

Influenza: Avances recientes en virología molecular y prevención de la enfermedad

Palabras clave: Virus de la influenza, virología molecular, hemaglutinina, neuraminidasa, lavado de manos, protección respiratoria, vacunación.

Key words: Influenza viruses, molecular virology, hemagglutinin, neuraminidase, hand washing, respiratory protections.

Recibido: 04/05/2010
Aceptado: 18/05/2010

Teodoro Carrada Bravo*

* Epidemiólogo Especialista en Enfermedades Transmisibles y Virología Médica.

Correspondencia:

Dr. Teodoro Carrada Bravo
Calzada de los Rincones 694, Col. Las Plazas
36620 Irapuato, Guanajuato, México.
E-mail: teocaba@hotmail.com

Resumen

Los virus de la influenza son Orthomyxoviridae, tienen ocho segmentos de ARN separados y codifican diez proteínas, se explica así el por qué la recombinación es frecuente: cuando dos virus diferentes coinfectan la misma célula, se intercambian los genes con facilidad, pudiendo resultar hasta 256 descendientes distintos. Los virus A se categorizan por la variación de las hemaglutininas (HA) y neuraminidasas (NA). La HA se liga con los sialorreceptores y penetra en la vesícula endosómica de la célula hospedadora, alcanza luego el núcleo donde se replica el ARN mensajero capaz de producir los viriones nuevos, la tarea principal de las NA es liberarlos de la célula. Esta publicación revisa los avances recientes en la estructura molecular y funciones de HA y NA, conocimiento obtenido con el uso de cristalografía y espectrofotometría de masas, métodos de purificación bioquímicos, más el empleo de los anticuerpos monoclonales. El conocimiento novedoso logrado ha servido para entender los fenómenos de patogenidad-virulencia, la transmisión rápida de los virus A H1N1 porcino y A H5N1 aviar circulantes, los mecanismos de adaptación interespecies y el diseño de fármacos antivirales nuevos. La investigación clínica sirvió para reiterar el lavado de las manos con agua y jabón como primera línea de prevención, así como el uso apropiado de mascarillas quirúrgicas; los expertos recomiendan la necesidad de vacunar a los trabajadores de la salud como un grupo blanco prioritario, a fin de disminuir el riesgo de contagiar a los enfermos de riesgo alto.

Abstract

Influenza viruses are Orthomyxoviridae which contain eight separate RNA-segments that encode 10 proteins, this explain why reassortment happens so often. If two different viruses co-infect the same cell an exchange of genes can easily take place yielding up to 256 different off-springs. Viruses type A are categorized by variation of two glycoproteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). NA attaches to sialic acid receptors and penetrates into host cell endosomal vesicles, then moves to the nucleus where RNA encodes messenger to produce virions. NA task is to enable new virions to separate from infected cell. This paper reviews recent advances in molecular structure functions of HA and NA, provided by crystallography, mass spectrophotometer, biochemical methods and the use of monoclonal antibodies, the new collected information may help to explain pathogen city-virulence and rapid transmission of A H1N1 porcine and A H5N1 avian circulating viruses, mechanisms of interspecies adaptation, and development of new antiviral drugs. Clinical research served to stress the importance of hand washing as the first line of prevention, the proper use of surgical masks and respirators, health experts have designated health clinical workers as a priority group to receive the protective vaccinations, to decrease chances of transmitting the flu-viruses to at-risk patients.

Introducción

Los virus de la influenza A y B se han distinguido porque tienen la capacidad de generar epidemias y pandemias, señaladas por enfermedad respiratoria febril y aguda, los brotes ocurren de modo explosivo y son atacadas las personas susceptibles de cualquier edad.¹ La epidemiología de esta enfermedad se ha explicado porque el virus se mantiene circulando en los reservorios naturales de aves acuáticas silvestres, pollos, codornices, patos domésticos, cerdos, caballos, perros, ballenas, focas, humanos y otros mamíferos. Los hospedadores tienen un sistema inmune que les permite resistir el ataque de la influenza, pero lo importante es la inmunidad colectiva o de grupo. El virus circula en un devenir continuo al pasar de un hospedador a otro o de una especie a otra, y sufre mutaciones del genoma puntuales y menores, pero a veces se registra un cambio genético mayor o de recombinación, con modificación de la estructura antigénica viral, circunstancia que dificulta la vacunación protectora de la población en riesgo.²⁻⁴

En este trabajo se presenta la ultraestructura y propiedades generales de los virus de la influenza, se revisa el proceso de replicación con detalle, y se revisa la virología molecular con un modelo referente a la investigación cristalográfica y funcional de las hemaglutininas y neuraminidasas. Se analizan los mecanismos de transmisión y la contagiosidad de la influenza, se detallan los avan-

ces recientes en la prevención y control de los casos y brotes epidémicos.

Virología molecular descriptiva de la influenza

Myxovirus es palabra derivada del griego clásico *myxa*, que significa moco. Las pandemias históricas fueron reconocidas como hechos catastróficos. En el siglo anterior fueron atribuidas causalmente al *Haemophilus influenzae* y otras bacterias; hasta 1933 cuando Smith, Andrews y Laidlaw⁴ aislaron en el laboratorio los virus de la influenza por inoculación nasal de los hurones.¹ Poco después, el doctor Burnet de Australia logró propagar los virus en la cavidad alantoidea del embrión de pollo⁵ (figura 1). Los virus respiratorios aislados fueron conservados en los laboratorios hasta 1970, cuando se separaron en dos grupos taxonómicos principales: los *Paramyxoviridae* y los *Orthomyxoviridae* (cuadro I), el prototipo de la primera familia es el virus del sarampión y el de la segunda familia el virus de la influenza A, B y C.

El virión de la influenza es una partícula ultramicroscópica con forma esférica u ovoide con diámetro promedio de 80-120 nm (figura 2). Sin embargo, en las cepas aviarias A H5N2 recién aisladas en China, se observó la presencia de filamentos alargados de 2,000 nm de largo por 80-120 nm de ancho (figura 3). La morfología del virión es modelada principalmente por la proteína matriz M1, envuelta a su vez por una capa doble de lípi-

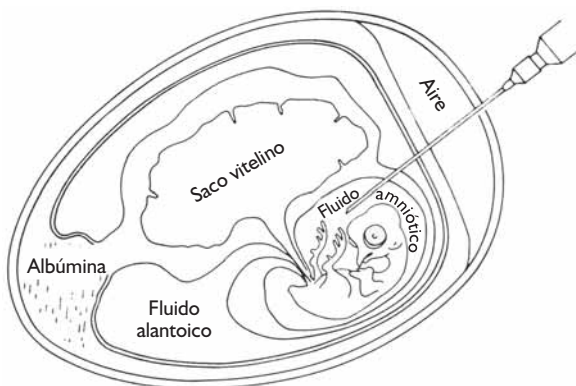
Cuadro I.

Propiedades diferenciales	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Paramyxoviridae</i>
Tamaño	80-120 nm, muy pleomórficos. El núcleo central mide 9 nm	125-250 nm, son algo pleomórficos, el núcleo central mide de 14 a 20 nm
Replicación	Nuclear	Citoplásmica
Genoma	ARN, segmentado, polaridad (-)	ARN, no segmentado, polaridad (-)
Prototipo	Influenza virus A, B, C,	Virus del sarampión

Fuente: Carrada-Bravo T. Taxonomía, clasificación de los virus respiratorios. Doc. Técnico, 2010.

dos para constituir la envoltura exterior o cápside (figura 4). Sobre la superficie externa se proyectan dos glicoproteínas, la hemaglutinina (HA) barra trimérica con la cabeza globular, mide 134 Å y la neuraminidasa (NA) con forma de champiñón, cuya cabeza es tetramérica y mide 60 Å.⁶

Método de inoculación en la cavidad del pollo*



*Se usan embriones con diez días de edad.

Figura 1. Los huevos libres de patógenos sirven para cultivar los virus de la influenza, crecen en el líquido alantoideo a 37 °C con 40-70% de humedad, siempre y cuando el embrión esté vivo. Cortesía del profesor AP Waterson, Universidad de Londres, Inglaterra.

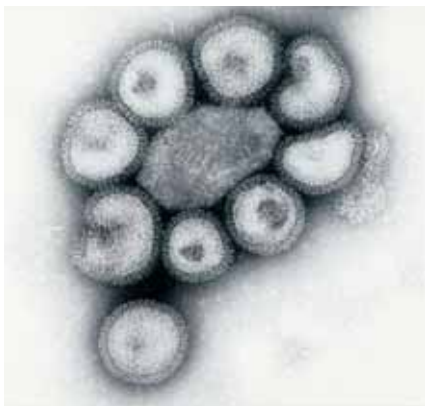


Figura 2. Microscopía electrónica (ME). Se ven nueve viriones de influenza A H1N1/porcina/2009 tienen forma redondeada u ovoide, rodeados por una corona de espículas superficiales (glicoproteínas), claramente visibles. Tinción negativa de ácido fosfotúngstico 3%, 110,000X.

Los virus A y B llevan en su núcleo interior (core) ocho segmentos de ARN helicoidal, con polaridad negativa (–) unidos siempre a la nucleoproteína (NP), cada segmento lleva tres polimerasas: polimerasa básica 1 (PB-1) polimerasa básica 2 (PB-2) y polimerasa ácida (PA)⁷ (figuras 5 y 6). Los genes ARN del uno al seis son monocistrónicos, la siete y ocho sintetizan dos péptidos cada uno, en total el virión puede sintetizar diez

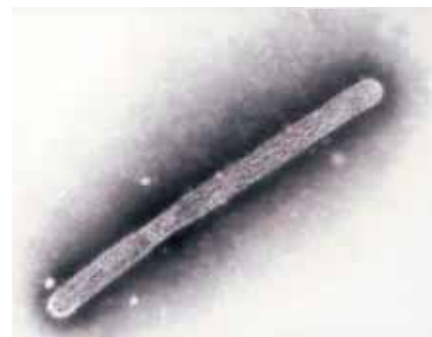


Figura 3. Microscopía electrónica. Se muestra un virión alargado y tubular de la cepa aviar A H5N2 aislada en Hong Kong, China, a partir de un caso humano. Tinción negativa de ácido fosfotúngstico, 110,000X.

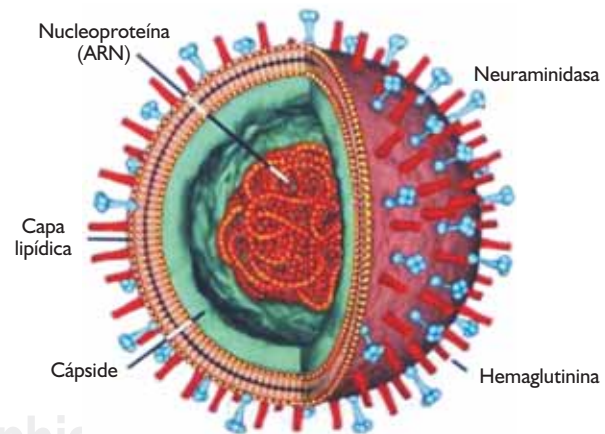


Figura 4. Esquema conceptual del virión maduro de influenza. La envoltura lleva una capa lipídica doble apoyada sobre la proteína matriz M2. La superficie tiene encajadas la hemaglutinina y la neuraminidasa, el núcleo arropa ocho genes helicoidales de NP-ARN.

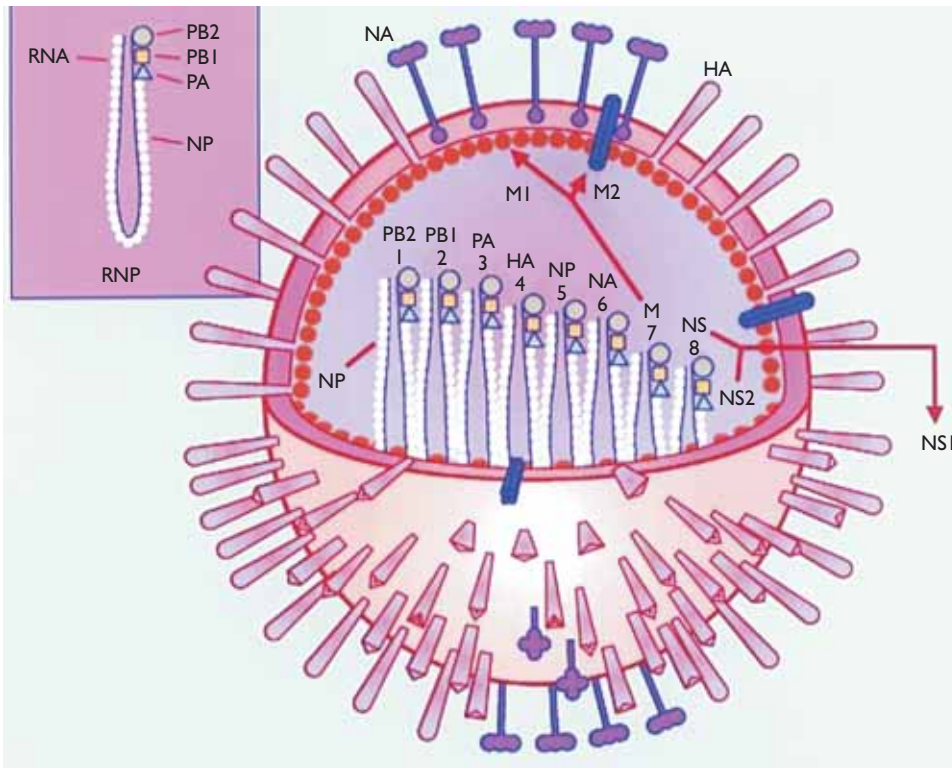


Figura 5. Esquema del virus de la influenza A. El núcleo tiene ocho genes segmentados: seis de ellos son monocistrónicos PB2, PB1, PA, HA, NA y NP; los dos restantes forman cada uno dos péptidos M1-M2 y NS-NS2.

62

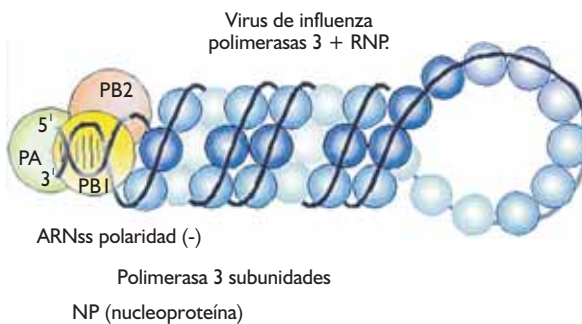


Figura 6. Se muestra con detalle un segmento genómico. La ribonucleoproteína (ARN + nucleoproteína N) helicoidal, y tres polipéptidos de las polimerasas asociados con cada gen viral. Cortesía del Dr. Paul Digard, Departamento de Patología, Universidad de Cambridge, Inglaterra.

péptidos funcionales (*cuadro II*). M1 es el soporte principal de la cápside, mientras M2, con 96 aminoácidos, está presente sólo en los virus A engarzado dentro de la cápside y funciona como canal iónico, importador de protones que penetran

dentro del endosoma, facilitando el funcionamiento de la hemaglutinina. Los anticuerpos específicos contra M2 reducen la replicación viral, pero se aumenta la protección heterosubtípica de los animales infectados. M2 se bloquea selectivamente por acción de los fármacos amantadina y rimantadina (*figura 7*) aunque las cepas virales A H1N1 circulantes desde 2009 han resultado ser resistentes a los dos medicamentos antivirales. El péptido NS-1 inhibe la síntesis del interferón, por ello es un factor de virulencia.⁸⁻¹⁰

Transmisión y contagiosidad del virus

Los virus de la influenza se propagan de persona a persona principalmente a través de los aerosoles expulsados a gran distancia con los estornudos (*figura 8*) y la tos. Los pulmones tienen 300 millones de sacos alveolares, encargados del intercam-

Cuadro II			
Segmento ARN	Tamaño (nt)	Polipéptidos	Función
1	2341	PB2	Transcriptasa: ligadura de la caperuza (Cap.)
2	2341	PB1	Transcriptasa: alargamiento molecular
3	2233	PA	Transcriptasa: proteasa
4	1778	HA	Hemaglutinina trimérica
5	1565	NP	Nucleoproteína: unida al ARN, transportadora del ARN viral (v-ARN) del núcleo al citoplasma
6	1413	NA	Neuraminidasa: liberación de viriones maduros
7	1027	M1	Proteína matriz, soporte de la cápside
		M2	Proteína, sirve como canal iónico.
8	890	NS1	No estructural, inhibe la síntesis del interferón, afecta el transporte y traslación de la ARN
		NS2	No estructural, función poco conocida

Fuente: Carrada-Bravo T. Taxonomía clasificación de los virus respiratorios. Doc. Técnico, 2010.

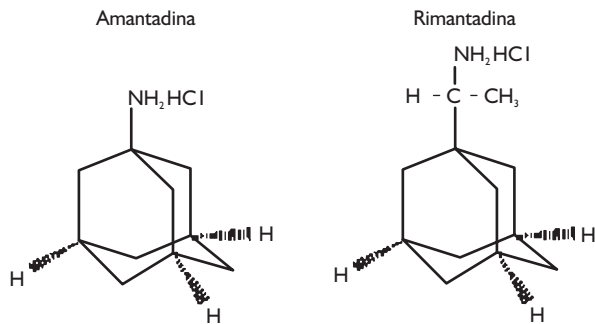


Figura 7. Dos fármacos inhibidores de la proteína M2 forjadora de los canales iónicos. Las cepas del virus A H1N1 porcino circulantes en México desde 2009, han sido totalmente resistentes a estos dos antivirales.

bio gaseoso entre el aire inspirado y la sangre de los capilares, el área de absorción calculada es variable 80-120 m² con tasa ventilatoria de seis litros de aire por mL. El intercambio respiratorio permite la inhalación de partículas grandes y micro gotillas ligeras; aquéllas con diámetro de 1-4 µm se depositan en los bronquiolos finos, las de tamaño mayor son atrapadas por el epitelio ciliar en movimiento, y la secreción mucosa nasal, llevándolas hacia la garganta para ser tragadas.¹¹⁻¹⁵

Los adultos enfermos eliminan el virus en máxima cantidad durante el segundo y tercer día de la



Figura 8. Al estornudar, el enfermo con influenza expulsa gran cantidad de partículas infectantes. Las más pesadas caen pronto, pero los aerosoles ligeros se mantienen flotando y pueden contaminar el ambiente circundante.

enfermedad, hasta por 10 días. Los niños escolares son propagadores principales de la infección, eliminando el virus incluso antes del inicio de los síntomas, hasta dos semanas postinfección.

La influenza se contagia de tres maneras:

- Transmisión directa. Al estornudar el enfermo expulsa moco y secreciones que van a depositarse sobre la conjuntiva, la mucosa nasal y la boca de otra persona sana.

- b) Los aerosoles de 0.5-5 μm de diámetro alcanzan las vías respiratorias bajas. Cuando el enfermo estornuda, suele expulsar 40 mil gotas; la mayoría caen por su propio peso, aunque las más finas se mantienen flotantes y sobreviven mejor en ambiente frío, con ausencia de luz solar y humedad relativa (HR) baja de 5%. Se explica así la transmisión favorable de la enfermedad durante la época invernal seca. Cuando la temperatura es 30 °C o más, la transmisión por aerosoles es inefectiva, pero persiste el contagio directo por desaseo y hacinamiento; por ello, en países menos desarrollados la transmisión ocurre durante todo el año y no se puede reducir cuando los usuarios no disponen de agua limpia y jabón, necesarios para el aseo personal y el lavado de manos frecuente, la vacunación oportuna y la educación de la población son necesarias también para reducir los peligros del contagio.
- c) Contagios mano-ojo, mano-nariz, mano-boca y mano sucia-fomites. Este mecanismo es particularmente importante en lugares hacinados, dentro de los hospitales y escuelas abarrotados y se empeora cuando las personas son desaseadas. El lavado de manos con agua y jabón es una medida preventiva muy útil y recomendable. El personal sanitario que no se lava las manos con frecuencia, puede iniciar un brote nosocomial de influenza.
- d) El virus persiste fuera del cuerpo sobre los fomites: billetes de banco, perillas de puertas, apagadores de luz y objetos de uso diario, la persistencia viral media en las superficies duras, no porosas como plástico y metal es uno a dos días, sobre papel de escritorio 15 minutos, en la piel humana cinco minutos; sin embargo, el virión embadurnado con moco podría durar 17 días sobre un billete de banco. Los virus de la influenza aviar se inactivan a 56 °C por 60 minutos, en pH ácido < 2, pero congelados en nitrógeno líquido sobreviven indefinidamente.

La mascarilla quirúrgica contra los respiradores

Los enfermos con influenza expulsan partículas infectantes e inhalables con diámetro variable 0.1-100 μm . Un objetivo principal durante las pandemias es proteger del mejor modo posible al personal sanitario, reducir los riesgos de la transmisión hospitalaria con un costo aceptable; sin embargo, se desconoce la efectividad real de las mascarillas quirúrgicas de precio bajo y accesibles contra los respiradores de poro muy fino, más costosos y difíciles de adquirir.

El doctor Mark Loeb y colaboradores de Ontario, Canadá, diseñaron un estudio de investigación en una muestra de enfermeras, de tiempo completo y voluntarias, adscritas en los Servicios de Urgencias, Medicina Interna y Pediatría, realizado en ocho hospitales de segundo y tercer nivel de esa ciudad. El objetivo de esa investigación fue comparar el uso de la mascarilla quirúrgica tradicional contra los respiradores N95, midiendo la efectividad protectora contra la influenza, en una muestra de enfermeras expuestas frente a pacientes respiratorios con fiebre, en el ambiente hospitalario. Fue un estudio descriptivo, aleatorizado, y doble ciego, realizado en 446 enfermeras con buen estado de salud, expuestas frente a enfermos con síntomas de influenza, durante un brote epidémico registrado en Ontario en los meses de enero-abril, 2009. Se midió el nivel de no protección de las enfermeras, habiéndose supervisado por auditoría externa el uso correcto y oportuno de mascarillas o respiradores, de acuerdo a las normas internacionales vigentes. Se consideró no protegida la enfermera que tuvo influenza, enfermedad o infección, confirmada en el laboratorio por un método muy sensible: la reacción de polimerasa en cadena o bien por la elevación al cuádruple de los títulos séricos de la hemaglutinación. Como criterio de no inferioridad protectora de las mascarillas y con intervalo de confianza del 95% ($\text{IC}_{95\%}$), cuando la reducción

de la incidencia de la influenza hospitalaria en las enfermeras expuestas fuese mayor a -9%. **Resultados:** Entre septiembre y diciembre de 2008 se escogieron 478 enfermeras elegibles, aunque sólo 446 fueron enroladas en el estudio. Fueron asignadas aleatoriamente en dos grupos de intervención: A) 225 usaron sólo mascarillas quirúrgicas tradicionales y B) 221 respiradores N95. Del grupo A, fueron atacadas por la influenza 50 enfermeras (23.6%) y del grupo B 48 (22.9%), con diferencia de riesgo absoluto -0.73%, IC_{95%} -8.8% a 7.3%, $p = 0.86$ es decir, el límite inferior del IC calculado estuvo por debajo del criterio estadístico establecido -9%. **Conclusión:** Se consideró que las mascarillas quirúrgicas tradicionales más baratas sí protegieron contra la influenza y su uso no dio resultados inferiores a los respiradores, mucho más costosos y poco accesibles; sin embargo, los expertos recomendaron por razones de prudencia emplear los respiradores de filtro fino N95 similares, cuando se realiza la intubación o endoscopia traqueal.¹³

Frente a un brote de influenza, es deseable promover el triage en las salas de espera y puertas de entrada de los hospitales a fin de separar los enfermos febriles o con síntomas respiratorios, aislándolos tempranamente. Se invita también a usar mascarillas protectoras para abatir el riesgo de contagios (*figuras 9 y 10*), además de promover vigorosamente la vacunación protectora contra la influenza y la neumonía neurotóxica en todos los trabajadores de la salud, y la población con mayor riesgo (*figura 11*); en los laboratorios donde se maneja el virus se requiere tener campanas de seguridad microbiológica y protectores de la cara (*figura 12*) (bioseguridad nivel tres).

En el manejo hospitalario, es importante definir el tipo del aislamiento y su duración en aquellos con influenza sospechosa o confirmada. Las secreciones nasofaríngeas y el esputo son reservorios de la infección, los enfermos pediátricos ambulatorios suelen excretar el virus un día antes del inicio clínico y continúan siendo infecciosos



Figura 9. Frente a un brote de influenza es recomendable usar las mascarillas protectoras, particularmente en las escuelas con hacinamiento, las salas de espera en la consulta externa, en el transporte público y en los lugares cerrados con poca ventilación.



Figura 10. El uso hospitalario de mascarillas quirúrgicas y respiradores, la limpieza de las manos, la aplicación de las mascarillas en los enfermos respiratorios, ayudan mucho para reducir los riesgos de la influenza nosocomial.



Figura 11. La vacunación oportuna con tres antígenos inactivados preparados contra los virus de influenza A y B circulantes, es una medida de protección muy recomendable, particularmente en los trabajadores de la salud más expuestos al riesgo de contagiarse.

por siete días; en cambio, los adultos lo excretan sólo por cuatro a cinco días; los hospitalizados más viejos se recuperan lentamente en 7-10 días, pero los internados menores excretan los virus hasta por 21 días. Los enfermos inmunocomprometidos o con linfopenia crónica suelen excretar el virus por tiempo prolongado: una niña de siete años con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) excretó el virus por nueve semanas. Los adultos con leucemia o trasplante de médula ósea lo excretaron por 7-44 días; en tales casos, el tratamiento antiviral se prolonga y, el enfermo se convierte en fuente peligrosa de virus resistentes al oseltamivir, siendo necesario implementar un monitoreo virológico constante, extremando las medidas de higiene nosocomial. En una investigación cuidadosa se demostró que 14% de los trabajadores en el área hospitalaria, adquirió la influenza de otro trabajador sanitario contagiado; por ello, cuando las enfermeras o médicos del Servicio presenten fiebre o síntomas respiratorios, es necesario enviarlos al domicilio, pudiendo regresar a su trabajo sin riesgo, un día después de haber cesado la fiebre (*figura 13*).

En los brotes de influenza deben desaconsejarse las visitas familiares de niños pequeños o mal nutridos, adultos diabéticos o debilitados, embarazadas, sujetos inmunocomprometidos o asmáticos y otros cardiopatas o con factores de riesgo, sin antecedentes de vacunación protectora. Aquellos enfermos en periodos de incubación o con síntomas leves deben usar mascarillas y tener facilidades para lavado de manos; es muy importante la separación espacial y la mejora de barreras físicas, vigilando la limpieza de las salas, del enfermo y la adherencia estricta del personal sanitario a las normas de higiene y desinfección. Frente a una epidemia en curso, es importante generar mensajes educativos bien elaborados para la televisión, periódicos, servicios radiofónicos y blogs para el internet, enfatizando el lavado de manos y el uso de mascarillas protectoras (*figura 14*), aconsejando el mantenerse alejados de los sitios de hacina-



Figura 12. El personal de laboratorio que maneja los virus de la influenza (investigación, cultivos y preparación de vacunas) requiere de una campana con flujo laminar controlado, mascarillas protectoras de alta calidad y de inmunización oportuna (bioseguridad nivel 3).

Figura 13. Enfermera joven, trabajadora del Servicio de Pediatría, quien se negó a usar la mascarilla protectora y nunca se inmunizó contra la influenza. Durante la pandemia 2009, presentó fiebre de 38 °C, estornudos frecuentes con secreción nasal y tos, más tarde fue hospitalizada por neumonía viral primaria.



Figura 14. El empleo de la mascarilla facial protectora, el lavado frecuente de las manos y el aseo personal deben ser inculcados tempranamente entre los niños del preescolar, a fin de crear una conciencia colectiva protectora.

miento, sin olvidar que la educación básica de prevención y control de enfermedades respiratorias transmisibles es tarea permanente del personal de salud, los maestros de las escuelas y los voluntarios capacitados; los mensajes deberán ser breves, claros y basados sólo en la mejor información científica disponible. En México es manifiesta la carencia de educadores para la salud bien formados y con alta calidad profesional.

En las escuelas con niños infectados pueden hacerse cierres parciales y transitorios, pero no se recomienda efectuar cierres masivos de restaurantes, sitios turísticos y lugares de diversión, circunstancia que podría causar efectos catastróficos en una economía debilitada, como ocurrió en México en 2009.¹¹

El lavado de manos como estrategia protectora

En un estudio publicado por el doctor SP Stone se demostró que 80% de los trabajadores del hospital, al «limpiar» las heridas infectadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, acarreaban hasta por tres horas este peligroso organismo en sus manos. También observaron que 60% de los médicos y enfermeras del hospital, al estar en contacto durante 30 a 60 minutos con un enfermo infectado por *Clostridium difficile*, se contaminaban fácilmente al momento de escribir las notas de visita o de llenar las hojas de medicamentos administrados, incluso sin haber tocado al enfermo.¹⁶ La conclusión más importante de esa investigación es que, después de haberse lavado las manos con agua y jabón, se logró erradicar virtualmente las dos bacterias patógenas temidas (figura 15).

Incorporar la prevención en la práctica diaria

El doctor MR Chassin, Presidente de la Comisión Internacional de la OMS para Lograr Mayor Segu-



Figura 15. El lavado cuidadoso de las manos con jabón y agua limpia suficientes, elimina las bacterias patógenas multirresistentes a los antibióticos y, destruye también los virus mortíferos respiratorios. Esta medida debe aplicarse aunque se utilicen los guantes.

ridad de los Enfermos, informó haber conducido una encuesta internacional referente a las 35 fallas de calidad identificadas más frecuentemente por las instituciones hospitalarias mismas. El problema que tuvo más votos fue la falla en la limpieza de las manos; por eso, se tomó la decisión de darle prioridad máxima y mucha atención, por ser la responsable mayor de infecciones nosocomiales, que derivan en estancia prolongada y mucho costo.

La Comisión señaló algunas de las barreras persistentes en los Servicios: lavamanos inexistentes o distantes del enfermo, carencia de una cultura de limpieza nosocomial, falta de agua y de jabón en los Servicios, creencia falsa de que al usar guantes no se requiere asear las manos, más los olvidos, las distracciones y negligencia del personal atareado. La gran tarea pendiente, apuntó el doctor Chassin, es empujar a aquellos establecimientos que trabajan bien para convertirlos en centros de excelencia. Transformar los hospitales haciéndolos más limpios, seguros y confiables, con un mínimo de riesgos, tal como lo hacen las industrias exitosas del aerotransporte y las plantas nucleares, que continuamente renuevan las estrategias de seguridad y mejor manejo.

La doctora KB Kirkland, infectóloga e investigadora, ha recalcado la ventaja práctica de tener en los consultorios médicos dispensadores de productos a base de alcohol bien formulados, como un medio más de interrumpir la transmisión de virus y bacterias patógenas; lo trascendente es elevar el nivel de conciencia colectiva y trabajar duro para lograr la limpieza total en nuestro trabajo diario, apuntó la doctora Kirkland, de ese modo se reforzará la salud propia de médicos y enfermeras.

En México se avanzó con la certificación de los hospitales, pero al entrar como observador salta a la vista cierto desaseo, que se traduce en infecciones difíciles de tratar y muertes evitables. Hace poco visité un «Hospital certificado», donde los enfermos se quejaban de ser asaltados por una plaga nocturna de cucarachas, el personal hospitalario estaba almorzando sabrosos bocadillos en horas y dentro del Servicio, nadie usaba cubrebocas a pesar de haber enfermos hospitalizados por influenza, y no había jabón ni lavaderos suficientes cerca de los enfermos. En la consulta externa, los sanitarios no se habían limpiado en dos días y dentro de algunos consultorios celebrábase ruidosa pachanga, acompañada de olorosos condimentos. Tal panorama, me temo, no es excepcional en este país, donde todavía la limpieza se considera como bien no necesario. El cambio debe comenzar en los hogares y escuelas del preescolar, pero el Sector Salud debería ser líder y ejemplo a seguir.¹⁶

¿Sirve de algo vacunarse contra la influenza?

Los prestigiados *Centers for Disease Control* (CDC) de los Estados Unidos y los expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendaron la necesidad urgente de médicos y enfermeras para recibir la vacuna antiinfluenza estacional más otra dosis de la nueva vacuna H1N1 en oferta, como medio seguro de protegerse y

disminuir el riesgo de contagiar a los niños y enfermos débiles a nuestro cargo.^{17,18} Totalmente acorde con esa recomendación, procuré vacunarme frente a mis propios alumnos, aunque algunos colegas desinformados o ignorantes se negaron a recibirla, signo seguro de una preparación profesional defectuosa y poco interés por informarse. La limpieza rigurosa y permanente de las manos, el uso correcto de mascarillas quirúrgicas, la vacunación oportuna y el empleo racional de los antivirales, son los cuatro pilares del trabajo médico con alta calidad. Al protegerte tú, garantizas la salud de la familia y la seguridad de nuestros enfermos. Dejo este pensamiento para reflexión de los más entendidos. Adviértase que la profesión médica avanzó gracias a los trabajos magistrales de los grandes investigadores R Koch, L Pasteur y J Lister defensores de la limpieza en los hospitales.

Los expertos reconocen cinco grupos prioritarios para la aplicación de vacunas: a) trabajadores de la salud y servicios médicos de urgencias. b) mujeres embarazadas, c) cuidadores de niños menores de seis meses, d) niños y jóvenes de seis meses a 24 años de edad y e) personas de 25 a 64 años afectadas por diabetes mellitus, cardiopatías crónicas, asma bronquial alérgica, fumadores crónicos, personas obesas y sujetos inmunocomprometidos o mal nutridos. El Hospital St. Jude en Memphis, Tennessee, tuvo un programa de vacunación hospitalaria muy exitoso, basado en tres puntales: educación, notificación y acceso fácil a la vacunación en horario conveniente, incluso para personal de turno nocturno.

Los contenidos y mensajes educativos fueron elaborados con sumo cuidado y detalle, fueron dados a conocer a todo el personal médico y de enfermería en las reuniones semanales, por correo electrónico, cartas personalizadas, carteles y mensajes breves, colocados en sitios estratégicos. Se hizo un listado de los no vacunados y la lista fue enviada a los jefes y supervisores de área, con el objetivo de lograr el convencimiento

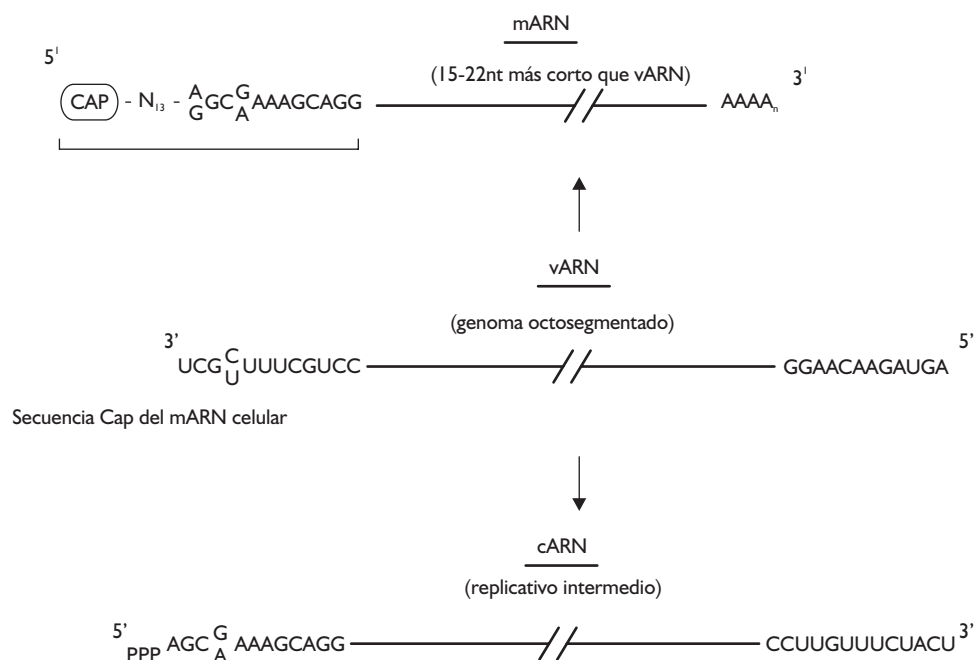


Figura 16. El virión de la influenza (v-ARN) se replica de dos maneras a través de un mensajero (transcripción m-ARN) de cadena más corta, o bien por copia directa c-ARN. Los extremos terminales de los genes virales permanecen conservados en los virus A y B.

to y la aceptación de los renuentes. La meta mínima del programa era vacunar a 80% del personal; sin embargo, se alcanzó la cifra récord de 96%, gracias al entusiasmo y la perseverancia de los directivos. Aquellos que se negaron a ser vacunados, debieron explicarlo en un escrito, donde además se obligaba a utilizar mascarillas durante la jornada laboral, o bien aceptaron ser reubicados en lugares donde no se atendieran pacientes con riesgo.^{17,18}

Replicación y genética viral

La estructura y secuencias de ARN viral se han conocido detalladamente gracias a las muchas investigaciones realizadas, pero las secuencias terminales 5' y 3' están bien conservadas en todos los segmentos del genoma (figura 16).

La entrada del virus a la célula es facilitada por enlace de la hemaglutinina (HA) con mucoproteínas provistas del grupo químico ácido N-acetil-neuramínico. (Sinónimo: ácido siálico = ASI). La neuraminidasa (NA) realiza la acción inversa,

es decir, impide el secuestro y acumulación de los viriones sobre la membrana celular liberándolos. Adviértase, el ácido siálico (ASI) es abundante en el moco y sobre las superficies celulares, y de no ser eliminado, anegarían las partículas virales, dificultando la propagación del virus (figura 17).

Después del reconocimiento inicial, el virión enlazado es englobado por endocitosis hasta penetrar en una vesícula endosómica, luego es acidificada por importación de protones hasta pH 5.0 (figura 18). La macromolécula HA es partida por enzimas semejantes a la tripsina, generando una hendidura molecular sobre la base del tallo, se producen dos péptidos secundarios: HA-1 con 329 aminoácidos (aa) lleva la porción -NH₂ terminal; el otro péptido, más pequeño, HA-2 contiene 221 aa. Ambos están unidos por un puente disulfuro existente entre la cisteína -14 de HA-1 y la cis -137 de HA-2, siendo importante resaltar que HA es una macromolécula flexible, moldeable y no una estructura rígida como se pensaba.²⁻⁹

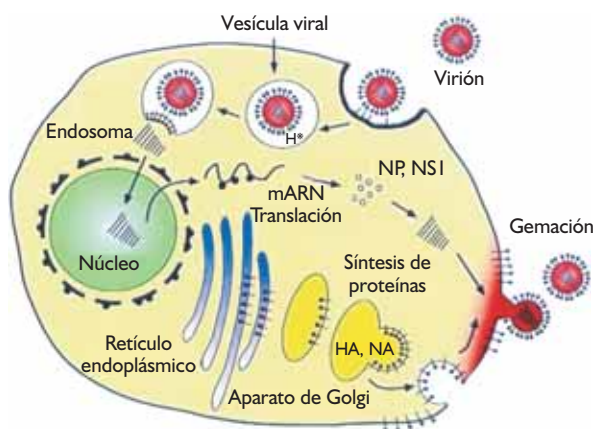


Figura 17. El virión infeccioso reconoce al sialorreceptor y penetra por endocitosis. Dentro del endosoma se acidifica y la hemaglutinina desdoblada entra en acción, dejando el genoma libre para luego replicarse en el núcleo. El virus aprovecha la maquinaria de polimerasa celulares, pero usa también tres polimerasas propias para forjar las copias de ARN. El virión se ensambla por debajo de la membrana y es liberado por acción de la neuraminidasa (NA).

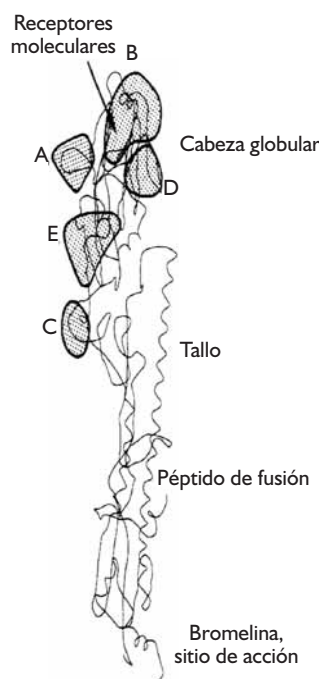


Figura 19. Hemaglutinina (HA), esquema de un monómero. La cabeza hidrofílica lleva cinco epítomos posibles A, B, C, D, E, entre ellos se «esconde» el sialorreceptor. En el tallo se localiza el péptido de fusión pequeño, pero funcionalmente importante. La bromelina sirve para «rasurar» las moléculas de HA separándolas de la envoltura viral.

70

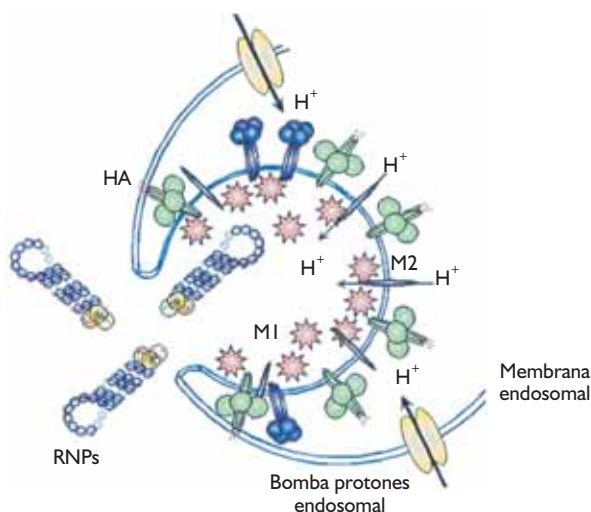


Figura 18. Dentro de la vesícula endosomal, la proteína M2 permite el paso selectivo de protones por medio de los canales iónicos y M1 se «reblandece». La envoltura viral se funde con la membrana celular por acción de la hemaglutinina (HA), la ribonucleoproteína (RNP) finalmente llega al núcleo replicándose.

Cuando HA-2 se libera, queda expuesto al llamado «péptido de fusión» responsable de unir la cápside del virus con la membrana de la célula, aunque HA-2 sirve también como punto de anclaje sobre la envoltura viral (*figura 19*).

¿Dónde se realiza la replicación viral temprana?

De entrada, se requiere de ciertas proteasas celulares semejantes a la tripsina, por ello, en los humanos la primorreplicación se restringe a las células CLARA, no ciliadas, existentes en los bronquiolos (*figuras 20 y 21*); estas células tienen la particularidad de producir y secretar una serinproteasa, exopeptidasa que rompe la HA a nivel de arginina-329, generando los dos péptidos HA1, HA2, respectivamente; sin embargo, las cepas aviares H5N1 pueden multiplicarse también sobre el epitelio intestinal de los patos sin producirles enfermedad, las aves silvestres infectadas acarrean el virus transmitiéndolo a las aves de corral, los cerdos y otros mamíferos.²

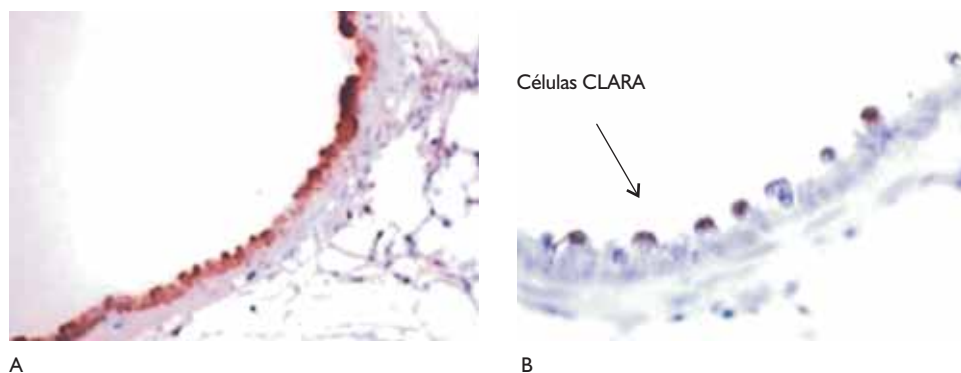


Figura 20. Dentro de los bronquiolos de los humanos y cerdos están alineadas las células Clara no ciliadas, productoras de una enzima semejante a la tripsina, capaz de desdoblar la hemaglutinina (HA) en dos péptidos mayores HA1 y HA2.

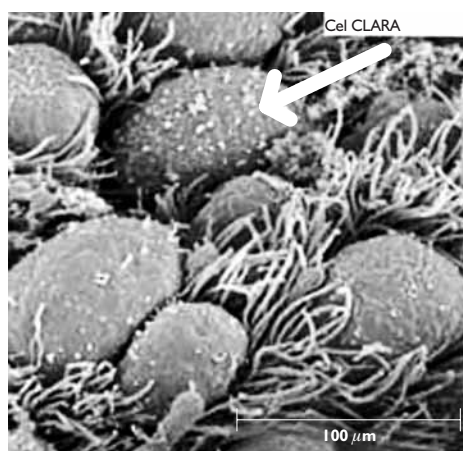


Figura 21. Microscopía electrónica de barrido del bronquiol humano. Las células Clara no son ciliadas pero sí son secretoras de enzimas proteolíticas, por ello, son colonizadas preferencialmente por los virus de la influenza A y B, de ahí la importancia en la patogenia del bronquio alveolitis viral primaria.

¿Cuál es la estrategia de la replicación viral?

La ribonucleoproteína (RNP) en cada segmento genómico lleva asociadas tres polimerasas PB1, PB2 y PA (figura 6) responsables de la transcripción dentro del núcleo.⁸

El ARN viral con polaridad negativa (v-ARN) sirve como un molde forjador: el extremo 3' lleva 12 nucleótidos (nt), y en el extremo opuesto 5' hay 13 nucleótidos, acarrea también seis uni-

dades sucesivas de uridina (U), las cuales sirven como señal en la poliadenilación. Las dos secuencias descritas se han conservado sin cambios en casi todas las cepas virales estudiadas.¹⁰

Durante la transcripción se sintetiza el mensajero (m-ARN) incompleto. Esta molécula tiene el extremo 3' poliadenilado, aunque no posee los 16 nucleótidos del vARN. En el extremo 5' lleva la caperuza (cap) aunque los nucleótidos del 9 al 15 son obtenidos del hospedador. Por otro lado, el ARN completo es copiado (c-ARN), réplica que se repite varias veces, y el producto resultante se usa para generar nuevas moléculas del vARN (figura 22).

Las dos primeras horas postinfección (fase temprana), hay síntesis del ADN-celular, proceso que puede ser inhibido con mitomicina C o luz ultravioleta, etcétera. En esta etapa, PB2 se liga con la cap-m7G, pero sólo en el m-ARN del hospedador, tal estructura es apartada del m-ARN por PB1, aunque PB2 sí permanece unido. Advuértase que la caperuza es en realidad un iniciador de la síntesis del ARN, aunque los nucleótidos del 11-15 son añadidos por PB1, poco después PB2 se disocia del ramal en crecimiento y PB1 junto con PA complementan la síntesis total de la hebra con sentido (+). Se apunta que en el núcleo de las células infectadas ha sido posible recuperar otro ARN con hebra doble (+/-), intermedio.

La nucleoproteína desocupada suele regresar al núcleo para reasociarse con el v-ARN recién

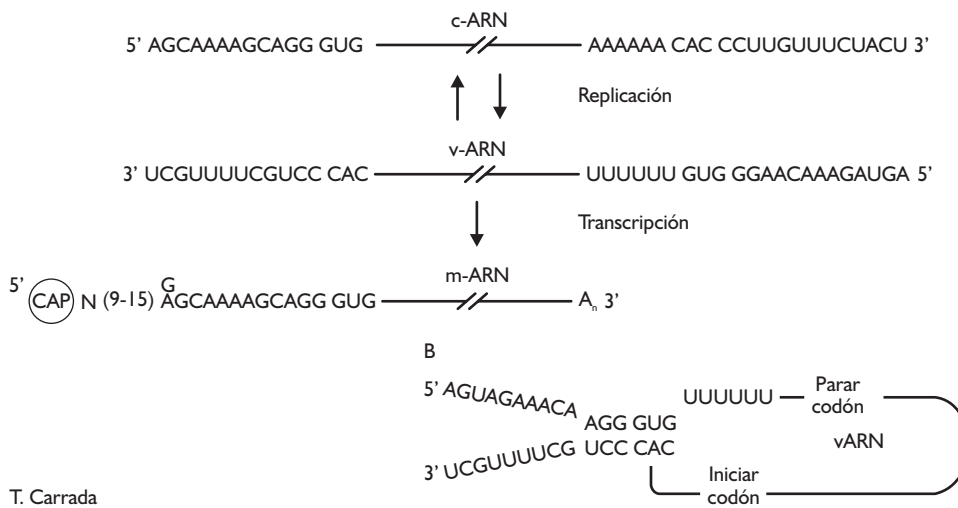


Figura 22. Las seis unidades de poli-U se transforman en poliadenina (arriba). El extremo 5' del mensajero tiene una caperuza seguida por 9-15 nucleótidos reconocibles por las polimerasas encargadas de la transcripción.

T. Carrada

sintetizado, la cantidad de la NP-libre sirve para regular la producción relativa del mensajero y del c-ARN. En la infección tardía se acumula gran cantidad de NP, deteniéndose la formación del mensajero, y continúa sin parar la formación de c-ARN; por esa razón, los expertos señalan que NP es factor crucial en el ciclo de la replicación, puesto que permite elegir los caminos entre la expresión o el ensamblaje final de los viriones.

Al cabo de cuatro horas postinfección, comienzan a generarse los primeros islotes de M1 sobre la membrana celular engrosados por la incorporación progresiva de HA y NA y, al final, se empaacan los segmentos de la nucleocápside en la partícula, cuando está casi lista para brotar fuera de la membrana. No hay ninguna enzima correctora de pruebas del v-ARN, y cuando la polimerasa realiza las copias del genoma viral, se comete un error por cada 10 mil nucleótidos añadidos, equivalentes aproximadamente a la longitud del v-ARN; por ello, los viriones nuevos sufren mutaciones llamadas deriva antigénica, es decir, la cabeza globular de HA es hipervariable en función del tiempo transcurrido; por esta razón, las vacunas antivirales necesitan ser reajustadas en su composición cuando menos una vez al año. La fragmentación

del genoma en ocho segmentos, permite también la recombinación, evento de ocurrencia más rara, es decir, los genes de aves y cerdos se recombinan con otras cepas de origen humano, pero esta circunstancia se da sólo cuando el virus de origen aviar o porcino coinfecta la misma célula; así, por ejemplo, la cepa del virus de influenza A causante de la pandemia 2009-2010 H1N1-SOV acarrea tres tipos de genes con origen distinto: humanos, aviarios de Norteamérica, y porcinos norteamericanos y euroasiáticos.

La neuraminidasa es responsable de la liberación final de los viriones maduros. En todas las investigaciones se ha demostrado la participación de esta glicoproteína en la virulencia; una cepa que sufre mutaciones de la hemaglutinina requiere de otras mutaciones compensatorias de NA. Algunos aislamientos virales mostraron ser resistentes frente al inhibidor de la NA oseltamivir, y también tuvieron cambios en la estructura molecular y virulencia. El efecto liberador de NA puede ser bloqueado por acción de los anticuerpos anti-NA. En el laboratorio se ha observado que las células infectadas liberan viriones durante varias horas sin sufrir lisis, aunque finalmente se mueren.¹⁻¹⁰

Ingeniería genética del virus de la influenza

El genoma ARN (-) no es infeccioso, pero cuando se convierte por vía reversa en c-ADN (transfección) tampoco se forman viriones infectantes; sin embargo, en los laboratorios de investigación se desarrolló un procedimiento de reconstrucción genómica, o genética inversa, que permite obtener viriones quiméricos a partir del v-ARN sintético y purificado, con capacidad de forjar proteínas virales seleccionadas a voluntad (*figura 23*). La transfección de los genes con la ayuda de las tres polimerasas injertadas dentro de una célula animal o con apoyo de un virus de la vaccinia acarreador de los plásmidos, ha hecho factible rescatar o aislar uno o varios de los genes virales de la influenza. En este sistema flexible es factible producir mutaciones específicas de un gen viral estudiado o implicado en la transcripción, replicación o empaque del ARN; por otro lado, esta metodología ha facilitado el análisis estructural y funcional de las proteínas virales responsables de la replicación, virulencia, interacción virus-hospe-

dador y de la patogenia, además ha servido para fabricar vacunas de calidad superior con uso de vectores virales. El neovirus quimérico se obtiene por transfección controlada de los ocho plásmidos disponibles en el laboratorio, capaces de codificar cada uno de los ocho segmentos del ARN. De la misma manera, la polimerasa viral-ARN es reconstituida en la célula animal por la cotransfección simultánea de los plásmidos que expresan PB1, PB2, PA y NP, el sistema total se maneja con 12 plásmidos y permite la manipulación total de los ocho segmentos, obteniéndose como producto final un virus recombinante.^{3,19}

Cristalografía macromolecular: estructura y función

Los científicos forjaron en los laboratorios de física un método para cristalizar y analizar la arquitectura de la hemaglutinina viral del virus de la influenza. La macromolécula fue cristalizada, y luego, se examinó bajo una fuente poderosa de rayos X de onda muy corta (1-3 Å), por difracción. Con este procedimiento, se obtuvo la imagen

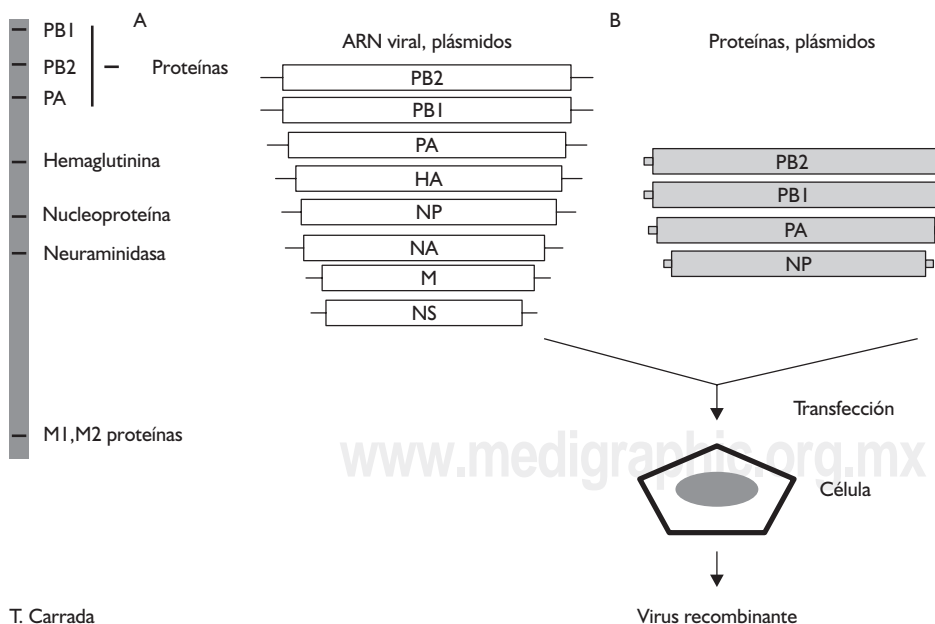


Figura 23. En el laboratorio el ARN-viral se transforma en ADN (genética inversa), y se almacena dentro de un vector adecuado (fago o bacteria). Los ocho plásmidos (pm) guardados en las librerías genómicas pueden recombinarse a voluntad o ser cambiados por genes mutantes, uniéndose todos dentro de una célula hospedadora con cuatro plásmidos de las polimerasas; de este modo, es factible «crear» viriones híbridos o quiméricos y vacunas de mejor calidad (ingeniería protónica).

detallada de la estructura atómica y molecular, y más tarde, se analizó con ayuda de las computadoras y de un software especializado.²⁰

En la cristalografía, la primera etapa es seleccionar y purificar en lo posible la macromolécula que se desea estudiar, por ejemplo: la hemaglutinina (glicoproteína) del virus de influenza A H1N1. Con este propósito, el virus debe ser clonado dentro de un sistema de expresión conveniente, como lo es el virus grande y fácilmente manipulable de la vaccinia; la meta es amplificar el gen selecto y producir cantidades relativamente grandes de la glicoproteína investigada. En la práctica, la suspensión de vaccinia que contiene el plásmido de HA se homogeniza y se pone en solución de sacarosa 70%, más amortiguador TRIS y NaCl 150 mM a pH 8.0, y se centrifuga a 25,000 revoluciones por minuto (rpm) por dos horas. La fracción flotante contiene la envoltura viral; se recentrifuga y se digiere con bromelina y mercaptoetanol 28%; la enzima rompe el tallo basal de la molécula, separándola del anclaje transmembrana. La fracción obtenida se purifica al 95% mediante cromatografía de intercambio iónico en columna, obteniéndose una concentración aproximada de dos mg/mL.²⁰⁻²²

El paso siguiente es forjar cristales de la macromolécula con el método artesanal de los micrototes, es decir, ensayar concentraciones diversas de la microproteína expuestas frente a diversos agentes químicos promotores de la cristalización (piperazina más ácido etanosulfónico pH 6.5), seguido por un agente precipitante como el sulfato de amonio al 18% por una semana, los microcristales diamantinos se resguardan en frío dentro del nitrógeno líquido.

El material criopreservado se trasporta al laboratorio de biofísica, y se coloca dentro de un sincrotrón, aparato que produce rayos X de onda muy corta. La muestra estudiada se fija sobre un goniómetro, instrumento que permite rotarla lentamente con ayuda de un robot; de este modo,

se obtienen las imágenes atómicas que se transforman matemáticamente en un mapa por efecto de la densidad electrónica diferencial de las manchas y sombras registradas inicialmente, se analizan con un modelo computacional fabricado expresamente. Se ha obtenido así la estructura y la secuencia tridimensional de los átomos y grupos químicos componentes, el modelo original se ha refinado con un software poderoso y se han construido gráficas moleculares interactivas que se depositan en el Banco de Datos de Proteínas y, desde luego, se acostumbra publicarlas para ser difundidas y puestas a consideración de los expertos o interesados.²⁰⁻²²

Hemaglutinina: arquitectura molecular y funciones

La cabeza globular de la hemaglutinina estructurada principalmente por el péptido HA1 es una región de reconocimiento, hipervariable: el monómero lleva cinco receptores de los anticuerpos específicos y un sialorreceptor. La porción basal e hidrofóbica constituida por HA2 sirve como punto de anclaje en la envoltura viral (*figuras 24 y 25*), es decir, facilitan el enganche de la glicoproteína dentro de la bicapa de lípidos propia del virión. La especificidad y virulencia de las cepas virales está regulada por HA, por ejemplo, la influenza aviar epidémica causada por A H5N1 tiene como reservorio natural las aves acuáticas silvestres; este virus tiene la propiedad de poder ligarse con el epitelio intestinal de los patos sin producirles ninguna enfermedad, es eliminado por las heces y contamina las aguas de los lagos que sirven de hábitat a los patos y gansos silvestres (*figuras 26 y 27*).

Cuando el virus A H5N1 llegó a los mercados húmedos y sucios de Hong Kong, China (*figuras 28 y 29*), atacó las parvadas de pollos domésticos que se vendían vivos, causando epizootias mortíferas que cursaron con letalidad hasta de 80%. Infectó también a los vendedores y matan-

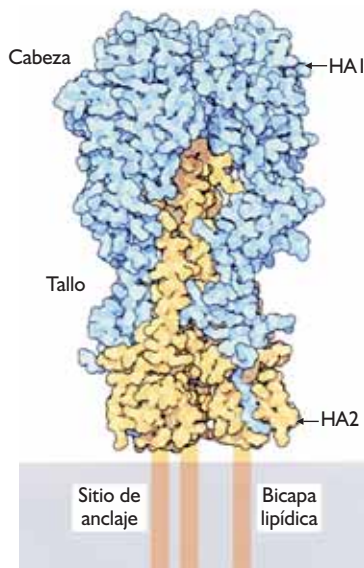


Figura 24. Cada virión tiene 170 trimeros de la hemaglutinina (HA) con peso molecular 75 kDa. Esta glicoproteína está formada por dos péptidos glicosilados: HA1 (color azul) 329 aminoácidos y HA2 (color amarillo) 221 aminoácidos dominio hidrofóbico que sirve como ancla

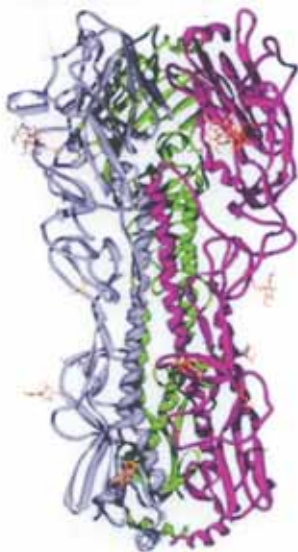


Figura 25. Hemaglutinina, imagen cristalográfica. El trímero se mantiene unido por ligaduras covalentes, el tallo fibrilar está constituido por seis hélices. En la cabeza están los epitopos neutralizantes más los sialorreceptores. Obsérvese las moléculas colgantes de carbohidratos (color café amarillo) en varios puntos de la macromolécula. Compárese con el monómero de la figura 19.

ceros de pollos, a los manejadores de gallos de pelea y, ocasionalmente, produjo casos humanos de neumonía viral primaria muy graves, principalmente en niños y jóvenes, aunque la retransmisión de un humano infectado a otra persona sana ha sido más bien excepcional. Para abatir los brotes de influenza aviar en humanos, fue preciso sacrificar grandes cantidades de pollos de los mer-



Figura 26. Los lagos, presas y las aguadas naturales permiten el descenso de las aves acuáticas migrantes, principalmente patos, gansos y cisnes, reservorios importantes de los virus de la influenza A. Algunas personas se han contaminado por haber entrado en contacto o manipulado estos animales.



Figura 27. Los científicos capturan las aves silvestres migrantes, para tomarles muestras de sangre y heces fecales y reconocer así los subtipos circulantes de la hemaglutinina (HA) (1-15) y neuraminidasa (NA) (1-9) que suelen acarrear en el intestino por más de dos semanas.

cados e incinerar los restos de los animales para reducir los riesgos (figuras 30 y 31). Fue necesario limpiar los mercados y exigir que las aves se vendieran y transportaran con mucha limpieza; también se exigió el aseo de los sitios donde se realizaba la venta (figura 32) y de los rastros. Desde luego, se lanzó una campaña educativa intensa para fomentar el lavado de manos y la limpieza de



Figura 28. En los mercados de Hong Kong insalubre, húmedo y hacinado, era costumbre vender pollos, patos y pavos vivos transportados en condiciones de maltrato y mala higiene. Se inició así la feroz epizootia causada por el virus A H5N1 que diezmo las parvadas y más tarde se cebó en los humanos.



Figura 30. Ante la epizootia aviar en expansión del virus A H5N1 fue necesario sacrificar millones de pollos, gallos de pelea, pavos, codornices, patos y gansos domésticos. Esta medida drástica causó un desastre en la industria pecuaria, con pérdidas económicas incalculables y empobrecimiento de los campesinos y criadores de aves.



Figura 29. En China del Sur, Vietnam y Tailandia, se acostumbraba vender la carne de pollo o de gallos de pelea, contaminada por los virus aviar A H5N1. La influenza se transmitió en los matanceros, vendedores, y aquellos en contacto cercano con las carnes, plumas y excrementos contaminados.



Figura 31. Los cuerpos de pollos sacrificados para detener la epizootia en propagación, hubieron de ser incinerados para evitar la propagación del contagio. México debiera estar preparado para una tal eventualidad, a futuro.

Figura 32. Los mercados de aves vivas de Hong Kong, China, fueron renovados. Se instalaron jaulas nuevas, los vendedores fueron educados para usar mascarillas protectoras, haciéndose énfasis en la limpieza frecuente de las manos y el aseo de los muebles, pisos y herramientas de trabajo.



los trabajadores que están en contacto con las aves de corral; en algunos países se implementó además la vacunación obligatoria de las aves domésticas, con resultados variables. Las aves acuáticas silvestres son portadoras silenciosas del virus, transmitiéndolo a las aves domésticas, cerdos, caballos, vacas, gatos, perros, focas, ballenas y humanos en contacto cercano con esos animales (*figura 33*).

La epidemia originada en China se propagó rápidamente por varias naciones del Sureste Asiático, el Archipiélago Japonés, Indonesia, Turquía. En marzo 2010, hizo su aparición brusca en Rumania, causando alarma y gran preocupación en los países europeos, ante la posibilidad de que el muy virulento virus aviar pudiese recombinarse en un momento dado con la cepa pandémica A H1N1 procedente de México (*Figuras 34 y 35*).

¿Qué papel juegan los cerdos?

La influenza porcina fue conocida desde 1918, brotó bruscamente en la región Centro-Occidental de los Estados Unidos, cuando se enfermaron millones de cerdos y murieron miles de lechones (*figura 36*). En los bronquios de un lechón conservado en formaldehído desde hace 92 años, se demostró la presencia del virus A H1N1 semejante al causante de la pandemia mortífera de «Influenza Española». Hoy sabemos que los cerdos criados masivamente en hacinamiento suelen acarrear linajes bien diferenciados de los virus H1N1, H3N2 y de la llamada cepa porcina causante de la pandemia 2009-2010, originada en Norteamérica (*figura 37*). Se ha comprobado que el virus A H1N1 circulaba en las pjaras durante todo el año, aunque los brotes epizooticos fueron relacionados principalmente con el movimiento y maltrato de los cerdos llevados de una granja a otra; además, los puercos suelen ser contagiados por las aves silvestres y domésticas y son receptivos también al contagio por humanos con gripa. Estos criaderos antihigiénicos, como el sonado caso de «La Gloria» en Pe-

rote, Veracruz, que bien podría ser la fuente de brotes peligrosos. En México el asunto permanece sin ser investigado a profundidad, la Secretaría de Agricultura y Ganadería, que dispone de mucho presupuesto, ha permanecido al margen sin mostrar ningún interés ni preocupación.

Estructura macromolecular de la hemaglutinina

El monómero de hemaglutinina (HA) tiene un tallo constituido principalmente por el péptido HA2, que a su vez está formado por una hélice beta carboxiterminal, la más larga, y otra hélice alfa aminoterminal corta, ambas unidas por un asa en horquilla. En la parte basal de las dos hélices está situado el llamado «péptido de fusión» (pefu) hidrofóbico y pequeño; más abajo se localiza el punto de corte de la bromelina (*figura 38*). El péptido mayor HA1 forma la cabeza globular portadora de cinco regiones hipervariables con función de epítomos A, B, C, D, E, las cuales rodean el sitio donde tiene lugar la ligadura con el ácido siálico, esto es, HA1 la porción más externa y superficial desempeña tareas de reconocimiento y señalización específicas.²³⁻²⁵

La *figura 25* muestra un modelo cristalográfico integral de HA, estructura trimérica compleja. Sobre la superficie de la molécula se disponen varias cadenas de carbohidratos «colgantes» y expuestos, que participan también como antigénicos funcionales. El tallo central elástico está formado por seis hélices y la molécula remata en una cabeza cerebroide provista de tres hundimientos de la sialo ligadura, y varios puntos (epítomos) con los cuales se une a los anticuerpos específicos.

Los efectos ionizantes del pH sobre la estructura de HA se muestran en el modelo de la *figura 39*. En pH neutro las dos hélices se mantienen en horquilla, pero cuando el pH baja a 5, las dos hélices se alargan estirándose y el pefu se libera en la porción superior activada. Dentro del trímero, la molécula toma forma piramidal enroscada y, por

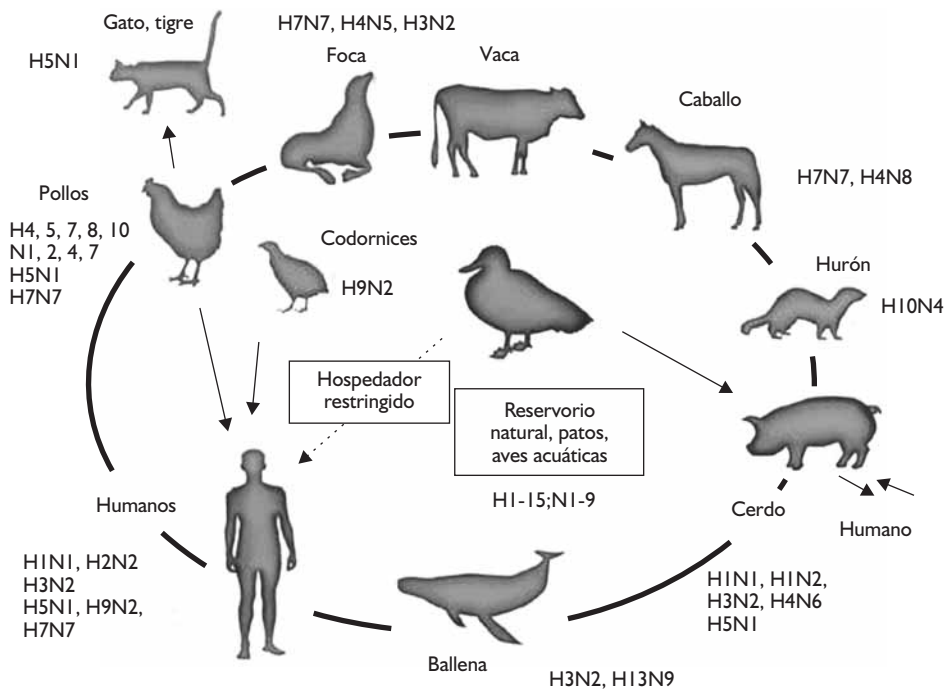
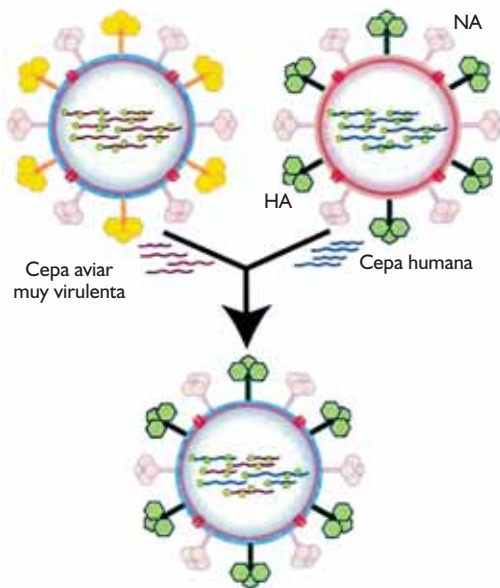


Figura 33. El virus de influenza A se mantiene circulando en gran variedad de reservorios naturales: patos, codornices, pollos, cerdos, felinos, caballos, vacas, mamíferos marinos y humanos. La transformación del virus aviar en humanos parecería estar limitada a las cepas H5 y H7 que causaron epizootias en el viejo mundo.

78



Virión híbrido adaptado al humano y virulento

Figura 34. El virus aviar H5 muy virulento de origen asiático alcanzó Rumania en abril 2010. ¿Es factible que la cepa A H1N1 porcina de Norteamérica se recombine dentro de un cerdo coinfectado y se genere otro virión más virulento para los humanos? Esta duda sólo podrá resolverse con el tiempo y la observación continua de los acontecimientos, con monitoreo de laboratorio.

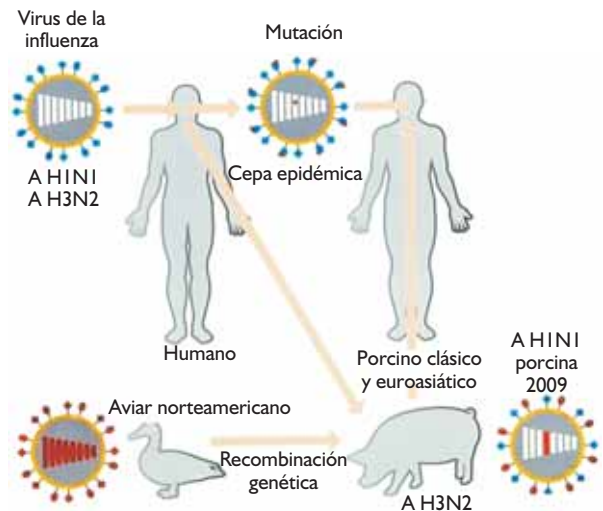


Figura 35. El virus A H1N1 porcino causante de la pandemia mexicana 2009 lleva en los genes tres linajes: porcino clásico de Norteamérica y porcino euroasiático, aviar norteamericano y humano. La cepa se propagó rápidamente, pero la letalidad registrada fue baja. El virus sigue sufriendo mutaciones puntuales en sus aminoácidos estructurales (deriva antigénica).



Figura 36. En 1918, las piaras de cerdos en Norteamérica sufrieron el embate mortífero del virus A H1N1 con letalidad alta de los lechones. La epizootia coincidió con el inicio de la «Influenza Española» que mató 50 millones de humanos.



Figura 37. En Perote, Veracruz, Puebla y ciertos lugares del Bajío mexicano existen criaderos de cerdos masivos, en condiciones de higiene desastrosa. El criadero «La Gloria» ha sido denunciado por su alta peligrosidad, sin ninguna norma de limpieza. Las autoridades no han realizado ninguna corrección.

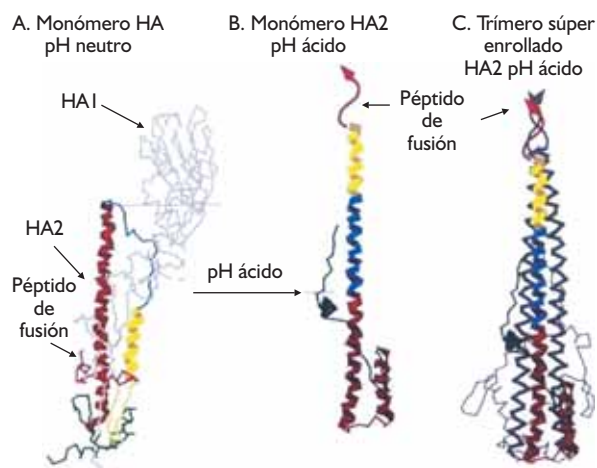


Figura 38. La hemaglutinina es un cimógeno HA-0 activado por acción de la tripsina que rompe el puente bisulfuro entre la cisteína-14 y la cis-137 de HA2. Cuando el pH baja 5.0 dentro del endosoma, queda expuesto el péptido de fusión y la molécula activada se enrolla preparándose para la acción.

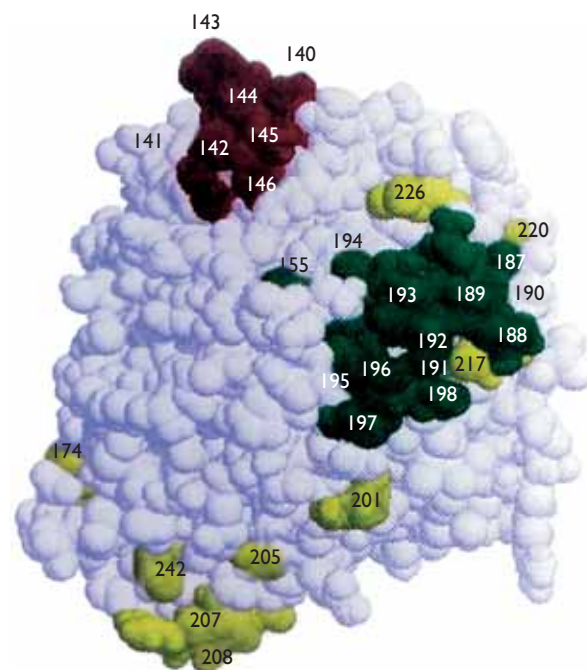


Figura 39. La cabeza globular con HA1 contienen los sitios antígenicos mayores (epitopos) demostrables por medio de anticuerpos monoclonales, altamente selectivos. La mutación de los aminoácidos estructurales explica la evolución y cambios continuos en las cepas circulantes por animales y humanos.

la punta, se asoman tres bandas del pefu listas para pegarse con la membrana del hospedador. Este proceso se ilustra mejor con un modelo de esferas y barras: HA1 está representado por tres esferas contiguas y HA2 por tres pares de barras asimétricas de colores rojo y verde, sujetadas a través de tres ganchos basales a la envoltura viral (*figura 40*). A pH 5.0 las esferas de HA1 se despliegan separándose, mientras las dos barras (hélices) de HA2 se estiran, dejando libre en el polo superior las puntas retorcidas del pefu.²⁶

La hemaglutinina en acción

La HA del virus de la influenza es una nanomáquina molecular citopática y mortífera diseñada para apuntar con precisión y atacar exitosamente las células respiratorias infectadas. Este proceso se divide en tres pasos fundamentales (*figura 41*).

Los tres puntos de reconocimiento ubicados sobre la cabeza globular de la glicoproteína HA1 (en color azul claro) se unen selectivamente a las cadenas de sialosacáridos de la membrana celular representados en color verde claro.

El virus es arrastrado hacia el interior de la célula dentro del endosoma vesicular, la célula le añade ácido hasta llegar a pH 5.0, ese pH bajo le sirve al virus para poder armar el ataque. La porción HA-1 acidificada se ioniza, desplegándose lateralmente, aunque también se repliega, demostrando así una flexibilidad funcional enorme. Las porciones del pefu representadas en rojo y las hélices centrales de color naranja normalmente están plegadas y acomodadas dentro de la macroproteína, pero en el medio ácido se estiran, salen afuera y apuntan hacia arriba, como se ve en el centro de la ilustración. El pefu tiene afinidad fuerte por la membrana celular, por ello, actúa como fijador de arrastre viral eficaz, acarrea el germen contra la membrana de la célula infectada.

Entonces, las porciones amarillas se repliegan deslizándose hacia los lados de la proteína y luego se cierran retorciéndose. En esta etapa final, la

envoltura del virus y la membrana celular son aproximadas y luego se fusionan. Poco después v-ARN se libera en el citoplasma y es transportado activamente hacia el núcleo para iniciar los procesos de traslación-replicación, haciendo uso de la polimerasa ARN del hospedador y de la maquinaria su celular (ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi) con provecho del parásito exitoso.²³⁻²⁸

La interacción virus-anticuerpos específicos

Este proceso depende de los linfocitos B que se transforman en plasmocitos capaces de producir inmunoglobulinas antivirales específicas, de afinidad variable (*figura 42*). El diseño molecular de la *figura 43* demuestra la interacción de las regiones hipervariables de HA1 color azul claro, con tres moléculas del fragmento Fab de la inmunoglobulina G, representada en color rojo; de ese modo, los anticuerpos llamados neutralizantes «bloquean» la cabeza de la macromolécula e impiden así la infectividad. Sin embargo, el virus de la influenza tiene mecanismos para evadir el bloqueo de los anticuerpos: uno de ellos es cambiar la localización o la composición de las cadenas de carbohidratos antigénicos representados en color verde, dispersas sobre la superficie de HA. El otro modo consiste en generar mutaciones de algunos aminoácidos componentes de la porción más expuesta en la cabeza, ya sea por un mecanismo de pérdida, ganancia o sustitución.

Recientemente, en los laboratorios de investigación del Instituto Sanford-Burnham, Estados Unidos, se logró preparar ciertos anticuerpos monoclonales (Ac Mo), los cuales tienen la propiedad de unirse selectivamente con el tallo de la hemaglutinina H5 (*figura 44*); de esta manera, las inmunoglobulinas impiden el cambio conformacional de la macromolécula que, como sabemos, es necesario para poder penetrar en la célula y abatir el sistema defensivo del hospedador. Tal tipo

Figura 40. Modelo computacional de la hemaglutinina (HA) desplegada. El péptido HA1 de mayor tamaño se representa por tres esferas grises manteniéndose plisado. En medio ácido la HA se despliega, quedando expuesto el péptido de fusión, previamente oculto; obsérvese la estructura del tallo fibrilar alargado, con seis hélices constitutivas.

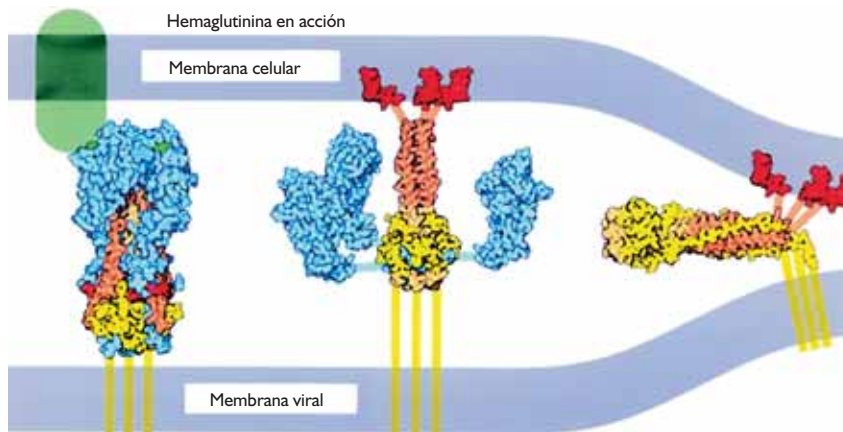
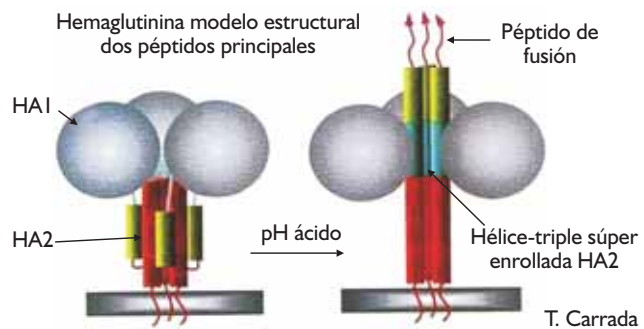
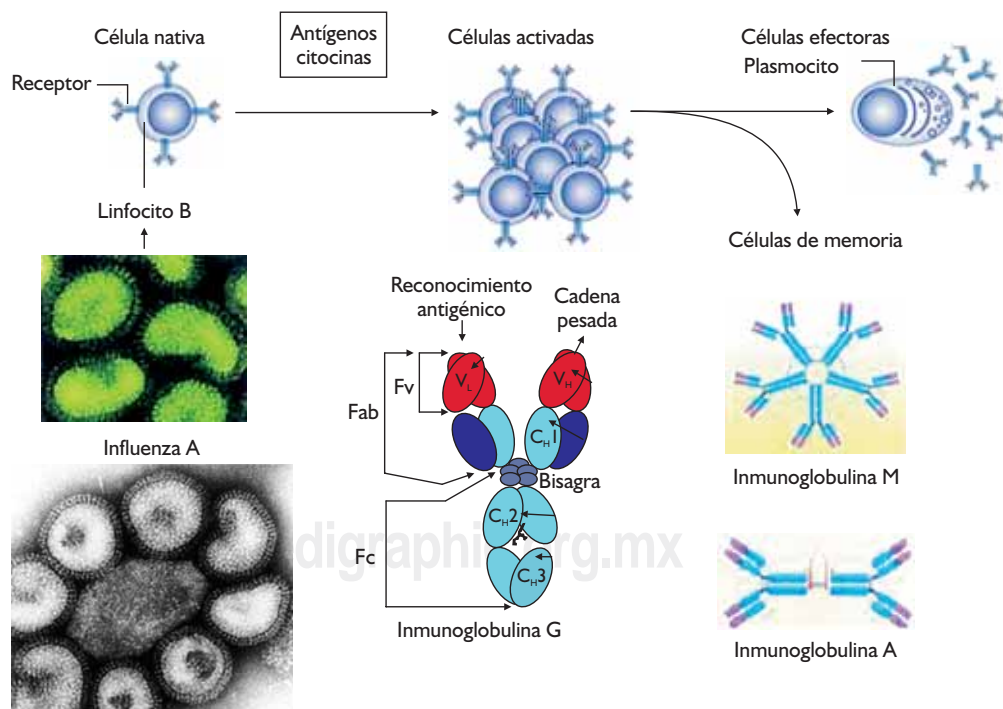


Figura 41. Izquierda: la hemaglutinina (HA) anclada sobre la envoltura viral se liga con el sialorreceptor (color verde). Centro: el péptido de fusión expuesto (color rojo) se pega fuertemente con la membrana celular. Derecha: la HA se repliega retorciéndose, aproximando así la membrana celular con la envoltura viral, para fundirse. Se liberan los genes para replicarse en el núcleo celular.

Figura 42. Las glicoproteínas virales superficiales hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) son reconocidas por los linfocitos B que se multiplican, generando células de memoria y plasmocitos, formadores a su vez de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA a nivel de las mucosas. Después de la vacunación se induce la síntesis de anticuerpos neutralizantes y protectores.



de inmunoglobulina, seguramente podrá ser utilizada en el futuro como arma terapéutica. Recuerdese, los Ac Mo se preparan para reaccionar con un solo epítipo, proceso caro de gran utilidad para la investigación.

Hemaglutinina y sialorreceptores

La «Pandemia Española» 1918-1919 causó más de 50 millones de muertes en el mundo. Fue causada por el virus A H1N1 de origen aviar primario. A través de la evolución se adaptó a los humanos, pero mantuvo en la estructura molecular las posiciones Leu-226 y Gly-228 (*figura 45*) y gran afinidad por los receptores del ácido siálico alfa-2,6-galactosa, distribuidos en las vías respiratorias altas de los humanos. En contraste, las cepas aviares muy virulentas A H5 surgidas en China han mostrado tener afinidad mayor por los receptores alfa-2,3-galactosa, existentes sólo en las partes más profundas del pulmón humano; por ello, se transmiten de humano a humano con dificultad.²³⁻²⁸

La hemaglutinina como herramienta del histopatólogo

La hemaglutinina purificada se inyecta en la sangre de los conejos y ratones de laboratorio, más tarde se recoge el suero y se apartan las inmunoglobulinas purificadas para marcarlas, de este modo, los investigadores tienen a su disposición un reactivo altamente específico que sirve para visualizar selectivamente las células atacadas por el virus (inmunohistoquímica molecular), esta herramienta ha permitido profundizar el conocimiento de la patogenia en la influenza humana (*figura 46*).

Estructura molecular-funciones de la neuraminidasa

En el laboratorio, hace más de 30 años se han venido usando las monocapas del riñón canino Ma-

din-Darvy (MDCK) como medio para cultivar el virus de la influenza A *in vitro* (*figura 47*). La presencia del virus porcino A H1N1 2009 puede demostrarse por inmunofluorescencia indirecta de los anticuerpos purificados clase IgG, preparados con sueros de conejos y marcados con fluoresceína verde brillante. El sistema se utiliza también para estudios de microscopía electrónica o para probar los efectos de los fármacos antivirales.

La hemaglutinina juega el rol principal cuando el virus llega a la superficie de la célula blanco ligándose con dos cadenas del ácido siálico y, finalmente, logra inyectar el genoma multiplicador. La neuraminidasa es protagonista cuando el virión formado intenta abandonar la célula. Esta glicoproteína lleva 450 aminoácidos encadenados, tiene forma de champiñón con cabeza tetramérica (*figura 48*). Se ha calculado que cada virión acarrea cerca de 100 moléculas de NA. Las cuatro subunidades idénticas están formadas cada una por seis laminillas plegadas con cuatro hebras antiparalelas- beta, estructuradas como las aspas de una hélice cuyo eje de simetría pasa por el centro de la subunidad. El sitio enzimático activo o esterasa se localiza dentro de una bolsa profunda colocada sobre la superficie de cada subunidad (*figura 49*); el sitio activo está cercado por aminoácidos de composición constante, pero los aminoácidos 119 y 276 son de ácido glutámico (*figura 50*). Las funciones básicas de la neuraminidasa son:

- I. La enzima cataliza la ruptura de las ligaduras alfa(2,6) o alfa(2,3)-cetósidas, existentes en el ácido siálico terminal (N-acetil-neuramínico) con residuo de galactosa adyacente.
- II. Habiéndose roto la sialoligadura, el virión es liberado y puede desprenderse de la célula madre.
- III. Impide la formación de viriones conglomerados o apelotonados en racimos de uva, por atrapamiento en el moco respiratorio espeso (*figura 51*).

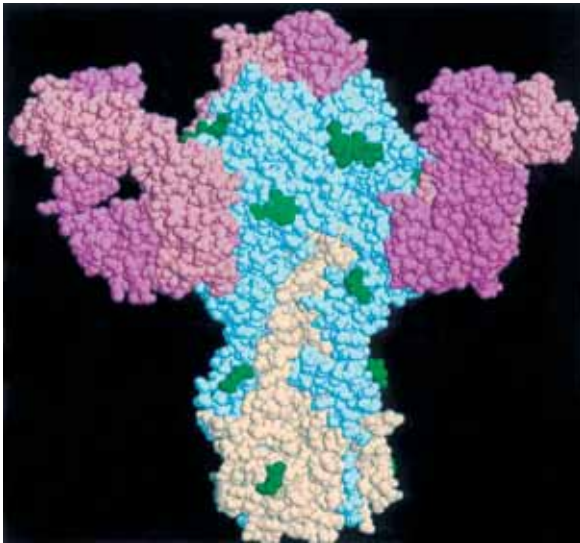


Figura 43. El péptido mayor HA1 (color azul) está unido con tres moléculas de un fragmento Fab-monoclonal con efecto neutralizante, de este modo se evita el despliegue de hemaglutinina y se reduce la capacidad del virus para multiplicarse. Los carbohidratos «colgantes» también son inmunogénicos (color verde claro).

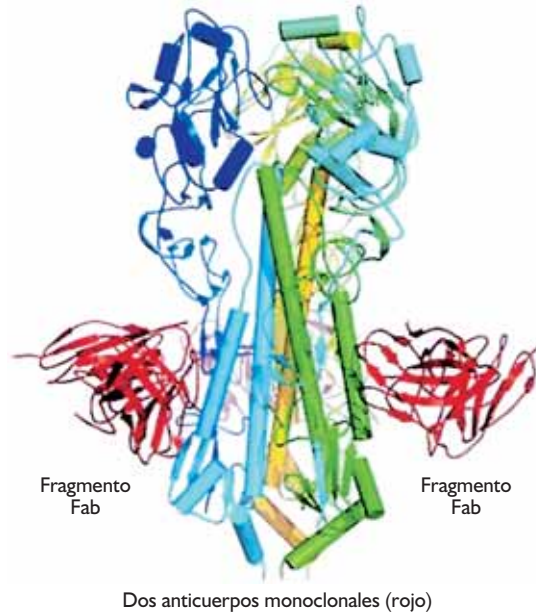


Figura 44. En los laboratorios de investigación es factible preparar inmunoglobulinas monoclonales altamente específicas (color rojo intenso), reconocen sólo los epítomos propios del tallo fibrilar de hemaglutinina (HA). A futuro, podrían ser incorporados en la terapéutica.

83

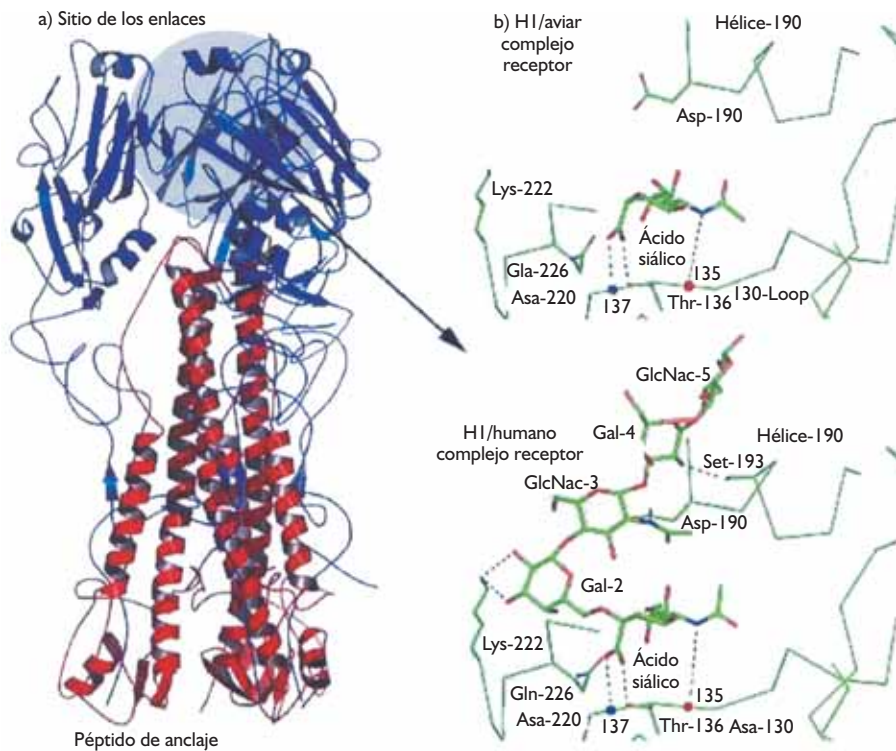


Figura 45. La hemaglutinina trimérica del virus A H1N1, 1918. El sitio de enlace siálico de cepas aviares o humanas es diferente, guarda relación estrecha con los aminoácidos estructurales en posiciones 220 y 222, en color rojo están representadas las hélices componentes del péptido HA2. Comparece con las figuras 38 y 40.

Figura 46. Células de pulmón humano que fueron infectadas por el virus A H1N1 porcino 2009. En el citoplasma de ambas células, se aprecia el color verde brillante indicativo de la presencia viral. Tinción de inmunofluorescencia indirecta por 850.

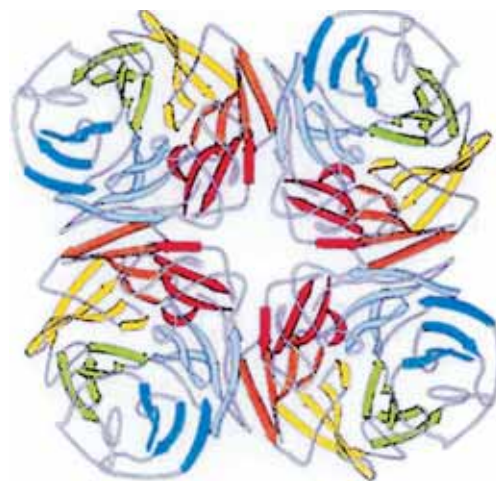
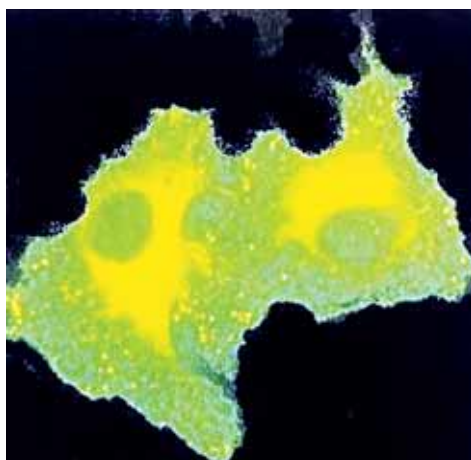
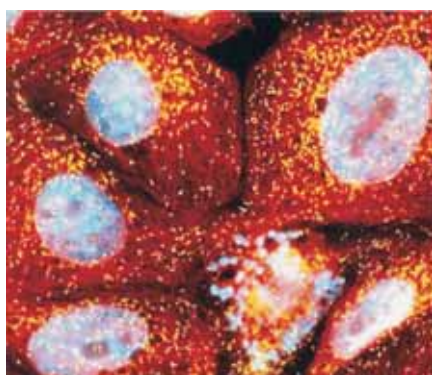
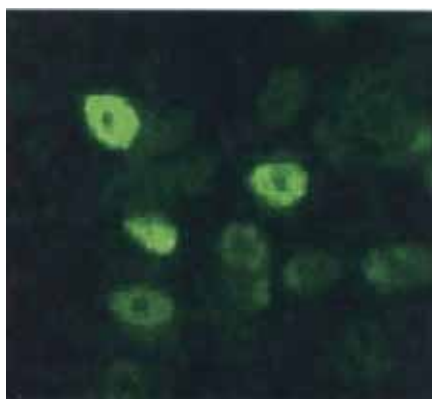


Figura 48. Imagen cristalográfica de la neuraminidasa tetramérica. Cada una de las subunidades lleva seis hebras antiparalelas, las laminillas están ordenadas como palas de una hélice, el eje de simetría cruza por el centro de cada subunidad.



Riñón canino Madin-Darby sin infección



Células RCMD infectadas influenza A(H1N1). IF(+)

Figura 47. Izquierda: monocapa celular de riñón canino-MD cultivada *in vitro*, con el núcleo de color azul tenue, no infectadas. Derecha: células RCMD infectadas por el virus A H1N1 porcino, los núcleos han tomado color verde intenso, después de seis horas postinfección.

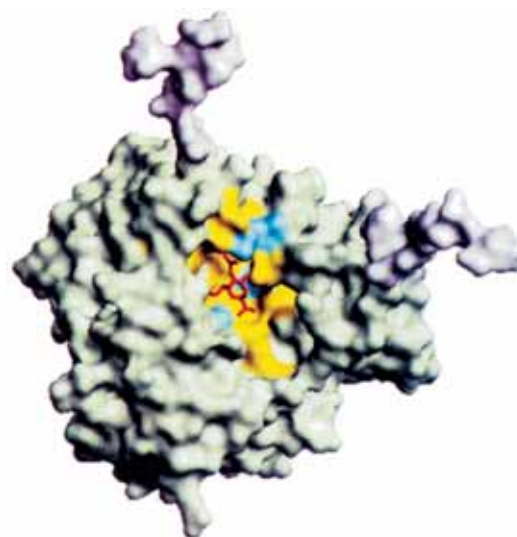


Figura 49. Neuraminidasa, modelo computacional de la estructura. Cada subunidad en la cabeza tiene el centro enzimático activo (color amarillo mostaza) colocado dentro de una bolsa profunda. El sustrato de ácido siálico (color rojo vivo) se acomoda dentro de la enzima para ser desdoblado. Esta molécula lleva decoraciones por carbohidratos prominentes. Cortesía del Dr. M. Matrosovich.

IV. La actividad de la enzima previene la inactivación viral y facilita la propagación ulterior del virus en otras células del aparato respiratorio.^{29,30}

La NA participa también en la patogenicidad y respuesta inflamatoria. La cepa A/WS/33(H1N1) tiene una NA con afinidad por el plasminógeno, sustancia que a su vez facilita la partición enzimática de HA, aumentando así la virulencia. Por otra parte, NA activa el factor de crecimiento transformante beta y, cuando aumentan los niveles de esta citocina, se inicia la apoptosis celular. La NA purificada promueve la generación de algunas citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (FNT) propias del macrófago.

Neuraminidasa y respuesta humoral de inmunoglobulinas

Se ha investigado en humanos y en animales la relación de NA frente a los anticuerpos específicos. De un modo general, se ha demostrado correlación significativa de la respuesta humoral medida por los niveles de IgM e IgG con los niveles de protección alcanzados contra la influenza. En 1972 un grupo de voluntarios fue inoculado con la cepa de influenza salvaje A/Hong Kong/68 H3N2, este virus acarrea una HA distinta de la cepa por entonces circulante H2N2, aunque la NA de las dos era semejante, por tanto los voluntarios no formaron anticuerpos (Ac) protectores contra la hemaglutinina, pero en cambio, sí formaron en el suero niveles variables de anticuerpos neutralizantes antineuraminidasa. La gravedad clínica de la enfermedad respiratoria, la duración de la excreción viral y la cantidad máxima del virus excretado, se correlacionaron inversamente con los títulos séricos medidos de los anticuerpos antineuraminidasa (*figuras 52 y 53*).

Los resultados del experimento de 1972 fueron más tarde reafirmados por otra investigación independiente, realizada en Tecumseh, Michigan.

En ese lugar se hizo un seguimiento longitudinal de 274 adultos, expuestos durante el brote de influenza A/Hong Kong/68 H3N2. La proporción de aquellos que sufrieron enfermedad respiratoria atribuible a la cepa pandémica fue menor en la medida que los títulos de anticuerpos antineuraminidasa preexistentes estaban elevados.^{29,30}

Los investigadores han fabricado también vacunas humanas contra la influenza experimental, las cuales contienen sólo los antígenos activos y protectores de NA. Por ejemplo, treinta y nueve voluntarios humanos fueron divididos aleatoriamente para recibir una dosis de vacuna B (contra el virus-B) o bien fueron inmunizados con otro virus híbrido que contenía una hemaglutinina equina-1 ó H7 aviar, además de los antígenos N2 provistos por la cepa de influenza entonces circulante A/Hong Kong/68 H3N2. Más tarde, todos los participantes fueron inoculados con el virus salvaje H3N2. Aunque no hubo diferencias de los dos grupos en la frecuencia de los aislamientos virales, sí se demostró una disminución significativa de los participantes enfermos y con respuesta febril en correlación con la aplicación de la vacuna híbrida y con los títulos IgA medidos en la secreción respiratoria. Adicionalmente, los títulos séricos de inmunoglobulinas antineuraminidasa guardaron relación inversa con la gravedad y duración del cuadro clínico. Esos tres magníficos estudios de investigación, realizados en voluntarios humanos, aportan un mensaje claro, e inconfundible:

La neuraminidasa es una glicoproteína inmunogénica y los anticuerpos formados tienen un efecto protector contra la enfermedad. Por tanto, si primero se recibe una dosis de vacuna estacional con H3N2 y H1N1, seguramente se empezará a formar protección contra cuatro antígenos H1, H3, N2 y N1; pero si además se recibe el refuerzo de la nueva vacuna contra la cepa porcina epidémica H1N1, que ha causado tantas defunciones, el nivel personal de protección será muy alto, con probabilidad mínima de enfermar.

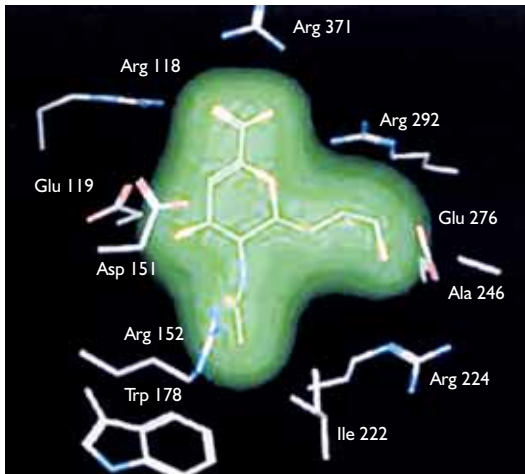


Figura 50. El sustrato de la enzima neuraminidasa está colocado dentro de un «corral» rodeado por 11 aminoácidos. Los glutamatos en posiciones 119 y 276 llevan añadidas moléculas de carbohidrato. Esta estructura es conservada casi en todas las cepas virales investigadas.

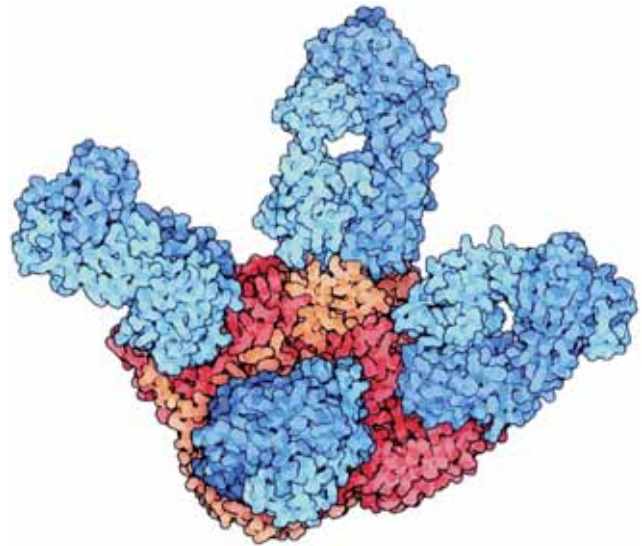


Figura 52. Tetrámero cefálico de la neuraminidasa (color café rojizo), la enzima es neutralizada y bloqueada por la presencia de cuatro unidades de IgG (color azul) generados por la vacunación específica. Esos anticuerpos obstruyen la liberación viral y suelen reducir los daños en la persona vacunada (efecto protector).

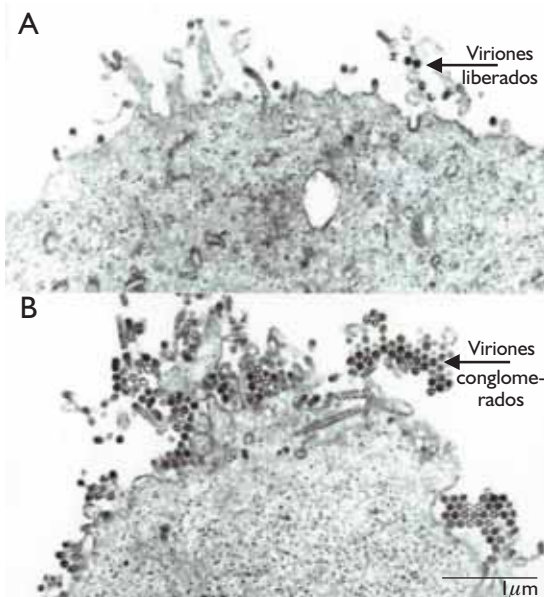


Figura 51. Microscopía electrónica de transmisión. Las células de riñón canino MD fueron infectadas por el virus A H1N1 porcino, en dos lotes separados: **A)** sobre la membrana celular están los viriones esféricos y oscuros liberados por efecto de la neuraminidasa. **B)** cuando en el cultivo se añade oseltamivir en solución, el fármaco inhibe la neuraminidasa, los viriones se apilatan sin poderse liberar y la infectividad queda detenida.

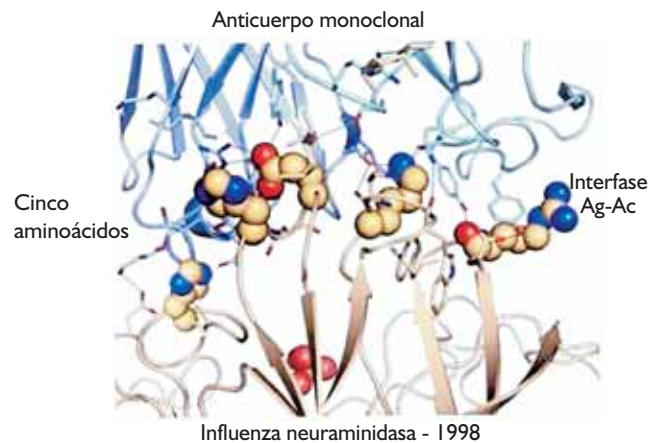


Figura 53. Con cristalográfico molecular es factible demostrar la interfase de interacción entre los anticuerpos monoclonales específicos y la superficie de la neuraminidasa. El fragmento Fag de la IgG se liga sobre cinco de los aminoácidos integrantes del epitopo original.

Por el contrario, si no se ha recibido ninguna vacuna protectora previa, queda totalmente expuesto a recibir el peso brutal y arrollador de la influenza maligna y agotadora A H1N1 porcina, con riesgo adicional de sufrir complicaciones graves o de morir. Los no inmunizados que trabajan en los hospitales se convierten en un peligro grave para los niños mal nutridos y los adultos debilitados o inmunocomprometidos, y no sería remoto que pudieran acarrear el contagio a la propia familia o comunidad. Vacunarse a tiempo es sin duda uno de los mejores negocios y yo, humilde epidemiólogo, he preferido siempre recibir el beneficio de la vacuna inactivada, aunque no ignoro que el proceso de la vacunación conlleva un riesgo pequeñísimo 1:1'000,000 de sufrir síndrome de Guillain-Barré. Es un riesgo calculado, aunque el beneficio para algunos es bien seguro, por ello, con todos los medios a mi alcance he procurado promover la aplicación de la vacuna en mi familia, mis amigos y, sobre todo, mis pacientes. ¿Vale la pena quedarse sin vacunar? La respuesta es un rotundo ¡No!^{29,30}

La influenza puede ser detenida cuando se trabaja bien

En el estado de Guanajuato, México, en el lapso de un año (23 de abril de 2009 a 23 de abril de 2010) se confirmaron 1,232 casos de influenza causada por el virus A H1N1 con 31 defunciones, aunque la última muerte ocurrió en octubre de 2009; el promedio de edad de los fallecidos fue 39 años (rango: 7 a 74 años) y 58% de los muertos eran mujeres. La inversión en equipamiento e insumos para atacar a la enfermedad fue 221 millones de pesos. Además, fueron invertidos 3.9 millones en medicamentos diversos, 108 millones en recursos humanos y 7.2 millones en promoción y difusión para el público. En total, la epidemia costó al estado 340 millones de pesos.

Para enfrentar el brote se contrataron 500 médicos y enfermeras y 1,000 promotores de la

salud. Al inicio se tenían 249 camas de terapia intensiva y hubo necesidad de aumentarlas a 360. El estado realizó una campaña de vacunación intensiva, habiéndose logrado aplicar 925 mil 460 vacunas en lugares públicos, estadios, palenques, orfanatos, clínicas y hospitales, con una cooperación ejemplar y exitosa de todo el Sector Salud. Como resultado, desde hace seis meses no hubo ninguna defunción y en los meses de marzo y abril sólo se registró un caso confirmado, es decir, la acción educativa realizada en la población, la respuesta unida del Sector Salud y el uso de laboratorio y de los antivirales permitieron abatir el brote y reducir los riesgos de la población. En Irapuato participó incluso la Presidencia Municipal y los grupos de la sociedad organizada más representativos, con un éxito total. A pesar de los rumores falsos, la población acudió a las clínicas y muy pocos se negaron a ser vacunados. Vale la pena apuntar, señaló el Secretario de Salud, doctor José Ángel Córdova, que de 12.5 millones de vacunas aplicadas hubo sólo 176 reacciones inversas a nivel nacional. Esa información es un dato fuerte que apoya la necesidad de proteger a la población en riesgo y a los trabajadores de la salud, por medio de vacunas de buena calidad, fácilmente accesibles, sin costo alguno.

Los inhibidores de la neuraminidasa

La estructura de la neuraminidasa fue descubierta por PM Colman en 1994. El sitio catalítico de la enzima es una bolsa en donde se acomoda a la perfección el ácido siálico.

El hidroxilo-4 de la azúcar se inserta en la cavidad de la proteína con agua (H₂O) y la superficie lleva dos carbohidratos propios del aminoglutamato. Habiéndose reconocido tales estructuras, se intentó desarrollar los fármacos antagonistas e inhibidores de NA con la meta de producir un compuesto más básico y más voluminoso que el -OH polar. En un primer intento se sustituyó un

Cuadro III.

Propiedad	Zanamivir	Oseltamivir
Absorción oral (%)	Muy baja < 5%	Alta > 80%
Formulación	Polvo seco para inhalar **	Cápsula oral y líquido
Distribución (%)	Faringe 80, pulmón 15	Árbol respiratorio
Biodisponibilidad (%)	12 - 17	80
Conc. plasmática pico (ng/mL)	30 - 50	350
Volumen de distribución /litro	16	23 - 26
Eliminación plasmática/hora	2.5 - 5	7 - 9.
Metabolismo	Ninguno	Desesterificación
Eliminación renal	Sí	Sí
Ajuste por insuficiencia hepatorrenal	Ninguno	Reducir la dosis

*Para tratamiento se administra dos veces al día, en profilaxis una sola vez. ** Zanamivir se administra en espray nasal, gotas, nebulización (96 mg) o polvo en aerosol con mezcla de lactosa o bien, intravenoso (600 mg). Oseltamivir en presentación tabletas 75 mg o 150 mg, por cinco días. El inicio temprano de la terapia antiviral reduce la infección y aumenta la eficacia; no es recomendable iniciarla después de dos días ni en los casos leves.

hidroxilo por el grupo $-NH_2$ y más tarde fue reemplazado por un guanido trinitrogenado y así nació el zanamivir (*figura 54*). Habiéndose cambiado $-NH_2$ por guanido, la constante de ionización K_I se incrementó 100 veces y se formó un compuesto más soluble; por el contrario, si se logra reducir la solubilidad de la proteína, de inmediato se aumenta la fuerza de la ligadura enzima-sustrato, por tal razón se procedió a reemplazar el grupo glicerol polar por una cadena hidrofóbica de metil-propano o dietilo, finalmente se prefirió el derivado de dietilo como sustituto del glicerol en la piranosa C-6 (oseltamivir), producto de gran utilidad clínica (*figura 55*). En el *cuadro III* se comparan las propiedades de ambos fármacos en uso actual.³⁰

¿Cómo evolucionaron los fármacos inhibidores de neuraminidasa?

La neuraminidasa es una macromolécula esencial para la replicación exitosa del virus de la influenza. Por ello, los farmacólogos expertos enfocaron sus baterías en la síntesis de los antagonistas del ácido siálico (ASI). El fármaco deseable debería ser químicamente distinto del sustrato natu-

ral, de modo tal que la enzima no pudiera catalizar la reacción que resultaría en su destrucción. Sin embargo, debiera ser suficientemente parecido al ASI como para unirse fuertemente al sitio activo, bloqueándolo. El nuevo fármaco debería ser estable, con baja toxicidad y capaz de sobrevivir al fenómeno de la drogoresistencia. Un ejemplo bueno se ilustra mediante tres estructuras comparativas (*figura 56*); la primera demuestra la interacción normal del ASI con los polisacáridos y aminoácidos del sitio activo.

La segunda muestra la unión del oseltamivir antiviral, molécula poco más grande en tamaño, de este modo empuja al glutamato (color rosado) contra la histidina (también en rosado). El funcionamiento de la enzima es inhibido, la tercera estructura es de una cepa viral ya resistente: por medio de una mutación fue sustituida la histidina por tirosina, forzando el glutamato contra el oseltamivir que todavía fue capaz de unirse a la enzima, pero no tan fuertemente; por eso, los polisacáridos del sustrato pudieron desplazarlo fácilmente y el fármaco no fue efectivo contra el virus mutante, al final quedó espacio para que ASI pudiera de nuevo unirse y la enzima siguió activa, cumpliendo la función de liberar al virión.³⁰

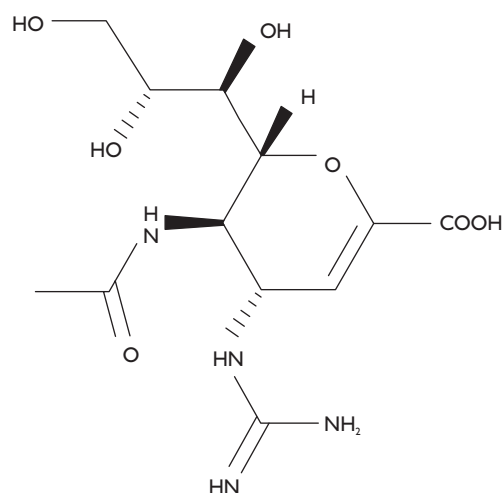


Figura 54. El fármaco zanamivir es inhibidor competitivo del ácido siálico, con fórmula 4-guanido 2,4-dideoxi-2,3-dihidro N-acetil-neuramínico. Este producto fue diseñado con la ayuda de la computadora, clínicamente se usa como polvo inhalable, es poco tóxico y muy efectivo.

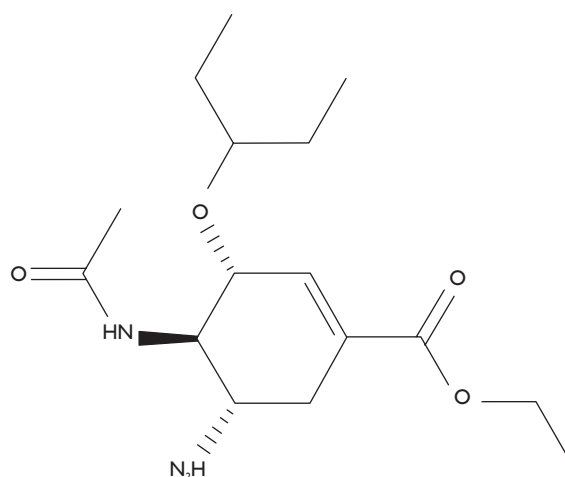


Figura 55. El oseltamivir lleva un éter etílico hidrofóbico y un grupo amino básico. El fármaco se administra en forma oral, llega al suero en una hora y se distribuye por todo el aparato respiratorio del sujeto infectado. Está indicado incluso en niños pequeños, sin ningún riesgo.

Influenza y coinfección bacteriana agregada

Entre mayo y agosto 2009 el Departamento de Patología del CDC en Atlanta, Georgia, recibió y examinó 77 muestras *post mortem* de tráqueas y pulmones humanos fallecidos por ataques del virus porcino A H1N1 circulante. Los especímenes fueron cortados, fijados, y teñidos con hematoxilina-eosina tradicional, por el método de Gram (Lillie-Twort) para tejidos y la tinción argéntica Warthin-Starry, además de aplicar técnicas moleculares propias para histoquímica y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con ese armamentario se pudo detectar la coexistencia de bacterias patógenas: *Streptococcus pneumoniae* en 10 muestras, *Streptococcus pyogenes* en seis; *Staphylococcus aureus* en siete; *Streptococcus mitis* en dos; *H. influenzae* en una y con bacterias múltiples en cuatro. Esta investigación sirvió para confirmar que la tercera parte de los enfermos atacados por la influenza suelen morir víctimas de coinfecciones bacterianas agregadas 22 (29%). Se observó

que las cepas virulentas y mortíferas del neumococo fueron acompañantes principales; por tanto, la vacunación antineumocócica polivalente con 23-polisacáridos incluidos (PPV23) debería ser promovida ampliamente en todos los trabajadores de la salud y en la población de niños y adultos mayores con riesgo alto. Obsérvese que *Staphylococcus aureus*, que podría ser eliminado con el lavado de manos frecuente, ocupó un lugar destacado en el estudio. La limpieza personal, así como el aseo permanente de las zonas hospitalarias con agua y jabón, seguramente ayudarán a reducir la carga pesada y vergonzosa de las infecciones nosocomiales.³¹

El repunte de la influenza en México

La Secretaría de Salud informó: hasta el 7 de abril de 2010, habiéndose confirmado por el laboratorio 72,392 casos de influenza clínica con 117 enfermos graves hospitalizados y 1,184 defunciones. Los estados de la República con mayor

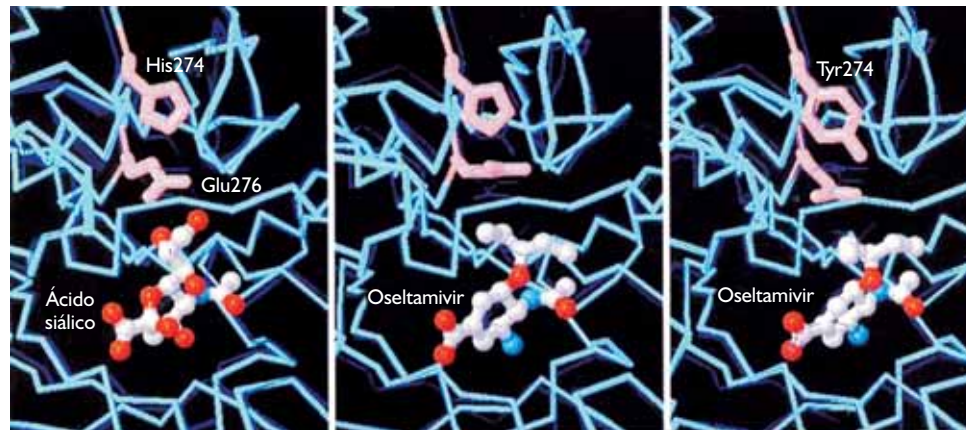


Figura 56. Izquierda: el ácido siálico (substrato) interactúa con histidina-274 y con ácido glutámico-276 propio de la neuraminidasa. Centro: el oseltamivir es más voluminoso, por ello, empuja el glutamato contra la histidina (ambos en color rosado), deteniendo la acción enzimática. Derecha: cepa viral resistente a oseltamivir. En este caso la histidina fue sustituida por tirosina (mutante), este aminoácido empuja el glutamato hacia abajo restableciendo la función enzimática.

número de muertes registradas fueron: Estado de México 54, Nuevo León 47, San Luis Potosí 38, Chihuahua 38. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias tan sólo en octubre 2009, hubo 85 enfermos hospitalizados con 38 intubados, los casos se redujeron durante el invierno, para volver a repuntar en la primavera del 2010. El doctor Alejandro Macías, Comisionado Nacional para la Influenza, estimaba que durante el brote de 12 meses cerca de 20 millones de mexicanos habían sido contagiados; otra cifra muy semejante había sido vacunada contra el virus porcino A H1N1 circulante. El Secretario de Salud, José Ángel Córdova, apuntó que la gran experiencia nacional de enfrentarse con el virus porcino ha servido para que México esté mejor preparado y tenga una respuesta rápida y fuerte, en caso de que se presentara la temible influenza aviar A H5N1 existente por ahora sólo en Eurasia y África, aunque en ese mismo mes el virus citado hizo su aparición en la República de Rumania, causando preocupación de su traslado eventual a México (Bol. de Influenza en México, temporada primavera 2010, Dirección de Epidemiología, SSA).

En el lapso de un año después de la alerta epidemiológica lanzada el 23 de abril 2009, la Secretaría de Salud de México registró 1,184 muertes atribuidas a la influenza A H1N1, habiendo sido más afectados los grupos de 20 a 59 años de edad (*figura 57*). Puede afirmarse que el virus circulante en el periodo 2009-2010 se propagó con suma facilidad primero en México y Norteamérica, más tarde por varios países del mundo; sin embargo, de acuerdo al número de casos confirmados, la letalidad calculada es 1.63; pero la letalidad real seguramente fue menor de 0.5%, dado que muchos casos no fueron notificados y otros más con síntomas sospechosos de influenza no se incluyeron en la lista de casos. De cualquier modo, el impacto letal sobre la población mexicana fue, en mi opinión, muy baja.

Discusión

El virus de la influenza es el microorganismo mejor investigado a nivel molecular: los estudios relacionados con la proteómica de las macromoléculas más superficiales ha permitido conocer a profundidad los mecanismos de la reacción anti-

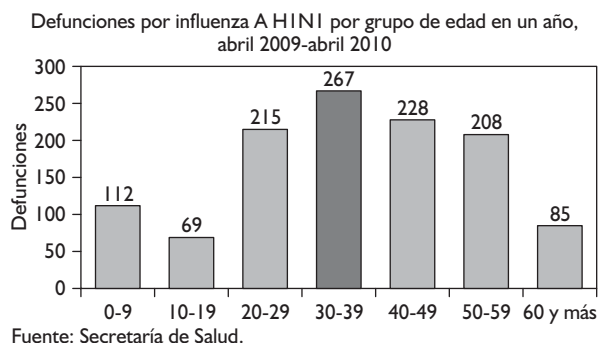


Figura 57. Letalidad atribuida al virus de la influenza porcina A H1N1 según grupos de edad, en números absolutos sobre un total de 1,184 defunciones registradas.

geno-anticuerpo, y la forma como se realiza el enlace selectivo de HA y NA con el substrato común del ácido siálico; por ello, se ha dicho que la virulencia de las cepas es dependiente del equilibrio armónico y la acción de ambos macropéptidos. Sin embargo, se desconocen los mecanismos íntimos necesarios para que la cepa de origen primario aviar se transforme en un patógeno de mamíferos y humano. Tal es el caso del virus A H1N1 que sin duda partió del reservorio aviar primario y en el año de 1910 comenzó su evolución exitosa para convertirse en el agente de la Influenza Española 1918-1919 que atacó por igual a los humanos y los cerdos, con letalidad espantable de poco más de 50 millones de muertos. Hoy en día está circulando en Asia y en Europa Oriental el virus aviar A H5N1 junto con el virus porcino A H1N1 originado en Norteamérica. El virus asiático es letal para pollos, patos y aves silvestres, pero se transmite mal entre los humanos; sin embargo, su virulencia para niños y jóvenes ha sido mayor a 50%, aunque la propagación se ha mantenido sin interrupción. El virus de origen norteamericano A H1N1 porcino se propagó primero en México y los Estados Unidos de Norteamérica, de humano a humano con mucha rapidez, pero con baja virulencia; de modo tal que la letalidad calculada ha sido inferior a 0.5%, cifra muy por debajo de las pandemias anteriores

del siglo XX. La pregunta es ¿Qué pasará en caso de que la cepa aviar virulenta y mortífera se recombine con el virus porcino muy transmisible aunque poco virulenta? Es evidente, a mi juicio, que no estamos bien preparados. Por ello, es importante monitorear de cerca la evolución de los dos virus y de otros más que pudieran ingresar en el escenario epidemiológico. Por la misma razón, es prudente en México desarrollar una infraestructura de vigilancia que permita descubrir tempranamente los casos de aves o cerdos infectados y las epizootias en esas especies como signo de alarma; de igual manera, es urgente montar a corto plazo el laboratorio nacional para poder producir vacunas contra la influenza de alta calidad para uso de humanos y animales. Es lamentable que la Secretaría de Agricultura y Ganadería y las Escuelas de Veterinaria se hayan interesado tan poco en tan grave problema.

En México se dispuso, por fortuna, de los antivirales principalmente el oseltamivir en cantidad suficiente y sin restricciones. Ese medicamento contribuyó sin duda a disminuir las muertes y aliviar los sufrimientos de los enfermos más débiles; pero está latente el peligro de que se incremente la circulación de cepas resistentes. Conviene aclarar que en los enfermos con resistencia al oseltamivir se puede aplicar todavía el zanamivir inhalable que ya está disponible en México. Los expertos han señalado la ventaja de usar la quimioterapia combinada múltiple, aplicando oseltamivir-zanamivir y ribavirina (análogo de la viramida), fármaco que inhibe las polimerasas del ARN. Se cuenta también ya con el nuevo producto DAS 181(Fludase) es un inhibidor potente del virus A H5N1 en los ratones infectados. En la búsqueda de fármacos protectores, los investigadores han recurrido al uso de medicamentos antiinflamatorios como las estatinas. También deben tomarse en cuenta los anticuerpos monoclonales que, aunque de costo alto, pueden bloquear de manera eficaz la replicación viral, como he intentado demostrar en este trabajo. En algunos la-

laboratorios se investiga también la llamada inmunidad heterotípica proporcionada por antígenos como la proteína M1 con participación de los linfocitos T, este tema merece ser investigado con mayor profundidad.

En México se ha logrado certificar a muchos hospitales públicos y privados, acción del todo laudable. Sin embargo, deberían incluirse nuevos indicadores de calidad; por ejemplo, el número y porcentaje de trabajadores de la salud que han recibido con oportunidad las vacunas protectoras contra la influenza y contra los neumococos. En Estados Unidos y Canadá los hospitales privados y los de mayor prestigio han optado por no contratar a quienes se nieguen a vacunarse, dado que representan un riesgo grave para los enfermos débiles a su cargo. También deben revisarse las reglas de limpieza hospitalaria y en consulta externa, con énfasis mayor en el lavado de manos con agua y jabón y el uso correcto de mascarillas quirúrgicas protectoras.

92

Las aves de mal agüero y algunos políticos ignorantes pronosticaron que la campaña en México de vacunación sería un fracaso, pero para el 23 de marzo ya se habían aplicado más de 25 millones de vacunas y la campaña exitosa realizada en el estado de Guanajuato demostró que la población mexicana es inteligente y receptiva y no se deja engañar tan fácilmente. También vale la pena mencionar la cooperación tan estrecha que se dio entre las autoridades federales y el personal de salud del Distrito Federal. La campaña se llevó a cabo en las estaciones del metro, sitios de diversión, incluso en los antros con mucha participación de jóvenes, señoras y niños. Este hecho demuestra que la salud es un bien de todos, muy por encima de los partidos políticos y las diferencias ideológicas. Lo verdaderamente importante es reforzar la vigilancia epidemiológica con apoyo de laboratorio y no bajar la guardia, considerando la imposibilidad de predecir cuál virus circulará en la próxima pandemia. El estudio de la biología molecular y de la genómica contribuirá sin duda a dar apoyos seguros

y tranquilidad a la población. El Sector Salud debe promover la investigación epidemiológica y clínica con vigor renovado, como una garantía de protección para la población en riesgo.

Agradecimientos

Este trabajo es un homenaje a los formadores en el Hospital General de México, profesores Samuel Morones Alba (infectólogo), Guillermo Bosque Pichardo (cardiólogo), Fernando Latapi (dermatólogo), Alejandro Celis Salazar (neumólogo e investigador), maestros brillantes y talentosos. Más tarde, tuve la suerte de ser alumno de la maestra María Victoria de la Cruz (embrióloga) y Carlos Biro (inmunología), Isaac Costero (anatomía patológica) del Instituto Nacional de Cardiología. En 1960, cuando todavía era estudiante de medicina comencé mi labor en el Sanatorio para Tuberculosos de Huipulco como Prosector de Autopsias y más tarde fui el encargado del Departamento *Post Mortem*, en ese hospital maravilloso trabajé como profesor ayudante de Clínica y Patología del aparato respiratorio, bajo la dirección de los profesores eminentes doctor Ismael Cosío Villegas, mi muy admirable Director, doctor Miguel Jiménez iniciador de la quimioterapia antituberculosa en México y doctor Fernando Rébora Gutiérrez, maestro de calidad excepcional; todos fueron humanistas y defensores de los enfermos más pobres, por ello, me siento profundamente complacido de que el INER que ellos fundaron se mantenga trabajando con mucha calidad y entusiasmo a pesar de las carencias y los recortes presupuestales. Empecé la vida trabajando en un laboratorio de histopatología, terminé mi residencia en neumología y me marché a Londres, para lograr mi especialidad, primero en epidemiología en la *London School of Hygiene and Tropical Medicine* y más tarde hice virología médica en la Escuela Real de Postgrado en la Universidad de Londres; por todo ello, los virus respiratorios y de la influenza en particular siempre me han interesado como

objetos mayores de estudio. Este trabajo modesto es una contribución realizada con los ahorros de mi pensión que generosamente me otorga el IMSS y no persigue fines partidarios ni de servilismo político, pero sí el deseo de servicio al estado de Guanajuato, mi tierra amada.

Referencias

- Salomon R, Webster RG. The influenza virus enigma. *Cell* 2009; 136: 402-410.
- Hayden FG, Palese P. Influenza virus. En: Richman DG, Whither RJ, Hayden FG (eds). *Clinical Virology*. 2nd ed. Washington DC: ASM Press; 2002. p. 891-920.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Rawoka J. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbial Rev* 1992; 56: 152-159.
- Smith W, Andrews CH, Laidlaw PP. A viruses obtained from influenza patients. *Lancet* 1933; 2: 66-68.
- Burnet FM. Growth of influenza virus in the allantoic cavity of the chick embryo. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1941; 19: 291-295.
- Nicholson KL, Wood JM, Zambon M. Influenza (Seminar). *Lancet* 2003; 362: 1733-1745.
- Nicholson KG, Webster RG, Haynes AJ eds, *Textbook of Influenza*. Oxford: Blackwell Science; 1998.
- Kamps BS, Hoffmann Ch, Preiser W (eds). *Influenza Report*. 2006; [PDF free download Flying Publisher]: p. 225.
- Digard P. Myxovirus. In: *Microbiology Bytes: Virology: Orthomyxovirus*; Actualized April 8, 2009. p. 12
- Wright PF, Neumann G, Kawoka Y. Orthomyxovirus. In: Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2007. p. 1691-1740.
- Srinivasan A, Perl TM. Respiratory protection against influenza. *JAMA* 2009; 302: 1903-1904.
- Salgado CD, Farr BM, Hall KK, Hayden FG. Influenza in the acute hospital setting (Review). *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 145-155.
- Loeb M, Dafoe N, Mahony J, John M, Sarabia A, Glavian V et al. Surgical Mask N95 Respiratory for Preventing Influenza Among Health Workers. A randomized trial. *JAMA* 2009; 302: 1865-1871.
- Lowen AC, Stell J, Mubareka S, Palese P. High temperature (30 °C) blocks aerosols but not contact transmission of influenza virus. *J Virol* 2008; 82: 5650-5652.
- Mubareka S, Lowen AC, Steel J, Coates AL, Garcia-Sastre A, Palese P. Transmission of influenza viruses via aerosols and fomites in the Guinea pig model. *JID* 2009; 199: 858-865.
- Nikta M. Hand washing, a key anti-flu strategy, often neglected by health care workers. *JAMA* 2009; 302: 1850-1851.
- Couch RB, Kasel JA. Immunity in influenza (Review). *Ann Rev Microbiol* 1983; 37: 520-549.
- Hampton T. H1N1 vaccine urged for health workers, but some resist getting on board. *JAMA* 2009; 302: 1848-1849.
- Neumann G, Kawoka Y. Reverse genetics of influenza virus. *Virology* 2001; 287: 243-250.
- Cornejois D. Biological crystals: at the interface between physics, chemistry and biology. *Science in School* (www.sciencecompany.com/sci-exper).
- Abad-Zapatero C. Crystals and life: A personal journey. La Jolla, CA, USA. Internac University Line. ISBN: 9780972077408. 2002: 1-16.
- Pando RRV, Lanz-Mendoza H. La importancia de la proteómica en la salud pública. *Sal Pub Mex* 2009; 51: S386-S394.
- Goodsell DS. Protein Data Bank. Portal to Macromolecular Structure: Hemagglutinin, Molecule of the Month. 2010; febrero 23.
- Webster RG, Walker EJ. Influenza. *Amer Scient* 2003; 91: 122-129.
- Wang Q, Cheng F, Lu M, Tian X, Ma J. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. *J Virol* 2008; 82: 3011-3020.
- Cox NJ, Bender CA. The molecular epidemiology of influenza viruses. *Semin Virol* 1995; 6: 359-370.
- Soliner TH. Intracellular and viral membrane fusion: e uniting mechanism. *Current Op Cell Biol* 2004; 16: 429-435.
- Shekel J, Wile D. Receptor binding and membrane fusion in virus entry. The influenza hemagglutinin. *Ann Rev Biochem* 2000; 69: 531-569.
- Colman P, Varghese J, Laver W. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza neuraminidase. *Nature* 1983; 303: 41-44.
- Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 2000; 355: 827-835.
- Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial coinfection in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) United States, May-August 2009. *MMWR* 2009; 58: 1071-1074.