



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA



**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

**Efecto de la Obesidad y Severidad
de la Infección por Influenza A H1N1 2009
sobre la Respuesta de Citocinas**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

Dulce María Arreguín Porras

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Juan Carlos López Alvarenga

Dra. María Esther Ocharán Hernández

Diciembre 2011



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
 ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 9 del mes de diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

“Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas”

Presentada por la alumna:

Arreguín

Apellido paterno

Porras

Apellido materno

Dulce María

Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	7	7	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

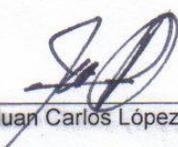
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

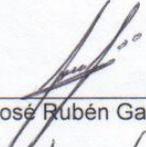
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

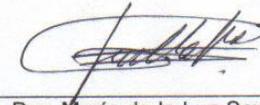
LA COMISIÓN REVISORA

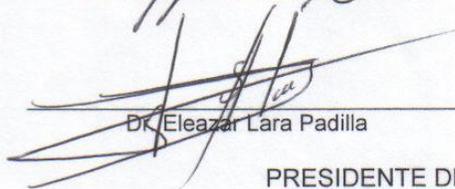
Directores de tesis


 Dr. Maria Esther Ocharán Hernández

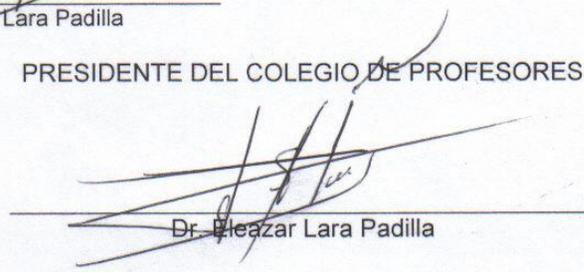

 Dr. Juan Carlos López Alvarenga


 Dr. José Rubén García Sánchez


 Dra. María de la Luz Sevilla González


 Dr. Eleazar Lara Padilla

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


 Dr. Eleazar Lara Padilla



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 21 del mes Diciembre del año 2011, la que suscribe Arreguín Porras Dulce María alumna del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD con número de registro A100770, adscrita a la ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. María Esther Ocharán Hernández, Dr. Juan Carlos López Alvarenga y cede los derechos del trabajo intitulado “Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas” al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección dmarreguinp@yahoo.com.mx . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Arreguín Porras Dulce María
Nombre y firma



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



Este trabajo se realizó en el Servicio de Infectología en el Hospital General de México, OD y en la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional bajo la Dirección del Dr. Juan Carlos López Alvarenga y la Dra. María Esther Ocharán Hernández. Deriva del proyecto sometido a la Dirección de Investigación del Hospital General de México O.D. el 27 de noviembre del 2009, y aprobado con número de registro DI/010/301/05/011 el 17 de febrero de 2010.



“Buscad leyendo y hallaréis meditando”

San Juan de la Cruz (1542-1591)

“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota”

Santa Teresa de Calcuta (1910-1997)

“Sin claridad no hay voz de sabiduría”

Sor Juana Inés de la Cruz (1651-1696)

“La peor prisión es un corazón cerrado”

Beato Juan Pablo II (1920-2005)

“Lee y conducirás, no leas y serás conducido”

Santa Teresa de Jesús (1515-1582)

“Todo el que cree, piensa. Porque la fe, si lo que cree no se piensa, es nula”

San Agustín de Hipona (354-430)

“En realidad, todas las cosas, todos los acontecimientos, para quien sabe leerlos con profundidad, encierran un mensaje que, en definitiva, remite a Dios”

Juan Pablo II (1920-2005)

“Si no se vive para los demás, la vida carece de sentido”

Santa Teresa de Calcuta (1910-1997)



AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios por esta oportunidad de avanzar en la ciencia, ya que a mayor conocimiento, mayor criterio para la interpretación de los diferentes estudios de investigación y para la toma de decisiones diarias para el diagnóstico certero y tratamiento eficaz de los pacientes.

Agradezco a mi familia su ejemplo de constancia en el crecimiento intelectual y espiritual, así como su apoyo incondicional a pesar de cualquier circunstancia por más difícil que sea, y en especial les agradezco a mis hijos José Francisco y Dulce Cristal su paciencia y comprensión para que yo pudiera lograr esta meta en mi vida personal y profesional.

Agradezco a mis tutores, a la Dra. María Esther Ocharán Hernández y al Dr. Juan Carlos López Alvarenga por su gran apoyo, dedicación, enseñanza, y disposición para compartir sus conocimientos siempre con sencillez y sabiduría.

Agradezco a mis sinodales, a la Dra. María de la Luz Sevilla González, al Dr. Eleazar Lara Padilla y al Dr. José Rubén García Sánchez por su enseñanza, recomendaciones, su tiempo y disposición, siempre con gran generosidad.

Agradezco a la Dirección de Investigación del Hospital General de México y a todos y cada uno de sus integrantes por todo el apoyo y colaboración estrecha en cada etapa de este estudio.

Agradezco al Servicio de Infectología en especial al Dr. César Rivera por haber permitido realizar este estudio con los pacientes atendidos en dicho servicio, y haberme autorizado estar al pendiente de cada caso probable de influenza para su evaluación clínica y diagnóstica en consulta externa y hospitalización.



Agradezco a la Unidad de Epidemiología en especial a la Dra. Graciela Solache, que trabajó en conjunto con el Servicio de Infectología, Neumología y Urgencias para poder identificar casos probables y referirlos a Infectología para su diagnóstico y manejo integral.

Agradezco a la Unidad de Genómica por el apoyo diagnóstico de RT-PCR para el virus de Influenza A H1N1 2009.

Agradezco al laboratorio central en particular a la Química Neyla Baltasar, por ayudar al procesamiento bioquímico de las muestras.

Agradezco al equipo del Dr. David Kershenovich en la Unidad de Medicina Experimental de la UNAM, por su apoyo en Inmunología y para la determinación de las citocinas en especial al Dr. Joselín Hernández por su dedicación y enseñanza.

Agradezco a todos nuestros pacientes por su cooperación, ya que a pesar de su estado de salud, estable o crítico, ponen su confianza y su vida en nosotros como médicos.

Y en especial agradezco a la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional por darnos la oportunidad de realizar la Maestría en Ciencias de la Salud en las instalaciones del hospital donde laboramos, ya que gracias a su apoyo, hemos recibido en la enseñanza de nuestros maestros una gran riqueza y hemos completado los estudios de Investigación sin dejar de laborar como médicos clínicos en nuestra área de trabajo.



INDICE

Índice	8
Índice de tablas y figuras	10
Abreviaturas	13
Glosario	14
Resumen	16
Abstract	18
1. Introducción	20
2. Antecedentes	22
3. Justificación	34
4. Hipótesis	35
5. Objetivos	36
5.1. Objetivo General	36
5.2. Objetivos Específicos	36
6. Material y Métodos	37
Diseño de Estudio	37
Características de la muestra	37
Descripción de los procedimientos	38
Criterios de selección de muestra	39
Tamaño de la muestra	41
Variables	42
Análisis Estadístico	44
Flujograma	46
Método de evaluación clínica de influenza	47
Métodos de laboratorio	48
7. Resultados	53
8. Discusión	108
9. Conclusiones	114
10. Anexos	116



Anexo No. 1. Carta de consentimiento informado	116
Anexo No. 2. Hoja de recolección de datos.....	118
Anexo No. 3. Proceso de extracción de RNA de virus de Influenza	122
Anexo No. 4. Protocolo de detección de virus Influenza A RT-PCR	123
Anexo No. 5. Protocolo de detección de virus Influenza A H1N1 RT-PCR	124
Anexo No. 6. Secuencia genética del virus de Influenza.....	125
Anexo No. 7. Guía de ensayo Bio-plex para citocinas.....	126
Anexo No. 8 Prueba <i>t</i> de Student clínica casos y controles	128
Anexo No. 9. ANOVA, datos clínicos, gravedad de influenza	129
Anexo No. 10. Prueba <i>t</i> de Student. Bioquímicas. Casos y controles	130
Anexo No. 11. ANOVA, parámetros bioquímicos	131
Anexo No. 12. Estadísticos de citocinas de acuerdo a obesidad.....	133
Anexo No 13. ANOVA, citocinas-gravedad de influenza	135
Anexo No. 14. Matriz de correlaciones anti-imagen citocinas	138
Anexo No. 15. Matriz de componentes citocinas.....	140
Anexo No. 16 ANOVA, descriptivos de factores 1, 2, 3 y 4.....	141
Anexo No. 17 ANOVA, factor 1, 2, 3 y 4 con gravedad de influenza.....	142
Anexo No. 18. ANCOVA, factor 1 citocinas + IMC + gravedad influenza ..	143
Anexo No. 19. ANCOVA, factor 2 citocinas + IMC + gravedad influenza ..	144
Anexo No. 20. ANCOVA, factor 4 citocinas + IMC + gravedad influenza ..	145
11. Bibliografía	146



INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Producción y función de citocinas	26
Tabla 2. Clasificación clínica de influenza	47
Tabla 3. Frecuencia de acuerdo a gravedad de influenza	53
Tabla 4. Antecedente de vacunación en pacientes con influenza	54
Tabla 5. Co-morbilidad en las pacientes con influenza.....	55
Tabla 6. Frecuencia de sobrepeso y obesidad	55
Tabla 7. Frecuencia de obesidad.....	56
Tabla 8. Cuadro clínico de influenza	57
Tabla 9. Prueba <i>t</i> de Student. Datos clínicos.....	58
Tabla 10. Tamaño del efecto de IMC y gravedad de influenza	58
Tabla 11. ANOVA Datos clínicos	59
Tabla 12. Prueba <i>t</i> de Student. Parámetros bioquímicos	64
Tabla 13. ANOVA. Parámetros bioquímicos.....	65
Tabla 14. Tabla de contingencia de obesidad-gravedad de influenza.....	71
Tabla 15. Tabla de contingencia de obesidad-gravedad de influenza.....	72
Tabla 16. Tabla de contingencia de obesidad-gravedad de influenza.....	72
Tabla 17. Frecuencia 3 grupos de gravedad de influenza	73
Tabla 18. Magnitud del efecto de obesidad en citocinas	75
Tabla 19. Concentración de suero de citocinas – gravedad de influenza.....	77
Tabla 20. Comunalidades de citocinas	95
Tabla 21. Eigenvalores	96
Tabla 22. Matriz de componentes rotados con Varimax.....	98
Tabla 22. Distribución de citocinas de acuerdo a cada factor.....	99
Tabla 24. Contrastes ortogonales de cada factor – gravedad influenza.....	100
Tabla 24. Coeficientes de contrastes ortogonales	100
Figura 1. Citocinas activadas por linfocitos T Th1, Th2, Th17 y Th reg	25
Figura 2. Expresión de citocinas de acuerdo a gravedad de influenza.....	30



Figura 3. Esquema de las etapas del análisis.....	38
Figura 4. Tamaño de la muestra	41
Figura 5. Flujo-grama del protocolo	46
Figura 6. Curva de RT-PCR	48
Figura 7. Kit M50-0KCAFOY de Bio-Plex.....	50
Figura 8. Placa de plástico con 1x96 pozos.....	50
Figura 9. Equipo Bio-Plex	51
Figura 10. Fundamento de anticuerpos biomarcados con microesferas	52
Figura 11. ANOVA Peso y gravedad de influenza	60
Figura 12. ANOVA. IMC y gravedad de influenza.....	61
Figura 13. ANOVA. Perímetro abdominal y gravedad de influenza	62
Figura 14. ANOVA. Frecuencia respiratoria y gravedad de influenza.....	63
Figura 15. ANOVA. Glucosa y gravedad de influenza	66
Figura 16. ANOVA. TGP y gravedad de influenza	67
Figura 17. ANOVA. TGO y gravedad de influenza.....	68
Figura 18. ANOVA. DHL y gravedad de influenza	69
Figura 19. ANOVA. CPK y gravedad de influenza	70
Figura 20. Prueba t de Student. IL-2 y obesidad.. ..	74
Figura 21. ANOVA. IL-1 β y gravedad de influenza	78
Figura 22. ANOVA. IL-2 y gravedad de influenza	79
Figura 23. ANOVA. IL-4 y gravedad de influenza	80
Figura 24. ANOVA. IL-6 y gravedad de influenza	81
Figura 25. ANOVA. IL-7 y gravedad de influenza	82
Figura 26. ANOVA. IL-8 y gravedad de influenza	83
Figura 27. ANOVA. IL-9 y gravedad de influenza	84
Figura 28. ANOVA. IL-13 y gravedad de influenza	85
Figura 29. ANOVA. Eotaxina y gravedad de influenza	86
Figura 30. ANOVA. FGF- basic y gravedad de influenza.....	87
Figura 31. ANOVA. G-CSF y gravedad de influenza	88



Figura 32. ANOVA. IFN γ y gravedad de influenza.....	89
Figura 33. ANOVA. IP-10 y gravedad de influenza.....	90
Figura 34. ANOVA. MCP-1 y gravedad de influenza	91
Figura 35. ANOVA. TNF α y gravedad de influenza	92
Figura 36. ANOVA. VEGF y gravedad de influenza.....	93
Figura 37. Gráfico de sedimentación de componentes.....	97
Figura 38. Contraste ortogonales Factor 1	101
Figura 49. Contraste ortogonales Factor 2	102
Figura 40. Contraste ortogonales Factor 4	103
Figura 41. ANCOVA. Factor 1 + IMC + gravedad influenza.....	105
Figura 42. ANCOVA. Factor 2 + IMC + gravedad influenza.....	106
Figura 43. ANCOVA. Factor 4 + IMC + gravedad influenza.....	107



ABREVIATURAS

CDC. Centers for Disease Control and Prevention (Centro para la prevención y control de enfermedades, Atlanta, Estados Unidos)

CPK. Creatinfosfoquinasa

DHL. Deshidrogenasa láctica

DMS. Diferencia Mínima Significativa (prueba post hoc de ANOVA)

TNF α . Factor de necrosis tumoral alfa

FC. Frecuencia cardiaca

FGF Basic. Factor de crecimiento fibroblástico básico

FR. Frecuencia respiratoria

G-SCF. Factor estimulador de colonias de granulocitos

GM-CSF. Factor estimulador de colonias de monocitos/ granulocitos

IFN γ . Interferon gamma

H1N1. Hemaglutinina 1, neuraminidasa 1.

IL. Interleucina

IMC. Índice de masa corporal

IP-10. Inductor de proteína 10

KMO. Prueba de Kaiser-Meyer-Oklin en análisis de factores latentes

MCP-1. Proteína quimiotáctica de los macrófagos

MIP-1. Proteína inhibitoria de migración de macrófagos.

NIC. National influenza centres (Centros nacionales de influenza)

OMS. Organización Mundial de la Salud

Pg/ml. Picogramos por mililitro

PA. Perímetro abdominal

RT-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

TGO. Enzima transaminasa glutámico oxaloacética

TGP. Enzima transaminasa pirúvica

UCI. Unidad de cuidados intensivos

VEGF. Factor de crecimiento endotelial vascular



GLOSARIO

Citocina: Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular esenciales para comunicación intercelular, son producidas por varios tipos celulares, principalmente por el Sistema Inmune. Estos mediadores solubles controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como: diferenciación y maduración celular, inflamación, respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos. Cada citocina se une a un receptor de superficie celular específico generando cascadas de señalización celular que alteran la función celular. Pueden ser autocrinas, paracrinas, endocrinas.

H1N1. Subtipo del virus de Influenza con el glucopéptido de hemaglutinina tipo 1, y glucopéptido neuraminidasa tipo 1.

Oponización: La opsonización por anticuerpos es el proceso por el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito. La opsonización implica la unión de una opsonina, en especial, un anticuerpo a un receptor en la membrana celular del patógeno. Tras la unión de la opsonina a la membrana, los fagocitos son atraídos hacia el patógeno. La porción Fab del anticuerpo se une al antígeno, en tanto que la porción Fc del anticuerpo se une al receptor Fc del fagocito, facilitando la fagocitosis. El complejo receptor-opsonina también puede crear otros productos como las proteínas del sistema del complemento C3b y C4b. Estos componentes se depositan en la superficie celular del patógeno y contribuyen a su destrucción. También se puede destruir la célula por un proceso denominado citotoxicidad dependiente de anticuerpo en el cual el patógeno no necesita ser fagocitado para su destrucción. Durante este proceso, el patógeno es opsonizado al unírsele un anticuerpo IgG. El anticuerpo desencadena la liberación de productos de lisis de células como monocitos, neutrófilos, eosinófilos y células asesinas naturales. Este proceso



puede provocar la inflamación de los tejidos circundantes y dañar las células sanas.

Quimiocinas: familia grande de moléculas quimiotrayentes con una función fundamental en la migración de leucocitos.

RT-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Incluye un panel de cebadores (primers) de oligonucleótidos y doble sonda de hidrólisis (Taqman) para ser utilizado en tiempo real RT-PCR para la detección in vitro cualitativa y caracterización de los virus Influenza A H1N1 2009 en las muestras respiratorias y cultivos virales. InfA está diseñado para la detección universal del virus Influenza A. El cebador (primer) y la sonda swInfA (swine influenza A viruses) están diseñado específicamente para detectar el virus Influenza A H1N1 2009. El cebador (primer) y la sonda swH1 están diseñado para detectar específicamente influenza H1. Este ensayo se utiliza para muestras respiratorias positivas a la prueba de influenza A tomadas de los pacientes sospechosos infectados por influenza A H1N1.



RESUMEN

Introducción: Además de virulencia propia del subtipo A(H1N1)2009 del virus Influenza, hay factores del huésped no comprendidos todavía, que intervienen favoreciendo mayor morbi-mortalidad. El **objetivo** de este estudio fue determinar la expresión de citocinas asociada a respuesta inflamatoria aguda por virus Influenza A(H1N1)2009 y su relación con grado de obesidad y gravedad de influenza. **Material y métodos:** Estudio casos-controles para el análisis clínico en Hospital General de México de enero 2010 a septiembre 2011. Los casos fueron pacientes con Influenza A(H1N1) grave, los controles con influenza moderada. Para análisis de citocinas se agregó un tercer grupo sin influenza (pareados en sexo, edad e IMC). Identificación viral por RT-PCR en exudado faríngeo. Se realizó historia clínica, biometría y química sanguíneas; por sistema Bio-plex se determinó la concentración sérica de 27 citocinas. Se compararon grupos con *t* de Student y ANOVA, OR para riesgo de obesidad en gravedad de influenza. Análisis de factores latentes para determinar factores de citocinas. Un modelo de ANCOVA tipo I para determinar interacción de citocinas con gravedad de influenza e IMC. **Resultados:** 45 pacientes con influenza: 18 moderados y 27 graves (15 críticos, 12 no críticos); 41 sujetos sin influenza. Los pacientes graves presentaron mayor IMC (26.7 ± 1.01 vs 31.4 ± 1.5 , $p = 0.022$), mayor perímetro abdominal (92.3 ± 3.6 , vs 106.8 ± 3.1 cm, $p = 0.005$), mayor peso, frecuencia cardíaca, respiratoria, concentración sérica de glucosa, TGO, DHL y CPK ($p < 0.05$). Los obesos tuvieron mayor riesgo de ser paciente crítico con influenza respecto a no obesos (OR 3.06, IC 95% 0.68, 13.78). Citocinas con diferencia significativa de acuerdo a gravedad de influenza ($p < 0.05$): IFN γ , TNF α , IL-2 (actividad Th1); IL-4, IL-6, IL-9, IL-13 (actividad Th2); IL-6, GM-CSF, TNF α (actividad Th17), IL-8, MCP-1, G-SCF, IL-1 β (actividad de monocitos y macrófagos), IL-7, FGF-b y VEGF. Con análisis de factores latentes se determinaron 4 perfiles de citocinas en base a gravedad de influenza e IMC. El modelo de ANCOVA mostró diferencia significativa en



factores 1, 2 y 4 ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES. La obesidad es riesgo para mayor gravedad de influenza, con alteraciones metabólicas, hepáticas y en músculo (glucosa, TGO, CPK, DHL). La gravedad de influenza conlleva la participación del sistema inmune innato y adquirido, con acción inflamatoria y disminución de la anti-inflamatoria.

Palabras Clave: Influenza A H1N1 2009, obesidad, citocinas



ABSTRACT:

Introduction: In addition to virulence characteristic of subtype A (H1N1) 2009 Influenza virus, host factors are not included yet involved favoring increased morbidity and mortality. The aim of this study was to determine the expression of cytokines associated with acute inflammatory response influenza A (H1N1) 2009 and its relationship to degree of obesity and severity of influenza. **Material and methods:** A case-control study for clinical analysis in Mexico City General Hospital in January 2010 to September 2011. Cases were patients with influenza A (H1N1) disease, controls with moderate influenza. For analysis of cytokines was added a third group without influenza (matched for sex, age and BMI). Viral identification by RT-PCR in throat swabs. Patient's medical records, biometrics and blood chemistry, for Bio-plex system determined the serum concentration of 27 cytokines. Groups were compared using Student's t test and ANOVA, OR for risk of obesity in severity of influenza. Latent factor analysis to determine factors of cytokines. ANCOVA model to determine cytokine interaction with severity of influenza and BMI. **Results:** 45 patients with influenza, 18 moderate and 27 severe (15 critical, 12 noncritical), 41 patients without influenza. Severe cases had higher BMI (26.7 ± 1.1 vs 31.4 ± 1.5 , $p = 0.022$), increased waist circumference (92.3 ± 3.6 , 106.8 ± 3.1 cm vs $p = 0.005$), greater weight, heart rate, breathing, serum glucose, AST, DHL and CPK ($p < 0.05$). The obese were more likely to be critically ill with influenza on non-obese (OR 3.06, 95% CI 0.68, 13.78). Cytokines with a significant difference according to severity of influenza: IFN γ , TNF, IL-2 (Th1 activity), IL-4, IL-6, IL-9, IL-13 (Th2 activity), IL-6, GM-CSF, TNF α (Th17 activity), IL-8, MCP-1, G-CSF, IL-1 β (activity of monocytes and macrophages), IL-7, FGF-b and VEGF ($p < 0.05$). With latent factor analysis identified 4 cytokine profiles based on severity of influenza and BMI. The ANCOVA model showed significant differences in factors 1, 2 and 4 ($p < 0.05$).



CONCLUSIONS. Obesity is a risk for more severe influenza, metabolic disorders, liver and muscle (glucose, AST, CPK, LDH). The severity of influenza involves the participation of innate and acquired immune system with inflammatory action and reduction of anti-inflammatory.

Keywords: Influenza A H1N1 2009, obesity, cytokines.



1.- INTRODUCCION

El virus de Influenza A H1N1 2009 pandémica es una cepa que ha tenido modificaciones genéticas que repercuten en cuadros de viremia y cuadro clínico con mayor morbi-mortalidad con respecto al virus de Influenza A H1N1 estacional (1).

El 37% de los pacientes afectados tienen antecedentes de problemas metabólicos, entre ellos la obesidad. Se ha reportado la asociación de obesidad mórbida y defunción en pacientes con influenza (2). Aunque hay estudios de la participación de la inflamación aguda por el virus de Influenza H1N1, aún falta por estudiar la participación de la inflamación crónica de los obesos en estos pacientes con influenza H1N1 para incrementar la respuesta inflamatoria aguda y aumentar la expresión de citocinas pro-inflamatorias con mayor severidad clínica (3).

Este es un estudio de casos-controles, tradicionalmente para este tipo de análisis se describe dos grupos, en la presente investigación consideramos tres factores (grupos) que se analizaron en dos diferentes etapas. En la primera etapa del análisis clínico, los casos correspondieron a pacientes con Influenza grave (pacientes hospitalizados estratificados en críticos por requerir Unidad de Cuidados Intensivos y en no críticos) y los controles a pacientes con Influenza leve y moderada (ambulatorios). En la segunda etapa del análisis de citocinas, se analizaron tres factores que para fines de esta tesis se usará indistintamente como grupos:

Grupo 1: Pacientes con Influenza grave (que correspondieron a los mismos casos de la etapa 1). Grupo 2: Pacientes con Influenza moderada (que correspondieron a los mismos controles de la etapa 1)



Grupo 3: Sujetos sin Influenza, pareados por sexo, edad e índice de masa corporal (IMC) con los pacientes de Influenza (ver figura 3 en la sección de material y métodos).

Al comparar pacientes con Influenza grave vs leve-moderada, se esperó que a mayor Índice de masa corporal (IMC) se mostraría mayor interacción multiplicativa de la expresión de citocinas pro-inflamatorias (como por ejemplo, IFN γ , TNF α , IL-15, IL-12p70 por inducción de linfocitos Th1; IL-6, IL-8, IL-9, IL-17, TNF α , GM-SCF por inducción de linfocitos Th17; IL 4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 por inducción de linfocitos Th2), para correlacionar la respuesta inflamatoria, la obesidad y la gravedad de Influenza

Este estudio se realizó con los pacientes con diagnóstico de Influenza A H1N1 2009 atendidos en el Hospital General de México, O.D. de enero de 2010 a septiembre de 2011.



2.- ANTECEDENTES

A finales de abril la Organización Mundial de la salud (OMS) anunció la aparición de un nuevo virus de influenza en México y Estados Unidos.(2) Esta cepa particular influenza A (H1N1) 2009, no había circulado previamente en humanos, el virus era totalmente nuevo, contagioso, con la capacidad de propagarse de persona a persona y de un país a otro, por lo que causó la primera pandemia de Influenza desde 1968.(3) El virus se propagó a 74 países en junio, a tan solo 6 semanas después de la detección de los primeros dos casos en México.(4) Como resultado de esta extensión, la OMS declaró la pandemia de gripe como la fase 6 en junio de 2009, con cerca de 30,000 casos confirmados. (5) Posteriormente la OMS declaró el 10 de agosto de 2010 que el mundo entró en el período post-pandémico, con 637,613 casos confirmados y 18,138 defunciones reportados en la OMS hasta la fecha.(6)

En México se han reportaron 72,548 casos confirmados y 1,316 defunciones hasta la fecha.(7) Con base en la experiencia de las anteriores pandemias, se esperaba que la influenza pandémica A (H1N1) 2009 tuviera comportamiento de Influenza estacional y siguiera circulando. (4, 8)

Sin embargo, se han presentado brotes o epidemias localizadas que incluyen enfermedad grave en grupos jóvenes durante este período post-pandémico inmediato. A más de año y medio del inicio de esta pandemia aún circula este suptipo viral en varias partes del mundo, causando principalmente enfermedad leve o moderada por la inmunidad establecida en la población.(9)

El virus de la Influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. (10) El comportamiento patogénico es diferente entre los diferentes serotipos estacionales y el nuevo serotipo A H1N1 2009 pandémico. (11) Los serotipos encontrados en 176,815 especímenes provenientes de 80 países estudiados por los centros nacionales de influenza (NIC) desde el 19 de abril hasta el 24 de octubre del 2009 fueron: H1N1 pandémico fueron 112,425 (63.6%); A (H1)



estacional 6,963 (3.9%); A (H3) fueron 20,392 (11.5%); influenza A con subtipo no definido 32,194 (18.2%) e influenza B 4,841(2.7%).(12)

Los grupos de edad más afectados fueron de 5 a 14 y 25 a 44 años, pero esto se atribuyó a la acumulación de susceptibles en esos grupos, ya que no se vacunaron por tratarse de grupos no considerados como prioritarios para la vacunación contra la influenza.(13)

El nuevo virus A (H1N1) produce mayor mortalidad en personas jóvenes, al contrario de lo que sucede con la influenza estacional que muestra un mayor impacto en niños pequeños y personas de edad avanzada. El retraso de la atención médica y la morbilidad asociada fueron factores relevantes del fallecimiento.(13)

Los pacientes con Influenza se clasifican en leve y moderada, cuando no hay compromiso respiratorio o enfermedad crónica descompensada.(14) En la Influenza severa hay compromiso respiratorio que requiere hospitalización para apoyo respiratorio. (8) Las complicaciones más severas son neumonía primaria viral, neumonía bacteriana sobreagregada, sepsis grave y fallo multiorgánico. (15)

El diagnóstico se realiza por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), protocolo establecido por la CDC y la OMS desde el 28 abril del 2009. Incluye un panel de cebadores (primers) de oligonucleótidos y doble sonda de hidrólisis (Taqman) para ser utilizado en tiempo real RT-PCR para la detección in vitro cualitativa y caracterización de los virus Influenza A H1N1 2009 en las muestras respiratorias y cultivos virales. (16) Esta técnica es la establecida e indicada hasta la fecha por la OMS y la CDC. Con una sensibilidad del 51% y especificidad del 99%.(17) Aunque hay un nuevo método para la detección del virus de la influenza pandémica es el análisis de alta resolución de fusión del gen de la neuraminidasa sin necesidad de sondas específicas. (18)



Está descrita la respuesta inmune innata inducida por la infección viral; ésta depende de las citocinas y quimiocinas que se producen en reconocimiento del virus. Las citocinas y quimiocinas derivadas de macrófago promueven la respuesta fagocítica por medio del reclutamiento y producción de fagocitos frescos y la producción de moléculas opsonizantes adicionales por medio de las reacciones de fase aguda.(19) Los interferones son citocinas inducidas por infección vírica. Una clase de células linfoides conocidas como linfocitos citolíticos (NK) son activados por interferones para contribuir a la respuesta innata del hospedador contra virus.

Los linfocitos similares a los del sistema inmunitario innato (ILL) que contribuyen a respuestas rápidas a infección al actuar en etapas tempranas utilizan un grupo limitado de segmentos de gen que codifica para receptor de antígeno para sintetizar inmunoglobulinas y receptores de células T.

La respuesta innata inducida puede eliminar con éxito la infección o contenerla mientras se desarrolla una respuesta adaptativa. La inmunidad adaptativa aprovecha muchos de los mismos mecanismos efectores que utiliza el sistema inmune innato, pero la inmunidad adaptativa puede dirigirlos con mayor precisión. De esta manera las células T específicas para antígeno activan las propiedades microbicidas y secretoras de citocinas de macrófagos que albergan a patógenos, los anticuerpos activan complemento, actúan como opsoninas directas para fagocitos y estimulan a los linfocitos citolíticos para que destruyan células infectadas. Además la respuesta inmunitaria adaptativa utiliza citocinas y quimiocinas de forma similar a la de la inmunidad innata para inducir respuesta inflamatoria que promueve el flujo del anticuerpo y linfocitos efectores hacia sitios de infección.

Las Células T CD4+ juegan un papel fundamental en la mediación de la inmunidad adaptativa a una variedad de patógenos. (20) Durante la activación

del TCR en un entorno de citocinas en particular, la célula T CD4+ ingenua puede diferenciarse en uno de varios linajes de las células T helper (Th).(21) Diferentes tipos de células T efectoras han sido documentadas con distintas funciones biológicas: Th1, Th2, Th17, Tfh y Th9 se han implicado en la respuesta inflamatoria; mientras que las células T reguladoras (Treg) incluyendo las Treg naturales (nTreg), las Treg inducidas (iTreg) y las Treg clase 1 (Tr1) participan en la supresión inmune. (22-24) En la figura 1 se observan las citocinas activadas por cada una de las células Th.

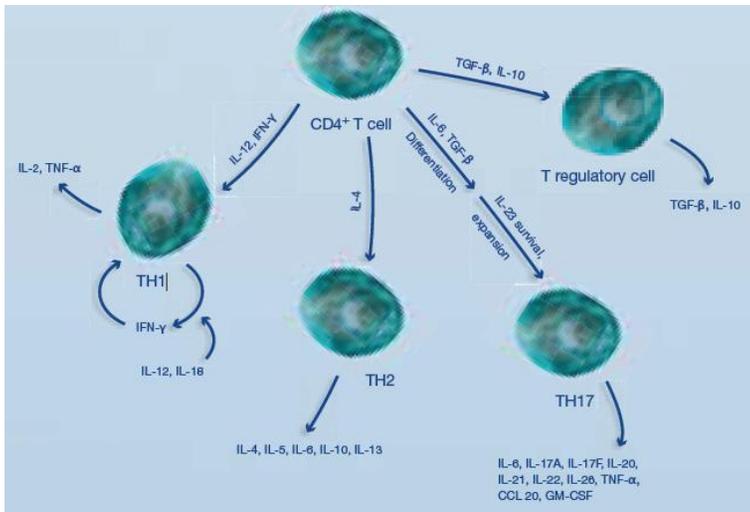


Figura 1. Citocinas activadas por linfocitos T CD4+ TH1, Th2, Th17 y T reguladores.

<http://www.abacus-als.com/LinkClick.aspx>

Las citocinas se caracterizan por su redundancia: muchas citocinas distintas comparten funciones similares. Además, las citocinas son pleiotrópicas: actúan sobre muchos tipos celulares diferentes y una célula puede expresar receptores para más de una citocina. (25) En la tabla 1 se mencionan las funciones de las citocinas que analizamos en este estudio.

Tabla 1. Producción y función de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

CITOCINA	CÉLULA QUE LO PRODUCE	FUNCIÓN	COMENTARIOS
Interleucina 1 β (IL-1 β) (26)	Monocitos, Macrófagos tisulares, células de	Inmunomodulador potente el cual media	Comparte el mismo receptor de superficie que



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



	Lagerhans, Dendríticas, Natural Kille, linfocitos granulares grandes. Endotelio vascular, musculo liso, fibroblastos, epitelio timico, astrocitos, microglia, células de gliom, queratinocitos, y condrocitos.	amplia variedad de respuesta inflamatorias e inmunes, incluyendo la activación de células B y T	IL 1alfa
Interleucina-1ra (IL-1ra)	Monocitos, Macrófagos tisulares, células de Lagerhans, Dendríticas, Natural Kille, linfocitos granulares grandes. Endotelio vascular, musculo liso, fibroblastos, epitelio timico, astrocitos, microglia, células de gliom, queratinocitos, y condrocitos.	Inhibición de interleucina 1	Es estimulada por IL-1B, IL-4 e IL-6 y contrarregulada por glucocorticoides
Interleucina-2 (IL-2) (27)	Linfocito T CD4+ Th1	Potente factor de crecimiento celular linfoide el cual ejerce su actividad biológica en células T al promover la proliferación y maduración	Adicionalmente estimula el crecimiento y diferenciación de células B, NK, célula LK, monocitos y oligodendrocitos
Interleucina-4 (IL-4) (28)	Células T activadas, mastocitos, basofilos	Regula la diferenciación de células T CD4+ naive a Th2 Regula producción por células B IgE e IgG1	Las células Th2 produce IL-4, IL-5e IL-13, que tiende a favorecer la respuesta humoral
Interleucina-5 (IL-5) (29)	Células T	Promotor del crecimiento de progenitores inmaduros hematopoyéticos BFU-E	Estimula la activación y diferenciación de eosinofilos y promueve la generación de linfocitos citotóxicos
Interleucina-6 (IL-6) (24)	Células T y B Monocitos, fibroblastos, hepatocitos, células endoteliales	Potente factor de crecimiento celular linfoide que estimula el crecimiento y supervivencia de ciertas células T y B	Tiene un papel en las reacciones de fase aguda, respuesta inmune y hematopoyesis
Interleucina-7 (IL-7)	Células de estroma	Promueve la proliferación de células pre-B timocitos, células T progenitoras y madura	Induce la formación de células LK y CTLs y puede estimular la actividad tumoricida de monocitos y macrofagos



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



Interleucina-8 (IL-8) (24)	Monocitos, macrófagos, Células T, Neutrófilos y fibroblastos	Promueve la quimotaxis y degranulación de linfocitos	Es un miembro de la subfamilia alfa de quimiocinas CXCL8
Interleucina-9 (IL-9) (24)	Células T	Factor de crecimiento de células T, también puede ampliar la respuesta de mastocitos, e IL-3 o IL-4	IL-9 sinergia con eritropoyetina para promover la formación de colonias eritroides
Interleucina-10 (IL-10)	Linfocito CD4+ Th2 Célula T regulatoria	Inhibición de la síntesis de citoquinas mediada por macrófagos, supresión de la respuesta inmune retardada de hipersensibilidad	Estimula la respuesta de Th2, lo cual resulta en elevada producción de anticuerpos
Interleucina-12p70 (IL-12p70)	Linfocitos B activados, células dendríticas y macrófagos	Potente regulador de la respuesta inmune mediada por células y es clave en el desarrollo de célula Th1	Antagonismo por IL-12
Interleucina-13 (IL-13) (30)	Linfocitos Th2 activados	Supresión de actividad citotóxica de macrófagos	Estimulación por la expresión de IL-1RA y supresión por secreción de citoquinas proinflamatorias
Interleucina-15 (IL-15) (31) (32)	Fagocitos mononucleares	Estimula la activación proliferación y supervivencia de linfocitos T, NK	Rol importante en la patogénesis de artritis reumatoide via la activación de células T e induce la producción de IL-17
Interleucina-17 (IL-17A) (33-34)	Linfocitos subpoblación CD4+ Th17	Induce la producción de IL-6, IL-8, G-CSF y PG2 en epitelio, endotelio y fibroblastos, aumentan la superficie de expresión de ICAM-1 en los fibroblastos, activación de NF-kB y coestimulación de proliferación de célula T	En ratones ocasiona una artritis autoinmune que clínica e inmunológicamente similar a artritis reumatoidea
Factor de crecimiento fibroblástico básico (Basic FGF)	Células de tejido neural, pituitaria, corteza adrenal y placenta	Estimula la proliferación de células endoteliales, mesenquimatosas y neuroectodérmicas	Potente actividad angiogénica in vivo
Eotaxina (CCR3) (35)	Eosinófilos, basófilos, mastocitos, mononucleares, plaquetas, progenitores hematopoyéticos CD34+	Tiene un papel en enfermedades alérgicas como asma bronquial y rinitis alérgica	Coreceptor para VIH 1-2y la unión con la eotaxina ha demostrado ser un inhibidor en la infección por VIH en algunos tipos de células



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF)	Monocitos y macrófagos	Estimulador de las células de la médula ósea especialmente neutrófilos	Aumenta la supervivencia y la actividad inmune de neutrófilos maduros
Factor estimulador de colonias de monocitos/granulocitos (GM-CSF)	Lifocitos T o B activos, mastocitos, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales	Estimulación de colonias progenitoras de macrófagos/granulocitos	Factor de crecimiento para progenitores eritroides, megacariocitos y eosinófilos
Interferon γ (IFN γ)	Células NK Otras células	Actividades anti-virales. Anti-proliferativo Inmunoregulador Actividad proinflamatoria	Puede regular la activación antigénica del CMH I y II por células presentadoras de antígenos
Inductor de proteína 10 (IP-10)	Monocitos, fibroblastos, células endoteliales. Inducido por LPS, IL-1 β , TNF α , INF- γ , IL-12 y virus.	Selectivamente quimio- atrae a linfocitos Th1 activados y monocitos. Inhibe citocinas que estimulan la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas. Angiostático y mitogénico de células de músculo liso	Es una citocina que pertenece a la familia de las quimiocinas CXC
Proteína quimiotáctica de los macrófagos (MCP-1)	Monocitos	Quimiotaxis de monocitos	También regula la adhesión de moléculas de expresión y producción de citoquinas en monocitos
RANTES (36)	Células T, monocitos, macrófagos	Miembro de la familia de quimiocinas CC, es quimiotáctico para monocitos, macrófagos, células T de memoria, y eosinófilos, e induce la liberación de histamina de basófilos.	Agregados de RANTES causan la activación de células T y neutrófilos promoviendo la infección de VIH, mientras que la forma dimerica induce quimiotaxis e inhibición de la infección por VIH.
Factor de necrosis tumoral alfa TNF α (37)	Macrófagos, monocitos, neutrófilos, células T (CD4+) y NK	Citolisis y citoestasis de algunas líneas celulares tumorales <i>in vitro</i> , necrosis hemorrágica de tumores <i>in vivo</i> , aumenta la quimiotaxis	También aumenta la proliferación de fibroblastos



		y fagocitos de neutrófilos	
--	--	----------------------------	--

Aunque en las enfermedades crónicas y en cáncer se puede presentar un estado de disfunción de células T: una célula T exhausta. (38)

La respuesta inmune en los pacientes con el nuevo virus de influenza A (H1N1) no están totalmente caracterizados.

Una de las características importantes en la inmunopatogénesis de la Influenza es la presencia en el huésped de una hipercitonemia (tormenta de citocinas) la cual se caracteriza por una producción y secreción exagerada de un gran número de citocinas pro-inflamatorias, misma que puede también deberse a una alta carga viral como consecuencia de una elevada virulencia. Almansa y col. (39) determinaron que la carga viral en las muestras faríngeas es 300 veces mayor en el grupo de pacientes con el peor condición respiratoria al ingreso en la UCI, ellos encontraron que la carga viral faríngea está directamente relacionada con los niveles plasmáticos de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-12p70, IFN-gamma, los factores quimiotácticos MIP-1 beta, GM-CSF, el mediador angiogénico VEGF e IL-1ra.

Se ha reportado alteración del desarrollo de la inmunidad adaptativa en los casos más graves de la influenza pandémica, lo que lleva a un ciclo incesante de la replicación viral y la liberación de citocinas y quimiocinas innata. (25, 40) La interrupción de este ciclo nocivo puede mejorar el resultado de la enfermedad. La invasión del agente viral o la misma alteración de la regulación autoinmune puede dar lugar a la activación de células T (CD3) y monocitos (11). Estas células inducen mecanismos efectores inmunes, en pacientes con influenza se ha reportado el incremento de mediadores en respuesta a la estimulación por Th-1 como INF- γ , TNF- α , IL-15 e IL-12p70; así como IL-6, IL-8, IL-9, e IL-17 en respuesta a la estimulación por Th-17. (41-42)

Bermejo-Martin y col. (43) reportaron la expresión de diferentes citocinas de

acuerdo a la gravedad de Influenza. (Refiriendo que IL-15, IL-12p70 e IL-6 se incrementan en pacientes con Influenza graves críticos. Mientras que en pacientes graves tanto críticos como no críticos se elevan IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, INF- γ , TNF- α . Y por otra parte en todos los pacientes con Influenza independientemente de su gravedad se elevan IP10, MCP-1, MIP-1 β (12). Sin lograr entender la participación del incremento de estas citocinas de acuerdo a cada grupo de gravedad. Lo que puede observarse en la figura 2.

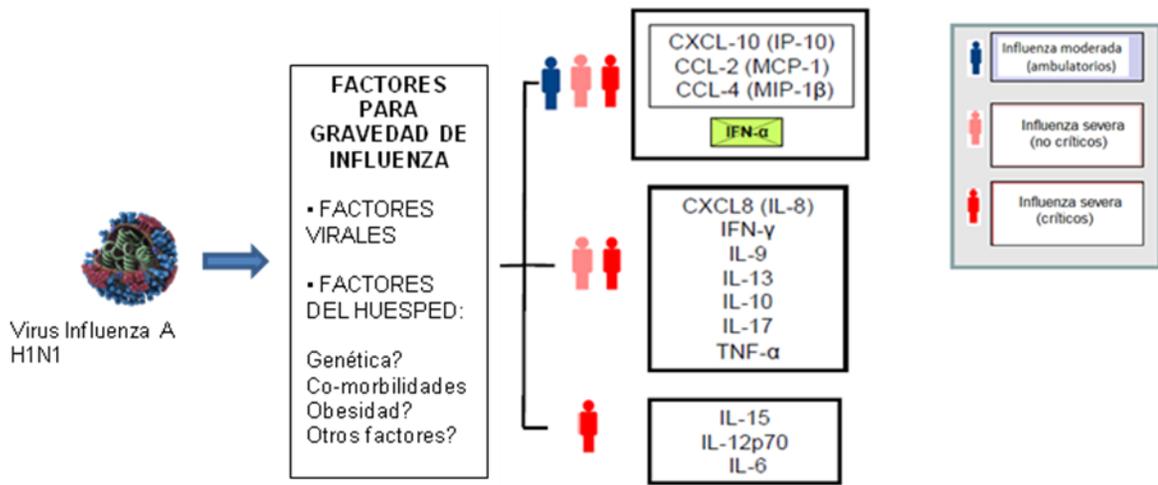


Figura 2. Expresión de citocinas de acuerdo a gravedad de influenza: moderada, severa no crítica y severa crítica. Bermejo-Martin, et.al. 2010.

Bermejo y col. (44) reportaron que la mayoría de los pacientes con influenza presentaron se caracterizó por la presencia de comorbilidades y ausencia de condiciones inmunosupresoras; en los pacientes más graves se deterioró la expresión de un número de genes que participan en la respuesta inmune adaptativa, en comparación con los pacientes menos graves. Estos genes han participado en la presentación de antígenos de células B de desarrollo, T-helper diferenciación celular, CD28, granzima B de señalización, la apoptosis y la ubiquitinación de proteínas.

Lee y col. (45) reportaron la elevación de las citocinas pro-inflamatorias con



predominio de IL-6, la cual prevé la admisión en la unidad de cuidados intensivos (UCI) con OR de 12.6 correlacionándose con fiebre, taquipnea y desaturación.

Por otra parte, el mundo está experimentando una epidemia de obesidad.

La prevalencia en México es de 30%(13)

Los sujetos con obesidad presentan inflamación crónica basal mediada por invasión de macrófagos al tejido adiposo.(46) La presencia de adipocitos de gran tamaño es lo que caracteriza un empeoramiento en las características metabólicas de las personas. La inflamación crónica caracterizada por aumento de la proteína C reactiva se asocia a mayor riesgo cardiovascular.(47-52) y a estrés oxidativo por el adipocito.(53-55)

La obesidad está asociada con alteración de las actividades metabólicas y secretorias de adipocitos y está caracterizada por un estado inflamatorio crónico de bajo grado. (56-57) Estudios iniciales, enfocados a células mieloides (monocitos, macrófagos y células dendríticas) han mostrado la acumulación de estas células en el tejido adiposo en condiciones de obesidad tanto en ratones como en humanos. (56) En obesidad humana los macrófagos del tejido adiposo parecen menos polarizados que en los ratones con capacidades pro-angiogénicas, (21).

Los adipocitos estimulados por señales de origen infeccioso o inflamatorio secretan citocinas pro-inflamatorias: IL-6, IL-10, ACE, TGF β 1, TNF, IL-1 β , PAI-1 y IL-8, IL-15, factores quimiotácticos atrayentes de monocitos y macrófagos como MCP-1, MIP1 y GM-CSF; así como factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento del hepatocito, SAA3, factor inhibitorio de la migración de macrófagos, haptoglobina, factores de complemento B, D C3, prostaglandina E2 y moduladores potentes como leptina, adiponectina y resistina. (58-63) (64) Además de una adipocina antiinflamatoria (IL-10) se han identificado en niveles circulantes, así como la liberación in vitro por la grasa principalmente liberadas por las células grasa del tejido adiposo humano.(58) En contraste, los niveles



circulantes de leptina y-FABP 4 también se han incrementado en la obesidad y son principalmente liberadas por las células grasas del tejido adiposo humano.(63-64)

Además de los adipocitos, el tejido adiposo contiene fibroblastos, pre-adipocitos, macrófagos que residen en este tejido, y constituyentes vasculares. Los macrófagos producen muchas de las moléculas pro-inflamatorias secretadas por el tejido adiposo favoreciendo el desarrollo y el mantenimiento de la inflamación inducida por la obesidad en el tejido adiposo. (60)

La expresión genética de ambas células es igual: los macrófagos expresan la mayoría de los productos genéticos del adipocito,(65) como las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP-aP2), y PPAR γ , mientras que los adipocitos pueden expresar muchas proteínas que podrían considerarse exclusivas de genes pro-inflamatorios de macrófagos, tales como TNF- α , IL-6 y metaloproteinasas de la matriz (MMP).(60) La habilidad funcional de estas dos células coincide y se sobrepone. Los macrófagos pueden atraer, englobar, y almacenar lípidos para convertirse en células espumosas ateroscleróticas.(66)

Los pre-adipocitos bajo ciertas circunstancias pueden presentar propiedades fagocíticas y antimicrobianas,(67) y pueden tener la capacidad de diferenciarse en macrófagos en un medio ambiente propicio. A mayor obesidad mayor acumulación de macrófagos en el tejido adiposo.(60) El aumento de los niveles de calprotectina en la obesidad están relacionados con el contenido de macrófagos relacionados con CD68, MCP1, CD11b y NOX2 como factor quimiotáctico en el reclutamiento de macrófagos a la inflamación. (68) La chemirina, con función inmune actualmente es estudiada como nueva adipocina.(69) así como la IL-17.(33) Estudios recientes sugieren que los efectos inflamatorio podrían estar mediados por la activación de los receptores tipo toll (TLR).(70-71)

Por inmunohistoquímica se ha documentado en el tejido adiposo además de macrófagos, células endoteliales, células del estroma, y células sanguíneas.



Los macrófagos además de la protección contra microorganismos también tienen actividad citotóxica contra células tumorales, regulación de la homeostasis local a través de la producción de factores de crecimiento y citocinas. Se encuentran en tumores, promueven la angiogénesis tumoral, residen en placas ateroscleróticas.(72-75)

El deterioro de la respuesta inmune en el huésped obeso conduce a una mayor susceptibilidad a la infección con un número de distintos patógenos como la tuberculosis adquirida en la comunidad, y la influenza. (76)

Los depósitos de grasa murinos contienen células linfoides del sistema inmune innato (NK células natural killer, NKT y células $T\gamma\delta$) y el sistema inmune adaptativo ($T\alpha\beta$ y células B).(56)

La secreción de quimiocinas por adipocitos puede promover la migración de linfocitos en tejido adiposo. Aunque quimio-atrayentes de células T tales como CCL5 y CXCL12 han sido descritos para ser expresados en tejido adiposo su origen celular así como la modulación de su expresión de acuerdo a la adiposidad no están todavía claros.

Se ha reportado en la literatura la asociación de obesidad mórbida con la defunción de pacientes con influenza (77) así como complicaciones de tipo neumonía bacteriana sobreagregada. (78)

Se ha identificado además la existencia de grupos de alto riesgo, tales como la obesidad y no es de extrañar que la probabilidad de encontrar personas con obesidad que se infecten con influenza sea proporcional a la prevalencia nacional, sin embargo, Dominguez-Cherit, et al. reportaron que el 36% de los pacientes críticos con infección de influenza H1N1 en México fueron obesos. Hagau y col. (79) reportaron incremento significativo de IL-8 en pacientes obesos con influenza A H1N1.

En la actualidad permanece sin aclararse una pregunta fundamental: ¿por qué algunos individuos resisten a la infección o se recuperan rápidamente, mientras que otros experimentan una enfermedad grave e incluso letal?



3. JUSTIFICACION

Existen factores de riesgo no bien estudiados en los pacientes con influenza para evolucionar con mayor gravedad clínica con repercusión respiratoria y metabólica, independientemente de la actividad viral de cada serotipo por sí misma.

Aunque actualmente se están estudiando aspectos inmunológicos en la infección por influenza, especialmente con modelos animales; aún no está bien establecido el papel de las citocinas y la participación de la inflamación como mecanismo fisiopatológico de la gravedad de influenza. Por otra parte no existen estudios contundentes de la obesidad como riesgo de gravedad de influenza.

Ante la ausencia de estudios al respecto los resultados obtenidos en este estudio permitirán entender el papel de la inflamación en la gravedad de influenza, el diseño de futuras estrategias terapéuticas basadas en detección de factores de riesgo y un mejor conocimiento de los mecanismos que derivan en una mayor gravedad de la influenza.



4. HIPOTESIS

Si la obesidad y la severidad clínica de la influenza se asocian con mayor expresión de citocinas pro-inflamatorias, entonces al comparar pacientes con influenza grave, influenza leve-moderada y sujetos sin influenza, el índice de masa corporal mostrará interacción multiplicativa para explicar la expresión de estas citocinas.



5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Determinar el perfil de citocinas asociado a la respuesta inflamatoria aguda y su relación con el grado de obesidad y la gravedad de influenza.

5.2. Objetivos específicos:

- 1.- Describir las diferencias en las características clínicas y bioquímicas de acuerdo al grado de severidad de la influenza.
- 2.- Determinar el riesgo de obesidad de acuerdo a la gravedad de la influenza.
- 3.- Calcular la magnitud del efecto de la concentración de citocinas pro-inflamatorias respecto a los grados de obesidad.
- 4.- Calcular la magnitud del efecto de la concentración de citocinas pro-inflamatorias sobre la gravedad de influenza.
- 5.- Explorar la formación de grupos de citocinas de acuerdo a factores latentes subyacentes para identificar perfil de citocinas.
- 6.- Determinar el gradiente del perfil de citocinas de acuerdo a la gravedad de la influenza y la severidad de la obesidad.



6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Diseño de estudio

Pacientes con influenza A H1N1 2009 y sujetos sin influenza (pareados por sexo, edad e índice de masa corporal) que asistieron al Hospital General de México, O.D. entre enero de 2010 a septiembre de 2011.

Desde la perspectiva de la arquitectura de diseño:

Etapas 1: Casos y controles, observacional, transversal y prolectivo.

Etapas 2: Comparativo, observacional, transversal y prolectivo.

6.2.- Características de la muestra

El presente estudio se analizó en dos etapas.

La etapa 1 consistió en un estudio típico de **casos-controles para el análisis clínico**, los casos correspondieron a pacientes con influenza grave (pacientes hospitalizados estratificados en críticos por requerir Unidad de Cuidados Intensivos y en no críticos) y los controles a pacientes con influenza leve o moderada (ambulatorios).

En la etapa 2 se consideró el contraste de la concentración citocinas en suero de acuerdo a tres factores (indistintamente utilizaremos el término de grupos), descritos a continuación:

Grupo 1: Pacientes con influenza grave (que correspondieron a los mismos casos de la etapa 1).

Grupo 2: Pacientes con influenza moderada (que correspondieron a los mismos controles de la etapa 1)

Grupo 3: Sujetos sin Influenza, pareados por sexo, edad e índice de masa corporal (IMC) con los pacientes de Influenza (figura 3)

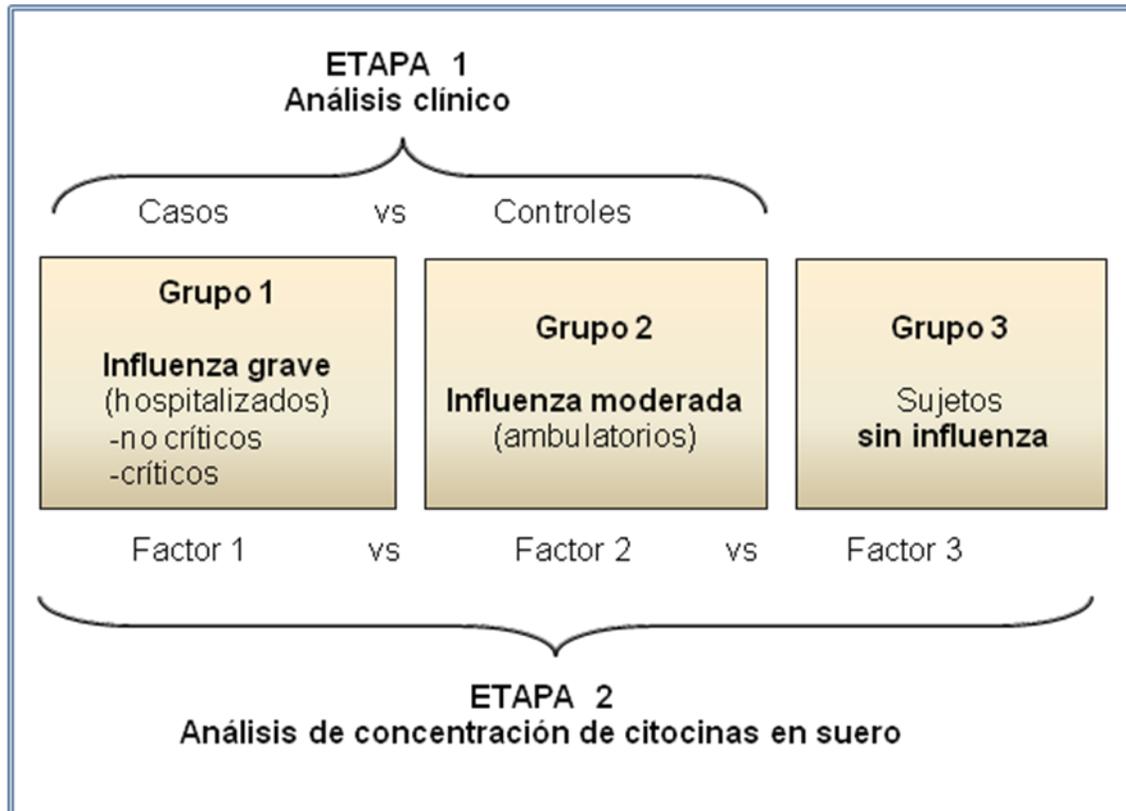


Figura 3. Esquema de las etapas del análisis. Etapa 1: análisis clínico. Etapa 2: análisis de concentración de citocinas en suero. Grupo 1 corresponden a los pacientes con influenza grave. Grupo 2 corresponden a los pacientes con influenza moderada. Grupo 3 corresponden a sujetos sanos sin influenza.

6.3 Descripción de los procedimientos

Se invitó a cada paciente a participar en el protocolo.

Cada paciente que aceptó firmó el consentimiento informado (autorizado por los comités de Ética y de Investigación del HGM, OD. ANEXO 1.

Se llenó la hoja de recolección de datos que incluye datos epidemiológicos y clínicos (por interrogatorio y exploración física), incluyendo peso, talla y perímetro abdominal. ANEXO 2.



Los casos y los controles de la etapa 1 fueron pareados en relación 1: 1 a 3 de acuerdo a sexo y edad \pm 5 años. Sin embargo 7 pacientes casos no se lograron parrear, porque fue mayor el número de casos que de controles que se atendieron en el Hospital General de México.

El grupo de sujetos sin influenza que se agregó para el análisis de la segunda etapa fueron pareados a los dos grupos de pacientes con influenza de acuerdo al sexo, edad \pm 5 años, e IMC \pm 2 como grupo de contraste para analizar la concentración de citocinas en suero. Esta maniobra aumentó el poder de la muestra.

6.3. Criterios de selección de la muestra

6.3.1. Criterios para pacientes con influenza.

Criterios de inclusión.-

- Hombres y mujeres
- 18 a 65 años de edad
- Diagnóstico clínico de influenza
- Pacientes atendidos en el Hospital General de México, O.D.
- Firma de consentimiento informado

Criterios de exclusión.-

- Identificación de otra patología pulmonar diferente a influenza
- Embarazadas

Criterios de eliminación:

- Que no se identifique RNA de virus de influenza



6.3.2. Criterios para sujetos sin influenza.

Criterios de inclusión.-

- Pacientes pareados a los casos y controles con influenza de acuerdo a sexo, edad \pm 5 años e IMC \pm 2.
- 18 a 65 años de edad
- Firma de consentimiento informado

Criterios de exclusión.-

- Patología pulmonar
- Diabetes mellitus (por glucosa de ayuno o por curva de tolerancia a la glucosa)
- Antecedente o diagnóstico clínico de hipertensión arterial sistémica
- Otra co-morbilidad inflamatoria o metabólica conocida además de obesidad

Criterios de eliminación.-

- Alteraciones metabólicas moderadas o severas diagnosticadas durante los estudios de laboratorio

6.4. Tamaño de la muestra

TAMAÑO DE MUESTRA Y POTENCIA

PARA ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES EMPAREJADOS

Riesgo: Obesidad.

Casos: Influenza Grave

Controles: Influenza leve-moderada

Consideramos error alfa < del 5%

Con potencia entre 65 y 95%

IC 95%

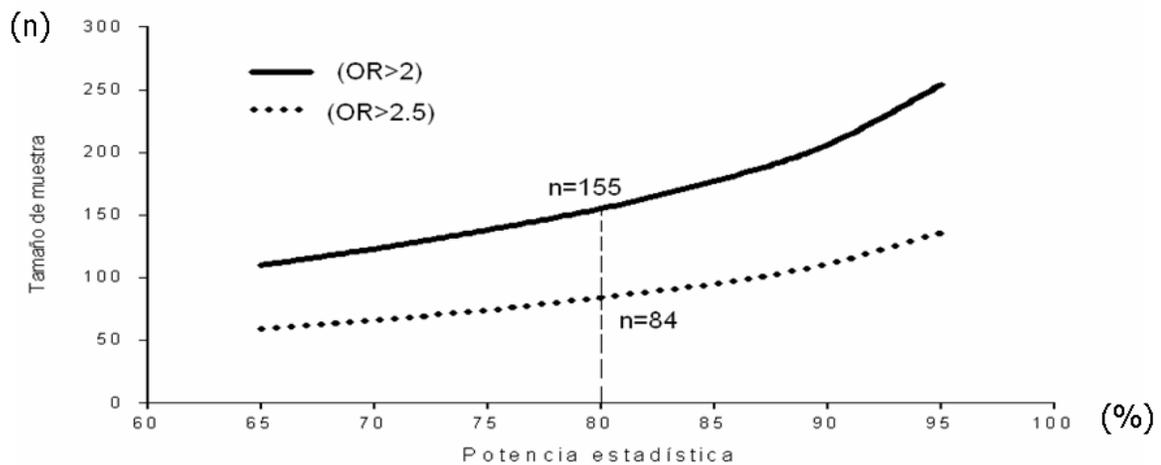


Figura 4. Cálculo del tamaño de la muestra para estudio de casos y controles emparejados, considerando proporción de casos expuestos el 40%, y proporción de controles expuestos el 22%, de acuerdo a riesgo de obesidad en gravedad de Influenza, calculada con $OR > 2$ y > 2.5 .

Consideramos un error alfa menor del 5% y una potencia entre 65 y 95%.

Para obesidad se calculó el OR entre el número de casos (pacientes con influenza grave) y el número de controles (pacientes con influenza leve o moderada). Se obtuvo un $OR > 2.5$, con IC 95% (0.62, 9.29), con una proporción de casos expuestos de 40% y una proporción de controles expuestos del 22% por lo que se calculó la n de 84 pacientes para cada grupo con una potencia de 80%.

Tomando en cuenta la muestra de pareo entre casos y controles con una



relación de 1: (1 a 3), un total de 160 a 320 pacientes.

En el presente estudio no se alcanzó el tamaño adecuado de la muestra debido a que se controló la pandemia de influenza A H1N1 2009, y dejaron de presentarse enfermos con influenza de este subtipo en el Distrito Federal, y por lo tanto en el Hospital General de México. Sin embargo consideraremos que el tamaño del efecto de la obesidad en gravedad de influenza es grande, del 78%, por lo tanto se continúa su abordaje para el análisis de la muestra por considerarse importante.

6.5. Variables.

6.5.1.-Variable dependiente

1.- Expresión de citocinas:

IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, Basic FGF, Eotaxina, G-SCF, GM-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF α , VEGF.

Unidad de medida: pg/ml

Variable cuantitativa continua

6.5.2.- Variables independientes.-

Cualitativas

1.- Gravedad de influenza

Definición: Paciente con infección por virus de influenza

Leve o moderado: paciente con influenza sin complicaciones pulmonares que no requiere hospitalización (ambulatorio)

Grave: paciente hospitalizado por complicaciones pulmonares



(principalmente Insuficiencia Respiratoria Aguda) y/o enfermedad crónica descompensada.

Variable cualitativa ordinal

2. - Obesidad

Definición:

Paciente con índice de masa corporal (peso/talla²) > de 30 kg/m²

Normal : IMC 18.5 – 24.99 kg/m² *

Sobrepeso: 25-29.99 kg/m²

Obesidad grado I: 30-34.99 kg/m²

Obesidad grado II: 35-39.99 kg/m²

Obesidad grado III: >40 kg/m²

Definición operacional: variable cualitativa ordinal

*Clasificación de la OMS de acuerdo al IMC

3.- Sexo:

Femenino

Masculino

Variable cualitativa dicotómica

Variables cuantitativas.-

4.- Edad

Años.

Variable cuantitativa discreta



5.- Índice de masa corporal (IMC)

Cociente entre peso y talla (kg/m^2)

Variable cuantitativa continua

6.- Perímetro de cintura abdominal

Medición en cm

(Medición del perímetro de la porción media del abdomen entre reborde costal inferior y la cresta iliaca)

Variable Cuantitativa continua

6.6. Análisis estadístico

La estrategia de análisis estadístico estuvo enfocada a contrastar el grupo de pacientes con influenza leve-moderada y grave, para:

- Variables cuantitativas: comparación de promedios con prueba t de Student ajustado por la varianza de cada grupo.
- Se hizo cálculo del tamaño del efecto para los análisis descritos a continuación: IMC con respecto a gravedad de influenza. El tamaño del efecto se hace relevante ante todo por la falta de poder que tenemos en la presente muestra. (31)
- ANOVA para análisis de varianza con análisis post hoc con la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS). Se describe el valor de p en los resultados en base a Brown-Forsythe.
- Se calculó OR con intervalos de confianza al 95% para riesgo de obesidad en gravedad de influenza
- Análisis de factores latentes: Se realizó la prueba de Kaiser-Meyer-Oklín (KMO) para determinar la adecuación del tamaño de la muestra y de las



variables seleccionadas al procedimiento de análisis de factores; esfericidad de Bartlett, matriz anti-imagen para verificar la conveniencia del procedimiento de componentes principales utilizados. Se empleó normalización de Kaiser y rotación de ejes por método Varimax. Se consideró como importantes aquellos componentes que tuvieran valor propio (eigen valor) mayor de 1.0 y se calculó la calificación de cada componente obtenida por una matriz de correlaciones.

- Se realizó análisis de ANCOVA para determinar el tamaño del efecto para la concentración de citocinas en suero de acuerdo a efectos principales (gravedad de la influenza y severidad de la obesidad) considerando *a priori* una interacción multiplicativa como significativa si el error alfa fue menor de 10% ($p < 0.10$)
 - Variable dependiente: concentración de citocinas en suero o calificación de acuerdo a factores latentes (perfil de citocinas)
 - Como factor fijo se consideró los grupos ya descritos de gravedad de influenza y el grado de obesidad ajustada por edad y sexo.

6.7. Flujograma de protocolo de influenza

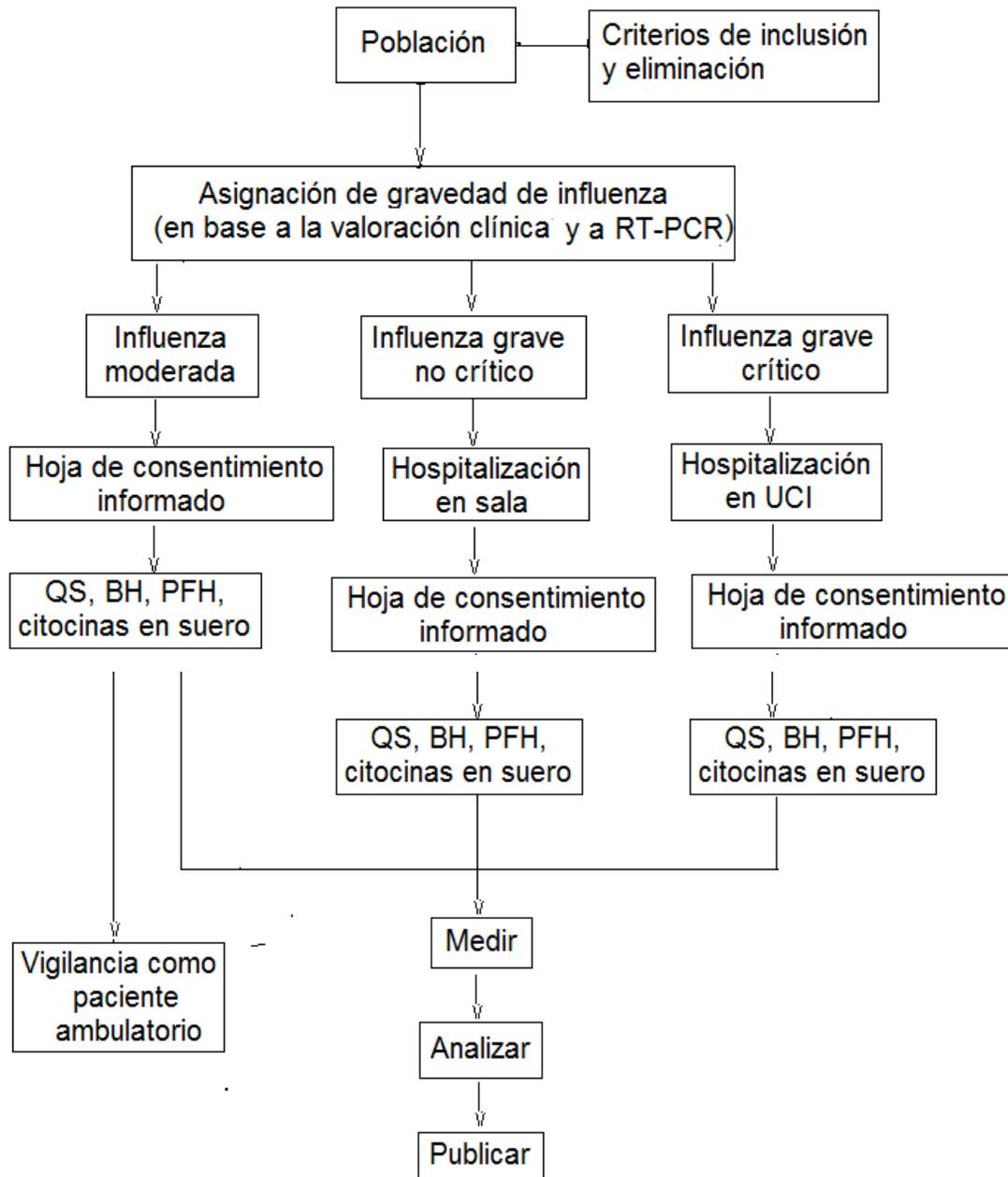


Figura 5 . Flujograma de protocolo del “Efecto de la obesidad y severidad de la infección por influenza A H1N1 2009 sobre la respuesta de citocinas”



6.8. Método de evaluación clínica de influenza.

Se tiene que evaluar al paciente con cuadro gripal que cuenta por lo menos con tres o más de los siguientes síntomas: fiebre, cefalea, ataque al estado general, tos seca, faringodinia, odinofagia, dolor abdominal, rinorrea hialina, rinorrea purulenta, inicio súbito, postración, escalofrío, disfonía, expectoración, hemoptisis, náusea, vómito, mialgias, artralgias, lumbalgia, conjuntivitis, congestión nasal, diarrea, dolor torácico, disnea, cianosis, hiperemia conjuntival, obstrucción nasal, sibilancias o estertores, desorientación.

Para evaluar la gravedad de influenza se consideran tres grados: leve, moderado y grave, en base a parámetros respiratorios, hemodinámicos y comorbilidad de enfermedad crónica como se observa en la tabla 2.(32)

Tabla 2 . Clasificación clínica de gravedad de influenza y referencia. Secretaría de Salud, México.

INFLUENZA	TIPO DE PACIENTE	REFERENCIA	TRATAMIENTO
Grave	Cuadro clínico de influenza con complicaciones pulmonares y/o enfermedad crónica descontrolada	Unidad médica hospitalaria con aislamiento estándar	Complicación de enfermedad crónica y complicaciones respiratorias y/o hemodinámicas. Oseltamivir
Moderada	Cuadro clínico de influenza sin complicaciones pulmonares y/o enfermedad crónica controlada	Aislamiento domiciliario y datos de alarma explicados	Sintomático y oseltamivir
Leve	Cuadro clínico de influenza sin complicaciones pulmonares y sin enfermedad crónica agregada	Aislamiento domiciliario estricto	Sintomático y control de infecciones

6.9. Métodos de laboratorio

1.- RT-PCR para influenza A, influenza A pandémica H1N1 2009, H1N1 estacional.

Se tomó muestra de exudado nasal y orofaríngeo con hisopo de dacrón para realizar reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) de Virus de Influenza A H1N1 2009 pandémico, H1N1 estacional, Influenza A (sin subtipo) (32), en el servicio de Genómica, HGM; en la figura 6 se observa la curva de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. La Extracción de RNA se realizó por el método QIAamp Viral RNA (método manual), y la RT-PCR se realizó con sonda Taq man, de acuerdo a los lineamientos de la CDC y la OMS. (13) ANEXO 3-5.

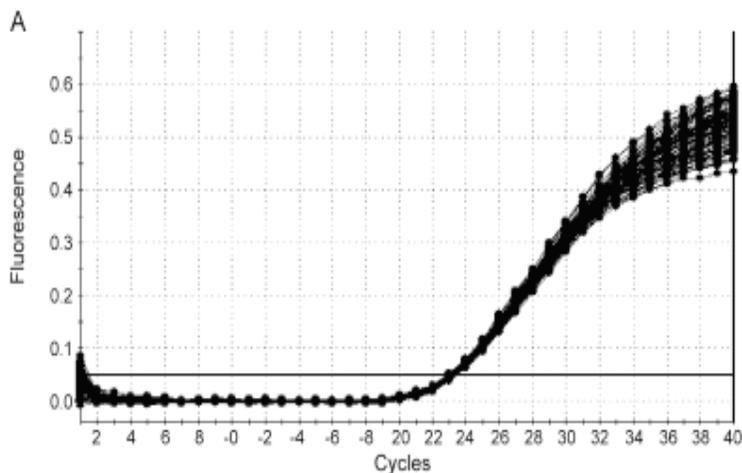


Figura 6. Curva de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Reproducibilidad y precisión del RT-PCR. Método Taqman®. El promedio de Ct para estas reacciones es 23 ± 0.3 .

La secuencia genética de los cebadores utilizados en PCR de virus de influenza se puede observar en el anexo 6.



2.-Determinación de biometría hemática, química sanguínea y pruebas de funcionamiento hepático.

Se tomaron 36 ml de sangre que fueron distribuidos en 4 tubos con anticoagulante y 4 tubos con gel, para determinación de biometría hemática, química sanguínea, pruebas de funcionamiento hepático (con el equipo sistematizado del laboratorio central del HGM) y determinación cuantitativa de citocinas.

3.- Para la determinación de citocinas se utilizaron kits con numero de catálogo M50-0KCAF0Y de Bio-Plex Pro-Human Cytokine 27-plex Assay de BIO-RAD (ver figura 7).

Se utilizaron 3 kits cada uno con 1x96 pozos de plástico (ver figura 8); que incluyeron las microesferas magnéticas acopladas, detección de anticuerpos, estándares y diluyentes para la detección de 27 citocinas humanas en cada kit: IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, Basic FGF, Eotaxina, G-SCF, GM-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF α , VEGF.



Figura 7. Kit M50-0KCAF0Y de Bio-Plex Pro-Human Cytokine 27-plex Assay de BIO-RAD.



Figura 8. Placa de plástico con 1 x 96 pozos para muestras de suero

La guía de Ensayo Bio-Plex para la determinación de citocinas en suero de los pacientes se encuentra en el ANEXO 6.

El sistema de Bio-plex (bio-complejo) tiene su base en los siguientes 3 elementos:

- 1.- Microesferas marcadas con fluorescencia (con diferente color o espectro) para permitir la discriminación de pruebas individuales con una suspensión múltiple. Esta detección simultánea de más de 100 tipos de moléculas en una placa de 96 pozos.
- 2.- Un Citómetro de flujo con dos láseres ópticos asociados para medir las diferentes moléculas unidas a la superficie de las microesferas.
3. Un procesador de señal digital de alta velocidad, que maneja eficientemente los datos de fluorescencia.

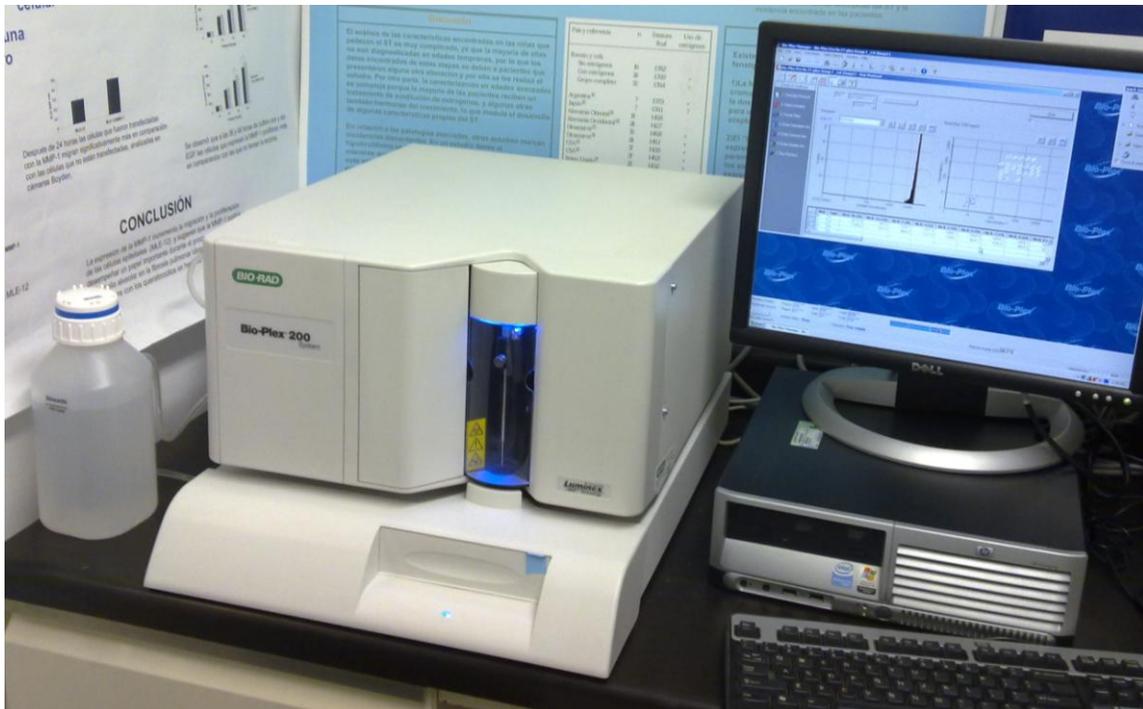


Figura 9. Equipo Bio-plex. Con citómetro de flujo de dos láseres ópticos con su procesador de señal digital, para el estudio de las moléculas unidas a las microesferas marcadas.

FORMATO DE ENSAYO

El principio del ensayo de Bio-Plex es similar al ELISA: la captura de los anticuerpos dirigidos contra los biomarcadores deseados son emparejados covalentemente a las microesferas. Las microesferas acopladas reaccionan con la muestra que contienen los marcadores de interés. Después de una serie de lavados para remover las proteínas no unidas, se agregan los anticuerpos biomarcados para crear un complejo sándwich (ver figura 9).

El complejo detectado finalmente está formado por la adición de ficoeritrina-streptavidina (SA-PE) conjugada. La ficoeritrina sirve como un indicador fluorescente o reportero.

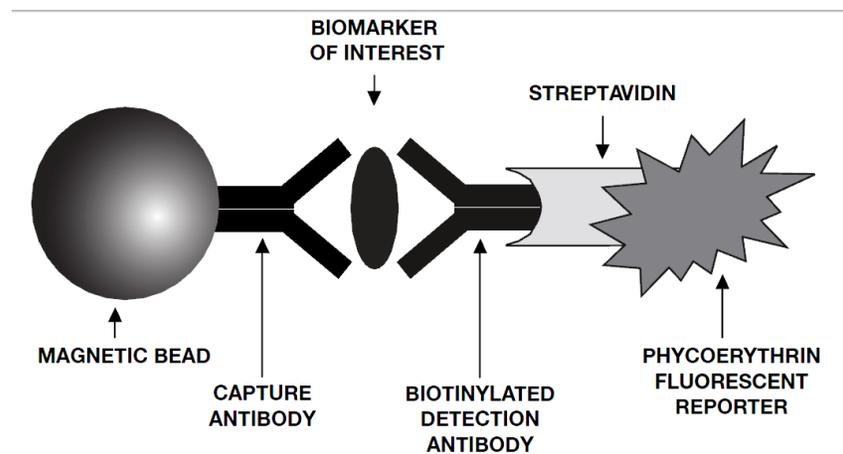


Figura 10. Principio del ensayo de Bio-plex: complejo sándwich de anticuerpos biomarcados con microesferas.



7.- RESULTADOS.

ANALISIS CLINICO

Se estudiaron a 45 pacientes con influenza A H1N1 2009 corroborada por RT-PCR, 26 hombres (57.8%) y 19 mujeres (42.2%), con edad promedio de 34.69 ± 10.3 años. De los cuales, 27 pacientes (60%) correspondieron a los casos es decir, a los pacientes con influenza grave (con criterios de hospitalización) y 18 pacientes (40%) al grupo de controles es decir, con influenza moderada o ambulatorios.

El grupo de los casos con influenza grave se estratificó en 2 grupos: críticos, aquellos que requirieron atención en la unidad de cuidados intensivos por inestabilidad respiratoria y/o hemodinámica, no críticos, aquellos que estando hospitalizados no requirieron unidad de cuidados intensivos.

En la tabla 3 se muestra la frecuencia de los pacientes con influenza de acuerdo a la gravedad de la infección viral.

Tabla 3. Frecuencia de pacientes de acuerdo a gravedad de Influenza

GRAVEDAD DE INFLUENZA	FRECUENCIA (n)	PORCENTAJE (%)
Moderada (ambulatorio)	18	40.0
Grave no crítico	12	26.7
Grave crítico	15	33.3
Total	45	100.0

Cabe mencionar que aunque el criterio de grupo control incluía pacientes con influenza tanto leve como moderada, ambos ambulatorios, solo se captaron pacientes con influenza moderada en el Hospital General de México, ya que los pacientes con influenza leve (con síntomas leves, sin complicaciones) no



ameritaron referencia a Hospital de Tercer Nivel de Atención Médica desde su evaluación inicial en el Primer Nivel.

Los antecedentes de vacunación para Influenza estacional o A H1N1 en pacientes que tuvieron la enfermedad de Influenza se reportan en la tabla 4, donde se muestra la diferencia estadística entre la presencia de enfermedad y el antecedente de falta de vacunación.

Tabla 4. Antecedente de aplicación de vacuna contra influenza en pacientes con la enfermedad de Influenza A H1N1

ANTECEDENTE DE VACUNACIÓN	NO	SÍ	p
Vacuna 2008 Influenza Estacional	43 (95.6%)	2 (4.4%)	<0.001*
Vacuna 2009 Influenza Estacional	40 (88.9%)	5 (11.1%)	<0.001*
Vacuna 2009 Influenza H1N1 pandémica	43 (100%)	0 (0%)	<0.001*
Vacuna 2010 Influenza Estacional	43 (100%)	0(0%)	<0.001*

*Prueba Binomial

A continuación se analizan las características clínicas de acuerdo al grado de severidad de influenza.

Las co-morbilidades más frecuentes en los pacientes con influenza fueron obesidad y antecedente de tabaquismo, tanto activo como ex fumador. Solo un paciente presentó co-morbilidad con estado de inmunosupresión, el cual tuvo diagnóstico de artritis reumatoide tratado con 5 mg de prednisona.

En la tabla 5 se observan las co-morbilidades que se presentaron en los pacientes con influenza.



Tabla 5. Co-morbilidades en los pacientes con influenza

COMORBILIDAD	CASOS		CONTROLES	
	Frecuencia n = 27	Porcentaje (100%)	Frecuencia / Porcentaje n = 18 (100 %)	
Obesidad	11	(40.7)	4	(22.0)
Diabetes mellitus	0	(0.0)	0	(0.0)
Otras enfermedades metabólicas (Intolerancia a los carbohidratos)	2	(7.4)	1	(5.6)
Enfermedad Hepática	0	(0.0)	0	(0.0)
Enfermedad Cardiovascular	2	(7.4)	1	(5.6)
Enfermedad hematológica	0	(0.0)	0	(0.0)
Tratamiento con Acido Acetilsalicílico	1	(3.7)	0	(0.0)
Tuberculosis	0	(0.0)	1	(5.6)
Otras Infecciones previas	0	(0.0)	0	(0.0)
Inmunosupresión	0	(0.0)	1	(5.6)
Enfermedades neurológicas	0	(0.0)	0	(0.0)
Tabaquismo	0	(0.0)	0	(0.0)
Padecimientos respiratorios crónicos	14	(51.8)	7	(38.9)
	2	(2.74)	2	(11.1)

Los padecimientos respiratorios crónicos presentes en los 2 pacientes correspondientes a los casos fue asma, y en los 2 controles fue alergia.

En la tabla 6 se categoriza el IMC de los pacientes con influenza de acuerdo a la clasificación de la OMS, donde se observa que el 77.8% de los pacientes tienen alteración del IMC, incluyendo a los que tienen sobrepeso.

Tabla 6. Frecuencia de de sobrepeso y obesidad en los pacientes con influenza de acuerdo al índice de masa corporal

CLASIFICACIÓN DE IMC* PACIENTES CON INFLUENZA	FRECUENCIA (n=45)	PORCENTAJE (%)	PORCENTAJE ACUMULADO (n=45)
Obesidad	15	33.4	33.3
Sobrepeso	20	44.4	77.8
Normal	10	22.2	100.0
Total	45	100.0	

*Clasificación de Obesidad de acuerdo a la OMS



En la tabla 7 se muestra los diferentes grados de obesidad en los pacientes con influenza. Se observa que el 33.3% de los pacientes tienen obesidad. La frecuencia y el tipo de obesidad se muestran en dicha tabla.

Tabla 7. Frecuencia de obesidad en los pacientes con influenza

CLASIFICACIÓN DE OBESIDAD* EN PACIENTES CON INFLUENZA	FRCUENCIA (n=45)	PORCENTAJE (%)	PORCENTAJE ACUMULADO (n=45)
Obesidad grado III	3	6.7	6.7
Obesidad grado II	4	8.9	15.6
Obesidad grado I	8	17.8	33.3

*Clasificación de Obesidad de acuerdo a la OMS

En la siguiente tabla se observa los síntomas y signos que se presentaron en los pacientes con Influenza A H1N1 2009 en la población de estudio, donde se observó que los síntomas más frecuentes son fiebre, tos seca, cefalea, ataque al estado general y disnea, sin que se haya presentado un síntoma o signo patognomónico de la enfermedad.

Los síntomas menos frecuentes fueron hipotermia, rinorrea purulenta y desorientación.



Tabla 8. Cuadro clínico de influenza A H1N1 2009

SINTOMA O SIGNO	CASOS	CONTROLES
	Frecuencia /Porcentaje n = 27 (100%)	Frecuencia / Porcentaje n = 18 (100 %)
Fiebre	25 (92.6)	16 (88.9)
Tos seca	25 (92.6)	13 (72.2)
Cefalea	21 (77.8)	16 (88.9)
Ataque al estado general	21 (77.8)	16 (88.9)
Disnea	24 (88.9)	13 (72.2)
Mialgias	18 (66.7)	17 (4.4)
Faringodinia	20 (74.1)	13 (72.2)
Artralgias	16 (59.3)	16 (88.9)
Escalofrío	13 (48.1)	16 (88.9)
Postración	19 (70.4)	9 (50.0)
Dolor torácico	16 (59.3)	11 (61.1)
Sibilancias y/o estertores	17 (63.0)	7 (38.9)
Lumbalgia	10 (37.0)	13 (72.2)
Taquicardia	14 (51.9)	9 (50.0)
Rinorrea hialina	11 (40.7)	12 (66.7)
Odinofagia	15 (55.6)	7 (38.9)
Expectoración muco-hialina	12 (44.4)	7 (38.9)
Dolor abdominal	10 (37.0)	9 (50.0)
Náusea	8 (29.6)	10 (55.6)
Taquipnea	12 (44.4)	5 (27.8)
Hemoptisis	15 (55.6)	2 (11.1)
Congestión nasal	7 (25.9)	10 (55.6)
Hiperemia conjuntival	4 (14.8)	8 (44.4)
Expectoración muco-purulenta	7 (25.9)	4 (22.2)
Diarrea	6 (22.2)	4 (22.2)
Conjuntivitis	7 (25.9)	5 (27.8)
Cianosis	7 (25.9)	1 (5.6)
Oliguria	3 (11.1)	5 (27.8)
Vómito	6 (22.2)	2 (11.1)
Hipotermia	2 (7.4)	4 (22.2)
Rinorrea purulenta	2 (7.4)	2 (11.1)
Desorientación	2 (7.4)	1 (56.0)

El 4.4% de los pacientes falleció por complicaciones de neumonía y SIRPA, posteriormente de requerir apoyo ventilatorio mecánico en la UCI.

De todos los pacientes se evaluaron los siguientes parámetros clínicos: signos vitales (presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, temperatura) y medidas antropométricas (peso, talla, índice de masa corporal y perímetro abdominal). En las tabla 9 se presentan



las variables que presentaron diferencias estadísticas entre los casos y los controles:

Tabla 9. Prueba *t* de Student de muestras independientes. Ajustada de acuerdo a homogeneidad de varianzas. Parámetros antropométricos y signos vitales de casos y controles.

VARIABLE	CASOS INFLUENZA GRAVE HOSPITALIZADOS		CONTROLES INFLUENZA MODERADA AMBULATORIOS		p
	Media	Error estándar	Media	Error estándar	
Peso (kg)	84.15	(3.92)	74.57	(3.51)	0.095
IMC	31.43	(1.50)	26.61	(1.01)	0.022*
Perímetro abdominal (cm)	106.88	(3.18)	92.33	(3.60)	0.005*
Frecuencia cardiaca (latidos por minuto)	89.15	(2.79)	81.78	(2.13)	0.042*
Frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto)	25.67	(0.74)	21.83	(0.69)	0.001*

* $p < 0.05$ IMC= índice de masa corporal

Donde se observa diferencia estadística entre el IMC, el perímetro abdominal, la frecuencia cardiaca y la frecuencia respiratoria entre los casos y los controles. El resto de datos descriptivos de estas variables como desviación estándar se encuentran en el anexo 8.

En la tabla 10 se observa que el tamaño del efecto (*effect size*) del IMC con respecto a la gravedad de influenza es del 79%. (31)

Tabla 10. Tamaño del efecto del IMC con respecto a gravedad de influenza

INFLUENZA	MEDIA	DE	n	EFFECT SIZE	IC (95%)
Moderada	26.61	4.29	18	79%	0.10 , 1.33
Grave	31.43	7.84	27		

El tamaño del efecto nos dice cuánto de la variable dependiente se puede controlar, predecir o explicar por la variable independiente en este caso, cuánto



de la gravedad de la Influenza puede explicarse por el índice de masa corporal, en este caso en el 79%. Hay una diferencia grande.

Para realizar la comparación entre la gravedad de influenza con respecto a los parámetros cardio-respiratorios y antropométricos se realizó la prueba de ANOVA de un factor, comparando a los pacientes ambulatorios, a los hospitalizados no críticos y a los críticos. En la tabla 11 se observan los valores de las medias y los intervalos de confianza al 95% así como la significancia estadística de cada variable. El resto de datos de esta tabla se encuentra en el anexo 9 como desviación estándar y error típico de la media de las variables.

Tabla 11. ANOVA de un factor. Pacientes ambulatorios, hospitalizados no críticos y críticos.

VARIABLES	AMBULATORIOS		NO CRITICO		CRITICO		p
	Media	IC 95%	Media	IC 95%	Media	IC 95%	
Peso (kg)	74.57 ^b	(67.15, 82.00)	76.67 ^b	(68.37, 84.96)	90.13 ^a	(77.12, 103.15)	0.042*
IMC	26.61 ^b	(24.48, 28.74)	28.9 ^c	(25.76, 32.04)	33.46 ^a	(28.35, 38.57)	0.02*
P. abdominal	92.33 ^b	(84.64, 100.0)	97.83 ^b	(90.92, 104.75)	114.64 ^a	(105.20, 124.09)	<0.001*
FC	81.78 ^b	(77.28, 86.28)	87.33 ^c	(79.70, 94.96)	90.6 ^a	(81.45, 99.75)	0.158
FR	21.83 ^b	(20.36, 23.30)	25.83 ^a	(22.75, 28.92)	25.53 ^a	(23.82, 27.24)	0.01*

*Brown-Forsythe IMC=Índice de masa corporal P.abdominal= perímetro abdominal (cm) FC= frecuencia cardiaca (latidos por minuto) FR= frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto)

Para determinar la relación entre el grupo que favoreció la diferencia significativa entre grupos e intragrupos se realizó la prueba **post hoc con DMS (Diferencia Mínima Significativa)** entre pacientes ambulatorios, no críticos y críticos. Los resultados se observan en las figuras 11 a 14.

En la figura 11 se observa la diferencia de peso entre los pacientes con influenza de acuerdo a la gravedad de la infección.

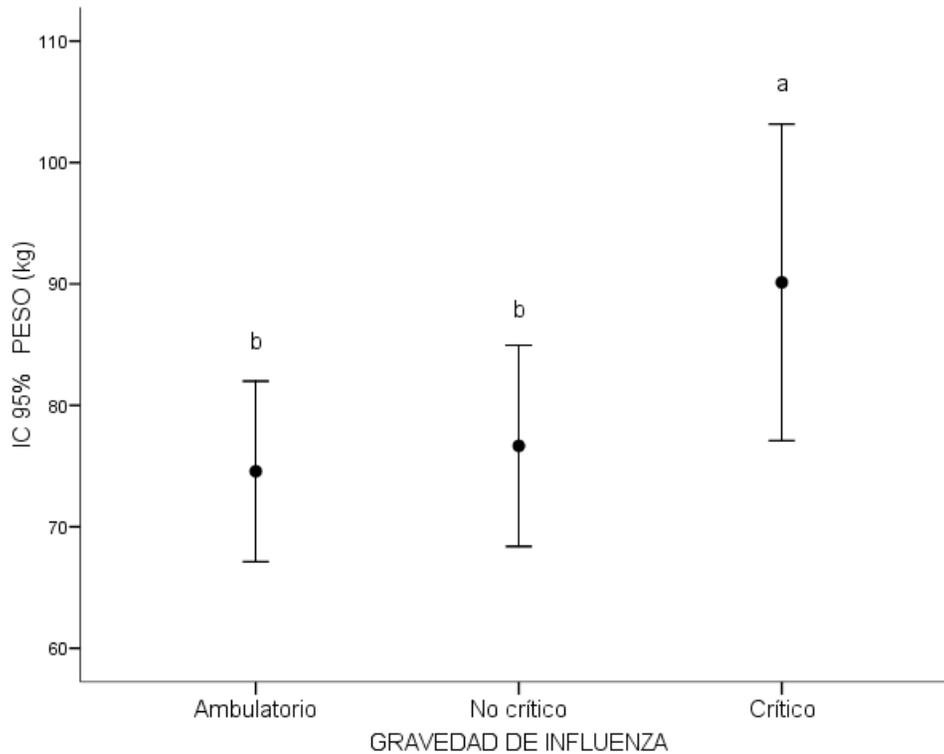


Figura 11. ANOVA de un factor. Diferencia de peso (kg) de acuerdo a gravedad de Influenza. $p = 0.042$ Brown-Forsythe

Con la prueba post hoc DMS, se muestra que el paciente crítico tiene mayor peso que el no crítico ($p=0.05$), y mayor peso que el ambulatorio ($p=0.017$)

No se muestra diferencia significativa del peso entre el paciente ambulatorio y el paciente hospitalizado no crítico.

En la figura 12 se observa la diferencia de IMC entre los pacientes con influenza de acuerdo a la gravedad de la infección.

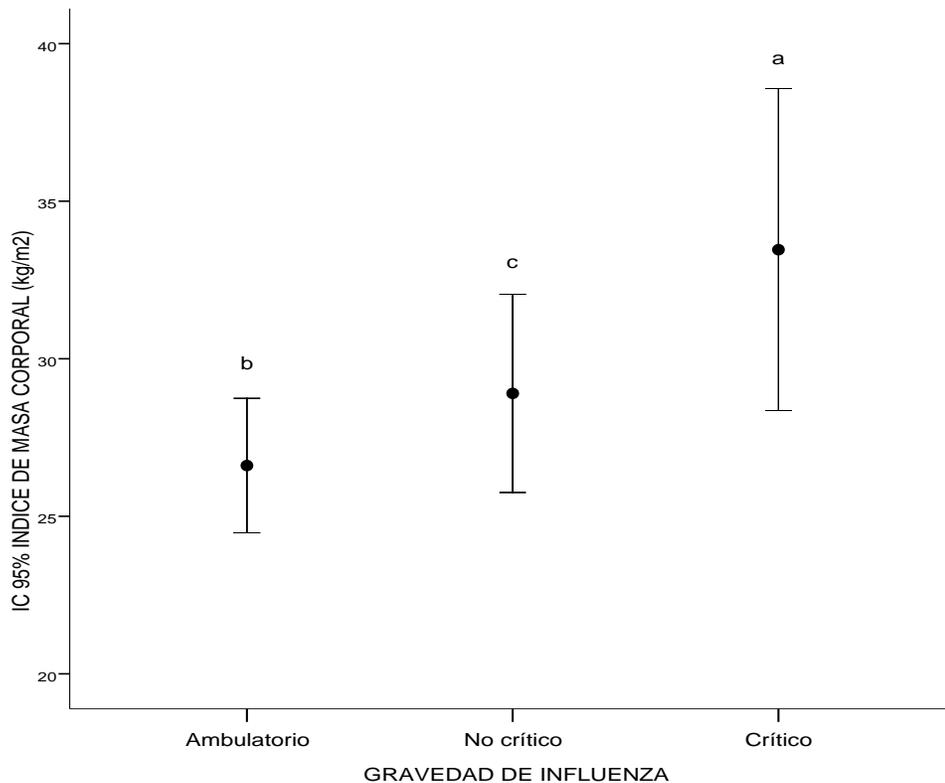


Figura 12. ANOVA de un factor. Diferencia de Índice de masa corporal (kg/m^2) de acuerdo a la gravedad de Influenza. $p=0.02$ Brown-Forsythe

Con la prueba post hoc DMS, se muestra que el paciente crítico tiene mayor IMC que el paciente ambulatorio ($p=0.004$). A pesar de la tendencia que se muestra en la figura 12, no se demuestra diferencia estadística entre el IMC del paciente crítico con respecto al no crítico ($p=0.07$), probablemente por la n de la muestra.

En la figura 13 se observa la diferencia de IMC entre los pacientes con influenza de acuerdo a la gravedad de la infección.

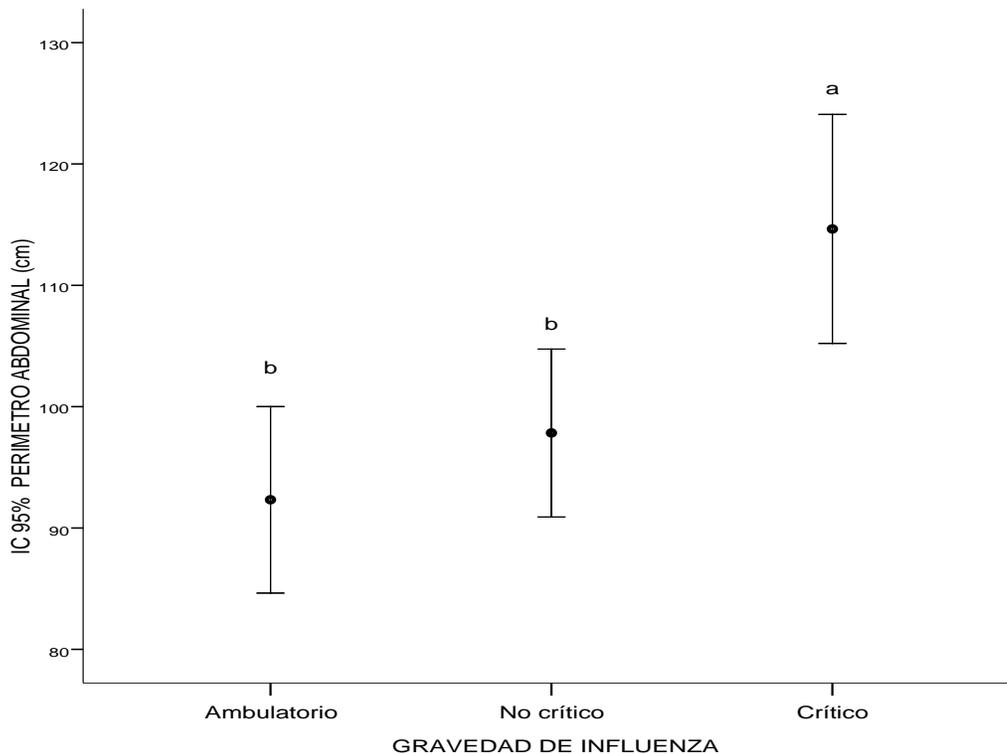


Figura 13. ANOVA de un factor. Diferencia de perímetro abdominal de acuerdo a gravedad de Influenza $p < 0.001$ Brown-Forsythe

Con la prueba post hoc DMS, se muestra que el paciente crítico tiene mayor perímetro abdominal que el no crítico ($p=0.005$), y mayor perímetro abdominal que el ambulatorio ($p<0.001$).

No se muestra diferencia significativa del peso entre el paciente ambulatorio y el paciente hospitalizado no crítico.

En la figura 14 se observa la diferencia de frecuencia respiratoria entre los pacientes con influenza de acuerdo a la gravedad de la infección.

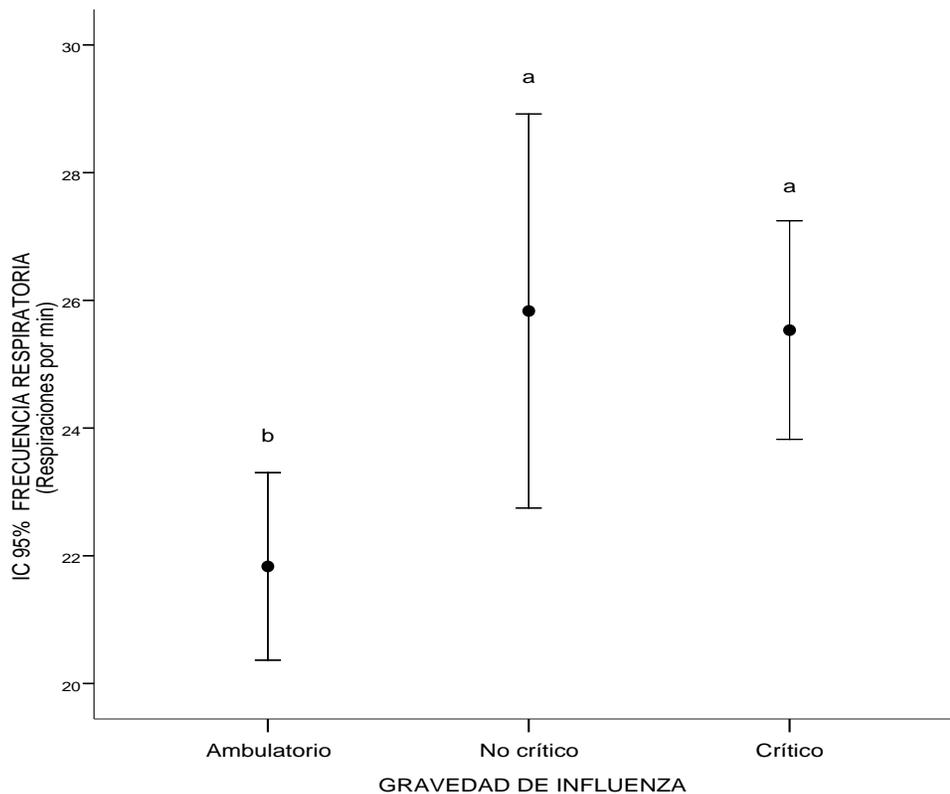


Figura 14. ANOVA de un factor. Diferencia de frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto) de acuerdo a gravedad de Influenza $p = 0.010$ Brown-Forsythe

Con la prueba post hoc DMS, se muestra que el paciente crítico y el no crítico tienen mayor frecuencia respiratoria que el ambulatorio ($p=0.005$).



A continuación se describen los resultados de las diferencias bioquímicas entre casos y controles de acuerdo a gravedad de influenza.

Tabla 12. Prueba *t* de Student de muestras independientes. Ajustada de acuerdo a homogeneidad de varianzas. Parámetros bioquímicos en casos y controles con Influenza.

VARIABLES	CASOS Influenza Grave Hospitalizados		CONTROLES Influenza Moderada Ambulatorios		p
	Media	Error Estándar	Media	Error Estándar	
Glucosa (mg/dl)	129.44	(10.97)	95.56	(2.78)	0.017*
TGP (U/L)	59.67	(9.39)	44.56	(6.59)	0.242
TGO (U/L)	71.70	(10.00)	45.78	(6.98)	0.040*
DHL (U/L)	434.70	(49.58)	210.11	(20.05)	0.001*
CPK (U/L)	680.36	(254.01)	225.56	(77.19)	0.147

* $p < 0.05$ TGP: Transaminasa glutámico pirúvica. TGO: Transaminasa glutámico oxaloacética. DHL: Deshidrogenasa láctica.
CPK: creatinina fosfocinasa.

Para completar la información de estos parámetros bioquímicos se puede revisar el anexo 9.

Para realizar la comparación entre la gravedad de influenza con respecto a los parámetros bioquímicos se realizó la prueba de ANOVA, comparando a los pacientes ambulatorios, a los hospitalizados no críticos y a los críticos (tabla 13), se observan los valores de la media e intervalo de confianza al 95%, así como las significancias estadísticas.



Tabla 13. ANOVA de un factor. Parámetros bioquímicos en pacientes ambulatorios, hospitalizados no críticos y críticos.

VARIABLES	AMBULATORIO		NO CRITICO		CRITICO		p
	Media	IC 95%	Media	IC 95%	Media	IC 95%	
Glucosa (mg/dl)	95.56	(89.67, 101.44)	116.00	(101.51, 130.49)	140.20	(99.67, 180.73)	0.036*
TGP (U/L)	44.56	(30.65, 58.46)	36.92	(14.55, 59.29)	77.87	(49.34, 106.39)	0.022*
TGO (U/L)	45.78	(31.05, 0.51)	53.08	(22.66, 83.50)	86.58	(57.91, 115.26)	0.036*
DHL (U/L)	210.11	(167.80, 252.42)	232.25	(167.04, 297.46)	596.67	(470.70, 722.64)	<0.001*
CPK (U/L)	225.56	(62.70, 388.41)	336.00	(113.10, 558.90)	950.93	(-0.28, 1902.14)	0.137

*p < 0.05

Los valores de desviación estándar y error típico de estas variables se pueden observar en el anexo 11.

Para determinar la relación entre el grupo que favoreció la diferencia significativa entre grupos e intragrupos se realizó la **prueba post hoc con DMS** (*Diferencia Mínima Significativa*) entre pacientes ambulatorios, no críticos y críticos. Los resultados se observan en las figuras 15 a la 19, donde se muestran diferencias significativas entre grupos e intragrupos en glucosa, TGP, TGO y DHL.

En la figura 15 se observa la diferencia de la concentración sérica de glucosa entre los pacientes con influenza de acuerdo a la gravedad de la infección.

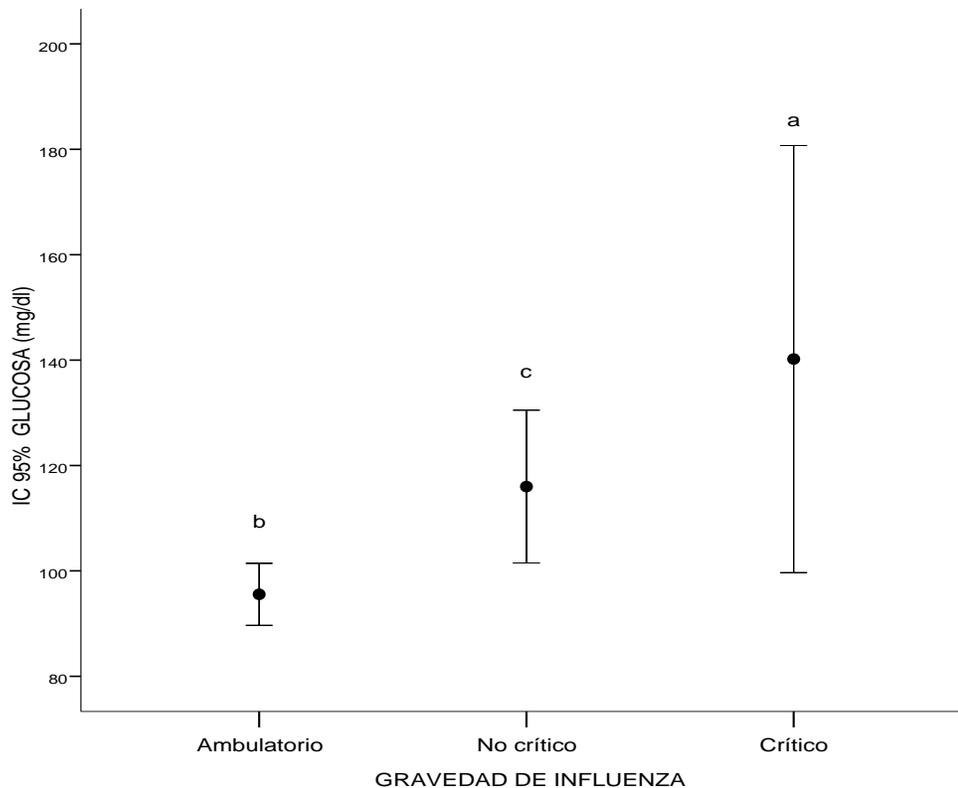


Figura 15. ANOVA de un factor. Diferencia de glucosa (mg/dl) de acuerdo a gravedad de Influenza $p=0.036$ Brown-Forsythe

Con la prueba post hoc DMS, se muestra que el paciente crítico tiene mayor concentración sérica de glucosa que el ambulatorio ($p=0.006$).

Aunque hay tendencia en la figura 15 de ser mayor la glucosa del crítico con respecto al no crítico, no se demuestra estadísticamente.

No se muestra diferencia significativa de la concentración de glucosa del paciente ambulatorio y el paciente hospitalizado no crítico.

En la figura 16 se observa la diferencia de la concentración sérica de transaminasa glutámico pirúvica (TGP) entre los pacientes con influenza de acuerdo a la gravedad de la infección.

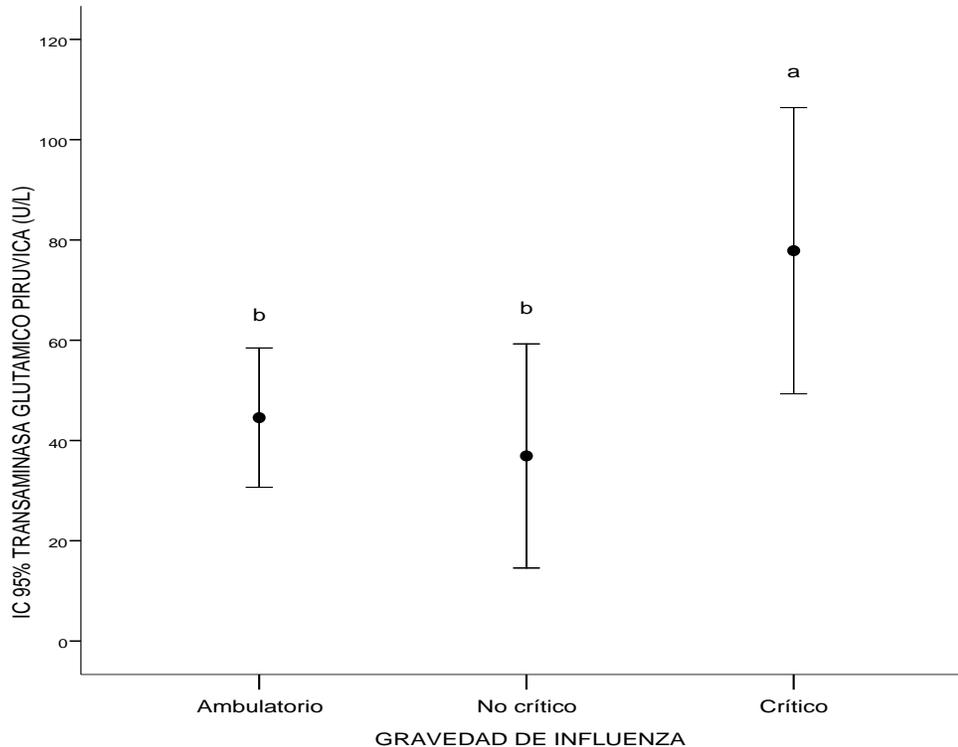


Figura 16 ANOVA de un factor. Diferencia de TGP (U/L) de acuerdo a gravedad de Influenza $p = 0.022$ Brown-Forsythe

Con la prueba post hoc DMS, se muestra que el paciente crítico tiene mayor concentración sérica de TGP que el no crítico ($p=0.019$), y mayor TGP que el ambulatorio ($p=0.010$).

No se muestra diferencia significativa de TGP entre el paciente ambulatorio y el paciente hospitalizado no crítico.

En la figura 17 se observa la diferencia de la concentración sérica de transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) entre los pacientes con influenza de acuerdo a la gravedad de la infección.

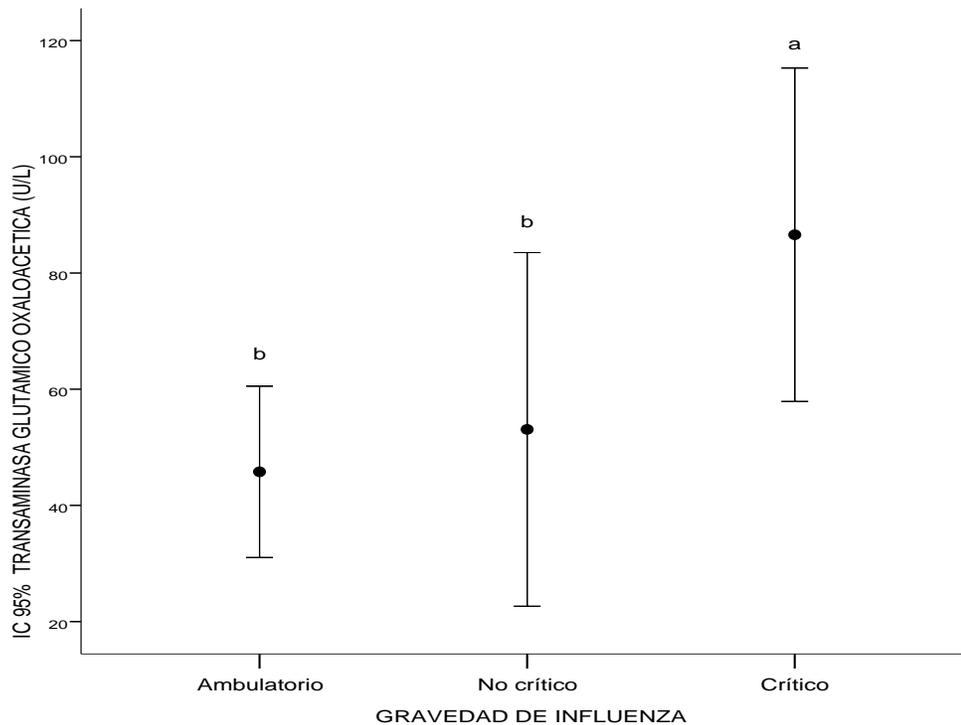


Figura 17. ANOVA de un factor. Diferencia de TGO (U/L) de acuerdo a gravedad de Influenza $p = 0.036$ Brown-Forsythe

Con la prueba post hoc DMS, se muestra que el paciente crítico tiene mayor concentración sérica de TGO que el no crítico ($p=0.05$), y mayor TGO que el ambulatorio ($p=0.01$).

No se muestra diferencia significativa de TGP entre el paciente ambulatorio y el paciente hospitalizado no crítico.

En la figura 18 se observa la diferencia de concentración sérica de deshidrogenasa láctica (DHL) entre los pacientes con influenza de acuerdo a la gravedad de la infección.

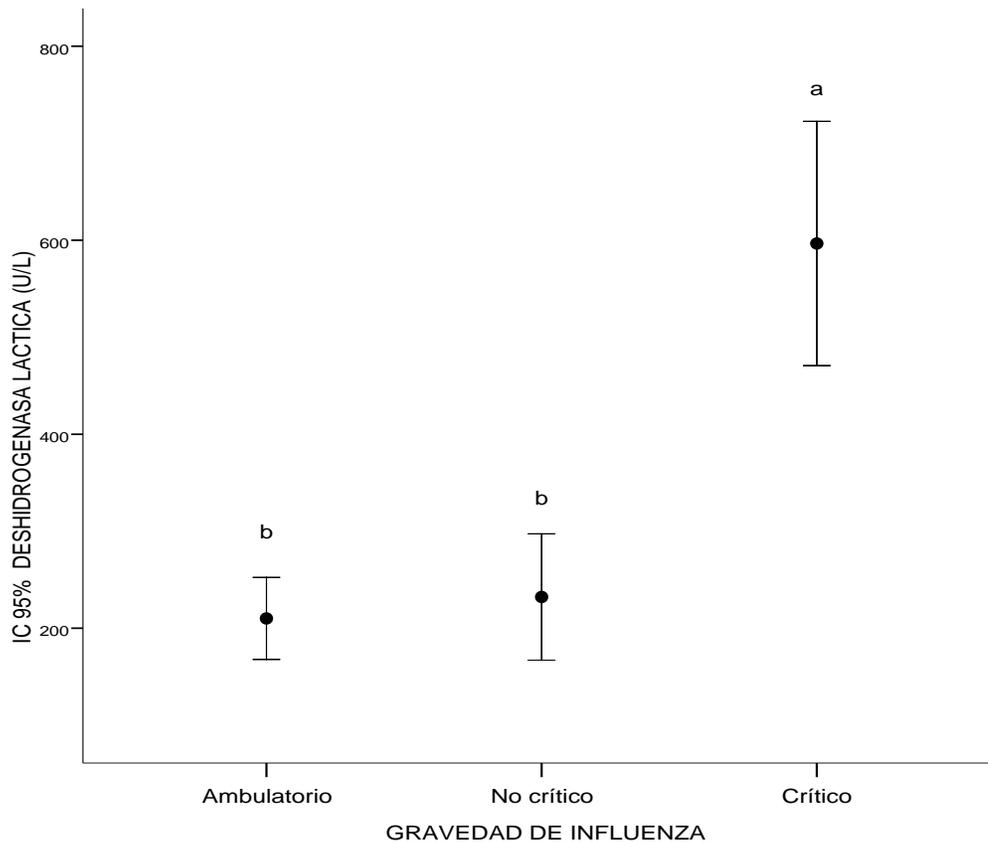


Figura 18. ANOVA de un factor. Diferencia de DHL (U/L) de acuerdo a gravedad de Influenza $p < 0.001$ Brown-Forsythe

Con la prueba post hoc DMS, se muestra que el paciente crítico tiene mayor concentración sérica de DHL que el no crítico ($p < 0.001$), y mayor DHL que el ambulatorio ($p < 0.001$).

No se muestra diferencia significativa de DHL entre el paciente ambulatorio y el paciente hospitalizado no crítico.

En la figura 19 se observa la diferencia de la concentración sérica de creatin fosfoquinasa (CPK) entre los pacientes con influenza de acuerdo a la gravedad de la infección.

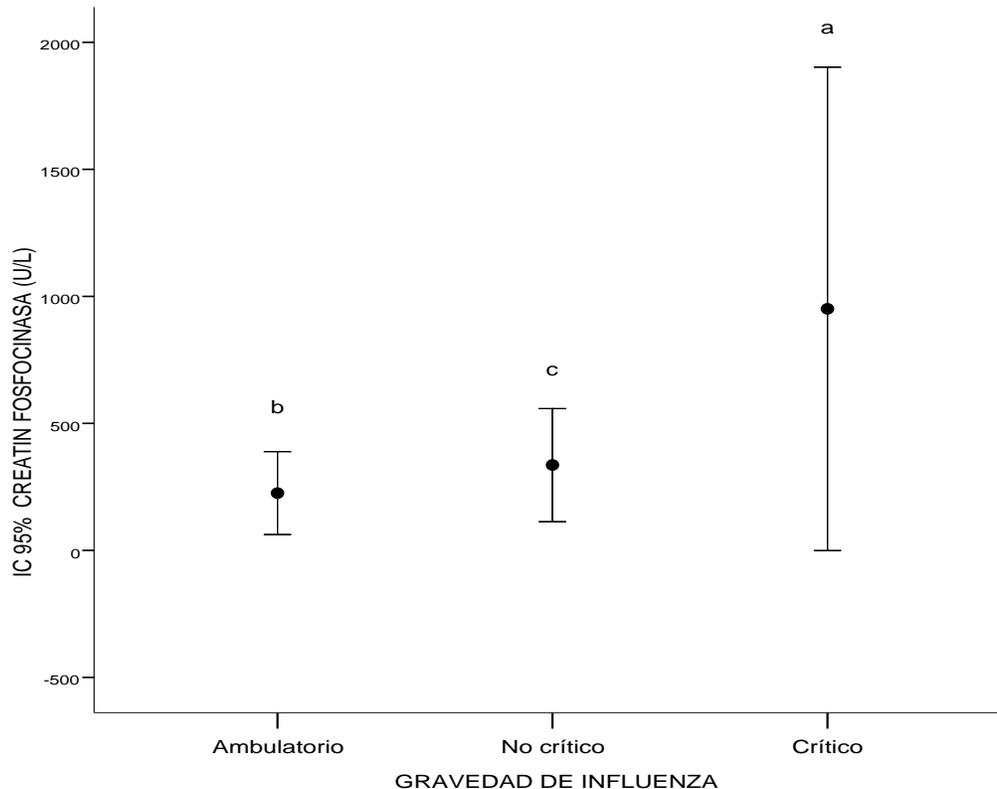


Figura 19. ANOVA de un factor. Diferencia de CPK (U/L) de acuerdo a gravedad de Influenza $p = 0.137$ Brown-Forsythe

Aunque la concentración sérica de CPK no muestra diferencia significativa de acuerdo a Brown Forsythe, se observa la tendencia de la diferencia entre la CPK de ambulatorios y no críticos con respecto a los críticos.

Se observa un intervalo de confianza muy grande de CPK de los pacientes críticos, esto se debe principalmente a la n de la muestra.



Se analizó el riesgo de obesidad de acuerdo a la gravedad de influenza de acuerdo al objetivo 2.

Se realizaron tablas de contingencia por chi cuadrada para determinar el riesgo de obesidad para gravedad de influenza.

En la tabla 14 se determinó la gravedad de influenza con el grupo de casos (hospitalizados) contra controles (ambulatorios).

Tabla 14. Tabla de contingencia obesidad - gravedad de influenza (ambulatorios contra hospitalizados)

Obesidad	Pacientes con Influenza		Total
	Hospitalizado	Ambulatorio	
Obeso	11	4	15
No obeso	16	14	30
Total	27	18	45

$P_{\text{Pearson}} = 0.19$

Los obesos tienen un riesgo (OR) 2.41 veces mayor que los no obesos para ser paciente con influenza grave. IC 95% (0.62, 9.29) por el método de Woolf.

Proporción de casos expuestos: 0.40 Proporción de controles expuestos: 0.22

En la tabla 15 se observa la tabla de contingencia donde se determinó el riesgo de obesidad para gravedad de influenza con los grupos de crítico y no crítico.



Tabla 15. Tabla de contingencia obesidad - gravedad de influenza (crítico contra no crítico)

Obesidad	Influenza grave		Total
	Crítico	No crítico	
Obeso	7	4	11
No obeso	8	8	16
Total	15	12	27

$p_{\text{Pearson}} = 0.48$

Los obesos tienen un riesgo (OR) 1.75 veces mayor que los no obesos para ser paciente crítico con Influenza. IC 95% (0.36, 8.42) por el método de Woolf.

En la tabla 16 se observa la tabla de contingencia donde se determinó el riesgo de obesidad para gravedad de influenza con los grupos crítico y ambulatorio.

Tabla 16. Tabla de contingencia obesidad - gravedad de influenza (crítico contra ambulatorio)

Obesidad	Pacientes con Influenza		Total
	Crítico	Ambulatorio	
Obeso	7	4	11
No obeso	8	14	22
Total	15	18	33

$p_{\text{Pearson}} = 0.138$

Los obesos tienen un riesgo (OR) 3.06 veces mayor que los no obesos para ser paciente crítico con Influenza. IC 95% (0.68, 13.78) por el método de Woolf.



2ª ETAPA DEL ANALISIS ESTADISTICO

ANALISIS DE CONCENTRACION DE CITOCINAS EN SUERO

Para el estudio y comprensión de la concentración de citocinas en suero en esta segunda etapa se consideró el contraste de acuerdo a tres factores (grupos), descritos a continuación:

Grupo 1: Pacientes con Influenza grave (que correspondieron a los mismos casos de la etapa 1).

Grupo 2: Pacientes con Influenza moderada (que correspondieron a los mismos controles de la etapa 1)

Grupo 3: Sujetos sin Influenza, pareados por sexo, edad e índice de masa corporal (IMC) con los pacientes de Influenza.

Quedaron incluidos 86 pacientes, 49 hombres (57%) y 37 mujeres (43%); con edad promedio de 34.6 ± 9.9 años. De los cuales 45 sujetos (52.3%) tuvieron Influenza A H1N1 2009 y 41 sujetos (47.7%) sin influenza como el tercer grupo.

En la tabla 17 se observa la frecuencia y porcentajes de los 3 grupos para el análisis de esta segunda etapa.

Tabla 17. Frecuencia y porcentaje de los tres grupos de gravedad de influenza.

GRAVEDAD DE INFLUENZA	FRECUENCIA n	PORCENTAJE (%)
Sin influenza	41	47.7
Influenza moderada	18	20.9
Influenza severa	27	31.4
Total	86	100.0

Se determinó la concentración de las citocinas en suero en su conjunto expresado en pg/ml y se realizó las pruebas de normalidad. Debido a la dispersión de los datos (desviaciones extremas, con sesgo a la derecha) y a las

desviaciones estándar tan amplios, se transformó las variables de citocinas a logaritmos.

Para buscar diferencias en la concentración de citocinas en suero entre pacientes obesos con respecto a los no obesos sin tomar en cuenta la gravedad de influenza, se realizó la prueba de *t* de Student donde no se observó diferencia estadística más que con la concentración sérica de IL-2 . La media de los no obesos fue de 0.25 ± 0.54 , de los obesos fue de 0.03 ± 0.30 ($p=0.020$).

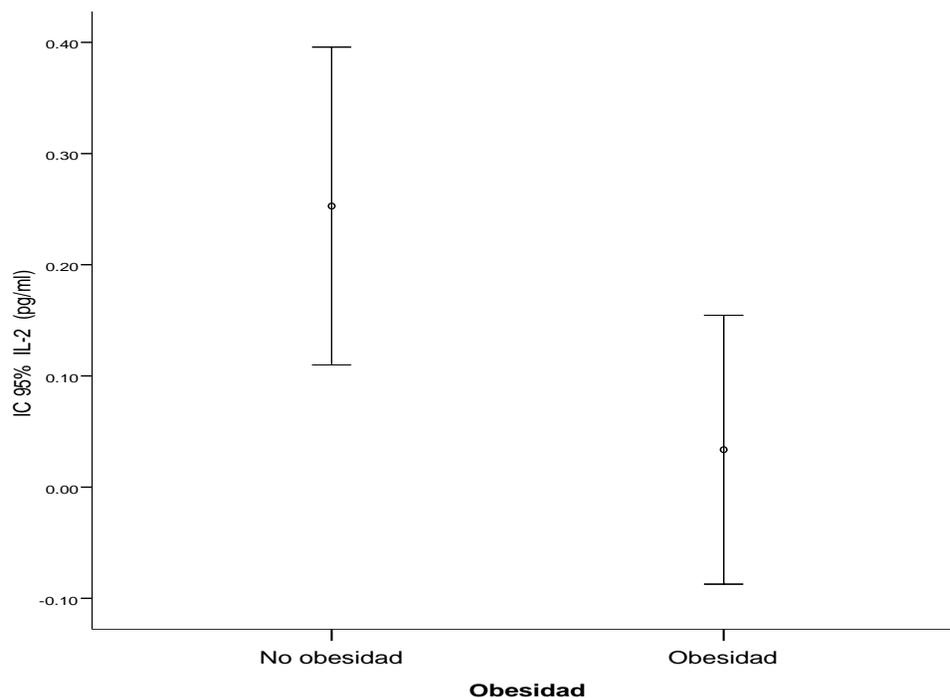


Figura 20. Prueba de *t* de Student. Concentración sérica de IL-2 en pacientes obesos con respecto a no obesos $p=0.020$

Al buscar la diferencia entre la concentración sérica de las citocinas con respecto a los grados diferentes de obesidad (grado I, II, III), incluso con sobrepeso y peso normal no se evidenció con el análisis de ANOVA ninguna diferencia significativa, probablemente por la *n* de la muestra.



Se calculó la magnitud del efecto de la concentración de citocinas respecto a la obesidad (tabla 18). Los valores de las medias y las desviaciones estándar de cada concentración sérica de citocina en logaritmo en base a la obesidad se encuentran en el anexo 12.

Tabla 18. Effect size de la concentración de citocinas con respecto a la obesidad

CITOCINA	EFFECT SIZE %	IC (95%)
IL 1b	19	-0.44, 0.80
IL 1ra	30	-0.33, 0.92
IL 2	63	-0.02, 1.25
IL 4	18	-0.80, 0.44
IL 5	34	-0.29, 0.96
IL 6	21	-0.42, 0.83
IL 7	34	-0.29, 0.96
IL 8	20	-0.81, 0.43
IL 9	12	-0.50, 0.74
IL 10	12	-0.74, 0.50
IL 12p70	24	-0.39, 0.86
IL 13	13	-0.49, 0.75
IL 15	10	-0.72, 0.52
IL 17	47	-0.16, 1.09
Eotaxina	10	-0.53, 0.71
FGF basic	20	-0.42, 0.82
GCSF	45	-0.18, 1.07
GMCSF	9	-0.71, 0.53
IFNG	6	-0.67, 0.57
IP 10	30	-0.92, 0.33
MCP1	22	-0.40, 0.84
MIP1a	32	-0.31, 0.94
MIP1b	16	-0.46, 0.78
RANTES	31	-0.32, 0.92
TNFa	16	-0.46, 0.78
VEGF	13	-0.50, 0.74
PDGF	9	-0.53, 0.71

La IL-2, IL 17 y GSF son las citocinas que tienen mayor magnitud del efecto en obesidad es decir, cuanto de la modificación de la concentración sérica de las citocinas puede explicarse por la obesidad. Las citocinas que tienen menor efecto de la obesidad son GM-CSF, IFN γ y PDGF.



ANOVA DE UN FACTOR.

Variable dependiente: concentración sérica de cada citocina.

Variable independiente: gravedad de influenza

Se realizó ANOVA de un factor, tomando como variable dependiente la concentración de cada citocina, en base a la gravedad de influenza. Las citocinas que **no presentaron diferencia significativa** de su concentración en suero entre estos grupos de gravedad de influenza y sujetos sin influenza fueron IL-1ra, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-15, IL-17, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES y PDGF.

Todas las demás citocinas, presentaron diferencia significativa de su concentración en suero, determinada la $p < 0.05$ con Brown-Forsythe. Se realizaron pruebas post hoc con Sheffé para determinar cuál de los grupos tenían diferencia significativa entre sí.

En las siguientes gráficas se marca con las letras a, b y c los factores principales.

En la tabla 19 se muestran los resultados de las citocinas con respecto a la gravedad de influenza que tuvieron diferencia estadística.



Tabla 19 Concentración sérica de citocinas de acuerdo a gravedad de influenza

CITOCINA	SIN INFLUENZA		INFLUENZA MODERADA		INFLUENZA GRAVE		p
	Media	IC 95%	Media	IC 95%	Media	IC 95%	
IL-1 β	0.34 ^b	(0.24, 0.48)	1.47 ^a	(0.81, 2.67)	1.32 ^a	(0.8, 2.16)	<0.001
IL-2	1.11 ^b	(0.91, 1.35)	2.87 ^a	(1.29, 6.38)	1.61 ^c	(0.99, 2.63)	0.041
IL-4	1.06 ^b	(0.88, 1.28)	2.41 ^b	(1.61, 3.6)	2.54 ^b	(1.75, 3.69)	<0.001
IL-6	0.98 ^b	(0.63, 1.52)	2.5 ^a	(5.88, 26.62)	12.2 ^a	(6.23, 23.88)	<0.001
IL-7	2.18 ^b	(1.49, 3.19)	7.46 ^a	(4.21, 13.2)	9.76 ^a	(6.69, 14.2)	<0.001
IL-8	4.28 ^b	(3.47, 5.28)	12.86 ^a	(13.52, 35.08)	21.78 ^a	(13.52, 35.08)	<0.001
IL-9	1.3 ^b	(0.96, 1.74)	2.76 ^c	(1.04, 7.33)	3.91 ^a	(1.78, 8.56)	0.041
IL-13	1.79 ^b	(1.34, 2.39)	2.18 ^c	(1.1, 4.3)	3.67 ^a	(2.4, 5.62)	0.05
B-FGF	1.0 ^b	(0.99, 1.01)	1.96 ^a	(0.98, 3.92)	1.61 ^c	(0.97, 2.65)	0.047
Eotaxina	13.5 ^b	(7.47, 24.6)	8.72 ^c	(2.45, 30.9)	2.67 ^a	(1.19, 6)	0.017
G-SCF	4.98 ^b	(3.36, 6.83)	20.73 ^a	(11.46, 37.51)	31.78 ^a	(22.2, 45.5)	<0.001
IFN γ	58.93 ^b	(49.8, 69.73)	98.4 ^c	(58.35, 165.9)	100.73 ^a	(64.133, 158.23)	0.05
MCP-1	6.67 ^b	(4.99, 8.92)	26.32 ^a	(14.37, 48.2)	27.71 ^a	(13.78, 55.73)	<0.001
TNF α	1.17 ^b	(0.78, 1.76)	2.48 ^c	(1.12, 5.49)	7.48 ^a	(4.2, 13.3)	<0.001
VEGF	4.92 ^b	(3.25, 7.44)	22.9 ^a	(9.99, 52.47)	45.55 ^a	(23.25, 89.23)	<0.001

Estos mismos resultados que muestran la diferencia estadística entre la concentración sérica de las citocinas con respecto a la gravedad de influenza están esquematizados en las siguientes figuras de la 21 a la 37.

En la figura 21 se muestra la concentración sérica de IL-1 β con respecto a la gravedad de influenza.

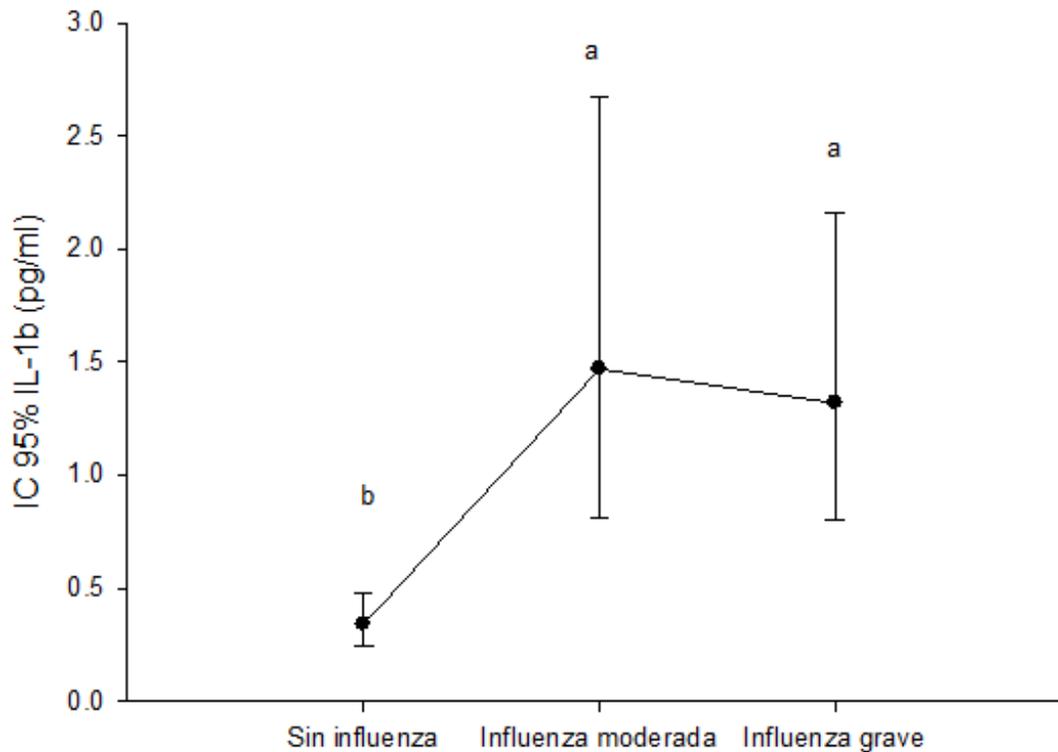


Figura 21. ANOVA de IL-1b de acuerdo a gravedad de influenza $p < 0.001$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que la concentración sérica de IL-1 β tanto en pacientes con influenza severa como en los pacientes con influenza moderada se incrementa significativamente con respecto a los sujetos sin influenza ($p < 0.001$)

En la figura 22 se muestra la concentración sérica de IL-2 con respecto a la gravedad de influenza.

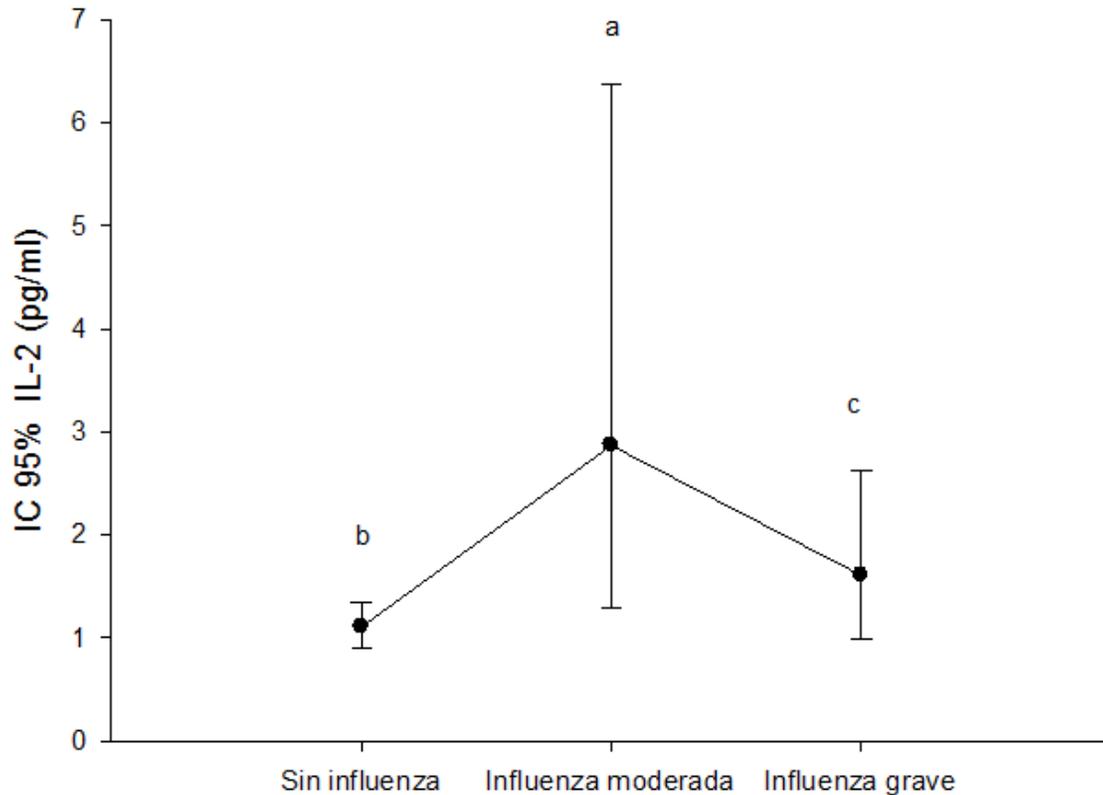


Figura 22. ANOVA de IL-2 de acuerdo a gravedad de influenza $p=0.041$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que la concentración sérica de IL-2 en pacientes con influenza moderada es mayor significativamente de los sujetos sin influenza ($p<0.001$), sin embargo no hubo diferencia significativa entre los pacientes con influenza moderada y grave.

En la figura 23 se muestra la concentración sérica de IL-4 con respecto a la gravedad de influenza.

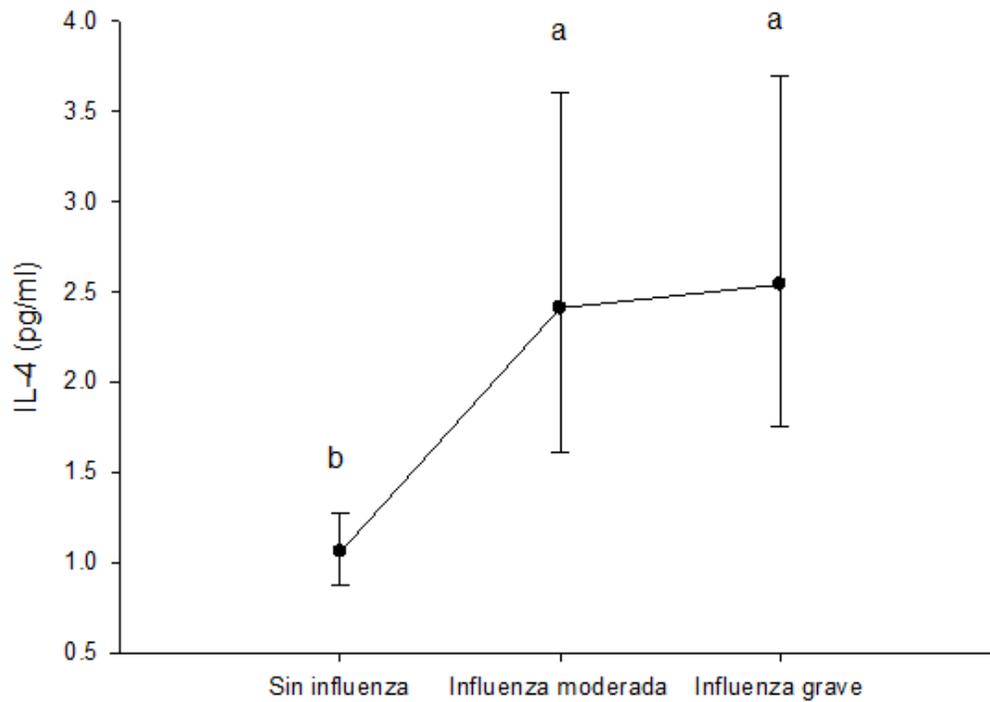


Figura 23. ANOVA de IL-4 de acuerdo a gravedad de influenza $p < 0.001$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que la concentración sérica de IL-4 tanto en pacientes con influenza grave como en los pacientes con influenza moderada se incrementan significativamente con respecto a los sujetos sin influenza ($p < 0.001$)

No se presenta diferencia significativa entre los pacientes con influenza moderada y grave.

En la figura 24 se muestra la concentración sérica de IL-6 con respecto a la gravedad de influenza.

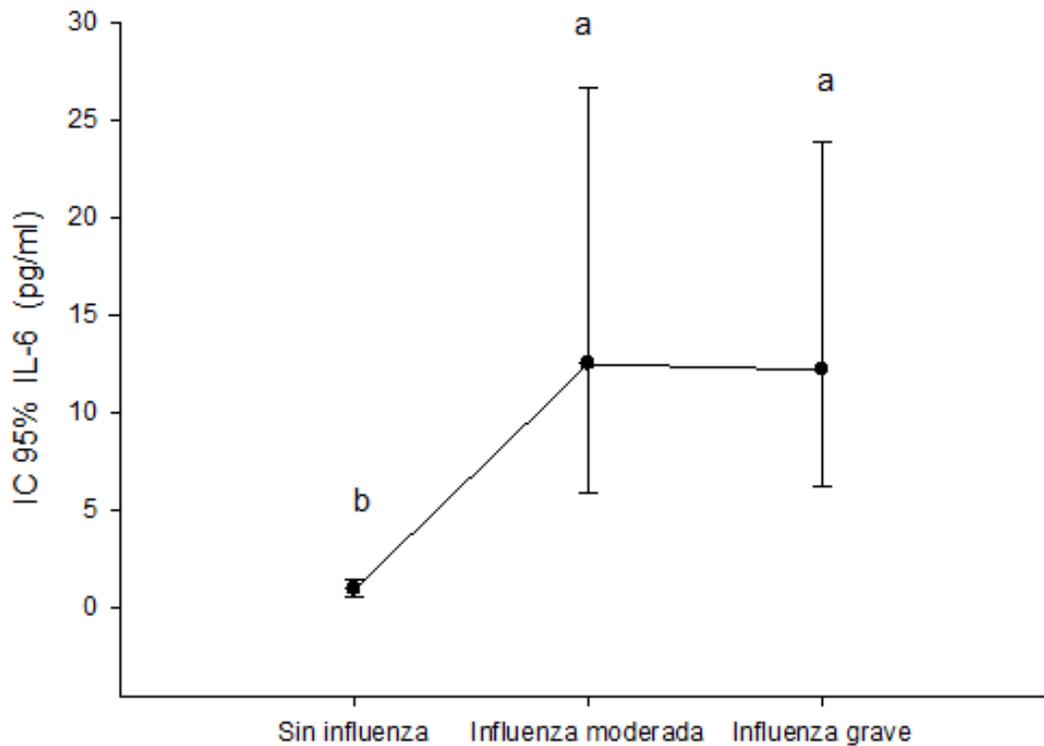


Figura 24. ANOVA de IL-6 de acuerdo a gravedad de influenza $p < 0.001$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que la concentración sérica de IL-6 tanto en pacientes con influenza grave como en los pacientes con influenza moderada se incrementan significativamente con respecto a los sujetos sin influenza ($p < 0.001$)

No se presenta diferencia significativa entre los pacientes con influenza moderada y grave.

En la figura 25 se muestra la concentración sérica de IL-7 con respecto a la gravedad de influenza.

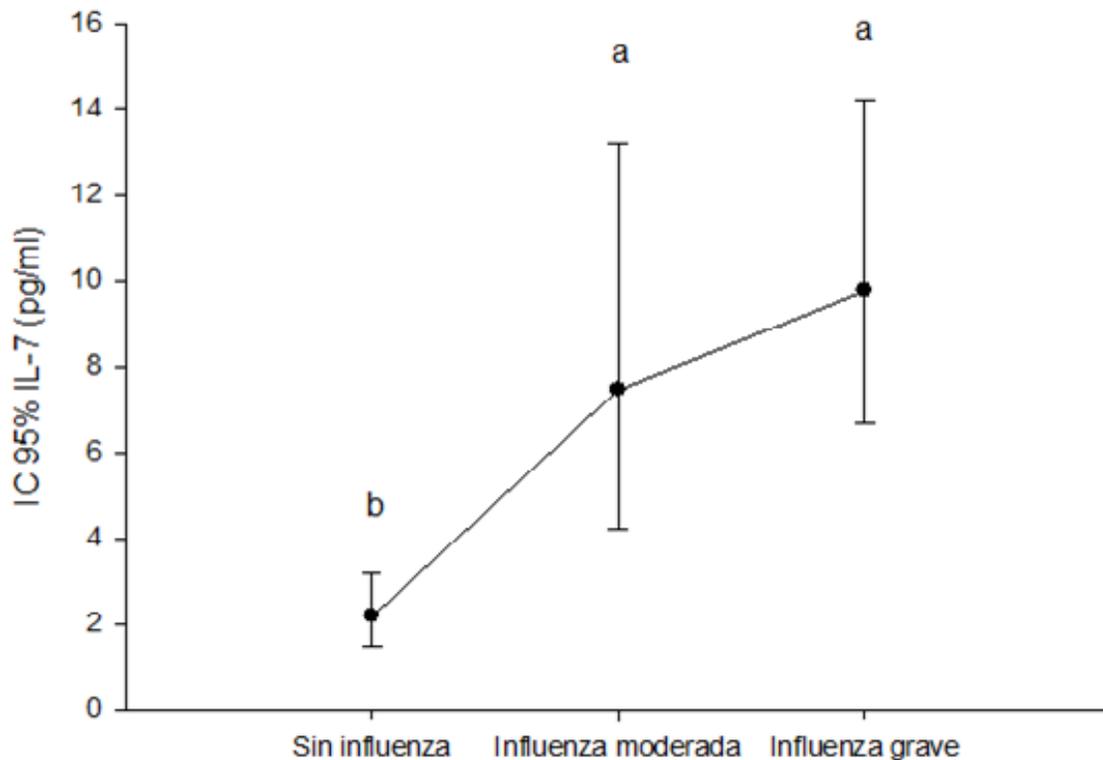


Figura 25. ANOVA de IL-7 de acuerdo a gravedad de influenza $p < 0.001$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que la concentración sérica de IL-7 tanto en pacientes con influenza grave como en los pacientes con influenza moderada se incrementan significativamente con respecto a los sujetos sin influenza ($p < 0.001$)

No se presenta diferencia significativa entre los pacientes con influenza moderada y grave.

En la figura 26 se muestra la concentración sérica de IL-8 con respecto a la gravedad de influenza.

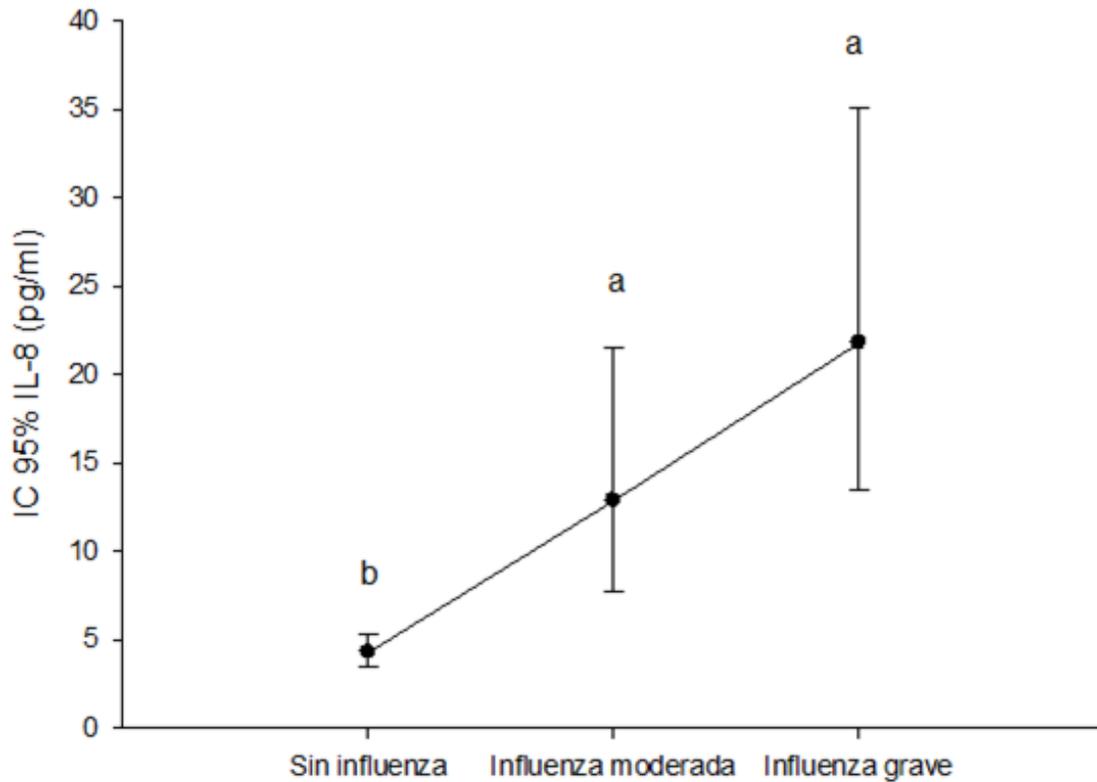


Figura 26. ANOVA de IL-8 de acuerdo a gravedad de influenza $p < 0.001$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que la concentración sérica de IL-4 tanto en pacientes con influenza grave como en los pacientes con influenza moderada se incrementan significativamente con respecto a los sujetos sin influenza ($p < 0.001$)

No se presenta diferencia significativa entre los pacientes con influenza moderada y grave.

En la figura 27 se muestra la concentración sérica de IL-9 con respecto a la gravedad de influenza.

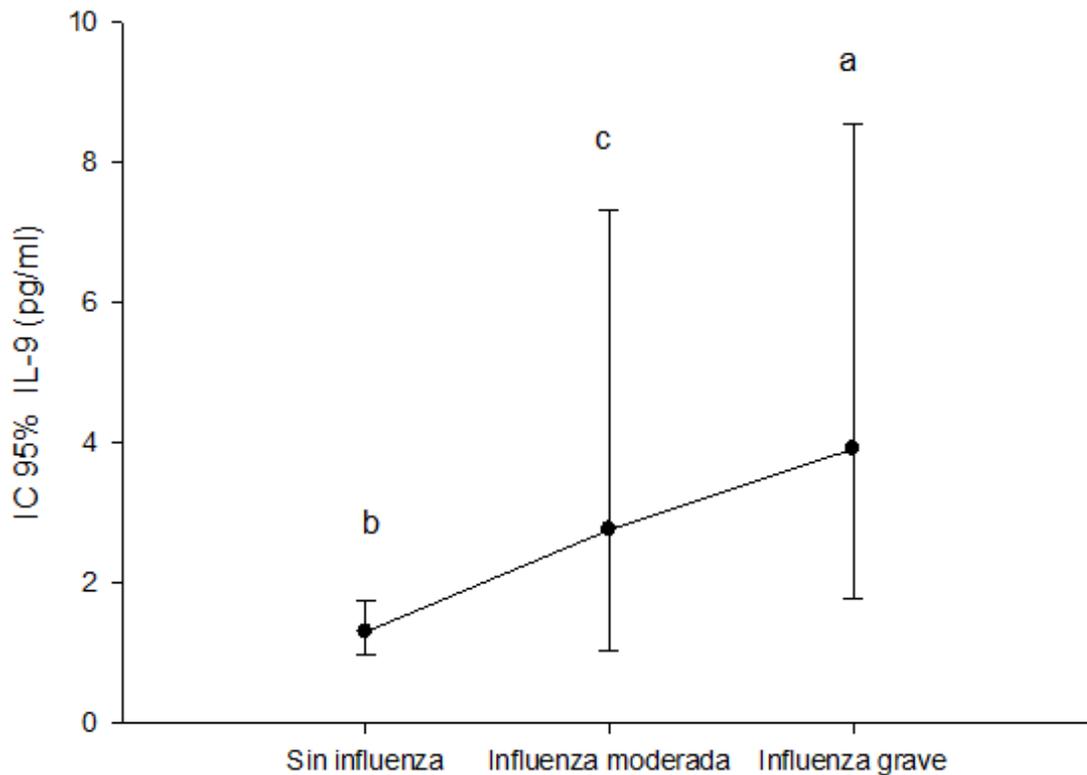


Figura 27. ANOVA de IL-9 de acuerdo a gravedad de influenza $p=0.041$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que la concentración sérica de IL-9 en pacientes con influenza grave se incrementan significativamente con respecto a los sujetos sin influenza ($p=0.021$)

Aunque gráficamente se observa tendencia de incremento de IL-9 en los pacientes con influenza moderada, con respecto a los sujetos sin influenza, no se demostró diferencia significativa, probablemente por la n de la muestra.

En la figura 28 se muestra la concentración sérica de IL-13 con respecto a la gravedad de influenza.

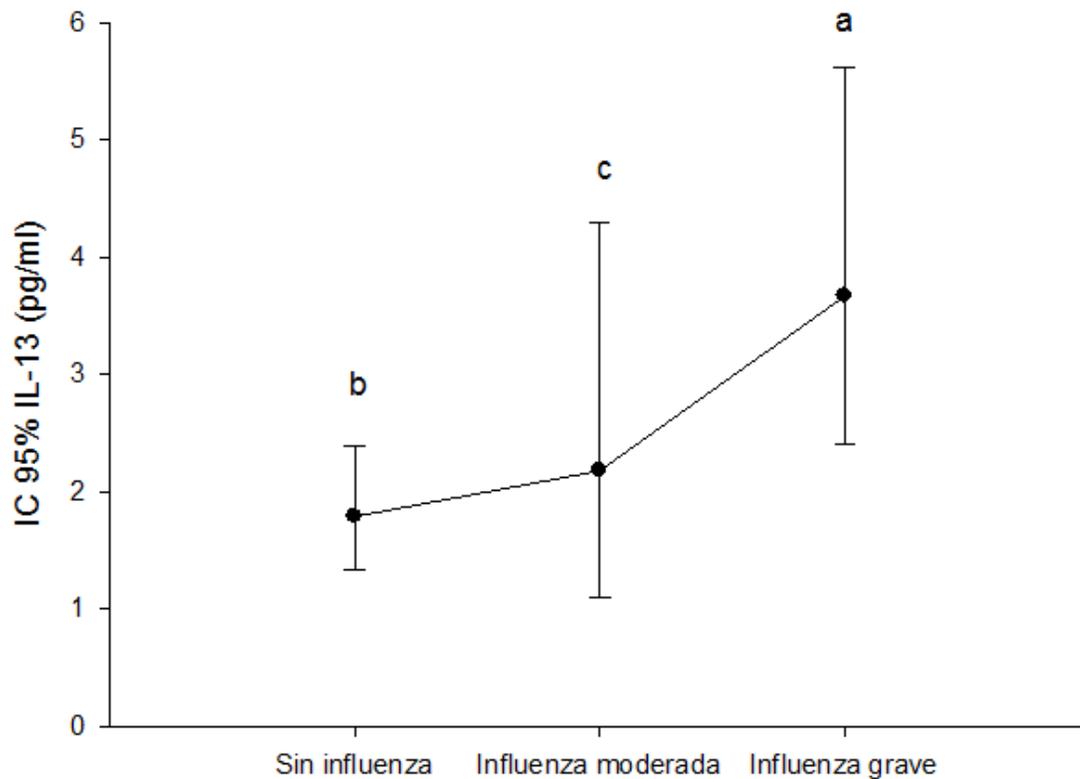


Figura 28. ANOVA de IL-13 de acuerdo a gravedad de influenza $p=0.05$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que la concentración sérica de IL-13 en pacientes con influenza grave se incrementan significativamente con respecto a los sujetos sin influenza ($p=0.029$)

No se mostró diferencia significativa de IL-9 en los pacientes con influenza moderada, con respecto a los sujetos sin influenza ni con los pacientes con influenza grave.

En la figura 29 se muestra la concentración sérica de eotaxina con respecto a la gravedad de influenza.

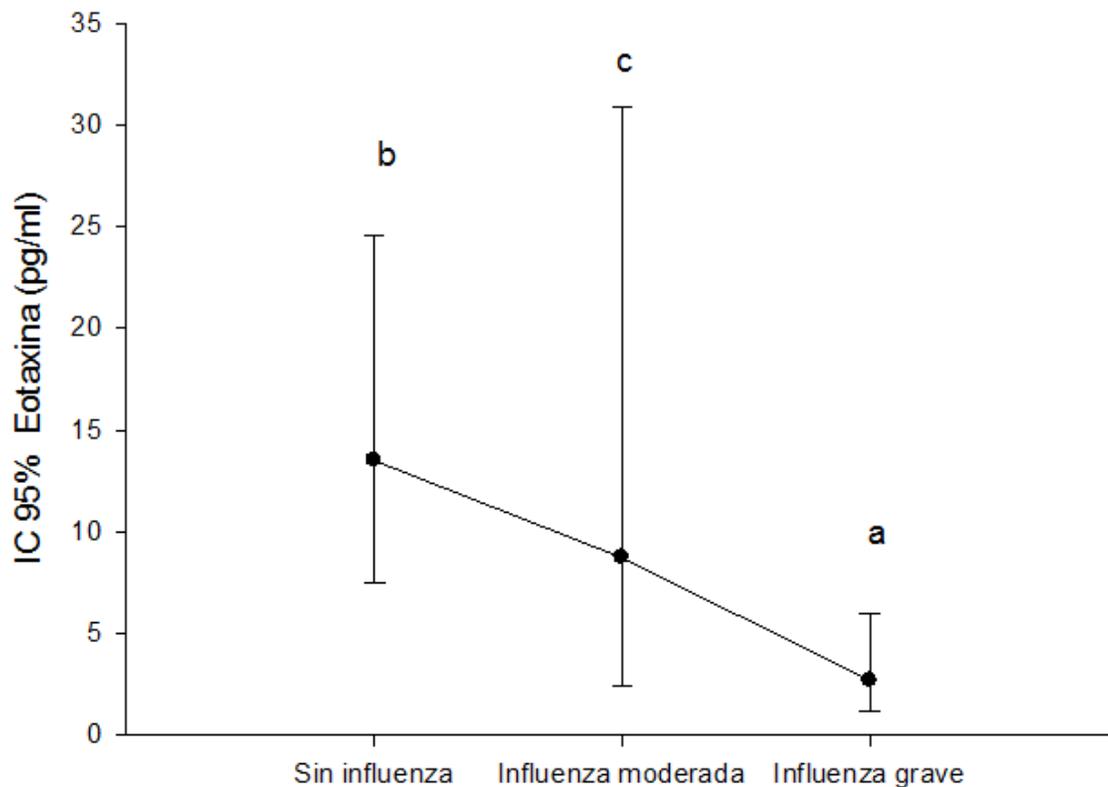


Figura 29. ANOVA de Eotaxina de acuerdo a gravedad de influenza $p=0.017$

Por la prueba post hoc de Scheffé se encontró disminución significativa de la concentración sérica de eotaxina en los pacientes con influenza grave con respecto a los sujetos sin influenza ($p=0.010$). A mayor gravedad de influenza, menor concentración de eotaxina.

Aunque se observa una tendencia de disminución de la eotaxina en los pacientes con influenza moderada, no se mostró diferencia significativa con respecto a los otros dos grupos.

En la figura 30 se muestra la concentración sérica del factor de crecimiento de fibroblastos básico con respecto a la gravedad de influenza.

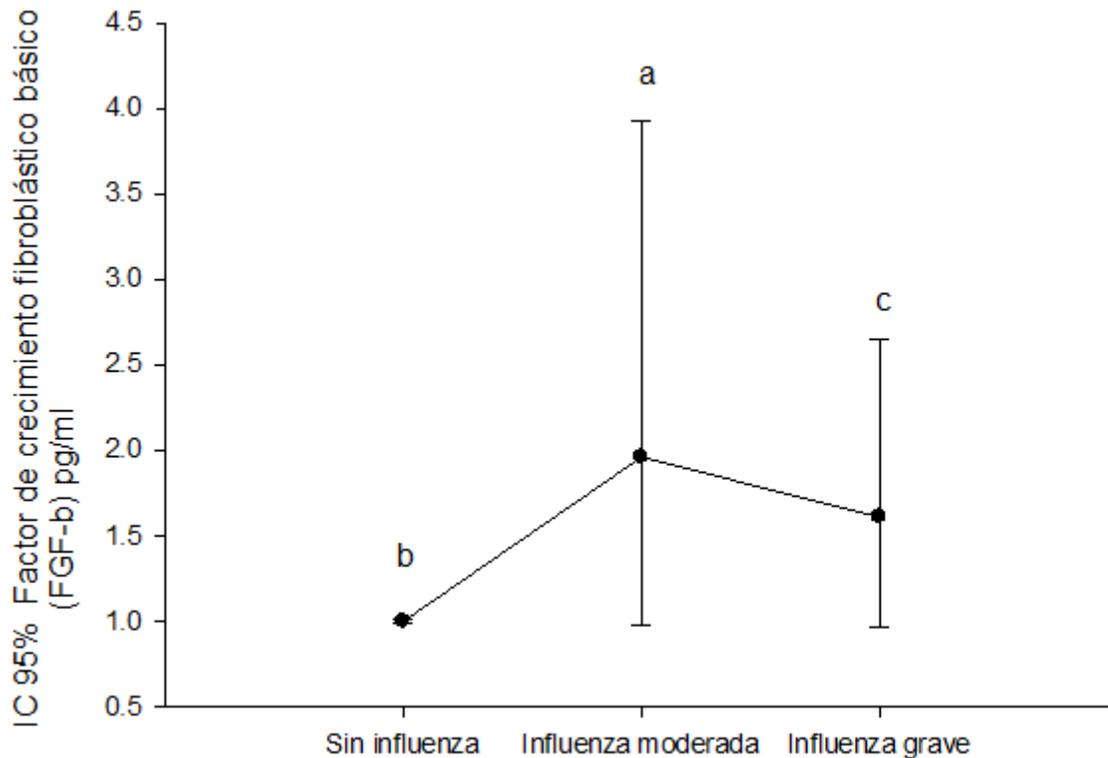


Figura 30. ANOVA de FGF-basic de acuerdo a gravedad de influenza $p=0.047$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que los pacientes con influenza moderada tienen mayor concentración de FGF-basic con respecto a los sujetos sin influenza ($p=0.047$).

No hubo diferencia significativa de los de influenza grave con respecto a los otros dos grupos.

En la figura 31 se muestra la concentración del factor estimulante de colonias de granulocitos con respecto a la gravedad de influenza.

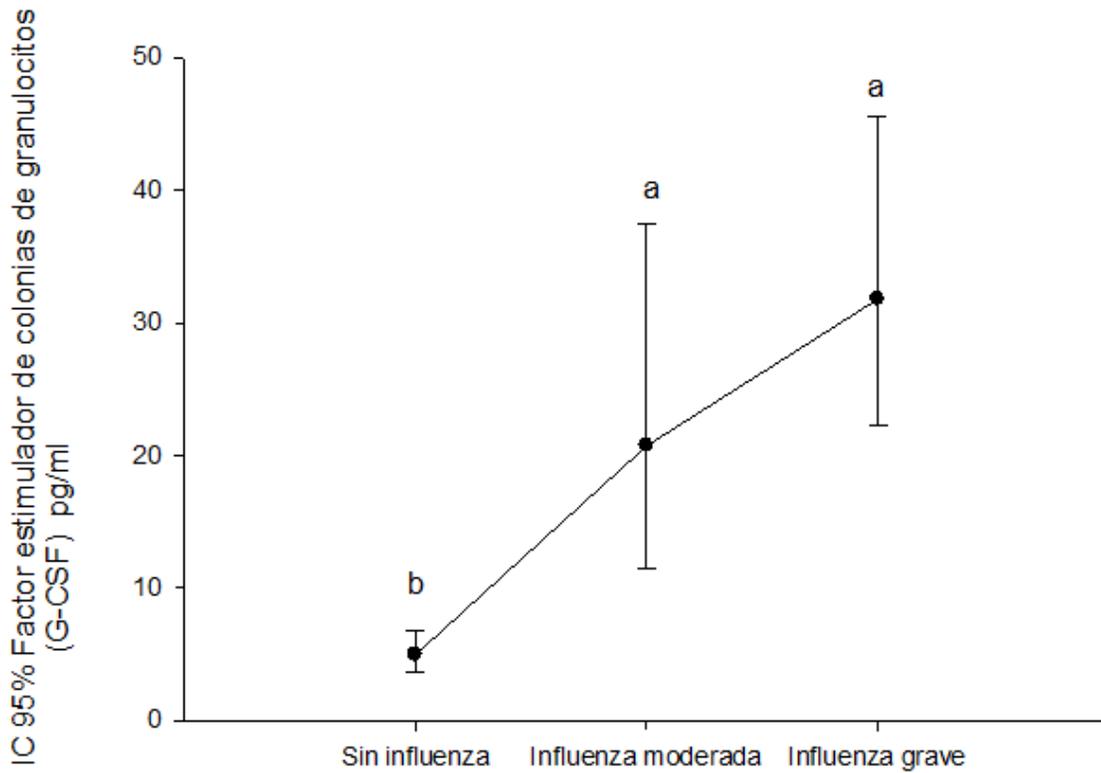


Figura 31. ANOVA de G-CSF de acuerdo a gravedad de influenza $p < 0.001$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que la concentración sérica de G-CSF tanto en pacientes con influenza grave como en los pacientes con influenza moderada se incrementan significativamente con respecto a los sujetos sin influenza ($p < 0.001$)

No se presentó diferencia significativa entre los pacientes con influenza moderada y grave.

En la figura 32 se muestra la concentración sérica de interferón γ y con respecto a la gravedad de influenza

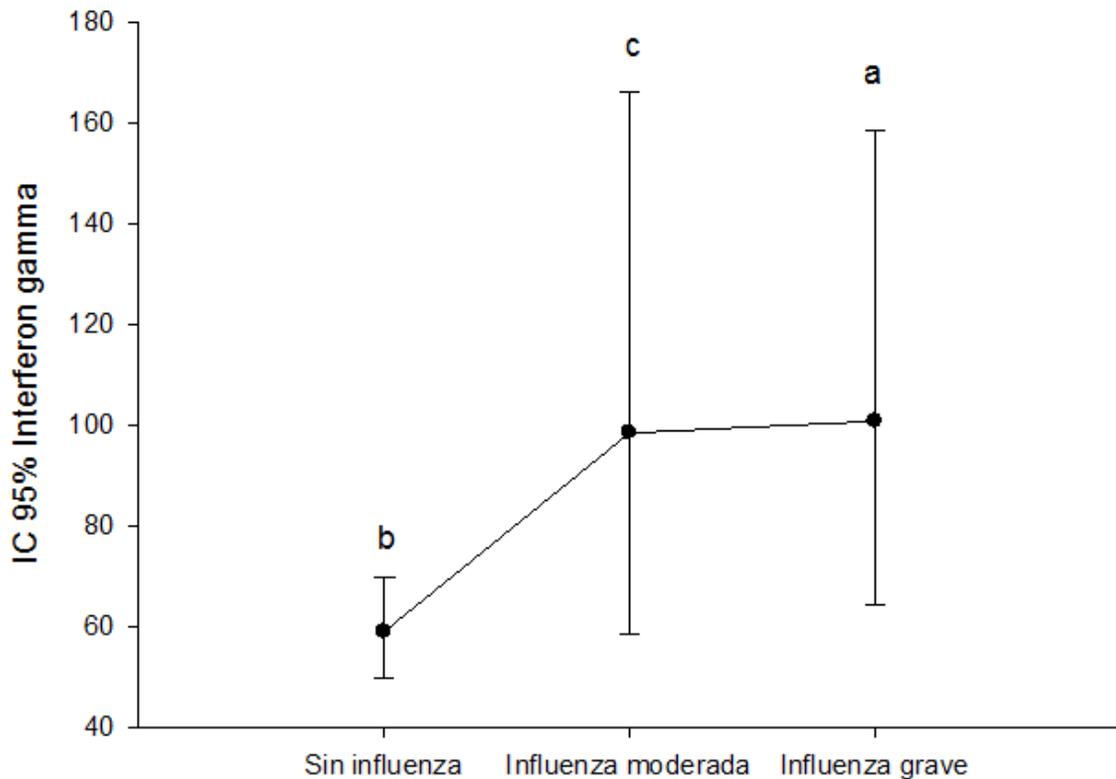


Figura 32. ANOVA de IFN- γ de acuerdo a gravedad de influenza $p < 0.05$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que la concentración sérica de IFN γ en pacientes con influenza grave se incrementa significativamente con respecto a los sujetos sin influenza ($p = 0.05$)

La concentración de IFN γ de los pacientes con influenza moderada no fue diferente a los pacientes con influenza grave.

En la figura 33 se muestra la concentración sérica del inductor de proteína 10 con respecto a la gravedad de influenza.

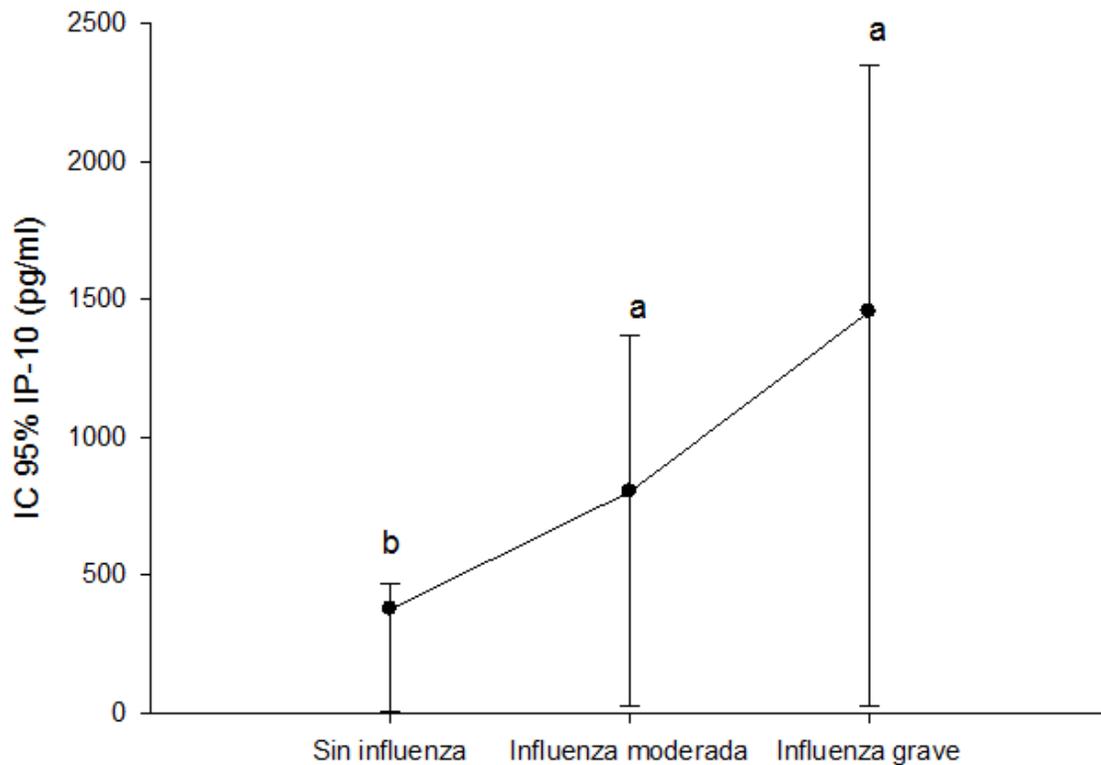


Figura 33. ANOVA de IP-10 de acuerdo a gravedad de influenza $p < 0.001$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que las concentraciones séricas de IP-10 se incrementan significativamente tanto en pacientes con influenza grave ($p < 0.001$) como en los pacientes con influenza moderada ($p = 0.026$) con respecto a los sujetos sin influenza.

No se presentó diferencia significativa entre los pacientes con influenza moderada y grave.

En la figura 34 se muestra la concentración sérica de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 con respecto a la gravedad de influenza.

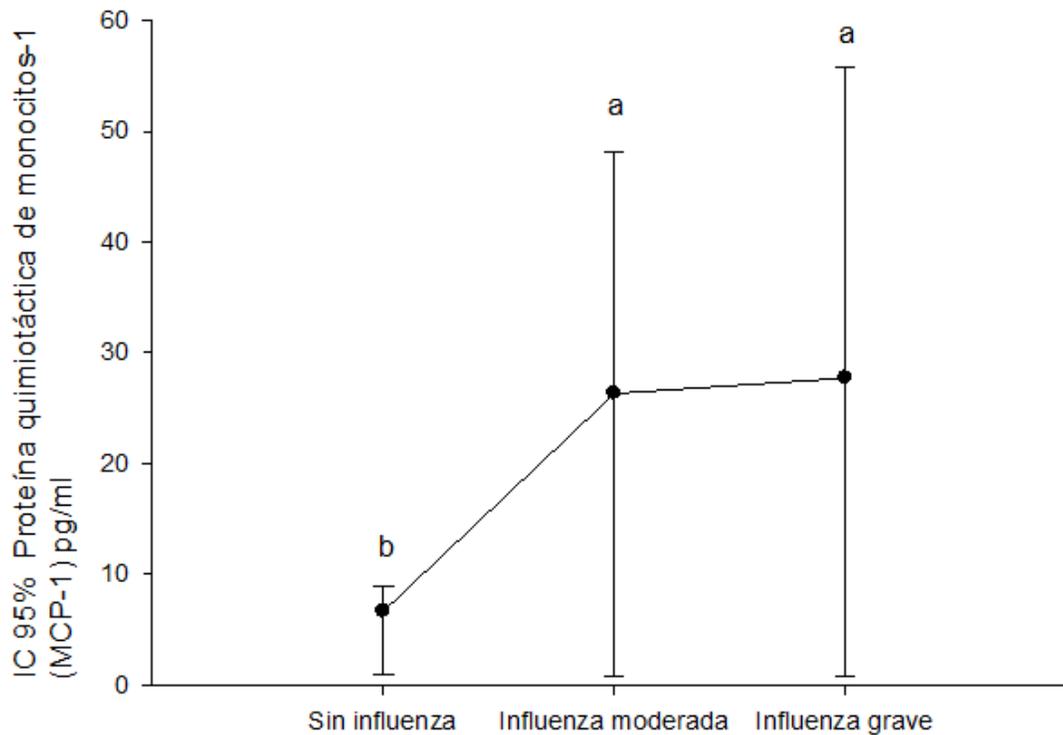


Figura 34. ANOVA de MCP-1 de acuerdo a gravedad de influenza $p < 0.001$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que las concentraciones séricas de MCP-1 se incrementan significativamente tanto en pacientes con influenza grave ($p < 0.001$) como en los pacientes con influenza moderada ($p = 0.002$) con respecto a los sujetos sin influenza.

No se presentó diferencia significativa entre los pacientes con influenza moderada y grave.

En la figura 35 se muestra la concentración sérica del factor de necrosis tumoral alfa con respecto a la gravedad de influenza.

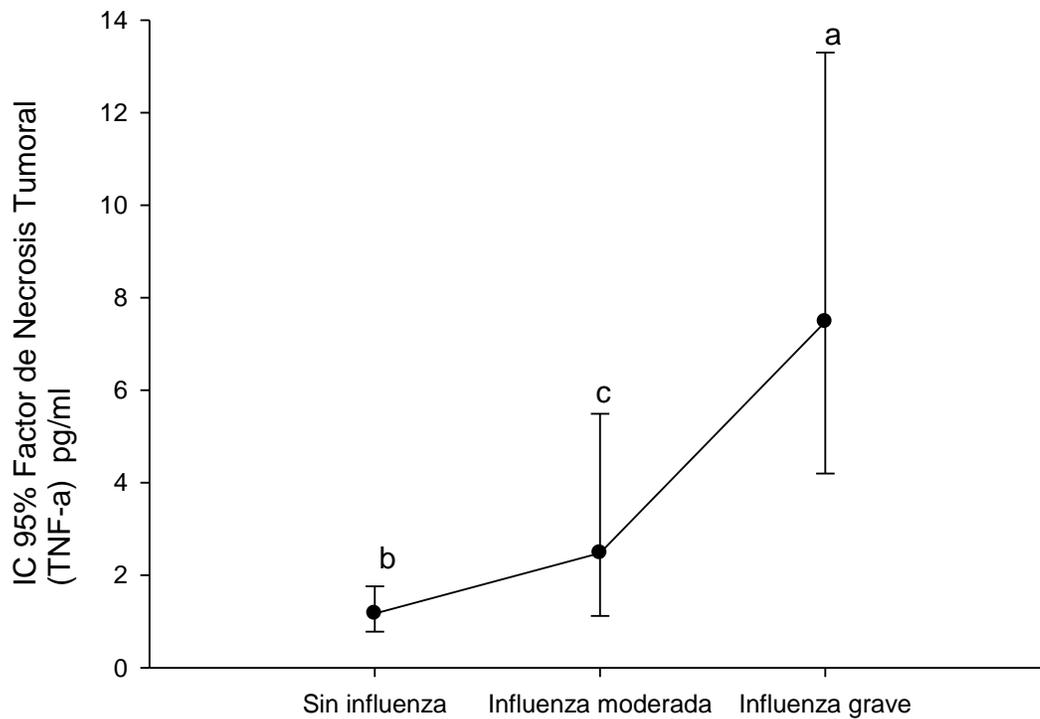


Figura 35. ANOVA de TNF- α de acuerdo a gravedad de influenza $p < 0.001$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que las concentraciones séricas de TNF- α se incrementan significativamente en pacientes con influenza grave ($p < 0.001$) con respecto a los sujetos sin influenza.

No se presentó diferencia significativa entre los pacientes con influenza moderada con ninguno de los dos grupos.

En la figura 36 se muestra la concentración sérica del factor de crecimiento endotelial vascular con respecto a la gravedad de influenza.

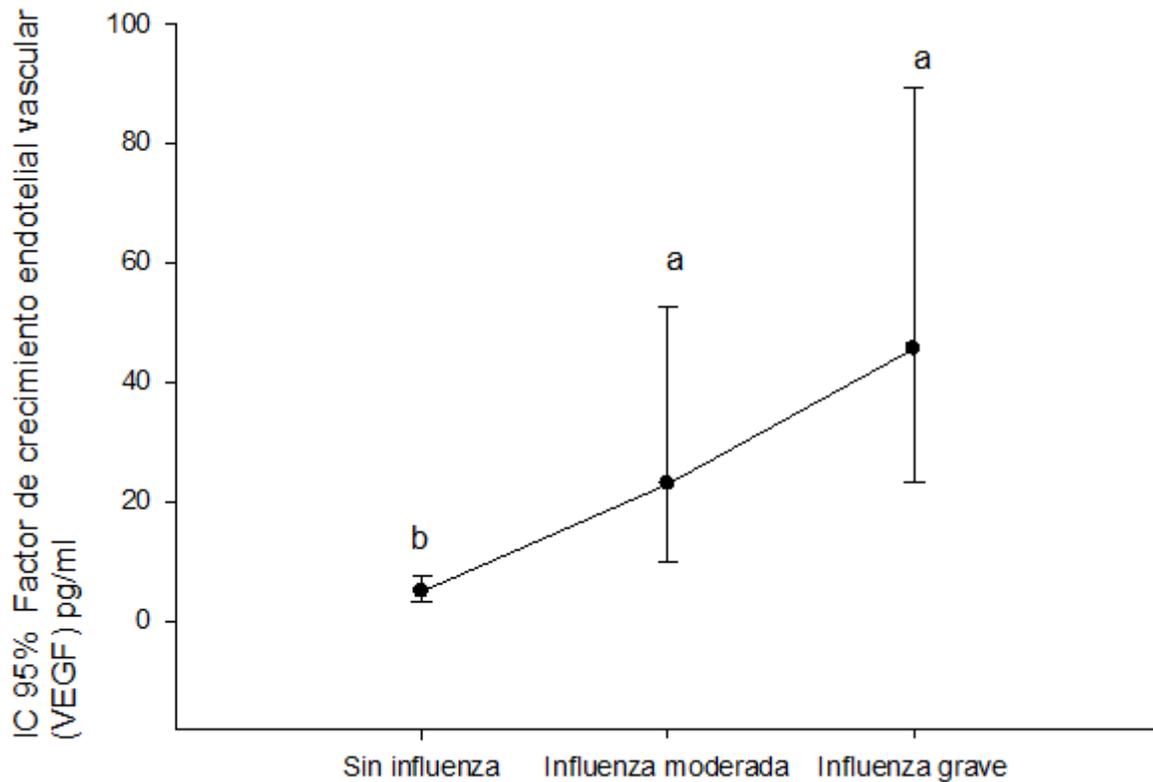


Figura 36. ANOVA de VEGF de acuerdo a gravedad de influenza $p < 0.001$

Por la prueba post hoc de Scheffé se muestra que las concentraciones séricas de VEGF se incrementan significativamente tanto en pacientes con influenza grave ($p < 0.001$) como en los pacientes con influenza moderada ($p = 0.003$) con respecto a los sujetos sin influenza.

No se presentó diferencia significativa entre los pacientes con influenza moderada y grave.



ANALISIS DE FACTORES LATENTES DE LA CONCENTRACION SERICA DE CITOCINAS

Se analizaron los resultados de las concentraciones séricas de citocinas de todos los pacientes. En la tabla 16 se observan los descriptivos univariados en cuanto a media y desviación estándar de cada una de la concentración sérica de citocinas de todos los pacientes con y sin influenza para determinar posteriormente comunalidad en cuanto a gravedad de influenza así como a clasificación de IMC por la OMS.

Se analizaron las concentraciones séricas de citocinas nuevamente en logaritmo por la desviación estándar tan amplia entre los resultados.

En la medida de adecuación muestral de Kaiser Meyer-Olkin (KMO) no hubo significancia estadística, mientras que en la prueba de esfericidad de Bartlett entre estas citocinas sí se observó significancia estadística < 0.001 .

Se realizó la matriz de correlaciones con covarianza anti-imagen y correlación anti-imagen. La extracción de la matriz de correlación se puede observar en el anexo 13. En la correlación anti-imagen (misma citocina), las citocinas se reportaron >0.9 cerca a 1.0 por lo que sí es adecuado realizar factores.

Mediante el método de extracción, se realizó el análisis de componentes principales. En este análisis de **comunalidades** se extrae el porcentaje de varianza de cada una de la concentración de citocinas correlacionada con la gravedad de influenza e IMC. (tabla 20)



Tabla 20. Comunalidades de citocinas

	Inicial	Extracción
log_IL1b	1.000	.830
log_IL1ra	1.000	.766
log_IL2	1.000	.726
log_IL4	1.000	.806
log_IL5	1.000	.733
log_IL6	1.000	.783
log_IL7	1.000	.756
log_IL8	1.000	.846
log_IL9	1.000	.665
log_IL12p70	1.000	.794
log_IL13	1.000	.660
log_IL15	1.000	.823
log_IL17	1.000	.781
log_EOTAXINA	1.000	.699
log_FGFbasic	1.000	.831
log_GCSF	1.000	.737
log_GMCSF	1.000	.880
log_IFNG	1.000	.870
log_IP10	1.000	.665
log_MCP1	1.000	.661
log_MIP1a	1.000	.889
log_MIP1b	1.000	.799
log_RANTES	1.000	.910
log_TNFa	1.000	.646
log_VEGF	1.000	.574
log_PDGF	1.000	.712
log_IL10	1.000	.473

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

Donde se observó que las citocinas que explican la mayor varianza extraída son IL-1 β , IL-4, IL-8, IL 15, FGF, GM-CSF, IFN γ , MIP-1 α y RANTES. Las comunalidades muestran el porcentaje de varianza extraída de cada uno de los factores. Los factores expresan diferentes dimensiones y pueden ser representados como ejes cartesianos con la limitación que podremos entender únicamente 3 dimensiones o ejes para efectos gráficos.

La IL-10 mostró la menor varianza extraída (47%).



Los valores propios (eigen valores) se muestran en la tabla 21. Se observa que hasta el cuarto componente se obtiene una varianza acumulada de 75.2%. En otras palabras, con solo cuatro variables creadas estamos explicando la varianza de 27 concentraciones séricas de citocinas.

**Tabla 21. Varianza total explicada de los componentes o factores.
Método de extracción: Análisis de Componentes principales.**

Componente	Eigenvalores iniciales			Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	14.152	52.415	52.415	7.269	26.924	26.924
2	3.203	11.863	64.278	6.078	22.511	49.435
3	1.745	6.464	70.741	4.927	18.248	67.683
4	1.215	4.502	75.243	2.041	7.560	75.243
5	.988	3.659	78.902			
6	.778	2.883	81.785			
7	.656	2.431	84.217			
8	.528	1.957	86.174			
9	.483	1.787	87.961			
10	.420	1.557	89.518			
11	.365	1.353	90.871			
12	.353	1.309	92.180			
13	.307	1.138	93.318			
14	.262	.971	94.289			
15	.229	.850	95.138			
16	.204	.757	95.895			
17	.169	.626	96.521			
18	.160	.593	97.114			
19	.155	.574	97.688			
20	.127	.472	98.160			
21	.115	.427	98.587			
22	.093	.345	98.931			
23	.091	.339	99.270			
24	.069	.257	99.527			
25	.061	.225	99.753			
26	.040	.147	99.899			
27	.027	.101	100.000			

Por lo que se escogieron estos primeros 4 componentes.

En la figura 37, se observa el gráfico de sedimentación donde se puede apreciar el peso de los 4 primeros componentes para explicar el 75.2% de la correlación buscada.

Gráfico de sedimentación

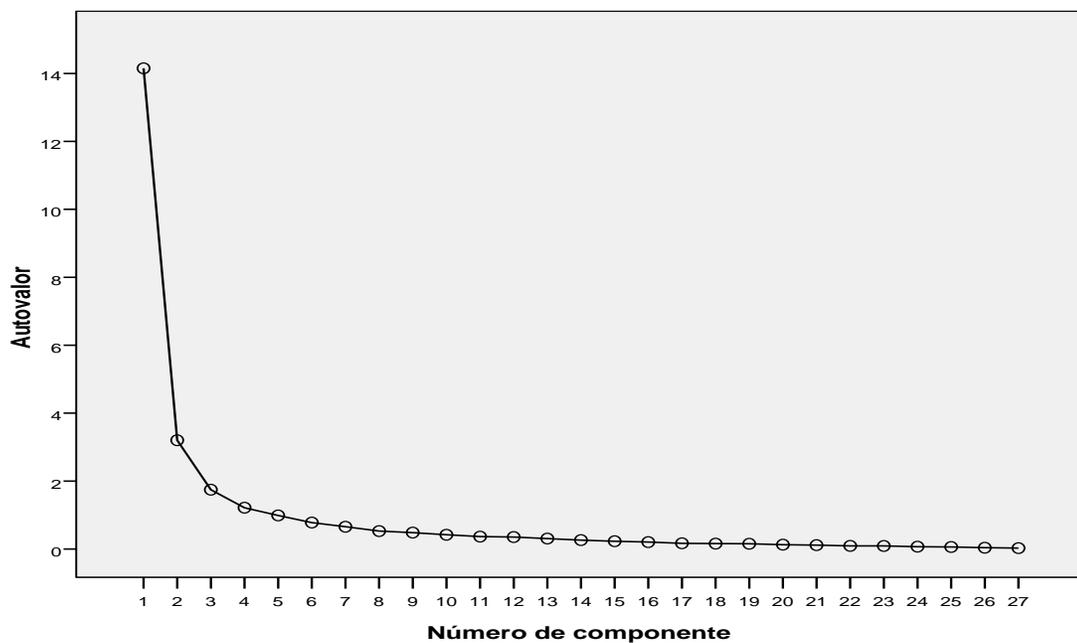


Figura 37. Gráfico de sedimentación de los componentes de concentración de citocinas de acuerdo a gravedad de influenza e IMC.

En el anexo 14 se observa la matriz de correlaciones sin rotar de la concentración de citocinas con gravedad de influenza e IMC.

En la tabla 22 se observa la matriz de correlaciones rotada (por el método de rotación: normalización Varimax con Kaiser), de la cual se tomaron los datos para distribuir a las diferentes citocinas en los 4 factores.



Tabla 22. Matriz de componentes rotados. Método de extracción: Análisis de componentes principales. Método de rotación: Normalización Varimax con Kaiser. La rotación ha convergido en 7 iteraciones.

	Componente			
	1	2	3	4
log_IL1b	.729	.294	.457	.060
log_IL1ra	.579	.517	.396	-.086
log_IL2	.458	.469	.545	-.020
log_IL4	.771	.293	.350	.057
log_IL5	.229	.762	.292	.125
log_IL6	.860	.089	.165	.095
log_IL7	.577	.251	.251	.545
log_IL8	.850	.154	.025	.315
log_IL9	.325	.295	.536	.430
log_IL12p70	.307	.450	.525	.471
log_IL13	.187	.346	.410	.581
log_IL15	.238	.107	.865	.082
log_IL17	.352	.656	.418	.226
log_EOTAXINA	.050	.707	.283	-.342
log_FGFbasic	.284	.310	.782	.205
log_GCSF	.822	.010	.160	.189
log_GMCSF	.220	.141	.888	.150
log_IFNG	.620	.402	.568	-.033
log_IP10	.652	.264	.118	.395
log_MCP1	.749	-.010	.311	-.050
log_MIP1a	.276	.826	.350	.090
log_MIP1b	.221	.831	.149	.193
log_RANTES	.070	.923	.180	.143
log_TNFa	.672	.188	.392	.070
log_VEGF	.579	.048	.125	.470
log_PDGF	.461	.632	.089	.304
log_IL10	.171	-.619	.137	-.205

Después de realizar el análisis de factores latente con rotación Varimax se decide proporcionarle un nombre a cada factor de acuerdo a las correlaciones > 0.5 encontradas en la matriz de estructura como se puede ver en la tabla 23.



Tabla 23 Distribución de citocinas de acuerdo a cada factor

FACTOR 1 CITOTOXICIDAD	FACTOR 2 ANTIINFLAMACIÓN	FACTOR 3	FACTOR 4 IL-13 E IL-7
IL1b IL1ra IL4 IL6 IL7 IL8 GCSF IFNG IP10 MCP1 TNFa VEGF	IL5 IL17 EOTAXINA MIP1a MIP1b RANTES PDGF IL10	IL2 IL9 IL12p70 IL15 FGFbasic GMCSF	IL13 IL-7



ANOVA CON CONTRASTES ORTOGONALES

Variable dependiente: Factor 1, 2, 3 y 4.

Variable independiente: Gravedad de influenza

Se contrastó cada uno de los factores y la gravedad de influenza. Los resultados descriptivos se reportan en el anexo 15.

Se presentó diferencia estadística en los factores 1, 2 y 4 como se observa en la tabla 24.

Tabla 24. Contrastes de cada factor con respecto a la gravedad de influenza

Factor	p
Factor 1 Citotoxicidad	< 0.001 *
Factor 2 Anti-inflamación	0.010 *
Factor 3	0.474
Factor 4 IL-13 e IL-7	<0.001 *

*Brown-Forsythe

La interacción inter-grupos e intra-grupos se encuentra en el anexo 16. La suma de los totales de cada factor está centrado en cero y el total de la desviación estándar es 1 para cada factor, por lo que la varianza de z es 1.

Se realizaron los coeficientes para los contrastes ortogonales donde se evaluaron dos contrastes como se puede observar en la tabla 25:

Contraste 1: pacientes sin influenza vs pacientes con influenza;

Contraste 2: pacientes con influenza moderada vs influenza grave.

Tabla 25 Coeficientes de los contrastes ortogonales.

Contraste	Análisis por gravedad de influenza		
	Sin influenza	Influenza moderada	Influenza grave
1	2	-1	-1
2	0	-1	1

En la figura 38 está representado el gráfico de los contrastes ortogonales del factor 1.

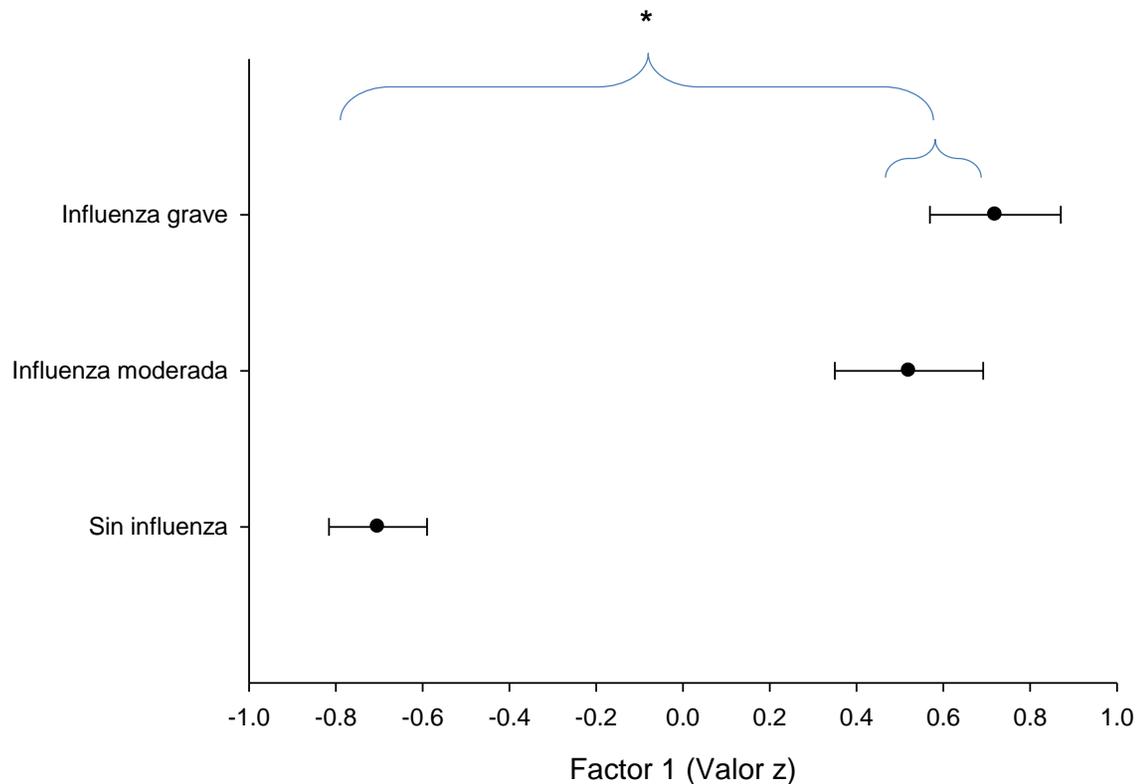


Figura 38. Contraste ortogonal para factor 1 y gravedad de influenza. * $p < 0.001$

Contraste ortogonal 1 de Factor 1 Citotoxicidad: Pacientes sin influenza y pacientes con influenza. Sí hay diferencia significativa.

Contraste ortogonal 2 de Factor 1 Citotoxicidad: Pacientes con influenza moderada e influenza grave no presentaron diferencia significativa.

En la figura 39 está representado el gráfico de los contrastes ortogonales del factor 2.

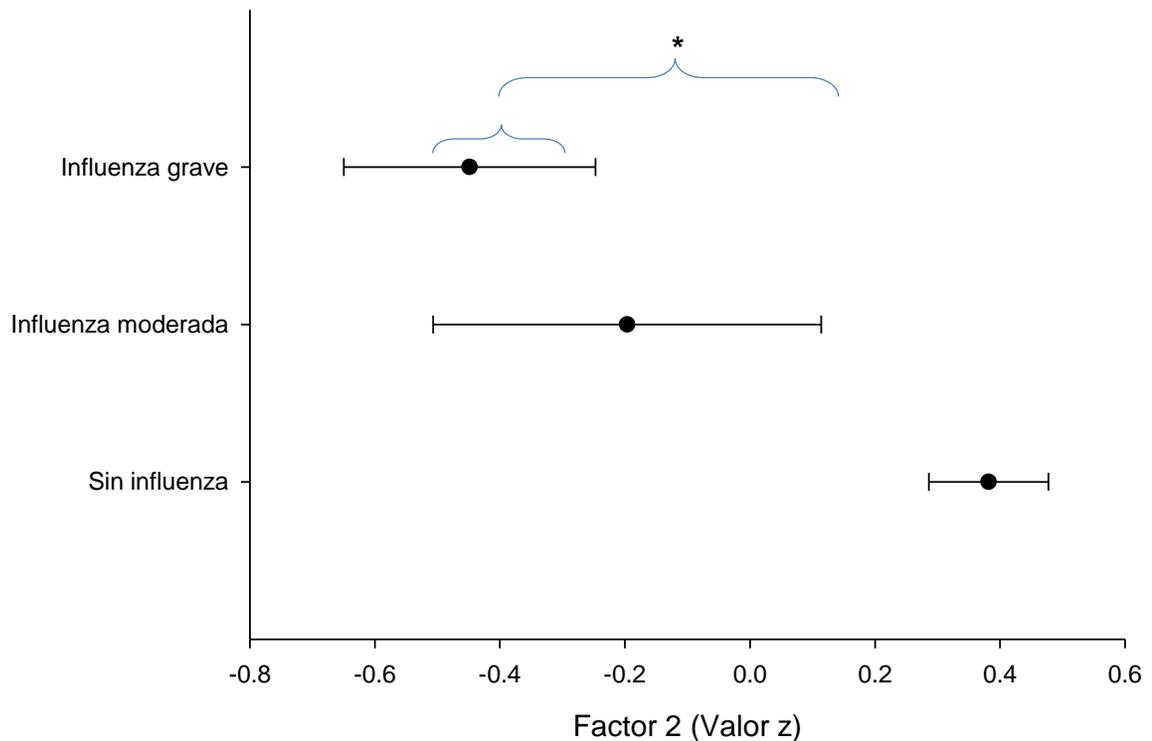


Figura 39. Contraste ortogonal para factor 2 y gravedad de influenza.
* $p < 0.001$

Contraste 1 de Factor 2 Anti-inflamación: Pacientes sin influenza y pacientes con influenza. Sí hay diferencia significativa.

Contraste 2 de Factor 2 Anti-inflamación: Pacientes con influenza moderada e influenza grave no presentaron diferencia significativa.

Ninguno de los dos contrastes ortogonales del factor 3 presentaron diferencia significativa.

En la figura 40 está representado el gráfico de los contrastes ortogonales del factor 4.

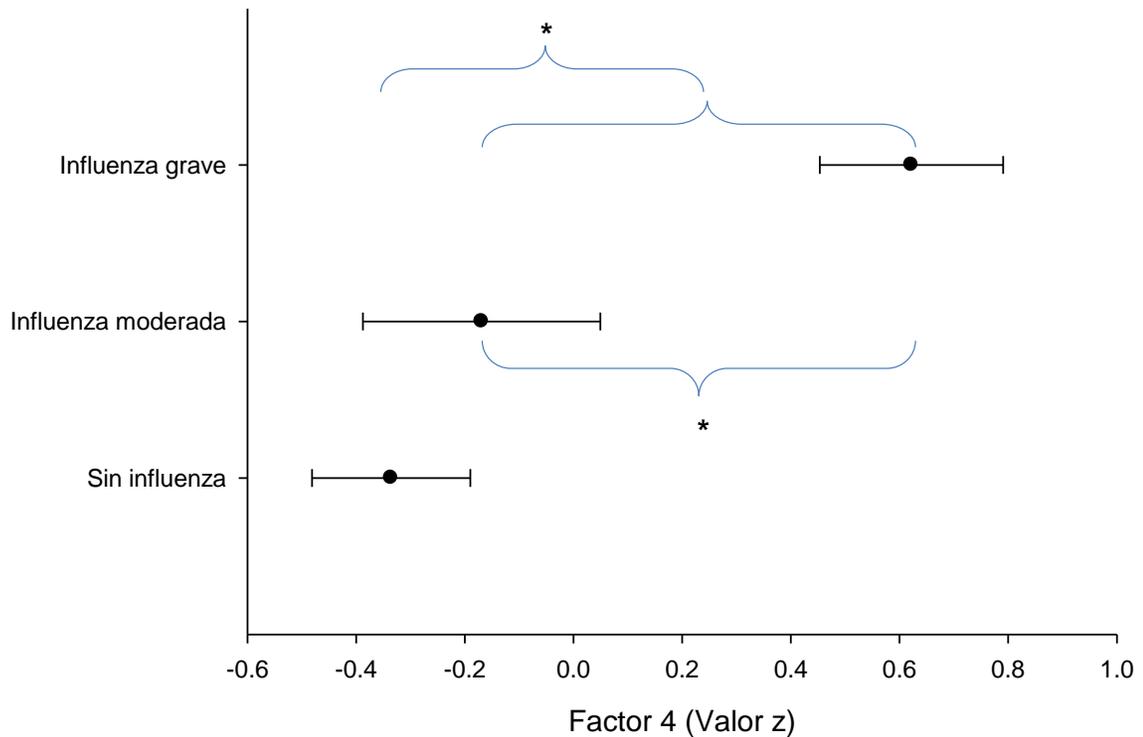


Figura 40. Contraste ortogonal para factor 4 y gravedad de influenza.
* $p = 0.007$

Ambos contrastes ortogonales del factor 4 presentaron diferencia significativa.

Contraste ortogonal 1 del Factor 4: IL 13 e IL-7: Pacientes sin influenza y pacientes con influenza, $p = 0.07$

Contraste ortogonal 2 del Factor 4: IL-13 e IL-7 Pacientes con influenza moderada e influenza grave, $p = 0.07$.



ANALISIS DE ANCOVA. INTERACCION DE CITOCINAS CON INDICE DE
MASA CORPORAL Y GRAVEDAD DE INFLUENZA

COVARIANZA:

$$\hat{y} = \text{crítico} + \text{IMC} + \text{edad} + \text{sexo} + [\text{interacción de crítico con obesidad}]$$

Variable dependiente: cada uno de los factores

Factores fijos: gravedad de influenza, IMC, sexo

Covariable: edad

Factores de interés: crítico y obesidad

Confusores: edad + sexo

Modelo Univariado: Custom

Dos vías: interacción crítico con IMC

Interacción no significativa por efectos principales

En la figura 41 podemos observar la gráfica del resultado del análisis de ANCOVA tomando como variable dependiente el factor 1 con la interacción de citocinas con índice de masa corporal y gravedad de influenza. En el anexo 17 se observa la B, error típico, la p y el eta al cuadrado para conocer la magnitud del efecto.

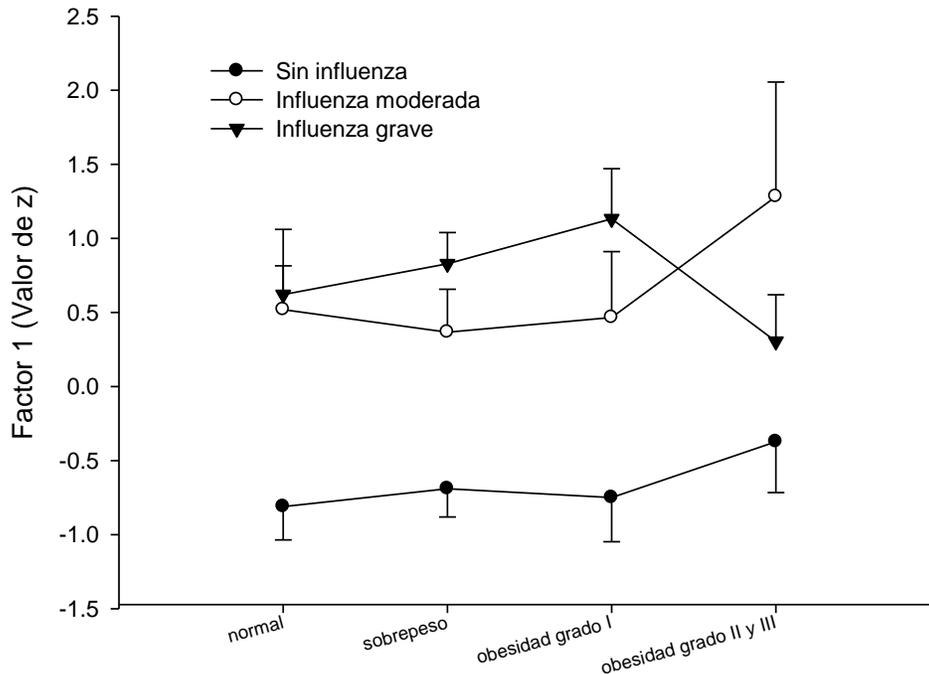


Figura 41. ANCOVA. Variable dependiente: Factor 1
Interacción de citocinas con índice de masa corporal y gravedad de influenza

Al observar los contrastes univariados del factor 1 con la gravedad de influenza (pacientes sin influenza y pacientes con influenza ya sea moderada o grave) sí se observa diferencia significativa <0.001 , sin embargo, cuando se valora la interacción tanto de citocinas, como del IMC como de la gravedad de influencias no se observa diferencia significativa.

En la figura 42 se observa el análisis de ANCOVA tomando como variable dependiente el factor 2, con la interacción de citocinas, índice de masa corporal y gravedad de influenza. En el anexo 18 se observa la B, error típico, la p y el eta al cuadrado para conocer la magnitud del efecto.

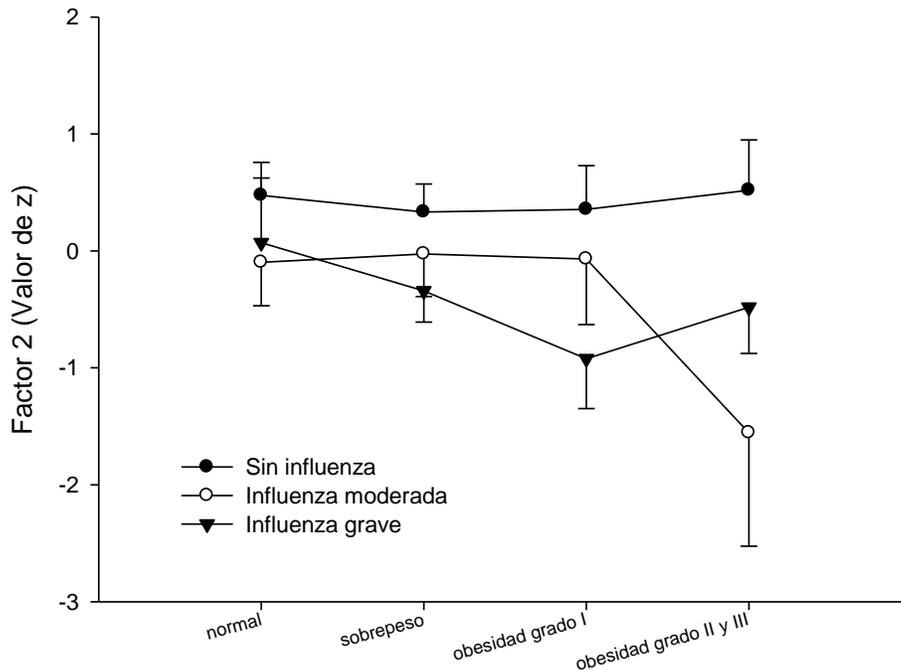


Figura 42. ANCOVA. Variable dependiente: Factor 2
Interacción de citocinas con índice de masa corporal y gravedad de influenza

Al observar los contrastes univariados del factor 2 con la gravedad de influenza (pacientes sin influenza y pacientes con influenza ya sea moderada o grave) sí se observa diferencia significativa con $p = 0.003$, sin embargo, cuando se valora la interacción tanto de citocinas, como del IMC como de la gravedad de influencias no se observa diferencia significativa.

En la figura 43 se observa el análisis de ANCOVA tomando como variable dependiente el factor 4, con la interacción de citocinas, índice de masa corporal y gravedad de influenza. En el anexo 19 se observa la B, error típico, la p y el eta al cuadrado para conocer la magnitud del efecto.

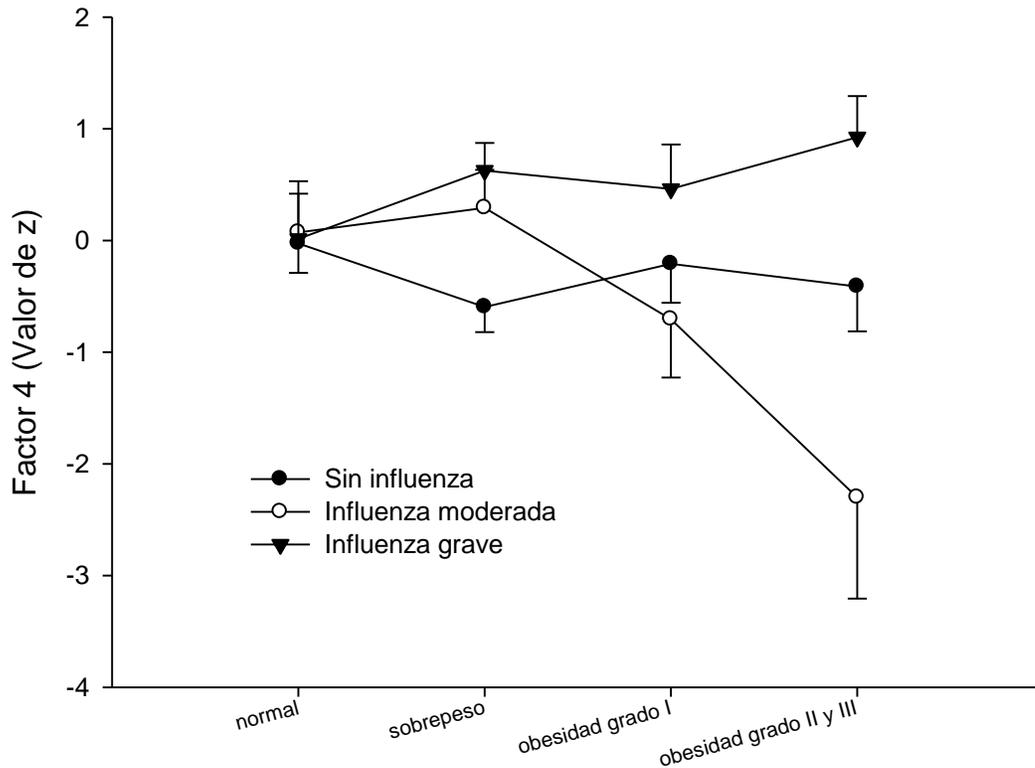


Figura 43. ANCOVA. Variable dependiente: Factor 4
Interacción de citocinas con índice de masa corporal y gravedad de influenza
***p = 0.001**

Se observa diferencia estadística en los contrastes univariados del factor 4 con la gravedad de influenza (pacientes con influenza grave con respecto a influenza moderada ($p=0.002$) y de pacientes graves con respecto a pacientes sin influenza ($p=0.001$). Por edad también hay significancia estadística.

Cuando se valora la interacción tanto de citocinas, como del IMC como de la gravedad de influencias se observa diferencia significativa $p = 0.05$.

\



8.- DISCUSION

Nosotros reportamos un estudio de casos y controles de pacientes con influenza A H1N1 2009 atendidos en el Hospital General de México durante el tiempo de enero del 2010 a septiembre del 2011. Este serotipo se presentó con una relación de 1:1 en hombres y mujeres, constatado en las diferentes revisiones (80). La cepa pandémica del virus H1N1 causó enfermedad grave en el 60% de los pacientes, requiriendo la admisión a la Unidad de Cuidados Intensivos al 33.3% de la población atendida. Aunque con menor mortalidad que en el primer brote del 2009, ya que en este tiempo fallecieron el 7.4% de los pacientes hospitalizados, a diferencia del 39% de los pacientes hospitalizados que fallecieron en México en el 2009 (81-82), principalmente por la experiencia en el diagnóstico y tratamiento oportuno (83).

Las co-morbilidades subyacentes fueron obesidad, sobrepeso, tabaquismo y enfermedades pulmonares crónicas. A diferencia de lo reportado previamente (80, 83-85), los pacientes con influenza no fueron diabéticos, ni tuvieron otras enfermedades crónico-degenerativas además de lo ya mencionado, ni tuvieron inmuno-compromiso más que solo en un caso de influenza moderada en una paciente con artritis reumatoide tratada con prednisona de 5 mg, (los casos de embarazo fueron excluidos para nuestro estudio por cuestiones éticas y para evitar sesgo por la respuesta inflamatoria propia del embarazo). Aunque identificamos jóvenes sanos dentro de los pacientes moderados y graves, lo que refleja la importancia de la virulencia propia del virus independientemente de las co-morbilidades subyacentes del huésped.

Con respecto a la obesidad de los pacientes con influenza la encontramos en el 33.3% y el sobrepeso en el 44.4% de todos los pacientes, esta cifra de obesidad ya mencionada por Patel y col.(84), pero no hace mención de su



importancia como riesgo para gravedad de influenza. Morgan y col.(86) reportaron que la obesidad mórbida es un factor de riesgo para hospitalización y muerte por influenza A H1N1 2009.

Al calcular el tamaño del efecto (87) del índice de masa corporal con respecto a la gravedad de influenza lo encontramos del 79%, que expresa que el índice de masa corporal explica la gravedad de influenza, hay una gran tamaño del efecto, sin embargo debido a la n que fue de 45 pacientes por los dos grupos, no se alcanzó la diferencia estadística al calcular el riesgo, aunque sí se incrementó el riesgo OR 2.41 veces mayor de los obesos con respecto a los no obesos para requerir hospitalización (IC 95% 0.62, 9.29), un OR de 1.75 veces mayor de los obesos con respecto a los no obesos de ser paciente crítico vs no crítico (IC 95% 0.36, 8.42) y un OR de 3.06 veces mayor los obesos con respecto a los no obesos de ser paciente crítico con respecto a ser ambulatorio (IC 95% 0.68, 13.78). Godoy y col. Reportaron un riesgo de obesidad grado III de OR 2.5 (IC 95% 1.4, 4.5) entre pacientes críticos y no críticos en la población de Cataluña. (85)

El cuadro clínico de la influenza es muy similar en todos los reportes previos. Solo retomando aquellos datos clínicos con diferencia estadística entre casos y controles con respecto a gravedad de influenza como son: índice de masa corporal, peso, perímetro abdominal (que son significativos estadísticamente a pesar de nuestra n), frecuencia respiratoria; así como los parámetros bioquímicos glucosa, TGO y DHL, por la viremia y compromiso a nivel hepático así como rabdomiólisis en los pacientes. En nuestros resultados la TGP y la CPK no alcanzaron diferencia estadística por la n , pero otros estudios previos si corroboraron la diferencia estadística. Diferentes autores mencionan el incremento de 'estos parámetros sin determinarlos estadísticamente entre el grupo de casos y controles (81, 83).



Con respecto al análisis de citocinas, se reportaron diferencias estadísticas de las siguientes citocinas con respecto a la gravedad de influenza:

Inducidas por linfocitos CD4+ Th1: IFN γ , TNF α , IL-2 con actividad principalmente pro-inflamatoria.(21)

Inducidas por linfocitos CD4+ Th2: IL-4, IL-6, IL-9, IL-13 (con actividad cooperadora por parte de estas citocinas).(21)

Inducidas por linfocitos CD4+ Th17 (30): IL-6, GM-CSF, TNF α (citocinas pro-inflamatorias).(21)

Monocitos, adipocitos: MCP-1, para quimiotaxis de los mismos monocitos, También regula la adhesión de moléculas de expresión y producción de citocinas en monocitos.

Monocitos y macrófagos: (G-SCF) Estimulador de las células de la médula ósea especialmente neutrófilos. Aumenta la supervivencia y la actividad inmune de neutrófilos maduros

Monocitos, macrófagos, endotelio vascular: IL-1 β , como inmunomodulador potente el cual media amplia variedad de respuesta inflamatorias e inmunes, incluyendo la activación de células B y T.

Monocitos, macrófagos, células T, neutrófilos y fibroblastos: IL-8,

Células del estroma: IL-7, induce la formación de células LK y CTLs y puede estimular la actividad tumoricida de monocitos y macrófagos.

Con respecto al factor de crecimiento fibroblástico básico (Basic-FGF) se desconoce su participación en las infecciones virales ya que hasta el momento se le asocia con células de tejido neural, pituitaria, corteza adrenal y placenta, pero con potente actividad angiogenica; que puede estar relacionado con VEGF como factor de crecimiento endotelial vascular con la misma actividad angiogenica.



Por otra parte la eotaxina (CCR3), producida por eosinófilos, basófilos, mastocitos, mononucleares, plaquetas, progenitores hematopoyéticos CD34+ Tiene un papel en enfermedades alérgicas como asma bronquial y rinitis alérgica, no se conoce su participación en la respuesta viral.

Las citocinas que no presentaron diferencia significativa de su concentración en suero entre estos grupos de gravedad de influenza y sujetos sin influenza fueron IL-1ra, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-15, IL-17, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES y PDGF.

Llama la atención que no haya diferencia estadística de la concentración sérica de IL-10 con respecto a pacientes con influenza o sujetos sin influenza, ya que el papel de esta citocina es reguladora, inducida por linfocitos Th reguladores

Bermejo-Martin y col. (43) presentaron un estudio piloto que describió las diferencias en la respuesta inmune temprana para los pacientes con influenza A H1N1 2009 tanto leve/moderada como severa; donde se reportó que los pacientes que evolucionaron con síntomas graves tuvieron respuesta linfocitaria Th1 e "hipercitocinemia" Th17, en comparación con los pacientes con influenza leve así como con los controles sanos. Los mediadores implicados en la Th1 y Th17 perfiles son conocidos por estar involucrados en la respuesta antiviral, pro-inflamatorias y autoinmunes. Este fue el primer trabajo de presentación de informes de la asociación de una respuesta inmune pro-inflamatoria a una infección grave pandemia, sin embargo nuestros resultados son muy diferentes con gran actividad Th1, Th2, y no predominantemente Th17, ya que IL-17 no presentó diferencia significativa, mientras que nuestro estudio tiene resultados compatibles con actividad citotóxica por neutrófilos y macrófagos.

A través del análisis de factores subyacentes de la concentración sérica de citocinas, se realizó la matriz de correlaciones entre las citocinas con



covarianza anti-imagen, y mediante el método de extracción se realizó el análisis de componentes principales para extraer el porcentaje de varianza y realizar el análisis de comunalidades. Al realizar la matriz de correlación y posteriormente rotarla con Varimax obtuvimos 4 perfiles de citocinas.

Factor 1 Citotoxicidad: IL1b, IL1ra, IL4, IL6, IL7, IL8, GCSF, IFN γ , IP10, MCP1, TNF α , VEGF

Factor 2 Anti-inflamación: IL5, IL17, EOTAXINA, MIP1a, MIP1b, RANTES, PDGF, IL10

Factor 3 : IL2, IL9, IL12p70, IL15, FGFbasic, GMCSF

Factor 4 :IL-13, IL-7

Los perfiles de citocinas 1 y 2 presentan similitud en que los pacientes con influenza tienen un comportamiento diferente a los que no tienen influenza. En el perfil 1 se observan componentes de inflamación tanto de respuesta innata (participación tanto de macrófagos como de neutrófilos y muy probablemente óxido nítrico), así como de respuesta inmune adquirida por la actividad Th1 pro-inflamatoria.

El perfil 2 tiene tendencia a citocinas que participan en la anti-inflamación, y la participación de macrófagos, para inhibir su migración a otros sitios, y limitarse localmente.

El perfil 3 tiene citocinas con actividades conocidas muy diferentes entre sí, e incluso no se observa en los resultados diferencia estadística.

El perfil 4 compuesto por IL-7 e IL-13, tienen diferencia significativa en la interacción tanto de obesidad como en la de gravedad de influenza, encontrando un comportamiento de reducción de la concentración de estas citocinas a mayor obesidad con influenza moderada. Mientras que se



incrementa la concentración de estas citocinas a mayor obesidad y mayor gravedad de influenza.

Actualmente queda claro que las citocinas son pleiotropicas (una citocina estimula funciones diversas) y de redundancia (una determinada función es promovida por varias citocinas), además en el caso de los receptores de quimiocinas hay promiscuidad, es decir, un solo receptor puede reconocer varias moléculas diferentes. Las citocinas son muy importantes tanto para la respuesta innata como en la adquirida. Aun falta mucho por poder entender los mecanismos de respuesta inmune antes las infecciones virales, como es este el caso de influenza.

Esto es principalmente porque la mayoría de los estudios realizados en inmunología en infecciones virales como en influenza se realizan en modelos animales, y solo muy escasos estudios inmunológicas han sido realizados en humanos.

Es necesario continuar con más estudios para determinar y cuantificar la células: neutrófilos, macrófagos, células NK e incluso células Th17 para poder ser más específicos y comprender mejor la participación de estas células en la regulación y contra-regulación de la respuesta inflamatoria tanto innata como adquirida.



9.- CONCLUSIONES

La obesidad incrementa el riesgo 2.41 veces mas para requerir hospitalización por influenza A H1N1 2009 (IC 95% 0.62, 9.29), con respecto a los no obesos. Los obesos tienen riesgo 1.75 veces mayor que los no obesos de ser paciente crítico vs no crítico (IC 95% 0.36, 8.42) y un riesgo 3.06 veces mayor con respecto a los no obesos de ser paciente crítico con respecto a ser ambulatorio (IC 95% 0.68, 13.78). El tamaño del efecto del índice de masa corporal con respecto a la gravedad de influenza es de 0.79, que expresa que el índice de masa corporal explica la gravedad de influenza en el 79%, hay una gran tamaño del efecto, sin embargo debido a la n que fue de 45 pacientes por los dos grupos (por haber cedido la pandemia y no haber más casos con este subtipo de influenza), no se alcanzó la diferencia estadística.

Las citocinas que presentaron diferencia significativa en base a la gravedad de influenza, fueron: IFN γ , TNF α , IL-2 (pro-inflamatorias con actividad Th1), IL-4, IL-6, IL-9, IL-13 (con actividad cooperadora Th2), IL-6, GM-CSF, TNF α (con actividad anti-inflamatoria Th17).

Por actividad de monocitos y macrófagos: IL-8, MCP-1, G-CSF, IL-1 β

Actividad anti-macrófagos: IL-7

Angiogénicos: factor de crecimiento fibroblástico básico y factor de crecimiento endotelial vascular.

Las citocinas que no presentaron diferencia significativa: IL-1ra, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-15, IL-17, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES y PDGF.

Se determinaron 4 perfiles: el perfil 1 con actividad principalmente citotóxica, con participación de macrófagos, neutrófilos muy probablemente óxido nítrico además de Th1 y Tc1. El perfil 2 con actividad proincipalmente anti-inflamatoria. El perfil 3 sin diferencia estadística. El perfil 4 con diferencia



significativa entre la interacción de los pacientes obesos y con la gravedad de la influenza caracterizado por la concentración de IL-7 e IL-13.

La característica pleiotrópica de las citocinas dificulta la comprensión del papel que tienen ante la infección viral, por lo que no se puede limitar el papel de las citocinas a solo la respuesta inmune adquirida, sino también a la respuesta innata ante estas infecciones virales. Aun falta entender con mayor claridad los mecanismos de respuesta inmune ante este tipo de infección por lo que se tienen que seguir investigando a nivel celular.



ANEXO 1 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado paciente, Usted ha sido invitado a participar en este estudio de participación voluntaria debido que padece de un problema de infección viral en la nariz, y vías respiratorias. No sabemos con certeza por qué algunas personas que padecen la influenza presentan un cuadro leve y parecido al catarro común, en cambio otras personas deben hospitalizarse por tener una enfermedad mas grave.

El objetivo de este estudio es investigar los factores que se asocian al tipo de respuesta de defensa contra el virus de la influenza que Usted presenta.

Para lograr este objetivo le pedimos nos permita realizarle algunas preguntas, mediciones, toma de muestra de su nariz y una muestra de sangre de 36 mL para poder definir si la enfermedad se asocia a anemia y la capacidad de defensa que usted tiene. Además se guardará una muestra para estudios posteriores, de ser así nos pondremos en contacto con Usted para solicitarle un nuevo consentimiento o pediremos autorización a la Comisión de Etica.

La toma de muestra de nariz se hará con un hisopo, que en general no le molestará, pero en algunos pacientes puede acompañarse de un ligero sangrado que cede de inmediato. Se tomará una muestra de sangre del pliegue del brazo, este procedimiento puede darle una ligera molestia y en algunos pacientes un pequeño moretón que desaparecerá en los siguientes días.

Usted tiene libertad de participar en este estudio, si usted rehúsa a participar, su tratamiento y atención médicos no se verán comprometidos, además no es necesario que de ninguna explicación de su negativa.

Si usted lo solicita se le podrá dar el resultado de sus exámenes y notificación del tipo de virus que presentó. Este es un beneficio adicional a su participación en el estudio.

En el caso de ser positivo su estudio para Influenza H1N1, se dará aviso de inmediato y se canalizará al servicio correspondiente en el hospital, para su atención.



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección
por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



Si tiene alguna duda o pregunta sobre esta investigación puede llamar al Dr. Juan Carlos López Alvarenga al teléfono 5004 3842 ó 5004 3843 en horario de 8:00 a 15:00 hrs. Para obtener mayor información acerca de sus derechos como paciente puede contactar a la responsable de la Comisión de Ética del Hospital General de México, Dra. Hilda Hidalgo Loperena al teléfono 27892000 Ext. 1368 en horario de 8:00 a 15:00 hrs.

Yo, _____ voluntariamente deseo participar en esta investigación, se me aclararon todas las dudas al respecto. Entiendo que si no deseo participar mi condición de paciente y la atención que recibo no se verá modificada. Doy mi consentimiento para que se tomen muestras y se guarden algunas de ellas para futuras investigaciones. En el entendido que me solicitarán un nuevo consentimiento o en su defecto pedirán autorización a la Comisión de Ética.

Nombre del paciente _____ Fecha
_____.

Nombre y Firma de Testigo 1
_____.

Nombre y Firma de Testigo 2
_____.

Firma del Investigador responsable _____ Fecha
_____.



ANEXO 2 HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Folio:

Datos generales			
Nombre: <input type="text"/>			
Apellido paterno		Apellido materno	
Nombre(s)			
Número de expediente del Hospital general: <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Consulta externa	<input type="checkbox"/> Hospitalización	
		No. Servicio: <input type="text"/>	No. Cama: <input type="text"/>
Si el paciente no tiene un número de expediente del Hospital General, capture alguno de los siguientes datos:			
ID del paciente: <input type="checkbox"/> CURP	<input type="checkbox"/> RFC	<input type="checkbox"/> IFE	<input type="text"/>
			Clave*
Fecha de primera entrevista: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	Hora: <input type="text"/> : <input type="text"/>		
Día / Mes / Año		Hrs. : min	
Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Femenino	Edad: <input type="text"/> Años	Fecha de nacimiento: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
Día / Mes / Año			
Ocupación: <input type="text"/>	Teléfono: <input type="text"/>		
Dirección: <input type="text"/>			
Delegación o municipio: <input type="text"/>	Entidad de residencia: <input type="text"/>		
<i>* Si el paciente se identifica con la credencial del IFE, capture la clave de elector que se encuentra al reverso de la misma en el costado izquierdo.</i>			

Gravedad del caso	
A) H1N1 / 09 <input type="checkbox"/>	Gravedad del caso: <input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severo
B) H1N1 estacional <input type="checkbox"/>	
C) H1 <input type="checkbox"/>	
D) H2N3 <input type="checkbox"/>	
<i>Marcar sólo una</i>	



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



Tipo de paciente			
Caso * <input type="checkbox"/>	Control * <input type="checkbox"/>		
Si el paciente es control			
Corresponde al caso #		Edad del caso:	Años
Sexo del caso:	<input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Femenino	Fecha de inclusión del caso:	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> Día / Mes / Año
Número de control para el caso:	<input type="checkbox"/> 1° <input type="checkbox"/> 2° <input type="checkbox"/> 3°		
<i>* Marcar sólo una</i>			

Tipo de interrogatorio			
Directo <input type="checkbox"/>	Indirecto <input type="checkbox"/>		
Si es indirecto indique:		Familiar: <input type="checkbox"/>	Expediente: <input type="checkbox"/>

Factores de riesgo			
Obesidad <input type="checkbox"/>	Enfermedades hepáticas <input type="checkbox"/>	Enfermedades cardiovasculares <input type="checkbox"/>	Tuberculosis <input type="checkbox"/>
Diabetes mellitus <input type="checkbox"/>	Enfermedades hematológicas <input type="checkbox"/>	Tratamiento prolongado con aspirina <input type="checkbox"/>	Otros padecimientos infecciosos <input type="checkbox"/>
Intolerancia a los carbohidratos <input type="checkbox"/>	Enfermedades neurológicas <input type="checkbox"/>	Trabajador de guardería/hospital/geriátrico <input type="checkbox"/>	
Otra alteración metabólica <input type="checkbox"/>	Enfermedades neuromusculares <input type="checkbox"/>	Contacto con confirmados de N1H1/09 <input type="checkbox"/>	
¿Cuál? <input style="background-color: yellow;" type="text"/>			
Tabaquismo <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> No fumador <input type="checkbox"/> Exfumador <input type="checkbox"/> Fumador		
Inmunodeficiencia <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Pad. Autoimmune neoplásicos <input type="checkbox"/> VIH <input type="checkbox"/> Enf.	Padecimientos respiratorios crónicos <input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Epoc	
<i>Marcar todas las que apliquen.</i>			
¿El paciente sabe si pertenece a un grupo de riesgo de complicaciones?		<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No
¿Sabe a cuál?		<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No
¿Ha padecido de hepatitis B o C?		<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No
Número de embarazos: <input style="background-color: yellow;" type="text"/>			



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



Antecedentes de vacunación			
Contra influenza estacional 2008:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fecha*: <input type="text"/> / <input type="text"/>
	Sí	No	Mes / Año
Contra influenza estacional 2009:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fecha*: <input type="text"/> / <input type="text"/>
	Sí	No	Mes / Año
Contra influenza estacional 2010:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fecha*: <input type="text"/> / <input type="text"/>
	Sí	No	Mes / Año
Contra influenza H1N1:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fecha*: <input type="text"/> / <input type="text"/>
	Sí	No	Mes / Año
* Anotar la fecha con la mayor precisión posible.			

Tratamiento con antivirales			
¿Se está tratando con Oseltamivir?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fecha de inicio: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
	Sí	No	Día / Mes / Año
¿Se está tratando con algún otro antiviral que no sea Oseltamivir?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fecha de inicio: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
	Sí	No	Día / Mes / Año
¿Cuál? <input style="width: 100px;" type="text"/>			

Datos clínicos

Síntomas											
Síntoma	Sí	No	Tiempo transcurrido			Síntoma	Sí	No	Tiempo transcurrido		
			0-24	24-72	72+				0-24	24-72	72+
Fiebre						Oliguria					
Cefalea						Mialgias					
Ataque al estado general						Artralgias					
Tos seca						Lumbalgia					
Ardor de garganta						Conjuntivitis					
Odinofagia						Congestión nasal					
Dolor abdominal						Diarrea					
Rinorrea Hialina						Dolor torácico					
Rinorrea Purulenta						Disnea					
Inicio súbito						Cianosis					
Posturación						Hiperemia conjuntival					
Escalofrío						Sibilancias o estertores					
Hemoptisis						Desorientación					
Nausea						Taquicardia					
Vómito						Taquipnea					
Espectoración hialina						Hipotermia					
Espectoración purulenta						Otros, especifique:					

Exploración física:			
Peso	<input type="text"/>	Kg	Presión arterial <input type="text"/> / <input type="text"/> mmHg
Talla	<input type="text"/>	m	Temperatura <input type="text"/> °C
IMC	<input type="text"/>	Kg/m ²	Frecuencia cardiaca <input type="text"/>
Perímetro abdominal	<input type="text"/>	Cm	Frecuencia respiratoria <input type="text"/>



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



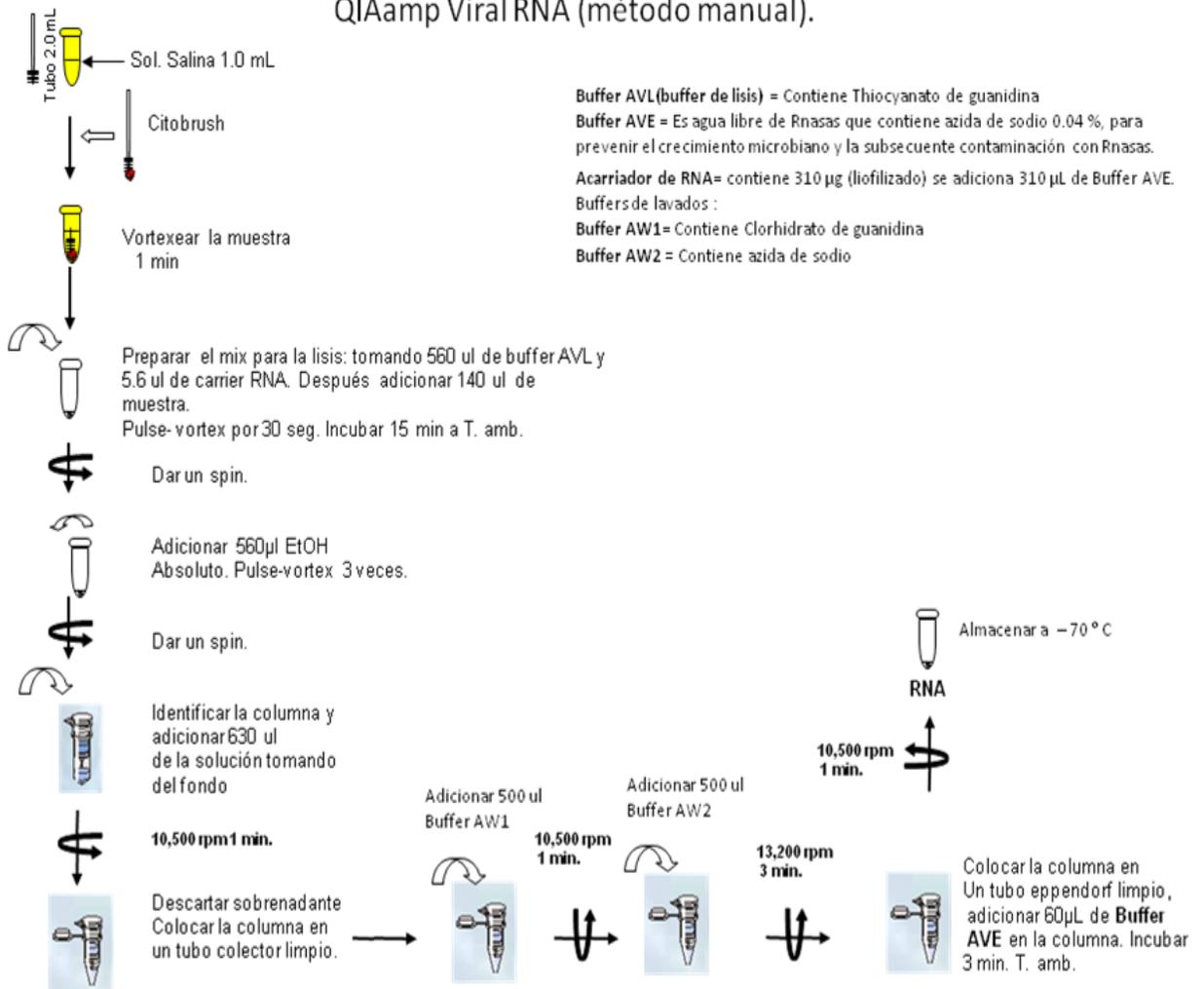
Complicaciones:		
Neumonía <input type="checkbox"/>	Insuficiencia renal aguda <input type="checkbox"/>	Sepsis <input type="checkbox"/>
SIRPA <input type="checkbox"/>	Choque séptico <input type="checkbox"/>	Falleció <input type="checkbox"/>
Requirió ventilador <input type="checkbox"/>	Otros, especifique: _____	

PCR		
¿Se envió muestra para PCR? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Fecha de toma: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> Día / Mes / Año	Hora: <input type="text"/> hrs
Muestra de sangre		
¿Se envió muestra de sangre? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Fecha de toma: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> Día / Mes / Año	Hora: <input type="text"/> hrs
* La etiqueta de la muestra debe incluir el folio de este formato, nombre completo del paciente y la fecha y hora de toma.		

T°	
Presión arterial media	
Frec cardiaca	
Frec respiratoria	
Oxigenación	
Si FiO2 ≥ 0.5 (AaDO2)	
Si FiO2 ≥ 0.5 (paO2)	
pH arterial	
Na plasmático (mmol/l)	
K plasmático (mmol/l)	
Creatinina (mg/dl)	
Hematocrito (%)	
Leucocitos (x1000)	
Suma de puntos	
Glasgow	
Edad	
Enf. Crónica	
Apache II:	

ANEXO 3 PROCESO DE EXTRACCION DE RNA DE VIRUS DE INFLUENZA

Proceso de Extracción de RNA por el método QIAamp Viral RNA (método manual).





ANEXO 4. PROTOCOLO PARA DETECTAR EL VIRUS DE LA
INFLUENZA A POR REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN
TIEMPO REAL (RT-PCR)

I. Preparar el mix para cada set de sondas .

Influenza A

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen de Reacción</i>
Agua libre de nucleasas	1.0 µl
Taq Man Influenza A 50X	0.5 µl
Enzime Mix RT-PCR 25X	1.0 µl
Buffer RT-PCR 2X	12.5 µl
Volumen Total	15.0 µl

Etiquetar los tubos con el número de Mix y número de muestra.

Influenza A (H1N1) subtype H1

Reactivos	Volumen de Reacción
Agua libre de nucleasas	1.0 µl
Taq Man Influenza A (H1N1) subtype H1 50X	0.5 µl
Enzime Mix RT-PCR 25X	1.0 µl
Buffer RT-PCR 2X	12.5 µl
Volumen Total	15.0 µl

Etiquetar los tubos con el número de Mix y número de muestra.

II. Después adicionar a cada tubo 10 µl de la muestra de RNA para cada marcador.

III. La reacción se lleva acabo en el equipo de PCR en tiempo real con las siguientes condiciones de ciclaje:

Transcripción Reversa 50°C por 30 min
Activación 95°C por 10 min
Amplificación 95°C por 15 seg
55°C por 60 seg 45 ciclos



ANEXO 5. PROTOCOLO PARA DETECTAR EL VIRUS DE LA INFLUENZA A
H1N1 POR REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL
(RT-PCR)

I.Preparar el mix para cada set de sondas .

Influenza A H1N1

Reactivos	Volumen de Reacción
Agua libre de nucleasas	1.0 µl
Taq Man Influenza A (H1N1) 50X	0.5 µl
Enzime Mix RT-PCR 25X	1.0 µl
Buffer RT-PCR 2X	12.5 µl
Volumen Total	15.0 µl

Etiquetar los tubos con el número de mix y número de muestra.

Rnase P

Reactivos	Volumen de Reacción
Agua libre de nucleasas	1.0 µl
Taq Man Rnase P 50X	0.5 µl
Enzime Mix RT-PCR 25X	1.0 µl
Buffer RT-PCR 2X	12.5 µl
Volumen Total	15.0 µl

Etiquetar los tubos con el número de mix y número de muestra.

II. Después adicionar a cada tubo 5 µl de la muestra de RNA

III. La reacción se lleva acabo en el equipo de PCR en tiempo real con las siguientes condiciones de ciclaje:

Transcripcion Reversa 50°C por 30 min

Activación 95°C por 10 min

Amplificación 95°C por 15 seg
 55°C por 40 seg 45 ciclos



ANEXO 6 SECUENCIA DE PRIMERS EMPLEADOS PARA VIRUS DE
INFLUENZA A H1N1 2009. PROTOCOLO DE RT-PCR PARA INFLUENZA A
H1N1 CDC/OMS.(13)

PRIMER AND PROBE SETS

Note: primer/probe sets may undergo periodic modification as information about current circulating viruses is known.

Primers and Probes	Sequence (5'>3')	Working Concentration
InfA Forward	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C	40 µM
InfA Reverse	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA	40 µM
InfA Probe ¹	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG	10 µM
SW InfA Forward	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG	40 µM
SW InfA Reverse	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC	40 µM
SW InfA Probe ²	CYA CTG CAA GCC CA" T" ACA CAC AAG CAG GCA	10 µM
SW H1 Forward	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA	40 µM
SW H1 Reverse	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC	40 µM
SW H1 Probe ²	CA GAA TAT ACA "T"CC RGT CAC AAT TGG ARA A	10 µM
RnaseP Forward	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	40 µM
RnaseP Reverse	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	40 µM
RnaseP Probe ¹	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG	10 µM

¹ TaqMan® probes are labeled at the 5'-end with the reporter molecule 6-carboxyfluorescein (FAM) and with the quencher, Blackhole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) at the 3'-end.

² Taqman® probes are labeled at the 5'-end with the reporter molecule 6-carboxyfluorescein (FAM) and quenched internally at a modified "T" residue with BHQ1, with a modified 3'-end to prevent probe extension by Taq polymerase.



ANEXO 7. GUIA DE ENSAYO BIO-PLEX PARA DETERMINACION DE CITOCINAS EN SUERO DE PACIENTES CON INFLUENZA

Se lleva a cabo el ensayo en una placa de 96 pozos.

PREPARACION INICIAL
1.- Planear la distribución de la placa
2.- Inicio. Colocar a temperatura ambiente el sistema Bio-Plex (30 minutos). - Mientras colocar los reactivos del ensayo a temperatura ambiente - Iniciar a descongelar las muestras.
3.- Primero lavar la estación o calibrar el equipo de aspiración por vacío (Manifold).
4.- Calibrar el sistema (ahora o después durante la incubación).
5.- Reconstituir el vial sencillo de estándar en 500 μ l del diluyente apropiado, homogenizar en el vortex, e incubar en hielo (30 min) - para muestras de suero y plasma usar diluyente estándar Bio-plex.
6.- Preparar las 8 series de dilución estándar y el blanco. - Agregar 72 μ l del diluyente al tubo S1, y 150 μ l del diluyente a los tubos S2-8 y el blanco. - Transferir 128 μ l del estándar reconstituido al S1 (Total de S1 200 μ l) - Entonces seriadamente, diluir la cuarta parte de S1 hasta S8 transfiriendo 50 μ l entre los tubos. Homogenizar con el vortex entre cada transferencia.
7.- Una vez descongelado, preparar 1 por muestra - Diluir el suero o plasma en el diluyente de Bio Plex.
8.- Preparar las microesferas acopladas en el amortiguador del ensayo (assay buffer), protegiéndolo de la luz: Agregar 575 μ l de microesferas a 5,175 μ l del buffer.
9.- Las muestras efectivas y estándares deben estar a temperatura ambiente antes de distribuirse.



CORRIENDO EL ENSAYO
1.- Humedecer la placa con filtro con 100 µl del amortiguador del ensayo (assay buffer)
2.- Agregar 50 µl de la preparación con microesferas a cada uno de los pozos de la placa del ensayo
3.- Lavar 2 veces con 100 µl del con el amortiguador de lavado (wash buffer)
4.- Agregar 50 µl de muestra, del estándar, blanco y controles.
5.- Cubrir e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente agitando (shaking) la placa a 300 RPM por 30 minutos. En los 10 minutos siguientes preparar 300 µl de detección de Anticuerpos en 2,700 µl del diluyente de detección de Anticuerpos.
6.- Lavar 3 veces con 100 µl del amortiguador de lavado (wash buffer)
7.- Agregar 25 µl de detección de anticuerpos ya preparado
8.- Cubrir e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente agitando la placa a 300 RPM durante 30 min. Mientras, preparar software del protocolo Ingresar valores en estándar S1 normalizados
En los siguientes 10 minutos preparar 60 µl de Streptavidin - Phycoerithryne (SA-PE) en 5,940 µl de amortiguador de ensayo (assay buffer). Proteger de la luz.
9.- Lavar 3 veces con 100 µl de amortiguador de lavado
10.- Agregar 50 µl de Streptavidina – PE
11.- Cubrir e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente agitando (shaking) la placa a 300 RPM durante 10 minutos
12.- Lavar 3 veces con 100 µl de amortiguador de lavado
13.- Resuspender las microesferas en 125 µl de amortiguador de ensayo, agitar a 1100 RPM por 30 segundos
14.- Leer la placa en equipo Bio Plex – En Parámetros bajos (PMT: low RP1)



ANEXO 8. PRUEBA t DE STUDENT DE MUESTRAS INDEPENDIENTES.
PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y ANTROPOMÉTRICOS EN PACIENTES
CASOS Y CONTROLES DE INFLUENZA.

Estadísticos de grupo

	Caso_control	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Peso	control	18	74.57	14.931	3.519
	caso	27	84.15	20.395	3.925
Talla	control	18	1.67	.094	.022
	caso	27	1.64	.086	.017
IMC	control	18	26.61	4.291	1.011
	caso	27	31.43	7.843	1.509
PA	control	16	92.33	14.429	3.607
	caso	26	106.88	16.256	3.188
Temperat	control	18	36.67	.714	.168
	caso	27	37.01	.819	.158
FC	control	18	81.78	9.046	2.132
	caso	27	89.15	14.520	2.794
FR	control	18	21.83	2.956	.697
	caso	27	25.67	3.893	.749
Sist	control	18	114.44	12.472	2.940
	caso	27	120.63	15.290	2.943
Diast	control	18	76.11	8.498	2.003
	caso	27	74.85	8.956	1.724

Análisis estadístico SPSS



ANEXO 9. ANOVA DE UN FACTOR. PARÁMETROS CARDIO-RESPIRATORIOS Y ANTROPOMÓRFICOS DE ACUERDO A GRAVEDAD DE INFLUENZA.

Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
Peso	ambulatorio	18	74.57	14.931	3.519	67.15	82.00	50	104
	no crítico	12	76.67	13.060	3.770	68.37	84.96	60	105
	Crítico	15	90.13	23.497	6.067	77.12	103.15	62	140
	Total	45	80.32	18.826	2.806	74.66	85.97	50	140
IMC	ambulatorio	18	26.61	4.291	1.011	24.48	28.74	20	37
	no crítico	12	28.90	4.948	1.428	25.76	32.04	22	37
	Crítico	15	33.46	9.225	2.382	28.35	38.57	24	51
	Total	45	29.50	7.012	1.045	27.40	31.61	20	51
PA	ambulatorio	16	92.33	14.429	3.607	84.64	100.01	67	123
	no crítico	12	97.83	10.886	3.143	90.92	104.75	74	112
	Crítico	14	114.64	16.355	4.371	105.20	124.09	96	145
	Total	42	101.34	16.986	2.621	96.04	106.63	67	145
FC	ambulatorio	18	81.78	9.046	2.132	77.28	86.28	68	100
	no crítico	12	87.33	12.010	3.467	79.70	94.96	76	110
	Crítico	15	90.60	16.526	4.267	81.45	99.75	59	114
	Total	45	86.20	13.020	1.941	82.29	90.11	59	114
FR	ambulatorio	18	21.83	2.956	.697	20.36	23.30	16	26
	no crítico	12	25.83	4.859	1.403	22.75	28.92	20	36
	Crítico	15	25.53	3.091	.798	23.82	27.24	20	31
	Total	45	24.13	3.992	.595	22.93	25.33	16	36

Análisis Estadístico SPSS



ANEXO 10 PRUEBA t DE STUDENT DE MUESTRAS INDEPENDIENTES.
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN PACIENTES CASOS Y CONTROLES DE
INFLUENZA.

	Caso_control	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Glucosa	control	18	95.56	11.828	2.788
	caso	27	129.44	57.044	10.978
TGP	control	18	44.56	27.961	6.590
	caso	27	59.67	48.819	9.395
TGO	control	18	45.78	29.624	6.982
	caso	27	71.70	51.978	10.003
DHL	control	18	210.11	85.078	20.053
	caso	27	434.70	257.623	49.580
CPK	control	18	225.56	327.493	77.191
	caso	25	680.36	1270.065	254.013
Fosf_Alc	control	18	95.44	48.264	11.376
	caso	26	116.54	76.592	15.021
Retis	control	16	1.61	.633	.158
	caso	27	1.35	.717	.138

Análisis estadístico SPSS



ANEXO 11. ANOVA DE UN FACTOR. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE
ACUERDO A GRAVEDAD DE INFLUENZA

Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
Glucosa	ambulatorio	18	95.56	11.828	2.788	89.67	101.44	70	118
	no crítico	12	116.00	22.811	6.585	101.51	130.49	83	167
	crítico	15	140.20	73.181	18.895	99.67	180.73	80	385
	Total	45	115.89	47.527	7.085	101.61	130.17	70	385
TGP	ambulatorio	18	44.56	27.961	6.590	30.65	58.46	17	127
	no crítico	12	36.92	35.207	10.163	14.55	59.29	14	146
	crítico	15	77.87	51.514	13.301	49.34	106.39	34	210
	Total	45	53.62	42.029	6.265	41.00	66.25	14	210
TGO	ambulatorio	18	45.78	29.624	6.982	31.05	60.51	19	151
	no crítico	12	53.08	47.880	13.822	22.66	83.50	17	193
	crítico	15	86.58	51.786	13.371	57.91	115.26	4	218
	Total	45	61.33	45.830	6.832	47.56	75.10	4	218
DHL	ambulatorio	18	210.11	85.078	20.053	167.80	252.42	108	403
	no crítico	12	232.25	102.631	29.627	167.04	297.46	124	461
	crítico	15	596.67	227.474	58.733	470.70	722.64	269	1085
	Total	45	344.87	233.230	34.768	274.80	414.94	108	1085
CPK	ambulatorio	18	225.56	327.493	77.191	62.70	388.41	50	1406
	no crítico	11	336.00	331.788	100.038	113.10	558.90	30	927
	crítico	14	950.93	1647.455	440.301	-.28	1902.14	37	6425
	Total	43	489.98	1008.317	153.767	179.66	800.29	30	6425

Análisis estadístico SPSS



ANEXO 12 ESTADISTICOS DE GRUPO.
CONCENTRACION DE CITOCINAS DE ACUERDO A OBESIDAD

	Obesidad	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
IL1b	no obesidad	30	.1735	.52967	.09670
	obesidad	15	.0750	.53133	.13719
log_IL1ra	no obesidad	30	1.9227	.80438	.14686
	obesidad	15	1.7021	.58867	.15199
log_IL2	no obesidad	30	.4324	.69053	.12607
	obesidad	15	.0624	.28733	.07419
log_IL4	no obesidad	30	.3726	.30672	.05600
	obesidad	15	.4438	.51091	.13192
log_IL5	no obesidad	30	-.1348	.58820	.10739
	obesidad	15	-.3243	.48243	.12456
log_IL6	no obesidad	30	1.1397	.70731	.12914
	obesidad	15	.9933	.69658	.17986
log_IL7	no obesidad	30	.9938	.45207	.08254
	obesidad	15	.8418	.43862	.11325
log_IL8	no obesidad	30	1.2137	.48632	.08879
	obesidad	15	1.3128	.54316	.14024
log_IL9	no obesidad	30	.5670	.90339	.16494
	obesidad	15	.4631	.75728	.19553
log_IL10	no obesidad	30	-.0089	.80066	.14618
	obesidad	15	.0987	1.01858	.26300
log_IL12p70	no obesidad	30	.4362	.73923	.13497
	obesidad	15	.2756	.48324	.12477
log_IL13	no obesidad	30	.4984	.53077	.09690
	obesidad	15	.4286	.53085	.13706
log_IL15	no obesidad	30	.1413	.44777	.08175
	obesidad	15	.1854	.37915	.09790
log_IL17	no obesidad	30	.3702	.69988	.12778
	obesidad	15	.0920	.24343	.06285
log_EOTAXINA	no obesidad	30	.6653	1.06675	.19476
	obesidad	15	.5681	.88744	.22914
log_FGFbasic	no obesidad	30	.2806	.62580	.11426
	obesidad	15	.1648	.42798	.11050
log_GCSF	no obesidad	30	1.4955	.30350	.05541
	obesidad	15	1.2932	.64808	.16733
log_GMCSF	no obesidad	30	.1272	.49143	.08972
	obesidad	15	.1704	.39084	.10092
log_IFNG	no obesidad	30	1.9903	.46525	.08494
	obesidad	15	2.0168	.51046	.13180
log_IP10	no obesidad	30	3.0081	.55412	.10117
	obesidad	15	3.1627	.42114	.10874
log_MCP1	no obesidad	30	1.4839	.66725	.12182
	obesidad	15	1.3335	.70227	.18133



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



log_MIP1a	no obesidad	30	-.0349	.56460	.10308
	obesidad	15	-.1919	.29887	.07717
log_MIP1b	no obesidad	30	.8437	.70855	.12936
	obesidad	15	.7340	.64403	.16629
log_RANTES	no obesidad	30	1.6242	.69326	.12657
	obesidad	15	1.4337	.44684	.11537
log_TNFa	no obesidad	30	.7203	.60106	.10974
	obesidad	15	.6065	.86345	.22294
log_VEGF	no obesidad	30	1.5703	.72872	.13304
	obesidad	15	1.4766	.78154	.20179
log_PDGF	no obesidad	30	2.4973	.58792	.10734
	obesidad	15	2.4481	.35097	.09062



ANEXO 13. ANOVA DE UN FACTOR. CITOCINAS DE ACUERDO A GRAVEDAD CON INFLUENZA

Citocina	Gravedad de Influenza	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
log_IL1b	Sin influenza	41	-.4660	.47679	.07446	-.6165	-.3155	-2.15	.43
	Influenza moderada	18	.1693	.51915	.12237	-.0889	.4274	-.32	1.56
	Influenza grave	27	.1216	.53990	.10390	-.0920	.3352	-.48	1.83
	Total	86	-.1486	.58587	.06318	-.2742	-.0230	-2.15	1.83
log_IL1ra	Sin influenza	41	1.6059	.40992	.06402	1.4765	1.7353	.88	2.61
	Influenza moderada	18	1.8815	.78277	.18450	1.4922	2.2707	.00	3.45
	Influenza grave	27	1.8276	.72468	.13946	1.5409	2.1143	.82	3.88
	Total	86	1.7332	.61446	.06626	1.6014	1.8649	.00	3.88
log_IL2	Sin influenza	41	.0467	.26990	.04215	-.0385	.1319	-.64	.72
	Influenza moderada	18	.4589	.69677	.16423	.1124	.8054	.00	2.04
	Influenza grave	27	.2092	.53445	.10285	-.0022	.4206	-.15	2.30
	Total	86	.1840	.49401	.05327	.0781	.2899	-.64	2.30
log_IL4	Sin influenza	41	.0277	.26246	.04099	-.0551	.1105	-.38	.59
	Influenza moderada	18	.3822	.35139	.08282	.2074	.5569	.01	.99
	Influenza grave	27	.4058	.40800	.07852	.2444	.5672	-.11	1.98
	Total	86	.2206	.37736	.04069	.1397	.3015	-.38	1.98
log_IL5	Sin influenza	41	-.2045	.31990	.04996	-.3054	-.1035	-.70	.79
	Influenza moderada	18	-.1362	.61612	.14522	-.4426	.1702	-.89	.99
	Influenza grave	27	-.2391	.52195	.10045	-.4456	-.0327	-.82	1.03
	Total	86	-.2011	.45691	.04927	-.2990	-.1031	-.89	1.03
log_IL6	Sin influenza	41	-.0068	.60032	.09375	-.1962	.1827	-1.70	1.34
	Influenza moderada	18	1.0973	.65935	.15541	.7694	1.4252	-.28	2.14
	Influenza grave	27	1.0866	.73704	.14184	.7950	1.3782	-.54	2.47
	Total	86	.5676	.85253	.09193	.3848	.7504	-1.70	2.47
log_IL7	Sin influenza	41	.3400	.52039	.08127	.1757	.5043	-.66	1.94
	Influenza moderada	18	.8733	.49965	.11777	.6248	1.1217	-.09	2.00
	Influenza grave	27	.9897	.41420	.07971	.8259	1.1536	.09	2.26
	Total	86	.6556	.56867	.06132	.5337	.7775	-.66	2.26
log_IL8	Sin influenza	41	.6320	.28868	.04508	.5409	.7231	.06	1.35
	Influenza moderada	18	1.1096	.44753	.10548	.8870	1.3321	.17	1.69
	Influenza grave	27	1.3381	.52324	.10070	1.1311	1.5451	-.05	2.43
	Total	86	.9536	.51480	.05551	.8433	1.0640	-.05	2.43
log_IL9	Sin influenza	41	.1140	.40502	.06325	-.0139	.2418	-.12	2.02
	Influenza moderada	18	.4416	.85205	.20083	.0179	.8654	-.20	2.82
	Influenza grave	27	.5928	.85967	.16544	.2528	.9329	-.31	3.22
	Total	86	.3329	.70395	.07591	.1820	.4838	-.31	3.22
log_IL10	Sin influenza	41	-.2721	.65083	.10164	-.4775	-.0666	-2.00	.00
	Influenza moderada	18	.0427	.84035	.19807	-.3752	.4606	-1.70	1.37



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



	Influenza grave	27	.0165	.90339	.17386	-.3409	.3738	-2.00	1.89
	Total	86	-.1156	.78285	.08442	-.2834	.0522	-2.00	1.89
log_IL12p70	Sin influenza	41	.1039	.28433	.04441	.0142	.1937	-.48	1.11
	Influenza moderada	18	.3442	.69390	.16355	-.0008	.6893	-.21	2.24
	Influenza grave	27	.4083	.65471	.12600	.1493	.6673	-.66	2.61
	Total	86	.2498	.53441	.05763	.1352	.3644	-.66	2.61
log_IL13	Sin influenza	41	.2545	.39340	.06144	.1303	.3787	-.80	1.09
	Influenza moderada	18	.3390	.59234	.13962	.0445	.6336	-.92	1.59
	Influenza grave	27	.5658	.46589	.08966	.3815	.7501	-.52	1.91
	Total	86	.3699	.47772	.05151	.2675	.4723	-.92	1.91
log_IL15	Sin influenza	41	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Influenza moderada	18	.1215	.38898	.09168	-.0720	.3149	-.43	1.43
	Influenza grave	27	.1791	.44886	.08638	.0015	.3566	-.19	1.83
	Total	86	.0816	.31378	.03384	.0144	.1489	-.43	1.83
log_IL17	Sin influenza	41	.0811	.32406	.05061	-.0212	.1834	-.85	1.04
	Influenza moderada	18	.3035	.65910	.15535	-.0242	.6313	.00	2.07
	Influenza grave	27	.2601	.56851	.10941	.0353	.4850	.00	2.34
	Total	86	.1839	.49511	.05339	.0777	.2900	-.85	2.34
log_EOTAXINA	Sin influenza	41	1.1328	.82140	.12828	.8735	1.3920	.00	2.22
	Influenza moderada	18	.9405	1.10641	.26078	.3903	1.4907	.00	2.84
	Influenza grave	27	.4278	.88733	.17077	.0768	.7788	.00	3.16
	Total	86	.8712	.94849	.10228	.6679	1.0746	.00	3.16
log_FGFbasic	Sin influenza	41	.0021	.01349	.00211	-.0022	.0064	.00	.09
	Influenza moderada	18	.2941	.60251	.14201	-.0055	.5937	-.10	2.05
	Influenza grave	27	.2073	.54782	.10543	-.0094	.4240	-.25	2.33
	Total	86	.1276	.42423	.04575	.0367	.2186	-.25	2.33
log_GCSF	Sin influenza	41	.6978	.43470	.06789	.5606	.8350	-.38	1.45
	Influenza moderada	18	1.3168	.51765	.12201	1.0594	1.5742	-.19	1.92
	Influenza grave	27	1.5022	.39388	.07580	1.3464	1.6581	.32	2.24
	Total	86	1.0799	.57354	.06185	.9569	1.2029	-.38	2.24
log_GMCSF	Sin influenza	41	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Influenza moderada	18	.0878	.37260	.08782	-.0975	.2731	.00	1.58
	Influenza grave	27	.1774	.50817	.09780	-.0236	.3784	.00	2.23
	Total	86	.0741	.33591	.03622	.0021	.1461	.00	2.23
log_IFNG	Sin influenza	41	1.7704	.23148	.03615	1.6973	1.8434	1.37	2.76
	Influenza moderada	18	1.9930	.45644	.10758	1.7661	2.2200	1.45	3.12
	Influenza grave	27	2.0032	.49573	.09540	1.8071	2.1993	1.34	3.51
	Total	86	1.8901	.39405	.04249	1.8056	1.9746	1.34	3.51
log_IP10	Sin influenza	41	2.5757	.30569	.04774	2.4792	2.6722	2.00	3.42
	Influenza moderada	18	2.9047	.46800	.11031	2.6719	3.1374	2.19	3.79
	Influenza grave	27	3.1630	.52559	.10115	2.9551	3.3709	1.86	4.07
	Total	86	2.8289	.48976	.05281	2.7239	2.9340	1.86	4.07
log_MCP1	Sin influenza	41	.8247	.39834	.06221	.6989	.9504	.00	1.63
	Influenza moderada	18	1.4203	.52842	.12455	1.1575	1.6831	.00	2.20
	Influenza grave	27	1.4428	.76686	.14758	1.1394	1.7461	.00	3.11
	Total	86	1.1434	.63570	.06855	1.0071	1.2797	.00	3.11
log_MIP1a	Sin influenza	41	-.0258	.18936	.02957	-.0855	.0340	-.28	.50



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



log_MIP1b	Influenza moderada	18	-.0818	.58594	.13811	-.3731	.2096	-.72	1.21
	Influenza grave	27	-.0908	.43431	.08358	-.2626	.0810	-.62	1.34
	Total	86	-.0579	.37974	.04095	-.1393	.0235	-.72	1.34
	Sin influenza	41	.9767	.31847	.04974	.8761	1.0772	.40	1.77
log_RANTES	Influenza moderada	18	.8339	.71505	.16854	.4783	1.1895	.00	1.97
	Influenza grave	27	.7894	.67292	.12950	.5232	1.0555	-.04	2.25
	Total	86	.8880	.54406	.05867	.7713	1.0046	-.04	2.25
	Sin influenza	41	1.8632	.30633	.04784	1.7665	1.9599	1.35	2.67
log_TNFa	Influenza moderada	18	1.5418	.67340	.15872	1.2069	1.8767	.82	2.87
	Influenza grave	27	1.5733	.60051	.11557	1.3358	1.8109	.85	3.43
	Total	86	1.7049	.51806	.05586	1.5938	1.8160	.82	3.43
	Sin influenza	41	.0703	.55852	.08723	-.1060	.2466	-1.70	1.46
log_VEGF	Influenza moderada	18	.3950	.69361	.16349	.0500	.7399	-1.30	1.99
	Influenza grave	27	.8739	.63208	.12164	.6239	1.1240	-.03	2.42
	Total	86	.3905	.69923	.07540	.2406	.5405	-1.70	2.42
	Sin influenza	41	.6922	.56840	.08877	.5128	.8716	-.85	1.53
log_PDGF	Influenza moderada	18	1.3599	.72404	.17066	.9998	1.7199	.00	2.30
	Influenza grave	27	1.6585	.73807	.14204	1.3666	1.9505	-.80	2.63
	Total	86	1.1353	.78477	.08462	.9671	1.3036	-.85	2.63
	Sin influenza	41	2.3555	.52143	.08143	2.1909	2.5200	1.41	3.27
log_PDGF	Influenza moderada	18	2.3474	.61842	.14576	2.0399	2.6549	1.42	3.66
	Influenza grave	27	2.5699	.42680	.08214	2.4011	2.7388	1.76	3.73
	Total	86	2.4211	.52002	.05608	2.3096	2.5326	1.41	3.73



ANEXO 14 TABLA DE MATRIZ DE CORRELACIÓN ANTI-IMAGEN ENTRE
CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS.

Matrices anti-imagen

Log citocinas	Log IL1b	log IL1ra	log IL2	log IL4	Log IL5	log IL6	log IL7	log IL8	log IL9	Log IL12p70	log IL13	Log IL15	Log IL17
log_IL1b	.959(a)	.091	-.246	-.185	-.243	-.009	-.145	.018	.030	.218	-.010	-.088	-.014
log_IL1ra	.091	.916(a)	-.441	.086	-.150	-.087	.152	-.024	.051	-.043	-.033	.084	.034
log_IL2	-.246	-.441	.925(a)	-.003	.118	-.114	-.084	.167	-.041	-.084	.035	.243	-.188
log_IL4	-.185	.086	-.003	.913(a)	-.476	-.007	-.133	-.383	-.068	-.026	.122	-.064	.020
log_IL5	-.243	-.150	.118	-.476	.859(a)	-.149	.137	.278	.184	.039	-.378	.062	-.171
log_IL6	-.009	-.087	-.114	-.007	-.149	.944(a)	-.197	-.101	.067	-.117	.223	-.073	.169
log_IL7	-.145	.152	-.084	-.133	.137	-.197	.932(a)	-.100	.027	-.064	-.418	.094	-.118
log_IL8	.018	-.024	.167	-.383	.278	-.101	-.100	.873(a)	-.229	.101	-.048	.102	-.044
log_IL9	.030	.051	-.041	-.068	.184	.067	.027	-.229	.881(a)	-.108	-.158	.036	.035
log_IL12p70	.218	-.043	-.084	-.026	.039	-.117	-.064	.101	-.108	.958(a)	-.179	.007	-.282
log_IL13	-.010	-.033	.035	.122	-.378	.223	-.418	-.048	-.158	-.179	.901(a)	-.054	.222
log_IL15	-.088	.084	.243	-.064	.062	-.073	.094	.102	.036	.007	-.054	.897(a)	-.138
log_IL17	-.014	.034	-.188	.020	-.171	.169	-.118	-.044	.035	-.282	.222	-.138	.926(a)
log_EOTAXINA	-.065	.073	-.082	-.121	.167	-.015	.250	.026	.101	.188	-.015	.104	-.158
log_FGFbasic	.010	.236	-.219	.214	-.259	-.014	-.075	.015	-.422	-.109	.037	-.257	-.176
log_GCSF	-.070	-.108	.080	-.114	-.164	-.104	.040	-.263	-.069	-.045	.009	-.037	-.254
log_GMCSF	-.032	-.040	-.130	-.005	.069	.132	-.020	.135	-.136	-.152	-.049	-.613	.075
log_IFNG	-.186	-.535	.123	-.462	.268	.003	-.042	.187	.080	-.061	-.008	-.192	.186
log_IP10	-.146	-.150	.135	.101	.263	-.171	.104	-.459	.203	.017	-.086	-.035	-.087
log_MCP1	-.134	-.089	-.047	.166	-.036	-.299	.015	-.236	-.362	.035	.069	-.017	-.123
log_MIP1a	.096	.019	-.257	.117	-.172	.067	-.046	-.433	.171	.070	.108	-.018	.032
log_MIP1b	.170	.274	-.154	-.011	-.175	.127	-.033	-.122	.108	-.185	-.064	-.079	.298
log_RANTES	-.034	-.225	.240	.113	-.169	-.058	.077	.229	-.338	-.005	-.036	.072	-.358
log_TNFa	-.128	.004	.045	-.095	.201	-.158	.140	.072	-.004	.066	-.191	.044	-.236
log_VEGF	-.083	-.020	-.022	.098	-.050	-.117	-.055	-.114	-.191	-.191	-.054	.242	-.066
log_PDGF	-.153	.095	-.027	-.047	.119	.053	-.204	-.141	.226	-.097	.152	-.011	.037
log_IL10	-.089	.036	-.033	-.226	.363	-.009	.251	-.059	.425	.025	-.110	.012	.134



Efecto de la Obesidad y Severidad de la Infección
por Influenza A H1N1 2009 sobre la Respuesta de Citocinas



a Medida de adecuación muestral

Log citocinas	log FGF basic	Log GCSF	Log GMCSF	Log IFNG	log IP10	Log MCP1	Log MIP1a	Log MIP1b	Log RANTES	Log TNFa	Log VEGF	Log PDGF	Log IL10
log_IL1b	.010	-.070	-.032	-.186	-.146	-.134	.096	.170	-.034	-.128	-.083	-.153	-.089
log_IL1ra	.236	-.108	-.040	-.535	-.150	-.089	.019	.274	-.225	.004	-.020	.095	.036
log_IL2	-.219	.080	-.130	.123	.135	-.047	-.257	-.154	.240	.045	-.022	-.027	-.033
log_IL4	.214	-.114	-.005	-.462	.101	.166	.117	-.011	.113	-.095	.098	-.047	-.226
log_IL5	-.259	-.164	.069	.268	.263	-.036	-.172	-.175	-.169	.201	-.050	.119	.363
log_IL6	-.014	-.104	.132	.003	-.171	-.299	.067	.127	-.058	-.158	-.117	.053	-.009
log_IL7	-.075	.040	-.020	-.042	.104	.015	-.046	-.033	.077	.140	-.055	-.204	.251
log_IL8	.015	-.263	.135	.187	-.459	-.236	-.433	-.122	.229	.072	-.114	-.141	-.059
log_IL9	-.422	-.069	-.136	.080	.203	-.362	.171	.108	-.338	-.004	-.191	.226	.425
log_IL12p70	-.109	-.045	-.152	-.061	.017	.035	.070	-.185	-.005	.066	-.191	-.097	.025
log_IL13	.037	.009	-.049	-.008	-.086	.069	.108	-.064	-.036	-.191	-.054	.152	-.110
log_IL15	-.257	-.037	-.613	-.192	-.035	-.017	-.018	-.079	.072	.044	.242	-.011	.012
log_IL17	-.176	-.254	.075	.186	-.087	-.123	.032	.298	-.358	-.236	-.066	.037	.134
log_EOTAXINA	-.183	.098	-.007	-.151	.263	-.087	-.039	-.303	-.086	.034	-.162	.149	.208
log_FGFbasic	.894(a)	.072	-.048	-.184	-.239	.170	-.268	.090	.283	.033	.157	-.074	-.347
log_GCSF	.072	.950(a)	.075	-.019	.094	.051	.061	-.027	.212	-.126	-.048	-.047	-.038
log_GMCSF	-.048	.075	.921(a)	-.061	-.020	-.028	-.029	.063	-.023	-.078	-.222	.028	-.092
log_IFNG	-.184	-.019	-.061	.921(a)	-.068	-.109	-.155	-.127	.046	-.057	.042	-.041	.150
log_IP10	-.239	.094	-.020	-.068	.886(a)	.084	.194	-.258	-.159	-.045	-.192	.111	.293
log_MCP1	.170	.051	-.028	-.109	.084	.898(a)	.008	-.148	.204	.045	.233	-.043	-.267
log_MIP1a	-.268	.061	-.029	-.155	.194	.008	.904(a)	-.007	-.596	-.179	-.039	.256	.084
log_MIP1b	.090	-.027	.063	-.127	-.258	-.148	-.007	.905(a)	-.423	.003	-.047	-.067	-.035
log_RANTES	.283	.212	-.023	.046	-.159	.204	-.596	-.423	.813(a)	.127	.189	-.492	-.204
log_TNFa	.033	-.126	-.078	-.057	-.045	.045	-.179	.003	.127	.954(a)	.074	-.193	-.082
log_VEGF	.157	-.048	-.222	.042	-.192	.233	-.039	-.047	.189	.074	.882(a)	-.187	-.368
log_PDGF	-.074	-.047	.028	-.041	.111	-.043	.256	-.067	-.492	-.193	-.187	.919(a)	.144
log_IL10	-.347	-.038	-.092	.150	.293	-.267	.084	-.035	-.204	-.082	-.368	.144	.538(a)

a Medida de adecuación muestral



ANEXO 15. MATRIZ DE COMPONENTES. CONCENTRACION DE
CITOCINAS CORRELACIONADA A GRAVEDAD DE INFLUENZA E IMC DE
ACUERDO A CLASIFICACION DE LA OMS

Matriz de componentes(a)

	Componente			
	1	2	3	4
log_IL1b	.864	.231	.047	.167
log_IL1ra	.820	-.045	.013	.302
log_IL2	.810	-.083	.177	.179
log_IL4	.835	.260	-.057	.194
log_IL5	.727	-.440	-.092	.052
log_IL6	.699	.479	-.191	.170
log_IL7	.760	.203	-.192	-.317
log_IL8	.711	.440	-.384	-.013
log_IL9	.740	-.003	.150	-.309
log_IL12p70	.815	-.130	.088	-.324
log_IL13	.652	-.117	.032	-.469
log_IL15	.666	.058	.608	-.077
log_IL17	.839	-.276	-.018	-.036
log_EOTAXINA	.466	-.541	.097	.424
log_FGFbasic	.791	-.059	.428	-.135
log_GCSF	.654	.521	-.182	.058
log_GMCSF	.701	.025	.606	-.143
log_IFNG	.886	.070	.169	.227
log_IP10	.710	.233	-.295	-.138
log_MCP1	.615	.473	.038	.239
log_MIP1a	.812	-.463	-.069	.104
log_MIP1b	.703	-.491	-.251	.014
log_RANTES	.660	-.662	-.190	.026
log_TNFa	.742	.278	.040	.129
log_VEGF	.571	.358	-.218	-.267
log_PDGF	.747	-.178	-.347	-.045
log_IL10	-.201	.570	.306	.123

Método de extracción: Análisis de componentes principales.
a 4 componentes extraídos



ANEXO 16 ANOVA DE UNA VÍA. DESCRIPTIVOS DE FACTORES 1, 2, 3 Y 4 CON GRAVEDAD DE INFLUENZA.

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Factor 1 Citotoxicidad	Sin influenza	41	-.7026825	.72376498	.11303310	-.9311310	-.4742341	-1.85794	1.12136
	Influenza moderada	18	.5209086	.72520727	.17093299	.1602715	.8815457	-1.07459	1.73360
	Influenza grave	27	.7197640	.78421226	.15092172	.4095400	1.029988 1	-1.71349	2.37011
	Total	86	.0000000	1.00000000	.10783277	-.2144004	.2144004	-1.85794	2.37011
Factor 2 Anti inflamación	Sin influenza	41	.3815874	.61250951	.09565792	.1882555	.5749192	-.64550	2.21158
	Influenza moderada	18	-.1965150	1.31664559	.31033634	-.8512675	.4582374	-1.64744	2.31744
	Influenza grave	27	-.4484374	1.04565310	.20123603	-.8620840	-.0347908	-1.42803	1.82094
	Total	86	.0000000	1.00000000	.10783277	-.2144004	.2144004	-1.64744	2.31744
Factor 3	Sin influenza	41	-.1324441	.41386099	.06463423	-.2630747	-.0018134	-1.13128	.57184
	Influenza moderada	18	.1887533	1.12269567	.26462191	-.3695502	.7470567	-.62402	4.45383
	Influenza grave	27	.0752833	1.45717938	.28043430	-.5011577	.6517242	-1.39911	5.78258
	Total	86	.0000000	1.00000000	.10783277	-.2144004	.2144004	-1.39911	5.78258
Factor 4 IL-13 e IL-7	Sin influenza	41	-.3353741	.93275763	.14567227	-.6297887	-.0409595	-2.22142	2.61292
	Influenza moderada	18	-.1690094	.92757916	.21863251	-.6302837	.2922648	-2.04885	1.24884
	Influenza grave	27	.6219447	.87710190	.16879834	.2749748	.9689147	-1.43619	2.04775
	Total	86	.0000000	1.00000000	.10783277	-.2144004	.2144004	-2.22142	2.61292



ANEXO 17. ANOVA DE UNA VÍA. VARIABLE DEPENDIENTE: FACTOR 1, 2, 3
Y 4. VARIABLE INDEPENDIENTE: GRAVEDAD DE INFLUENZA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
F1_Resp_Obesidad	Inter-grupos	39.116	2	19.558	35.379	.000
	Intra-grupos	45.884	83	.553		
	Total	85.000	85			
F2_Resp_Influenza	Inter-grupos	12.095	2	6.047	6.885	.002
	Intra-grupos	72.905	83	.878		
	Total	85.000	85			
F3_Resp_Aguda	Inter-grupos	1.514	2	.757	.752	.474
	Intra-grupos	83.486	83	1.006		
	Total	85.000	85			
F4_Resp_IL13	Inter-grupos	15.570	2	7.785	9.306	.000
	Intra-grupos	69.430	83	.837		
	Total	85.000	85			



ANEXO 18. ANCOVA. VARIABLE DEPENDIENTE: FACTOR 1
INTERACCION DE CITOCINAS CON INDICE DE MASA CORPORAL Y
GRAVEDAD DE I NFLUENZA

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Factor 1 Citotoxicidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Modelo corregido	40.463(a)	7	5.780	10.124	.000	.476
Intersección	2.005	1	2.005	3.511	.065	.043
Gravedad_analisis	38.015	2	19.007	33.289	.000	.460
IMC4_cat	.273	3	.091	.160	.923	.006
Sexo	.098	1	.098	.172	.680	.002
Edad	1.124	1	1.124	1.969	.165	.025
Error	44.537	78	.571			
Total	85.000	86				
Total corregida	85.000	85				

a R cuadrado = .476 (R cuadrado corregida = .429)



ANEXO 19. ANCOVA. VARIABLE DEPENDIENTE: FACTOR 2
INTERACCION DE CITOCINAS CON INDICE DE MASA CORPORAL Y
GRAVEDAD DE I NFLUENZA

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Factor 2 Anti-inflamación

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Modelo corregido	19.774(a)	13	1.521	1.679	.084	.233
Intersección	1.331	1	1.331	1.469	.229	.020
Gravedad_analisis	11.263	2	5.631	6.216	.003	.147
IMC4_cat	2.029	3	.676	.747	.528	.030
Sexo	2.693	1	2.693	2.973	.089	.040
Edad	.863	1	.863	.953	.332	.013
Gravedad_analisis * IMC4_cat	3.477	6	.580	.640	.698	.051
Error	65.226	72	.906			
Total	85.000	86				
Total corregida	85.000	85				

a R cuadrado = .233 (R cuadrado corregida = .094)



ANEXO 20. ANCOVA. VARIABLE DEPENDIENTE: FACTOR 4
INTERACCION DE CITOCINAS CON INDICE DE MASA CORPORAL Y
GRAVEDAD DE I NFLUENZA

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Factor 4 _IL13 e IL-7

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Modelo corregido	28.136(a)	13	2.164	2.740	.003	.331
Intersección	3.965	1	3.965	5.021	.028	.065
Gravedad_analisis	12.140	2	6.070	7.686	.001	.176
IMC4_cat	2.744	3	.915	1.158	.332	.046
Sexo	.301	1	.301	.381	.539	.005
Edad	3.298	1	3.298	4.176	.045	.055
Gravedad_analisis * IMC4_cat	10.310	6	1.718	2.176	.055	.153
Error	56.864	72	.790			
Total	85.000	86				
Total corregida	85.000	85				

a R cuadrado = .331 (R cuadrado corregida = .210)



12.- BIBLIOGRAFIA

1. Adalja AA. Comparing severity and outcomes for seasonal and 2009 H1N1 infections. JAMA. 2011 Jan 5;305(1):39-40.
2. Chan M. Swine influenza. 2009;http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_20090427/en/index.html (Revisado el 8 de agosto del 2010).
3. Chan M. Influenza A(H1N1). 2009;http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_20090429/en/index.html (Revisado el 8 de agosto del 2010).
4. Swerdlow DL, Finelli L, Bridges CB. 2009 H1N1 influenza pandemic: field and epidemiologic investigations in the United States at the start of the first pandemic of the 21st century. Clin Infect Dis. 2011 Jan 1;52 Suppl 1:S1-3.
5. Chan M. World now at the start of 2009 influenza pandemic. . www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/indexhtml. 2009 11 June 2009.
6. Chan M. Pandemic Influenza (H1N1) 2009. 2010;<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html> (Revisado el 18 de octubre de 2011).
7. México. Estadísticas de la epidemia de Influenza A H1N1. Secretaría de Salud. 2010;<http://portal.salud.gob.mx/contenidos/noticias/influenza/estadisticas.html>.
8. Dominguez-Cherit G, Namendys-Silva SA, de la Torre A, Macias AE, Cordova-Villalobos JA. H1N1 Influenza Pandemic of 2009 Compared With Other Influenza Pandemics: Epidemiology, Diagnosis, Management, Pulmonary Complications, and Outcomes. Curr Infect Dis Rep. 2010 May;12(3):204-10.
9. WHO. Influenza virus activity in the world. http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/indexhtml. 2012;(Revisado el 6 de enero 2012).



10. Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology*. 2011 Mar 15;411(2):229-36.
11. Bewick T, Myles P, Greenwood S, Nguyen-Van-Tam JS, Brett SJ, Semple MG, et al. Clinical and laboratory features distinguishing pandemic H1N1 influenza-related pneumonia from interpandemic community-acquired pneumonia in adults. *Thorax*. 2011 Mar;66(3):247-52.
12. WHO. Pandemic (H1N1) 2009 - update 97. 2010;(Revisado el 23 de abril 2010).
13. Fajardo-Dolci G. Perfil epidemiológico de la mortalidad por influenza humana A (H1N1) en México. *Salud Publica Mex*. 2009;51:361-71.
14. Kumar S, Havens PL, Chusid MJ, Willoughby RE, Jr., Simpson P, Henrickson KJ. Clinical and epidemiologic characteristics of children hospitalized with 2009 pandemic H1N1 influenza A infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 Jul;29(7):591-4.
15. Woo PC, Tung ET, Chan KH, Lau CC, Lau SK, Yuen KY. Cytokine profiles induced by the novel swine-origin influenza A/H1N1 virus: implications for treatment strategies. *J Infect Dis*. 2010 Feb 1;201(3):346-53.
16. WHO. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1). http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430pdf. 2009;(Revisado el 6 de octubre 2009).
17. Panning M, Baumgarte S, Laue T, Bierbaum S, Raith S, Drexler JF, et al. Singleplex real-time RT-PCR for detection of influenza A virus and simultaneous differentiation of A/H1N1v and evaluation of the RealStar influenza kit. *J Clin Virol*. 2011 Feb;50(2):171-4.
18. Varillas D, Bermejo-Martin JF, Almansa R, Rojo S, Nogueira B, Eiros JM, et al. A new method for detection of pandemic influenza virus using High Resolution Melting analysis of the neuraminidase gene. *J Virol Methods*. 2011 Jan;171(1):284-6.
19. Sakabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Takano R, Nidom CA, Le MQ,



Nagamura-Inoue T, et al. Cytokine production by primary human macrophages infected with highly pathogenic H5N1 or pandemic H1N1 2009 influenza viruses. *J Gen Virol*. 2011 Jun;92(Pt 6):1428-34.

20. Strutt TM, McKinstry KK, Dibble JP, Winchell C, Kuang Y, Curtis JD, et al. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat Med*. 2010 May;16(5):558-64, 1p following 64.

21. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*. 2010 Mar;28:445-89.

22. Wan YY, Flavell RA. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol*. 2009 Oct;1(1):20-36.

23. Zhang YH, Wang DY, Wang S, Yan HP, Wu H, Zhao DT, et al. [The analysis of effect of Th1/Th2 cytokine in the different prognosis in severe influenza A (H1N1)]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2011 Aug;25(4):274-6.

24. Winzler C, Fantinato M, Giordan M, Calore E, Basso G, Messina C. CD4(+) T regulatory cells are more resistant to DNA damage compared to CD4(+) T effector cells as revealed by flow cytometric analysis. *Cytometry A*. 2011 Nov;79(11):903-11.

25. Amanatidou V, Zaravinos A, Apostolakis S, Spandidos DA. Chemokines in respiratory viral infections: focus on their diagnostic and therapeutic potential. *Crit Rev Immunol*. 2011;31(4):341-56.

26. Lawson SR, Li Y, Patton JB, Langenhorst RJ, Sun Z, Jiang Z, et al. Interleukin-1beta expression by a recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*. 2011 Nov 20.

27. Berretta F, St-Pierre J, Piccirillo CA, Stevenson MM. IL-2 contributes to maintaining a balance between CD4+Foxp3+ regulatory T cells and effector CD4+ T cells required for immune control of blood-stage malaria infection. *J Immunol*. 2011 Apr 15;186(8):4862-71.

28. Vilela MC, Campos RD, Mansur DS, Rodrigues DH, Lacerda-Queiroz N,



Lima GK, et al. Role of IL-4 in an experimental model of encephalitis induced by intracranial inoculation of herpes simplex virus-1 (HSV-1). *Arq Neuropsiquiatr.* 2011 Apr;69(2A):237-41.

29. Wilson TM, Maric I, Shukla J, Brown M, Santos C, Simakova O, et al. IL-5 receptor alpha levels in patients with marked eosinophilia or mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Nov;128(5):1086-92 e1-3.

30. Newcomb DC, Boswell MG, Huckabee MM, Goleniewska K, Dulek DE, Reiss S, et al. IL-13 Regulates Th17 Secretion of IL-17A in an IL-10-Dependent Manner. *J Immunol.* 2012 Feb 1;188(3):1027-35.

31. Alonso-Arias R, Moro-Garcia MA, Vidal-Castineira JR, Solano-Jaurrieta JJ, Suarez-Garcia FM, Coto E, et al. IL-15 preferentially enhances functional properties and antigen-specific responses of CD4+CD28(null) compared to CD4+CD28+ T cells. *Aging Cell.* 2011 Oct;10(5):844-52.

32. Yu H, Tawab-Amiri A, Dzutsev A, Sabatino M, Aleman K, Yarchoan R, et al. IL-15 ex vivo overcomes CD4+ T cell deficiency for the induction of human antigen-specific CD8+ T cell responses. *J Leukoc Biol.* 2011 Jul;90(1):205-14.

33. Galgani M, Matarese G. Editorial: acute inflammation in obesity: IL-17A in the middle of the battle. *J Leukoc Biol.* 2010 Jan;87(1):17-8.

34. Li C, Yang P, Sun Y, Li T, Wang C, Wang Z, et al. IL-17 response mediates acute lung injury induced by the 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus. *Cell Res.* 2011 Oct 25.

35. Zietkowski Z, Skiepkowski R, Tomasiak-Lozowska MM, Zietkowska E, Bodzenta-Lukaszyk A. Eotaxin in exhaled breath condensate of allergic asthma patients with exercise-induced bronchoconstriction. *Respiration.* 2011;82(2):169-76.

36. Weiss ID, Shoham H, Wald O, Wald H, Beider K, Abraham M, et al. Ccr5 deficiency regulates the proliferation and trafficking of natural killer cells under physiological conditions. *Cytokine.* 2011 Jun;54(3):249-57.

37. Aldridge JR, Jr., Moseley CE, Boltz DA, Negovetich NJ, Reynolds C,



Franks J, et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 31;106(13):5306-11.

38. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):492-9.

39. Almansa R, Anton A, Ramirez P, Martin-Loeches I, Banner D, Pumarola T, et al. Direct association between pharyngeal viral secretion and host cytokine response in severe pandemic influenza. *BMC Infect Dis*. 2011;11:232.

40. Estella A. Cytokine levels in bronchoalveolar lavage and serum in 3 patients with 2009 Influenza A(H1N1)v severe pneumonia. *J Infect Dev Ctries*. 2011 Jul;5(7):540-3.

41. Almansa R, Socias L, Ramirez P, Martin-Loeches I, Valles J, Loza A, et al. Imbalanced pro- and anti-Th17 responses (IL-17/granulocyte colony-stimulating factor) predict fatal outcome in 2009 pandemic influenza. *Crit Care*. 2011 Oct 20;15(5):448.

42. Betts RJ, Prabhu N, Ho AW, Lew FC, Hutchinson PE, Rotzschke O, et al. Influenza A Virus Infection Results in a Robust, Antigen-Responsive and Widely Disseminated Foxp3+ Regulatory T Cell Response. *J Virol*. 2011 Dec 28.

43. Bermejo-Martin JF, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramirez P, et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2009;13(6):R201.

44. Bermejo-Martin JF, Martin-Loeches I, Rello J, Anton A, Almansa R, Xu L, et al. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2010;14(5):R167.

45. Lee N, Wong CK, Chan PK, Chan MC, Wong RY, Lun SW, et al. Cytokine response patterns in severe pandemic 2009 H1N1 and seasonal influenza among hospitalized adults. *PLoS One*. 2011;6(10):e26050.

46. Smith CW. Inflammation and Obesity. *Annu Rev Nutr*. 2008 Aug 12.

47. Aprahamian TR, Sam F. Adiponectin in cardiovascular inflammation and obesity. *Int J Inflam*. 2011;2011:376909.



48. Asferg C, Jensen JS, Marott JL, Appleyard M, Mogelvang R, Jensen GB, et al. Markers of inflammation and hemodynamic measurements in obesity: Copenhagen City Heart Study. *Am J Hypertens*. 2009 Apr;22(4):451-6.
49. Brasil AR, Norton RC, Rossetti MB, Leao E, Mendes RP. C-reactive protein as an indicator of low intensity inflammation in children and adolescents with and without obesity. *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Sep-Oct;83(5):477-80.
50. Calabro P, Golia E, Maddaloni V, Malvezzi M, Casillo B, Marotta C, et al. Adipose tissue-mediated inflammation: the missing link between obesity and cardiovascular disease? *Intern Emerg Med*. 2009 Feb;4(1):25-34.
51. Graziani F, Cialdella P, Liuzzo G, Basile E, Brugaletta S, Pedicino D, et al. Cardiovascular risk in obesity: different activation of inflammation and immune system between obese and morbidly obese subjects. *Eur J Intern Med*. 2011 Aug;22(4):418-23.
52. Wang Z, Nakayama T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:535918.
53. Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-Gonzalez A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 2011;12(5):3117-32.
54. Quilley J. Oxidative stress and inflammation in the endothelial dysfunction of obesity: a role for nuclear factor kappa B? *J Hypertens*. 2010 Oct;28(10):2010-1.
55. Wang H, Steffen LM, Vessby B, Basu S, Steinberger J, Moran A, et al. Obesity modifies the relations between serum markers of dairy fats and inflammation and oxidative stress among adolescents. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Dec;19(12):2404-10.
56. Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, et al. Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Oct;29(10):1608-14.



57. Andel M, Polak J, Kraml P, Dlouhy P, Stich V. [Chronic mild inflammation links obesity, metabolic syndrome, atherosclerosis and diabetes]. *Vnitr Lek.* 2009 Jul-Aug;55(7-8):659-65.
58. Antuna-Puente B, Fève B, Fellahi S, Bastard JP. [Obesity, inflammation and insulin resistance: which role for adipokines]. *Thérapie.* 2007 Jul-Aug;62(4):285-92.
59. Wellen K. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1111-9.
60. Bastarrachea RA. Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gac Méd Méx.* 2007;143(6):505-12.
61. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006 Mar;17(1):4-12.
62. Calabro P, Yeh ET. Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem.* 2007;42:63-91.
63. Fain JN. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:513948.
64. Tilg H, Moschen AR. Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases. *Clin Sci (Lond).* 2008 Feb;114(4):275-88.
65. Curti ML, Jacob P, Borges MC, Rogero MM, Ferreira SR. Studies of gene variants related to inflammation, oxidative stress, dyslipidemia, and obesity: implications for a nutrigenetic approach. *J Obes.* 2011;2011:497401.
66. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2009 Jun;6(6):399-409.
67. Cousin B, Andre M, Casteilla L, Penicaud L. Altered macrophage-like functions of preadipocytes in inflammation and genetic obesity. *J Cell Physiol.* 2001 Mar;186(3):380-6.



68. Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Ramirez B, Rotellar F, Valenti V, et al. Increased levels of calprotectin in obesity are related to macrophage content. Impact on inflammation and effect of weight loss. *Mol Med*. 2011 Jul 5.
69. Ernst MC, Sinal CJ. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Nov;21(11):660-7.
70. Fresno M, Alvarez R, Cuesta N. Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Arch Physiol Biochem*. 2011 Jul;117(3):151-64.
71. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, Greenway F, et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol*. 2010 Aug 1;185(3):1836-45.
72. Vacca A. Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J cancer*. 1999;79(5-6):965-70.
73. Takahashi K. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc* 2002;35:179-203.
74. Gonzalez-Chavez A, Elizondo-Argueta S, Gutierrez-Reyes G, Leon-Pedroza JI. Pathophysiological implications between chronic inflammation and the development of diabetes and obesity. *Cir Cir*. 2011 Mar-Apr;79(2):209-16.
75. Thompson AM, Zhang Y, Tong W, Xu T, Chen J, Zhao L, et al. Association of obesity and biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in adults in Inner Mongolia, China. *Int J Cardiol*. 2011 Aug 4;150(3):247-52.
76. Jain S, Chaves SS. Obesity and influenza. *Clin Infect Dis*. 2011 Sep;53(5):422-4.
77. Diaz E, Rodriguez A, Martin-Loeches I, Lorente L, del Mar Martin M,



Pozo JC, et al. Impact of obesity in patients infected with 2009 influenza A(H1N1). *Chest*. 2011 Feb;139(2):382-6.

78. Hingston CD, Holmes TW, Saayman AG, Wise MP. Obesity and risk of pneumonia in patients with influenza. *Eur Respir J*. 2011 May;37(5):1299; author reply -300.

79. Hagau N, Slavcovici A, Gonganau DN, Oltean S, Dirzu DS, Brezoszki ES, et al. Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. *Crit Care*. 2010;14(6):R203.

80. Zarychanski R, Stuart TL, Kumar A, Doucette S, Elliott L, Kettner J, et al. Correlates of severe disease in patients with 2009 pandemic influenza (H1N1) virus infection. *CMAJ*. 2010 Feb 23;182(3):257-64.

81. Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quinones-Falconi F, Bautista E, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med*. 2009 Aug 13;361(7):680-9.

82. Perez-Padilla R, Fernandez R, Garcia-Sancho C, Franco-Marina F, Mondragon E, Volkow P. Demand for care and nosocomial infection rate during the first influenza AH1N1 2009 virus outbreak at a referral hospital in Mexico City. *Salud Publica Mex*. 2011 Jul-Aug;53(4):334-40.

83. Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med*. 2009 Nov 12;361(20):1935-44.

84. Patel M, Dennis A, Flutter C, Khan Z. Pandemic (H1N1) 2009 influenza. *Br J Anaesth*. 2010 Feb;104(2):128-42.

85. Godoy P, Rodes A, Alvarez J, Camps N, Barrabeig I, Sala MR, et al. [Characteristics of cases hospitalized for severe pandemic (H1N1) 2009 in Catalonia]. *Rev Esp Salud Publica*. 2011 Jan-Feb;85(1):81-7.

86. Morgan OW, Bramley A, Fowlkes A, Freedman DS, Taylor TH, Gargiullo P, et al. Morbid obesity as a risk factor for hospitalization and death due to 2009



pandemic influenza A(H1N1) disease. PLoS One. 2010;5(3):e9694.

87. Becker LA. Effect Size (ES).

2000;[http://www.bwgriffin.com/gsu/courses/edur9131/content/EffectSizeBecker.](http://www.bwgriffin.com/gsu/courses/edur9131/content/EffectSizeBecker.pdf)

pdf (Revisado el 15 de agosto 2011).