral.¹⁸ La RpdR carece de la actividad para corregir los errores (edición) introducidos durante el copiado de la cadena molde de RNA y por lo tanto produce mutaciones.

Típicamente una RNapol viral exhibe una tasa de error de 1×10^{-3} a 1×10^{-5} , es decir, que introduce una mutación por cada mil o 100 mil nucleótidos copiados. Los virus de la influenza tipo A muestran el mayor número de mutaciones acumuladas a través del tiempo (*antigenic drift*), mientras los genomas de los virus de la influenza C tienen poca variabilidad, incluso si se han aislado con décadas de separación.¹⁹ Se ha estimado que la tasa de mutación para la HA (específicamente en el dominio HA₁) del subtipo H3 es de 6.7×10^{-3} mutaciones/sitio/año.¹⁹ Es claro que muchas de estas mutaciones se mantendrán silenciosas o darán origen a sustituciones sinónimas de aminoácidos (sin efecto en funcionalidad), pero algunas de ellas se traducirán en cambios significativos en la proteína correspondiente. La comparación de aminoácidos de la proteína HA de virus porcinos mostró que entre 1976 y 1982 la mutaciones provocaron nueve cambios de aminoácidos en esta proteína.²⁰ Otras observaciones sugieren que el subtipo H1 porcino tiene cambios más lentos que el H1 o H3 de virus humanos.²¹

La reasociación de segmentos en los virus de la influenza

Como se mencionó, una peculiaridad de los virus de la influenza A es que sus genes se encuentran codificados en segmentos separados. Este arreglo genómico permite que los virus puedan intercambiar segmentos completos (*antigenic shift*) con otras variantes virales y generar nuevas entidades. Algunos de estos virus tendrán la capacidad de infectar humanos y en ocasiones mediante eventos mutagénicos podrán adaptarse a ser transmitidos directamente entre ellos. Esto más que ser un evento raro ocurre con frecuencia en la naturaleza y es tal vez el principal origen de cepas con potencial pandémico.

Los cerdos han sido considerados por mucho tiempo el intermediario más importante y la fuente principal de nuevas variantes de virus de la influenza (Figura 4). Sin embargo, en años recientes hemos aprendido que hay variantes que

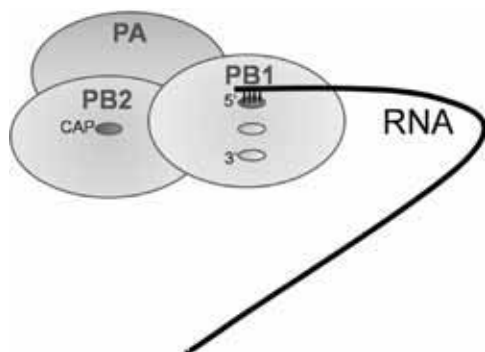


Figura 3. Configuración de la RNA polimerasa dependiente del RNA (RpdR) del virus de la influenza y su asociación con el segmento de RNAv. Se muestra el sitio de unión del cap (su cap) en el que se lleva a cabo el corte del cap del mensajero celular (*cap snatching*), para que así el mRNA viral suplante a uno celular. Adaptado de Li y colaboradores, 1998.¹⁸

pueden ser transmitidas directamente por las aves, tal fue el caso del virus H5N1 que causó importantes brotes epidémicos en 2003 en Asia. De hecho, se cree que éste es el primer paso de un virus zoonótico antes de que adquiera la capacidad de ser transmitido de humano a humano. La transmisión directa del virus de la influenza porcina a humanos fue documentada por primera vez en Wisconsin en 1976.²²

Las células susceptibles en los cerdos tienen receptores a los cuales se unen tanto los virus de la influenza de mamíferos como los de las aves, en consecuencia en sus células se produce una reasociación de segmentos y la emergencia de nuevas variantes.²³ Lo anterior es particularmente relevante si consideramos que la influenza es una zoonosis en esta especie. La reasociación de segmentos permite a un virus que infecta cerdos o aves, por ejemplo, obtener un segmento de un virus que proviene de humanos (Figura 4). Por esta razón, los cerdos son considerados los “vasos mezcladores” y la principal fuente de generación de nuevos virus de la influenza con potencial pandémico.^{9,24-26} La coinfección es un evento natural y se han confirmado dobles infecciones por H9N2 aviar y H3N2 humano en cerdos en el sureste de China.²⁷ La reasociación de los segmentos codificantes para HA y NA permite la aparición de nuevos subtipos virales.²⁸

A la fecha no se han descrito con detalle los mecanismos moleculares que intervienen en la reasociación de segmentos. Sin embargo, estudios de coinfección realizados con un virus humano H3N2 que circuló en Nueva York entre 1995 y 2006 y un virus H3N2 que causó brotes en Nueva Zelanda entre 2000 y 2005 indican que estos eventos pudieran no suceder al azar,²⁹ lo cual limita el número de reasociaciones funcionales posibles; de no ser así cada vez que dos virus de la influenza coincidieran se generaría un mayor número de variantes virales a las observadas.

No solo en los virus de la influenza tipo A sino también en los tipos B y C se pueden llevar a cabo reasociaciones *in vivo*, sin embargo éstas deben ocurrir únicamente entre miembros

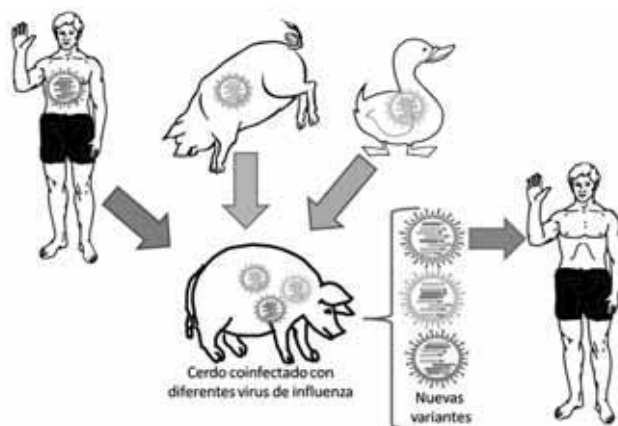


Figura 4. Modelo de la reasociación de segmentos genómicos en los virus de influenza. El cerdo se puede infectar con subtipos de virus de la influenza A de su misma especie, pero también con aquellos provenientes de humanos o aves. Cuando hay coinfecciones, la reasociación de fragmentos se lleva a cabo originando nuevas variantes virales.

del mismo tipo viral, no entre diferentes tipos. Las reasociaciones son epidemiológicamente importantes porque permiten grandes cambios en términos de la antigenicidad de las proteínas que componen al virión. Adicionalmente a las reasociaciones de segmentos ya mencionadas, los RNA virales también tienden a acumular mutaciones puntuales. Como consecuencia, la cubierta antigénica cambia y la respuesta inmune de las células B de memoria que se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos neutralizantes contra un tipo viral no es efectiva para otro. Ésta es la principal razón por la que la vacuna para la influenza estacional se debe preparar y aplicar cada año con los principales subtipos virales circulantes; es también la causa por la que se generan brotes periódicos y recurrentes de influenza.

Las proteínas de superficie y el tropismo viral

El tropismo viral se refiere al patrón de infección de ciertos órganos/tejidos y dentro de ellos de determinados tipos celulares, lo anterior se debe principalmente a receptores (proteínas de superficie) en esos tipos celulares. En algunos casos no es suficiente la presencia del receptor viral para que se lleve a cabo una infección productiva, ya que otros factores proteicos intracelulares pueden ser imprescindibles. Las proteínas de la superficie viral reconocen a su receptor específico en cada una de sus células hospederas, esta interacción posibilita el contacto inicial y es indispensable para llevar a cabo la interiorización del virus.¹

La proteína HA (hemaglutinina) viral reconoce en la célula blanco el binomio ácido siálico/galactosa presente en diferentes proteínas de la membrana celular.³⁰ Esta clase de receptores se encuentran en las células bronquiales no ciliadas, en las células alveolares y en la conjuntiva de los seres humanos. Las HA de los virus humanos reconocen los residuos de ácido siálico/galactosa unidos por un enlace α 2-6, éstos se localizan en células epiteliales de la mucosa nasal y paranasal, en la faringe, tráquea, bronquios y bronquiolos.³¹

En las aves, los virus de la influenza A infectan preferencialmente células del tracto digestivo donde el virus se replica y posteriormente es excretado en altas concentraciones en heces. Así, en las aves la transmisión ocurre por vía oral-fecal a través de aguas contaminadas por especímenes infectados.³²

La distribución de las diferentes especies de ácido siálico/galactosa varía entre los animales y los virus de la influenza difieren en su capacidad para reconocerlos. Por ejemplo, los virus de la influenza humana reconocen específicamente ácido siálico/galactosa ligado por enlaces α 2-6, mientras que los virus equinos se unen a ácido siálico unido a la galactosa por enlaces α 2-3.³³

Como ya se mencionó, el epitelio respiratorio de los cerdos puede ser infectado tanto por virus humanos como aviares, debido a que los cerdos viven en proximidad con los humanos y las aves. Existe una preocupación constante de su función como generador de nuevas variantes virulentas con capacidad de infectar y diseminarse entre los humanos.³⁴ Solo

los genes HA de los influenzavirus tipo A se han clasificado en 16 subtipos de acuerdo con sus características antigénicas, mientras que los B y C no han sido clasificados en subtipos.³⁵ Por otro lado, se han identificado nueve subtipos de NA para influenzavirus A en aves, aunque algunos subtipos pueden también infectar otras especies (Cuadro II).

Típicamente la influenza es transmitida por aerosoles que contienen virus y que son emitidos por personas infectadas al toser o estornudar. La influenza puede también transmitirse por saliva, secreciones nasales, heces y sangre de aves infectadas. La infección ocurre por el contacto directo con estos fluidos corporales o a través de superficies contaminadas (fómites). Sin embargo, parece ser que los aerosoles son los que causan la mayoría de las infecciones.

La variabilidad genética y la adaptación a nuevos hospederos

Aunque en la naturaleza han surgido algunos virus de la influenza A de origen aviar que pueden infectar directamente a humanos, en condiciones experimentales los virus aviares no se replican eficientemente en células humanas,³⁶ así como los virus de origen humano no se pueden replicar en células de aves. Se ha informado que los residuos 226 y 228 de la HA en los subtipos H3 son los que determinan esta restricción de hospedero.³⁷ Algunas mutaciones que ocurren en la proteína HA son determinantes para sobrepasar las barreras interespecie.

También existen evidencias que indica que la proteína PB2 de la RNA polimerasa es otro factor crítico en la definición del hospedero.³⁸ Cambios específicos en la proteína PB2 como en el aminoácido 627 (Glu→Lis) afectan la especificidad del hospedero.³⁹

En cuanto a las reasociaciones de segmentos, la evidencia experimental demostró que la sola movilización del segmento NS de la cepa aviar altamente patogénica A/Guangdong/1/95 (GD; H5N1) al fondo genético de la cepa FPV (H7N1) fue suficiente para incrementar su eficiencia de replicación, tanto en células humanas como de ratón, sin requerir adaptación previa.⁴⁰

La evolución de los virus de la influenza para adaptarse a nuevas especies está condicionada no solo por las características fisiológicas del hospedero, sino por aspectos ecológicos. El surgimiento de un virus zoonótico aun con baja capacidad para replicarse en células de humano, pudiera permitir a la larga la generación de las mutaciones suficientes para originar una variante mejor adaptada a la nueva especie. Es posible que la adaptación a nuevas especies sea más rápida cuando la variante viral surge por reasociación de segmentos, ya que este mecanismo permite cambios genéticos extensos.

Es importante notar que investigaciones retrospectivas han demostrado que 16 mutaciones fueron suficientes para que un virus de origen zoonótico adquiriera la capacidad de infectar humanos. Estas mutaciones ocurrieron en las proteínas virales: NS1, NS2, M1, NP, PA y PB2.⁴¹ Considerando la tasa de mutación de la RpdR, se pueden acumular

Cuadro II. Presencia o ausencia de subtipos de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA)

	Subtipo de HA					Subtipo de NA			
	Ave	Cerdo	Caballo	Humano		Ave	Cerdo	Caballo	Humano
H1	Sí	Sí	No	Sí	N1	Sí	Sí	No	Sí
H2	Sí	No	No	Sí	N2	Sí	Sí	No	Sí
H3	Sí	Sí	Sí	Sí	N3	Sí	No	No	No
H4	Sí	No	No	No	N4	Sí	No	No	No
H5	Sí	No	No	No	N5	Sí	No	No	No
H6	Sí	No	No	No	N6	Sí	No	No	No
H7	Sí	No	Sí	No	N7	Sí	No	Sí	No
H8	Sí	No	No	No	N8	Si	No	Sí	No
H9	Sí	No	No	No	N9	Sí	No	No	No
H10	Sí	No	No	No					
H11	Si	No	No	No					
H12	Sí	No	No	No					
H13	Sí	No	No	No					
H14	Sí	No	No	No					
H15	Sí	No	No	No					
H16	Sí	No	No	No					

rápida y algunos de ellos correlacionarse con los dominios de las proteínas que favorezcan adaptaciones a nuevos hospederos.

La variabilidad genética y la emergencia de cepas resistentes

Los antivirales son el tratamiento a seguir en las infecciones por el virus de la influenza. La *Food and Drug Administration* aprueba dos tipos de medicamentos para el control de la infección: los adamantanos (amantadina y rimantidina) y los inhibidores de la NA (zanamivir y oseltamivir).⁴²

El mecanismo de acción de los adamantanos es bloquear el conducto iónico que forma la proteína M₂ en la membrana viral y afectar así la replicación.⁴³ Sin embargo, pequeños cambios en la estructura tridimensional de la proteína M₂ pueden generar resistencia al fármaco. La mutación más frecuente es S31N, sin embargo, aunque este cambio altera la estabilidad de la proteína, el canal con la amantadina unida es todavía funcional y las partículas virales se forman y liberan.⁴⁴ Ya que los influenzavirus B carecen de proteína M₂, los adamantanos no tienen efecto sobre ellos. Por otro lado, en los últimos años se han seleccionado de manera natural numerosas cepas de virus de la influenza A resistentes a los adamantanos, limitando considerablemente su uso.⁴⁵⁻⁴⁷

Los antivirales inhibidores de la NA en virus de la influenza A y B son el zanamivir, el oseltamivir y el peramivir. La NA es una glucoproteína tetramérica anclada a la membrana del virión que tiene un papel crítico para la liberación de la progenie viral de las células infectadas y favorecer así la diseminación de los virus hacia otras células (www.medmol.es). El sustrato de la NA es el ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac). El zanamivir es un análogo de Neu5Ac en el que el hidroxilo del C4 se ha sustituido por una guanidina, dando lugar al Neu5Ac2en; este cambio aumenta la afinidad de unión a la

neuraminidasa unas 10 mil veces haciéndola irreversible.^{48,49} El zanamivir es efectivo pero solo si la administración es intranasal pues por vía oral su contribución terapéutica es pobre. Es importante destacar que los análogos de Neu5Ac2en se unen preferencialmente a las NA de los influenzavirus de tipo A y que mutaciones en el residuo E119 de la NA confieren resistencia a esta droga (www.medmol.es).

Por otro lado, el oseltamivir es un inhibidor de la NA activo por vía oral. Éste es administrado como un profármaco; el fosfato de oseltamivir por la acción de las esterasas del huésped es procesado en el metabolito activo, carboxilato de oseltamivir. La mutación H274Y en el gen de NA se asocia con resistencia a oseltamivir,⁵⁰ sin embargo, otros residuos están también involucrados en la resistencia a estos antivirales, tal sucede con R156, W178, S179, D198, I222, E227, E277, N294, E425.⁴² Otra mutación que confiere resistencia al peramivir en algunas cepas del virus de la influenza B es la H273T.⁵¹ Es crítico considerar que la selección de cepas resistentes al fármaco ocurre rápidamente durante los brotes. Antes de la temporada 2007-2008 menos de 1 % de las cepas de influenza A estacional mostraban resistencia al oseltamivir; para 2007-2008 la resistencia alcanzó 12 %.⁵² Actualmente el *Center for Diseases Control* informa 99.6 % de resistencia a oseltamivir en las cepas de influenza estacional (Cuadro III).

La rápida evolución genética de los influenzavirus que conduce a la aparición de cepas resistentes a drogas antivirales evidencia la necesidad de estrategias terapéuticas más efectivas en el tratamiento de este padecimiento.

Lecciones del pasado

En el siglo pasado ocurrieron epidemias importantes por el virus de la influenza A: en 1918, 1957, 1968 y 1977. Tan solo entre 1918 y 1919 se estima que murieron 40 a 60 millones de personas y se infectaron con la cepa circulante unos 500

millones más. El virus que produjo la pandemia de 1918 fue del subtipo H1N1 de origen aviar. En 1957, un virus del subtipo H2 produjo la epidemia y un virus H1 en 1977. El número de decesos tanto en 1957 como en 1968 fue cercano a los seis millones. En 1997, un virus aviar H5 y en 1999 un virus H9 causaron brotes de influenza en la región de Hong Kong.⁵³

Cuando la enfermedad comenzó en otoño de 1918 en Estados Unidos, se pensó que se trataba de una nueva y terrible arma química debido a que la Primera Guerra Mundial estaba en curso. Se llegó a especular, a pesar de su inviabilidad, que la compañía alemana Bayer había insertado el virus en las aspirinas para diseminarlo entre los estadounidenses. También se consideró la posibilidad de que los primeros casos en Boston se debieron a que un navío alemán encallado en el puerto lo había liberado allí.⁵⁴ Las víctimas de esa plaga tenían que encontrar alguna explicación a tan atroz padecimiento. Recientemente se ha descubierto y solo después de reconstruir al virus causante de esta pandemia, que éste surgió en la naturaleza y fue de origen aviar (H1N1); se han identificado también las mutaciones específicas que le confirieron la capacidad de ser transmitido de humano a humano y de producir la alta mortalidad que lo caracterizó.^{55,56}

La influenza de Hong Kong acaecida entre 1968 y 1969 fue un brote de categoría dos causado por una cepa H3N2, derivada de una H2N2 por reasociación de los segmentos HA. Este virus infectó a 500 mil residentes de Hong Kong, lo que representó aproximadamente 15 % de su población, aunque con una baja tasa de mortalidad. En Estados Unidos aproximadamente 33 800 personas murieron a causa de esta infección. Esta pandemia mató aproximadamente a un millón de personas en todo el mundo.⁵⁷

Cuadro III. Algunas mutaciones identificadas en la resistencia a drogas en los virus de la influenza A

Mutación	Proteína	Consecuencia	Referencia
S193F con D225N	HA	Resistencia a amantadina	64
L26F	M2	Resistencia a amantadina	65
V27A	M2	Resistencia a amantadina	65
S31N	M2	Resistencia a amantadina	44
E119	NA	Resistencia a zanamivir	www.medmol.es
H274Y	NA	Resistencia a oseltamivir	50
R156	NA	Resistencia a oseltamivir	42
W178	NA	Resistencia a oseltamivir	42
S179	NA	Resistencia a oseltamivir	42
D198	NA	Resistencia a oseltamivir	42
I222	NA	Resistencia a oseltamivir	42
E227	NA	Resistencia a oseltamivir	42
E277	NA	Resistencia a oseltamivir	42
N295S	NA	Resistencia a oseltamivir	66
E425	NA	Resistencia a oseltamivir	42

Ya en este siglo, otro brote por un virus aviar H5N1 amenazó con convertirse en una pandemia de grandes dimensiones en 2003. Este virus se transmitió de aves a humanos sin ningún huésped intermediario hasta ahora identificado. Los casos de influenza por H5N1 en humanos comenzaron a ser notificados desde 2002 y aparecieron en zonas rurales de diferentes países asiáticos. Los contagios ocurrieron en personas expuestas a dosis muy altas de virus presentes en aerosoles, generados al sacrificar aves enfermas sin las medidas de higiene adecuadas. Experimentos posteriores en ratones indicaron que la replicación del H5N1 se limitaba solo a la parte superior del tracto respiratorio.⁵⁸ En los humanos el virus no fue liberado eficientemente para infectar a otras personas, pues la infección se produce directamente en el pulmón, lo que limitó los riesgos.⁵⁹

Aunque en un principio se pensó que este virus H5N1 solo se transmitía de ave a humano y no de humano a humano, casos posteriores indicaron que podía directamente reconocer receptores en células humanas.^{60,61} Así, debido en parte a su ineficiente transmisión de humano a humano, fueron relativamente pocas las infecciones humanas ocurridas por este virus H5N1.^{31,62}

Finalmente, en abril del 2009 tuvo lugar en nuestro país un brote de influenza A originado por un virus de origen porcino H1N1, el cual alcanzó en pocos meses la categoría de pandemia. Aunque en un inicio se lanzó una alerta nacional para tratar de limitar la transmisión del virus, para finales de 2009 varios países habían sido afectados y numerosos contagios ocurrían alrededor del mundo, a pesar de las rígidas medidas tomadas.⁶³ De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, al 9 de mayo de 2010, 214 países habían confirmado casos de influenza A H1N1 y a pesar de una tasa de mortalidad no alta se han acumulado 18 036 fallecimientos en el mundo por este padecimiento. Este hecho nos recuerda una vez más el impresionante potencial pandémico que tienen estos virus.

Conclusiones

Debido a la sobresaliente capacidad de cambio del virus de la influenza, con bases en su configuración y características genéticas, las proteínas virales de superficie muestran de manera natural notables variaciones antigénicas. Esto tiene efecto sobre el tipo de hospederos que pueden ser infectados, así como en la virulencia y la evasión de la respuesta inmune. Debido a lo anterior y a las grandes epidemias de influenza experimentadas por la humanidad, la influenza ha representado y continuará representando la crónica de una pandemia largamente anunciada.

Referencias

1. **Strauss J, Strauss E.** Viruses and human disease. Second edition. San Diego, CA: Elsevier; 2008.
2. **Compans RW, Chopin PW.** Reproduction of mixoviruses. En: Franenkel-Conrat H, Wagner RR, editors. Comprehensive virology. Vol. 4. New York, USA: Plenum Press; 1975. pp. 179-252.
3. **Lamb RA, Krug RM.** Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. En: Knipe DM, Howley PM, editors. Fundamental virology. Fourth edition. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp. 725-769.

4. **Betakova T, Nermut MV, Hay AJ.** The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus. *J Gen Virol* 1996;77:2689-2694.
5. **Brassard DL, Lesser GP, Lamb RA.** Influenza B virus NB glycoprotein is a component of virions. *Virology* 1996;220:350-360.
6. **Tada Y, Hongo S, Muraki Y, Matsuzaki Y, Sugawara K, Kitame F, et al.** Phosphorylation in influenza C virus CM2 protein. *Virus Res* 1998;58:65-72.
7. **White D, Fenner F.** Medical virology. Fourth edition. USA: Academic Press; 1994.
8. **Duesberg P.** Distinct subunits of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Mol Biol* 1969;42:485-499.
9. **Webster R, Bean W, Gorman O, Chambers T, Kawaoka Y.** Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;56:152-179.
10. **Murphy B, Webster R.** Orthomyxovirus. En: Fields B, Knipe D, Howley P, editors. *Virology*. Second edition. New York, USA: Lippincott-Raven Publishers; 1996. pp. 1397-1445.
11. **Kuiken T, Holmes E, McCauley J, Rimmelzwaan G, Williams C, Grenfell B.** Host species barriers to influenza virus infections. *Science* 2006;312:4-13.
12. **Lamb R, Takeda M.** Death by influenza virus protein. *Nat Med* 2001;7:1286-1288.
13. **Cheung T, Guan Y, Ng S, Chen H, Wong C, Peiris J, et al.** Generation of recombinant influenza A virus without M2 ion-channel protein by introduction of a point mutation at the 5' end of the viral intron. *J Virol* 2005;75:4439-4443.
14. **Inglis S, Brown C.** Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acids* 1981;9:2727-2740.
15. **Shih S, Nemeroff M, Krug R.** The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6324-6328.
16. **Inglis SC, Lamb RA, Carroll AR, Mahy BWJ.** Polypeptides specified by the influenza virus genome. I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. *Virology* 1976;74:489-503.
17. **Lamb RA, Choppin PW.** Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides including three P polypeptides from RNA produced by primary transcription. *Virology* 1976;74:504-519.
18. **Li M, Ramirez B, Krug R.** RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA binding sites. *EMBO J* 1998;19:5844-5852.
19. **Smith FL, Palese P.** Variation in influenza virus genes: epidemiology, pathogenic, and evolutionary consequences. En: Krug RM, editor. *The influenza viruses*. New York, USA: Plenum; 1989. pp. 152-200.
20. **Luo S, McGregor M, Hinshaw V.** Hemagglutinin mutations related to antigenic variation in H1 swine influenza viruses. *J Virol* 1992;166:1066-1073.
21. **Both G, Sleight M, Cox N, Kendal P.** Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol* 1983;48:52-60.
22. **O'Brian R, Noble G, Easterday B, Kendal P, Nelson D, Hattwick M, et al.** Swine-like influenza virus infection in a Wisconsin farm family. *J Infect Dis* 1997;176(Suppl):390-396.
23. **Thacker E, Janke B.** Swine influenza virus: zoonotic potential and vaccination strategies for the control of avian and swine influenzas. *J Infect Dis* 2008;197:19-24.
24. **Brown I, Harris P, McCauley J, Alexander D.** Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *J Gen Virol* 1998;79:2947-2955.
25. **Castrucci M, Donatelli I, Sidoli L, Barigazzi G, Kawaoka Y, Webster R.** Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 1993;193:503-506.
26. **Scholtissek C, Burger H, Kistner O, Shortridge K.** The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* 1985;147:287-294.
27. **Peiris J, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster R, Shortridge K.** Cocirculation of avian H9N2 and contemporary 'human' H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J Virol* 2001;75:9679-9686.
28. **Webster RG, Laver WG, Air GM, Schild GC.** Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature* 1982;296:115-121.
29. **Rabadan R, Levine A, Krasnitz M.** Non random reassortment in human A influenza viruses. *Influenza Other Respiratory Viruses* 2008;2:9-22.
30. **Weiss W, Brown JH, Cusack S.** Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 1988;333:426-431.
31. **Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le M, Nidom C, Sakai-Tagawa Y, et al.** Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 2006;444:378-382.
32. **Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenstro J, Wallensten A, Fransson T, et al.** Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Path* 2007;3:630-638.
33. **Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Chambers TM, Kiso M, et al.** Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol* 2000;74:11825-11831.
34. **Yeun K, Wong S.** Human infection by avian influenza A H5N1. *Hong Kong Med J* 2005;11:189-199.
35. **Suzuki Y, Nei M.** Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol Biol Evol* 2002;19:501-509.
36. **Beare AS, Webster RG.** Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol* 1991;119:37-42.
37. **Vines A, Wells K, Mastrosovich M, Castrucci MR, Ito T, Kawaoka Y.** The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J Virol* 1998;92:7626-7631.
38. **Neuman G, Kawaoka Y.** Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* 2006;12:881-886.
39. **Subbarao EK, London W, Murphy BR.** A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 1993;67:1761-1764.
40. **Ma W, Brenner D, Wang Z, Dauber B, Ehrhardt C, Högnér K, et al.** The NS segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism, and host range of an H7N1 HPAIV. *J Virol* 2010;84:2122-2133.
41. **Allen J, Gardner S, Vitalis E, Slezak T.** Conserved amino acid markers from past influenza pandemic strains. *BMC Microbiology* 2009;9:1-10.
42. **Deyde VM, Sheu TG, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, Garten R, Alexander I, et al.** Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1102-1110.
43. **Bauer CM, Pinto LH, Cross TA, Lamb RA.** The influenza virus M2 ion channel protein: probing the structure of the transmembrane domain in intact cells by using engineered disulfide crosslinking. *Virology* 1999;254:196-209.
44. **Pielak R, Schnell J, Chou J.** Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:7379-7384.
45. **Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Oroz G, Wallis TR, Davis XM, et al.** Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 2005;366:1175-1181.
46. **Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI.** Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* 2006;295:891-894.
47. **Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, et al.** Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis* 2007;196:249-257.
48. **Staschke KA, Colacino JM, Baxter AJ, Air GM, Bansal A, Hornback WJ, et al.** Molecular basis for the resistance of influenza viruses to 4-guanidino-Neu5Ac2en. *Virology* 1995;214:642-646.
49. **Blick TJ, Sahasrabudhe A, McDonald M, Owens IJ, Morley PJ, Fenton RJ, et al.** The interaction of neuraminidase and hemagglutinin mutations in influenza virus in resistance to 4-guanidino-Neu5Ac2en. *Virology* 1998;246:95-103.
50. **Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, et al.** Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3284-3292.
51. **Baum EZ, Wagaman PC, Ly L, Turchi I, Le J, Bucher D, et al.** A point mutation in influenza B neuraminidase confers resistance to peramivir and loss of slow binding. *Antiviral Res* 2003;59:13-22.
52. **Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA, et al.** Oseltamivir-resistance working group. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA* 2009;301:1034-1041.
53. **Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC.** H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. *EMBO J* 2002;21:865-875.
54. **Kolata G.** Flu: The history of the great influenza pandemic of 1918 and the search for the virus that caused it. New York, USA: Simon & Schuster; 2001.
55. **Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solórzano A, Swayne DE, et al.** Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005;310:77-80.
56. **García-Sastre A, Whitley RJ.** Lessons learned from reconstructing the 1918 influenza pandemic. *J Infect Dis* 2006;194(Suppl 2):S127-S132.
57. **Daum LT, Canas LC, Klimov AI, Shaw MW, Gibbons RV, Shrestha SK, et al.** Molecular analysis of isolates from influenza B outbreaks in the U.S. and Nepal, 2005. *Arch Virol* 2006;151:1863-1874.
58. **Hatta M, Hatta Y, Kim J, Watanabe S, Shinya K, Nguyen N, et al.** Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog* 2007;3:1374-1379.
59. **Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y.** Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006;440:435-436.
60. **Wong S, Yuen K.** Avian influenza virus infections in humans. *Chest* 2006;129:156-168.
61. **Auewarakul P, Suptawiwat O, Kongchanagul A, Sangma C, Suzuki Y, Ungchusak K, et al.** An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J Virol* 2007;81:9950-9955.
62. **Mounts A, Kwong H, Izurieta H, Ho Y, Au T, Lee M, et al.** Case control study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease Hong Kong. *J Infect Dis* 1997;180:505-508.
63. **Secretaría de Salud México.** Plan nacional de preparación y respuesta ante una pandemia de influenza. Disponible en <http://www.dgepi.salud.gob.mx/pandemia/ppi.pdf>
64. **Bai GR, Chittaganpitch M, Kanai Y, Li YG, Auwanit W, Ikuta K, et al.** Amantadine- and oseltamivir-resistant variants of influenza A viruses in Thailand. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:897-901.
65. **Balannik V, Wang J, Ohigashi Y, Jing X, Magavern E, Lamb RA, et al.** Design and pharmacological characterization of inhibitors of adamantane-resistant mutants of the M2 ion channel of influenza A virus. *Biochemistry* 2009;48:11872-11882.
66. **Collins PJ, Haire LF, Lin YP, Liu J, Russell RJ, Walker PA, et al.** Structural basis for oseltamivir resistance of influenza viruses. *Vaccine* 2009;27:6317-23.