



Preocupación de una inminente pandemia

Aporta la Facultad de Química nuevos antivirales contra la influenza

Dr. Carlos Antonio Rius Alonso*

- **El virus se transmite inhalando microgotas, provenientes de la tos o estornudos de una persona infectada, o bien teniendo contacto con secreciones.**
- **Cada año enferman entre 10 y 20% de la población mundial; de ese porcentaje casi 5 millones se convierten en casos graves, que reportan hasta 500 mil defunciones.**
- **Las personas mayores de 65 años presentan mayor riesgo.**

Para conocer mejor al doctor Carlos Antonio Rius Alonso es importante mencionar que fue fundador y miembro del primer comité ejecutivo de las AAPAUNAM de 1979 a 1984 y en la actualidad es secretario de organización de la sección 24 de la AAPAUNAM; recibió el Premio al Mérito Académico 2010; como académico ha impartido 118 cursos a nivel licenciatura, 31 cursos de posgrado; 36 publicaciones en revistas y proceedings; ha presentado 95 trabajos en congresos; 36 desarrollos de software educativo; 20 videos educativos; ha dirigido 21 tesis de licenciatura y tres de maestría; 22 desarrollos tecnológicos implementados y en uso en la industria; ha impartido 54 conferencias por invitación; es pionero en el uso de Internet para la educación; tiene una página web desde hace 14 años, la cual ha tenido más de 9 millones 800 mil visitas desde 2007, con más de 24

mil archivos disponibles en red (organica1.org; organica1a.org); ha implementado el uso de exámenes en línea desde hace 10 años; ha fungido como miembro del Comité de Cómputo, Comité de Multimedia, Coordinador de los Proyectos Cómputo para la Docencia y en el desarrollo de software tridimensional en la sala IXLTI; en la actualidad es responsable del proyecto PAPIIME PE205313 Mejoramiento de la enseñanza de la química usando medios electrónicos; además, es corresponsable de los proyectos PAPIIT IN115713-2 Hacia una síntesis eficiente de curcumina y análogos estructurales que permitan su escalamiento, así como Nueva síntesis de isatinas con actividad biológica proyecto PAPIIT IN216113; sus principales líneas de investigación son desarrollo tecnológico, modelación molecular, uso de cómputo para la docencia y síntesis de compuestos orgánicos.

*Profesor-Investigador, Facultad de Química, UNAM.

La Facultad de Química de la UNAM desarrolla nuevos antivirales con resultados prometedores. Sobre todo, se está entendiendo el mecanismo de resistencia que poseen los virus, abriendo la posibilidad de elaborar sustancias que los inhiban. Para poder entender este mecanismo, mediante el cual una sustancia es activa, es necesario conocer las interacciones que se presentan en el sitio activo. La actividad biológica de un medicamento está relacionada con su afinidad al receptor que se va a inhibir, por ello, para encontrar esas sustancias que mantengan la actividad en proteínas y que sufrieron un cambio, se hacen trabajos de modelación molecular para encontrar cómo se puede restablecer la actividad y después pasar a la síntesis de los compuestos químicos que pueden ser más promisorios, así su actividad es evaluada primero *in vitro*, en cepas de virus resistentes, y después *in vivo*, con ratones infectados con los virus. Para esto

se ha integrado un sólido grupo de investigación formado por el autor de estas líneas, los doctores Gustavo García, Martha Albores, Rocío Pozas, los maestros en ciencias Yolanda González, Héctor Torres, y las químicas Yvonne Grillasca, y Alejandrina Acosta.

La influenza es una infección vírica, que produce fiebre, secreción nasal, tos, dolor de cabeza, malestar general e inflamación del revestimiento de la nariz, las vías respiratorias y ocasionalmente se manifiesta conjuntivitis. El virus se transmite inhalando micro gotas provenientes de la tos o los estornudos de una persona infectada o bien teniendo contacto con las secreciones. Ha estado con la humanidad desde hace mucho tiempo. De hecho su nombre proviene de las antiguas creencias de influencias malignas o sobrenaturales.

Los virus de influenza son clasificados en cinco géneros que pertenecen a la familia de los *Orthomyxoviridae*. De éstos sólo tres tipos –A, B y C– son los que infectan a humanos.

Las infecciones por influenza del tipo B involucran principalmente a niños y adolescentes, que en ocasiones pueden evolucionar en infecciones serias; aunque está involucrado en epidemias periódicas, la tasa de hospitalización es cuatro veces menor respecto al virus de influenza A.

El virus de influenza C también tiene la capacidad de producir epidemias y está asociado a enfermedades respiratorias moderadas, aunque raramente puede llegar a provocar infecciones severas del tracto respiratorio bajo. Sin embargo es menos común que el virus tipo A y se estima que en la etapa adulta la mayoría de los individuos (96%) presenta anticuerpos para él. Así, se estima que cada año enferma entre 10 y 20% de la población mundial, de ese porcentaje unos 5 millones se convierten en casos graves, de los que resultan entre 250 mil y 500 mil defunciones. Dichos casos son conocidos como influenza estacional. Normalmente la mayor

TABLA 1 PANDEMIAS OCURRIDAS DESDE FINES DEL SIGLO XIX

Años	Descripción viral	Cambio antigénico (fuente)	Impacto clínico
1889	H3N2	Desconocido	Grave
1900	H3N8	Desconocido	Moderado
1918 - 1956	H1N1 "Española"	HA, NA (posiblemente aviar)	Muy grave, 50 millones de muertos en el primer año
1957 - 1968	H2N2 "Asiática"	Nuevos HA, NA, PB1 (aviar)	Grave
1968 -	H3N2 "Hong Kong"	Nuevo HA**, PB1 (aviar)	Moderada
1977 -	H1N1 "Rusa"	Idéntica a la cepa de 1956	Relativamente leve
2009 -	H1N1 2009	Antigénicamente similar a la cepa porcina clásica A(H1N1), triple rearreglante del virus A(H1N1) de origen norteamericano que ha circulado entre los cerdos hace varias décadas	Moderada (en evolución)

Tomado de Córdova, J et al. *La epidemia de influenza A(H1N1) en México*. México: Editorial Médica Panamericana. 2010: 250

tasa de mortalidad corresponde a los virus tipo A. Particularmente las personas mayores de 65 años son las más vulnerables. La tasa de mortalidad anual relacionada con influenza en estas personas resulta en una por cada 2 mil 200 en Estados Unidos (EU), mientras que los años en que se presentan epidemias esta tasa cambia a un caso por cada 300.

Las organizaciones nacionales e internacionales para la protección de la salud ponen especial atención al virus de influenza tipo A, debido a la alta capacidad que tiene de generar pandemias, que son sus manifestaciones más severas (Tabla 1).

Aunque dichos eventos se presentan en intervalos de 10 a 40 años, únicamente se tienen registros confiables a partir de la ocurrida en 1918/1919, conocida como influenza española. Esta pandemia no tuvo precedente en cuanto a su severidad. Como medio de comparación, el SIDA mató a 25 millones de personas en los primeros 25 años, mientras que la influenza española lo hizo en 25 semanas. La mortalidad de esta enfermedad fue calculada por arriba de 2.5% en EU. El agente causante de esta pandemia fue un virus tipo A del subtipo H1N1.

Aunque la patogenicidad de este virus es multigénica, las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) son las principales determinantes. La designación de los virus de influenza A se apoya en las relaciones antigénicas de estas proteínas. Las cepas de influenza A que son estacionales desde 1977 son A (H1N1 y H3N2). Hasta ahora se tienen tipificadas las siguientes variedades de HA (H1 a H17) y NA (N1 a N9).

El intestino de las aves acuáticas silvestres es el reservorio más grande de estos virus y son excretados en altas concentraciones en las heces. En ellos circulan todos los subtipos de HA y NA. La mayoría de los virus de influenza no son patógenos para las aves acuáticas y se piensa que son la fuente de los virus transmitidos a otros animales como las aves de corral, mamíferos acuáticos y terrestres.

Los virus de la influenza A, han sido capaces de romper la barrera interespecie y uno de los factores que lo ha permitido es la convivencia cercana del hombre con aves, tanto de corral como silvestres.

Deriva y cambio antigénico

En contraste con otros virus respiratorios, los de influenza poseen dos mecanismos diferentes que les permiten reinfectar a los humanos previamente expuestos. El primero de estos mecanismos es llamado deriva antigénica y ocurre en virus de tipo A y B debido a mutaciones puntuales causadas en el ácido ribonucleico (RNA, por sus siglas en inglés) de la polimerasa viral. Este tipo de mutaciones se genera constantemente y en los genes de las proteínas HA y NA se acumulan hasta llegar el punto en el sistema inmune de personas previamente infectadas ya no las reconoce o lo hacen ineficazmente. Esto implica que se tenga que revisar la composición de la vacuna estacional cada año. Más específicamente la hemaglutinina, que es el principal antígeno de neutralización del virus.

El segundo mecanismo denominado cambio antigénico sucede cuando dos subtipos diferentes de virus infectan a un mismo huésped, dada la naturaleza segmen-

tada del virus los genes de estos patógenos se mezclan y provocan una nueva escala de virus con diversas combinaciones de genes.

Estas nuevas cepas pueden introducir proteínas inmunológicamente distintas en la población y si se presenta el contagio de persona a persona, el desenlace es una pandemia. En el siglo pasado hubo tres de estos cambios antigénicos que provocaron las pandemias de 1918, 1957 y 1968. Las cepas de 1957 y 1968 resultaron del intercambio de genes entre virus de tipo humano y aviar.

Tropismo

El virus normalmente ingresa en el organismo por la nariz o la boca e infecta a las células que recubren al tracto respiratorio. La especificidad ligando-receptor de la proteína HA es la responsable del grado de restricción del huésped. Los virus aislados en humanos se unen principalmente al ácido siálico, que es un tipo de azúcar. Esto se debe a que los enlaces de NANA que recubren la tráquea humana tienen principalmente sialiloligosacáridos.

La proteína HA, como indica su nombre, tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos, ya que la membrana de éstos es rica en una sialoglicoproteína llamada glicoforina. Esta propiedad de hemoaglutinación ha sido utilizada para la clasificación de los diferentes tipos de influenza.

Virus de influenza A (H5N1)

El primer reporte de una infección fatal en humanos con virus de influenza aviar ocurrió en 1997, en Hong Kong: 18 personas se infectaron y seis fallecieron.

Aunque después hubo apariciones esporádicas, este brote se mantuvo controlado mediante el sacrificio de millones de aves de corral. Sin embargo, tuvo un resurgimiento en 2003; en esta ocasión el virus se expandió al sureste de Asia, África y Europa. Específicamente este virus tiene una tasa alta de re arreglo y presenta características que merecen atención:

- llega a ser letal para aves de corral y acuáticas silvestres (reservorio natural).
- se replica y crea infecciones mortales en ratones, sin la necesidad de adaptarse previamente.
- infecta a varias especies de mamíferos con resultados fatales.
- estudios en hurones indican que su patogenicidad aumenta con el tiempo. Esto indica la adquisición de mutaciones que incrementan su patogenicidad en mamíferos, a su vez se han identificado y realizado en el laboratorio mutaciones en la NA.
- su transmisión a humanos está asociada a una infección respiratoria severa con un alto índice de mortalidad.

Hasta el 10 de agosto de 2012 se habían registrado 594 infecciones en humanos, de las cuales 349 personas fallecieron, lo que indica una muy alta tasa de mortalidad.

El subtipo H5N1 presenta poca difusión entre humanos, si bien existen casos aislados de infecciones humano-humano, el virus no se ha adaptado lo suficiente para desencadenar una pandemia. Contrario a la cepa A H1N1/2009 que se puede contagiar fácilmente entre personas, pero presenta baja tasa de mortalidad. Las infecciones por

virus A (H5N1) están relacionadas con leucopenia, neumonía severa.

Varios reportes indican que la cepa A (H5N1) se replica en el tracto respiratorio bajo y que la carga viral se correlaciona con el desenlace de la infección.

Virus de Influenza A (H1N1)

El 23 de abril de 2009 se reportó la presencia de un nuevo virus de influenza, descrito como de origen porcino en la mayoría de las muestras enviadas a Winnipeg, Canadá, y Atlanta, EU.

Dicho informe dio explicación a la ocurrencia de casos de neumonías graves en adultos y jóvenes que se reportaban en varios estados del país. Una epidemia por un nuevo virus de influenza no estaba dentro de las expectativas y nunca se había considerado en México. Al final de abril del mismo año, la diseminación y capacidad de contagio persona-persona del nuevo virus llevó a la OMS a declarar un nivel cinco en la alerta de pandemia (contagio persona-persona en al menos dos países y signos de una inminente pandemia). México estableció una campaña para educar a la población en las medidas sanitarias y de prevención. Finalmente, el 10 de agosto de 2010 se declaró el fin de la pandemia 2009/2010 de la cual se contabilizaron 18 mil 449 muertes hasta el 1 de agosto de 2010. Sin embargo, datos posteriores, los cuales consideraron fallecimientos por causas indirectas del virus, arrojaron una cifra 10 veces mayor.

El causante de dicha pandemia fue un virus de influenza A del subtipo H1N1. Para determinar su origen se efectuó la secuenciación de cada uno de los fragmentos ge-

nómicos y posteriormente el análisis comparativo con las secuencias anteriormente reportadas. De esta manera se producen una serie de árboles filogenéticos de cada uno de los fragmentos. A este tipo de virus se les conoce de manera general como virus rearreglantes, refiriéndose a ellos como dobles o triples, si su material genético derivó de dos o tres diferentes virus de influenza.

De los análisis anteriores se concluyó que el genoma de este nuevo virus proviene de una variante de virus de influenza "similar al de las aves" que afecta cerdos eurasiáticos, que a su vez proviene de una triple rearreglante aislada e identificada en la década de 1990 en el norte de EU. Esta última derivó de un virus clásico de cerdos y de uno humano tipo H3N2. Estos trabajos filogenéticos han permitido rastrear los orígenes del virus, no así el tiempo de gestación.

Diagnóstico

El diagnóstico para los casos de influenza no es necesario para iniciar un tratamiento; es utilizado principalmente para confirmar los subtipos de virus de influenza que circulan en la población en una determinada estación y la selección de las cepas para la elaboración de vacunas. También es importante entre los periodos epidémicos anuales, específicamente en la caracterización de los brotes.

Dado que hay mayor concentración del virus intracelularmente, la mejor muestra son las secreciones que contienen células infectadas tomadas de un sitio accesible, como la nasofaringe y orofaringe, durante los primeros tres días del inicio de los síntomas.

TABLA 1.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE INFLUENZA

Método	Tipos de virus que detecta	Ventajas	Desventajas	Tiempo
Cultivo celular (aislamiento)	A y B	Estándar de oro. Sensible y específico. Vital para la vigilancia virológica y la elaboración de vacunas.	Los resultados no están en tiempos clínicamente relevantes. Laborioso. Depende de la calidad de las muestras.	3-14 días
RT-PCR	A,B y C	Altamente sensible y específico. Resultados rápidos y puede detectar otros virus que no se aíslan.	Puede no identificar a las nuevas cepas circulantes o pandémicas.	< 1 día
Inmuno fluorescencia	A y B	Se puede realizar a partir de la muestra clínica. Específico y rápido	Requiere personal especializado. Depende de la calidad de la muestra.	Aprox. 4 horas
Pruebas rápidas	A y/o B	Específico, simple y rápido. Los resultados positivos son útiles para la vigilancia de la influenza estacional	Poca sensibilidad. Los resultados negativos requieren confirmación.	30-60 min.
Serología (HAI,MN, Fijación del complemento)	A,B y C	Puede detectar infecciones negativas al aislamiento. Útil como herramienta de investigación y vigilancia	El diagnóstico es únicamente retrospectivo. Limitada utilidad clínica. Sensibilidad y especificidad variables	2-4 semanas
Microscopía electrónica	A,B y C	Rápida en situaciones de emergencia. Sólo se requiere una muestra del paciente.	Requiere de fuerte inversión en equipo e infraestructura. Necesita personal especializado.	Aprox. 1 hora

Abreviaturas: RT- PCR, reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa; HAI, inhibición de la hemoaglutinación; MN, microneutralización. Tomado de Córdova, J., et al. *La epidemia de influenza A(H1N1) en México*. México: Editorial Médica Panamericana. 2010: 92

CONTROL, TRATAMIENTO Y PERSPECTIVAS

Vacunación

Una de las medidas adoptadas mundialmente para reducir la inci-

dencia de influenza estacional es la aplicación de la vacuna trivalente, que se produce con los virus mutados que mostraron ser predominantes en la temporada del año anterior. Una vacuna es el mejor método de profilaxis ante una in-

fección. Y en el caso particular de éstas, necesitan ser revisadas en periodos de uno a tres años, debido al proceso de deriva antigénica del virus.

Por otro lado, la producción de una vacuna para un nuevo virus

de proporción pandémica, a futuro, puede llegar a tardar entre seis y ocho meses, una vez sucedido el primer brote, debido a las características antigénicas que debe cumplir y al prolongado tiempo de evaluación de su seguridad. Tiempo en que el nuevo virus se distribuiría mundialmente, diezmando los sistemas de salud y la economía mundial.

Antivirales

Como parte de las estrategias de contención ante una posible pandemia, varios países han preparado reservas de antivirales. Éstos son adamantanos (rimantidina y amantadina) e inhibidores de la neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir).

La importancia de los antivirales radica en que si están disponibles en cantidades suficientes, podrían llegar a jugar un mejor papel de respuesta a una pandemia de influenza en ausencia de una vacuna efectiva.

Inhibidores del canal iónico M2

Hay dos inhibidores del canal iónico M2 que están indicados en la clínica para influenza. Amantadina (clorhidrato de 1-adamantanamina) es una estructura tricíclica de 10 carbonos con un grupo amino primario. Se sabe que tiene actividad antiinfluenza A desde 1960; fue aprobada inicialmente para la prevención del virus de influenza A H2N2 en EU durante 1966, posteriormente su uso se extendió para todos los subtipos de influenza una década después.

El segundo inhibidor es rimantadina, se trata de un derivado de la amantadina que incorpora un metilo entre el grupo amino y

la misma estructura tricíclica, ésta fue aprobada en 1993 (Figura 2.1). Los dos compuestos mantienen su actividad antiviral después de almacenamientos prolongados (25 años).

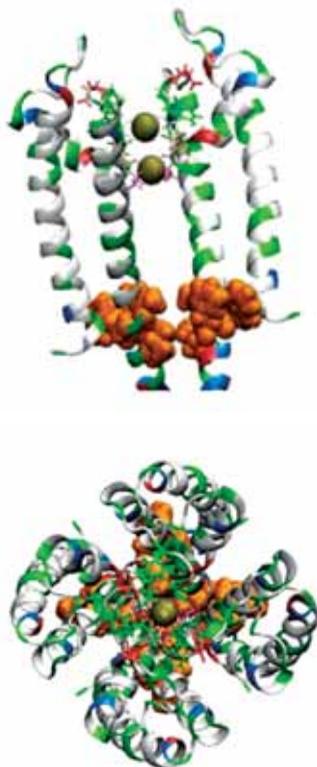


Fig 1. Canal iónico donde los inhibidores M2 pueden actuar para bloquear el paso de los iones.

Ambos antivirales inhiben la replicación *in vitro* de los virus de influenza A en bajas concentraciones.

Uno de los principales problemas al utilizar amantadina son los efectos adversos que presenta en el sistema nervioso central (SNC) y tiene un amplio espectro de toxicidad debido a la acción anticolinérgica que la hace incompatible con varios medicamentos. Rimantadina presenta menores efectos adversos en el SNC y depende de una menor función renal para su eliminación respecto a la amantadina.

El uso de amantadina para el tratamiento ha sido asociado a un

rápido surgimiento de virus resistentes, que parecen ser fácilmente transmisibles y altamente patógenos. Ahora ya es sabido que China facilitó y utilizó amantadina para detener los brotes de influenza aviar y como profilaxis para que las aves de corral no contrajeran el virus. Aun sabiendo que esta actividad estaba prohibida y que estudios anteriores habían confirmado que los virus generaban resistencia en pollos enfermos y tratados con estos inhibidores, las autoridades farmacéuticas y veterinarias de dicho país confirmaron esa información.

Cuando el virus A (H5N1) resurgió en Asia se observó que era resistente a este tipo de fármacos y, por tanto, son inútiles ante una posible pandemia proveniente de esta cepa.

Por otro lado, en todos los aislamientos de la cepa A(H1N1) pandémica de 2009 el virus mostró ser resistente a adamantanos; la mutación S31N en la proteína M2 es la responsable de que la mayoría de los virus de influenza A sean resistentes a los antivirales de este tipo.

Además de los dos inhibidores, se han encontrado otros derivados que también tienen actividad y que deben ser investigados. También se debe evaluar otros compuestos relacionados estructuralmente a la amantadina, como bananin (BAN).

Inhibidores de la neuraminidasa

Con base en los análisis realizados a la estructura cristalina de la NA, se han desarrollado potentes y selectivos inhibidores

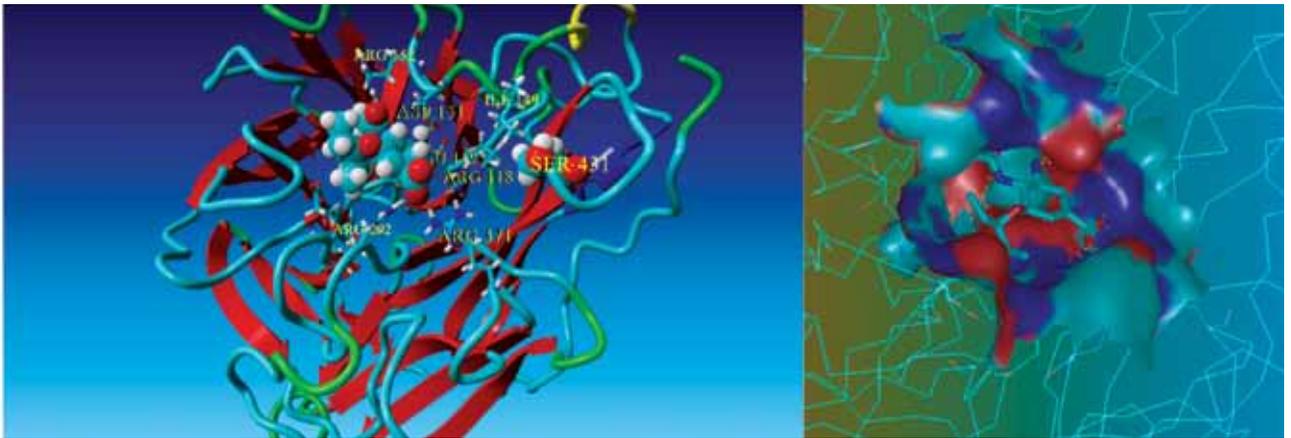


Fig 2. Neuraminidasa mostrando el sitio activo del inhibidor.

Cuando el virus A (H5N1) resurgió en Asia se observó que era resistente a este tipo de fármacos y, por tanto, son inútiles ante una posible pandemia proveniente de esta cepa.

para ésta. Los primeros inhibidores que se diseñaron fueron DANA (ácido 2-desoxi-2,3-didehidro-N-acetilneurámico) y FANA (ácido 2-desoxi-2,3-didehidro-N-trifluoroacetilneurámico) que fueron los pioneros en el desarrollo de esta ruta de acción.

El primer inhibidor clínicamente efectivo y aprobado para el tratamiento de la influenza en 1999 fue el zanamivir; este inhibidor también fue aprobado en 1999, debe administrarse por inhalación (10 mg dos veces al día), mientras el oseltamivir se puede administrar vía oral (75 o 150mg dos veces al día). Al parecer, este tipo de antivirales presentan menos problemas en cuanto a resistencia respecto a los inhibidores de M2 y su espectro antiviral incluye a los virus de influenza tipo B.

Resistencia de inhibidores de la NA

La resistencia hacia los inhibidores de la neuraminidasa surge debido a las mutaciones puntuales con la correspondiente sustitución de

aminoácidos en las proteínas HA y NA. El análisis de los virus mutantes aislados en cultivo celular reveló dos mecanismos de resistencia:

A) disminución de la HA por su receptor; las mutaciones que involucran a la proteína HA reducen la fuerza de unión con el ácido siálico y de esta manera se ve reducida también la dependencia de la actividad de la NA.

B) disminución de la unión entre la NA y su inhibidor.

Durante los últimos años se ha estado vigilando de cerca la resistencia a oseltamivir en todo el mundo. Dicha resistencia se evalúa mediante la detección de la mutación H274Y por técnicas de biología molecular (amplificación genética y/o pirosecuenciación). En EU se reportó que durante la temporada 2007-2008 hubo un incremento en el número de aislamientos de virus de influenza A(H1N1) resistentes a oseltamivir, mientras en Europa era 14% del total.