

**COLABORACIÓN ESPECIAL****FACTORES GENÉTICOS EN CASOS GRAVES DE GRIPE (H1N1) 2009****Francesc Calafell i Majó (1,2) y Fernando González Candelas (2,3)**

(1) Institut de Biologia Evolutiva, Universitat Pompeu Fabra-Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Departament de Ciències Experimentals i de la Salut (UPF), Barcelona

(2) Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)

(3) Centre Superior d'Investigació en Salut Pública (CSISP), Àrea de Genòmica i Salut, Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, València.

(4) Institut "Cavanilles" de Biodiversitat i Biologia Evolutiva (ICBiBE), Universitat de València

**RESUMEN**

La pandemia de gripe (H1N1) 2009 generó una serie de cuestiones, entre las cuales estuvo que entre un 25 y un 30% de los casos graves de gripe no presentaron ningún factor de riesgo obvio. Hipotetizamos que un elemento que puede contribuir a la respuesta son factores de riesgo genéticos del huésped involucrados en la mala progresión de la enfermedad. Varios indicios nos llevaron a esta hipótesis: estudios de agregación familiar en islandeses y mormones de Utah muestran una cierta heredabilidad de la mortalidad por gripe; se conocen casi 300 genes humanos necesarios para la replicación del virus de la gripe; y los pacientes más graves de gripe (H1N1)2009 mostraron una desregulación del sistema inmune adaptativo. Estamos abordando este problema mediante un diseño caso-control (casos hospitalizados de gripe (H1N1)2009 confirmados contra casos ambulatorios, también confirmados para (H1N1)2009), en el que se genotiparán más de un millón de polimorfismos de cambios de nucleótido (SNPs) y de variación de número de copia (CNVs) en casos y controles.

**Palabras clave:** Gripe. Pandemia. Estudios genómicos de asociación. Estudio de Asociación del Genoma Completo

Correspondencia:  
Francesc Calafell i Majó  
Doctor Aiguader 88  
08003 Barcelona  
francesc.calafell@upf.edu

**ABSTRACT****Genetic Factors in Severe Cases of (H1N1) 2009 Influenza**

The pandemic influenza (H1N1)2009 raised a number of issues, of which we address the following: Why did between 25 and 30% of severe influenza cases show no obvious risk factor? We hypothesize that an element that can contribute to the answer are host genetic risk factors involved in poor disease progression. Several indications led us to this hypothesis: i) studies of familial aggregation in Iceland and Utah Mormons show some heritability of influenza mortality; ii) nearly 300 known human genes are necessary for the replication of the influenza virus, and iii) the most severe cases of influenza A (H1N1) 2009 showed a deregulation of the adaptive immune system. We are addressing this problem through a case-control design (hospitalized cases of influenza (H1N1) 2009 confirmed against outpatient cases, also confirmed for (H1N1) 2009), which will be genotyped for more than a million single nucleotide polymorphisms (SNPs) and copy number variations (CNVs).

**Keywords:** Influenza, human. Outbreak. Pandemic. Genomewide association studies

## INTRODUCCIÓN

La pandemia causada por el nuevo virus gripal (H1N1)2009 movilizó a la comunidad de investigación biomédica de todo el mundo. La pandemia generó muchas preguntas, bastantes aún por responder, y se tuvieron que tomar decisiones para mitigar sus efectos sobre la salud general de la población, para evitar una sobrecarga excesiva del sistema sanitario, y para prevenir el mayor número posible de muertes. La respuesta inmediata de los investigadores permitió la identificación del nuevo virus y su caracterización genética. A su vez, esto permitió el seguimiento rápido y preciso de la pandemia y la preparación de una nueva vacuna en un tiempo récord de tan sólo seis meses después de la identificación del nuevo virus de la gripe. La pandemia de gripe (H1N1)2009 presentó las características típicas de las nuevas pandemias, como el aumento de la morbilidad y mortalidad entre los grupos de edad más joven, la mayoría de las infecciones y la mortalidad se producen durante las fases más tempranas, y la interrupción de la estacionalidad típica. En particular, aunque desproporcionada por el altavoz distorsionador de los medios de comunicación, se ha destacado la presencia de casos graves e incluso fatales en pacientes sin factores de riesgo clásicos (edad, embarazo, obesidad, otras enfermedades). En particular, entre un 25 y un 30% de los casos que requirieron hospitalización por la gripe A en España no presentaron ninguna comorbilidad ni embarazo<sup>1</sup>. La virulencia y gravedad de la infección son el posible resultado de una combinación de múltiples factores: el estado de salud general, la respuesta inmune temprana, la dotación genética del paciente, las características virales específicas, el acceso a los servicios de salud, etc.

Porqué algunas personas resisten la infección o se recuperan rápidamente, mientras que otras experimentan una enfermedad grave asociada con la infección, es una cuestión fundamental que la medicina ha tenido difi-

cultades para responder. Los agentes patógenos y los factores inmunes del huésped han sido investigados ampliamente para muchas enfermedades infecciosas, para abordar estas cuestiones. Sin embargo, se dispone de poca información sobre la influencia de los factores genéticos del huésped en la respuesta a las infecciones virales. Los factores genéticos pueden desempeñar un papel relevante, incluso esencial, en numerosos puntos durante el curso de la infección viral, incluyendo la adhesión y la entrada viral, la replicación, la progresión de la enfermedad y el desarrollo de la gravedad, y, por último, la transmisión<sup>2</sup>. Así, se ha encontrado que los genes específicos responsables de la respuesta inmunitaria del huésped son determinantes principales de la evolución clínica de la enfermedad asociada con el VIH<sup>3</sup> y las infecciones causadas por los virus de la hepatitis B y C<sup>4</sup>. Sin embargo, aún es escasa la información sobre determinantes genéticos en relación con la gravedad de la infección por el virus de la gripe, y, en particular, no se han publicado estudios genéticos de asociación caso-control<sup>5</sup>.

Estudios recientes han mostrado algunos aspectos de la biología básica del virus de la gripe que permitirían entender posibles factores de riesgo genéticos para la enfermedad. En sendos artículos publicados en el mismo número de *Nature*, König et al.<sup>6</sup> y Karlas et al.<sup>7</sup> determinan cuales son los genes humanos necesarios para la replicación temprana del virus. König et al.<sup>6</sup> encuentran 295 cofactores celulares necesarios para la replicación del virus, de los cuales 181 se pueden ensamblar en una red de interacciones huésped-patógeno altamente significativa. Aunque los autores realizaron su estudio primordialmente con un virus sintético, replicaron sus hallazgos con cepas silvestres del virus (H1N1)2009. Mediante una técnica molecular distinta, Karlas et al.<sup>7</sup> encontraron 287 genes humanos que influyen en la replicación del virus A de la gripe. Estos conjuntos de genes son candidatos naturales para que su diversidad entre individuos explique par-

te de la diversidad en el curso de la enfermedad entre pacientes, al lado de todos aquellos genes que medien en las respuestas inmunes e inflamatorias desencadenadas por la infección. Así, Bermejo-Martín et al.<sup>8</sup> estudiaron los patrones de expresión génica en 19 pacientes hospitalizados por gripe (H1N1)2009, y hallaron que los pacientes más graves (definidos como aquellos que necesitaron ventilación asistida) presentaban una disrupción importante de la expresión de los genes implicados en la inmunidad adaptativa. Una de las posibles (pero no la única) explicación de este hallazgo podría apuntar a que factores genéticos causaran esta disrupción, que debería confirmarse en muestras mayores.

La mejor evidencia de un papel para los factores de susceptibilidad genética en las consecuencias graves de la gripe proviene de estudios de agregación familiar. Dos de estos estudios han sido publicados en poblaciones con registros genealógicos especialmente buenos: los islandeses<sup>9</sup> y los mormones de Utah<sup>10</sup>. Gottfredson et al.<sup>9</sup> analizan la agregación familiar de los fallecimientos por gripe en la epidemia de 1918 en Islandia y hallan en las familias de los fallecidos riesgos relativos significativos de muerte por gripe hasta el cuarto grado de parentesco. En Utah, y a partir de 4.885 fallecidos por gripe en un período de 100 años, Albright et al.<sup>10</sup> encontraron riesgos significativos de muerte por gripe para parientes lejanos que no cohabitaban (el RR para la mortalidad por influenza llegó a 1,16 en familiares de tercer grado), lo que apoya que exista una contribución (probablemente pequeña) de factores genéticos de riesgo en la progresión a gravedad de la gripe.

Los estudios caso-control se han propuesto como el diseño óptimo para descubrir variaciones genéticas asociadas con la susceptibilidad genética a enfermedades multifactoriales<sup>11</sup>, y se han aplicado con éxito a una serie de enfermedades complejas<sup>12</sup>, incluyendo enfermedades infecciosas: por

ejemplo, Sikora et al.<sup>13</sup>, en malaria placentaria, y Dean et al.<sup>14</sup> y Samson et al.<sup>15</sup>, quienes descubrieron que un alelo defectuoso en el gen CCR5 protege contra el desarrollo del SIDA. La malaria y el SIDA son los casos más conocidos, pero no se sabe mucho más de otras enfermedades infecciosas y, en particular, los determinantes genéticos de susceptibilidad a la infección (leve o grave) siguen siendo desconocidos, probablemente debido a las dificultades en el diseño de un marco epidemiológico adecuado.

Dada esta falta de conocimientos específicos sobre los factores genéticos en la gravedad de gripe y los antecedentes descritos, planteamos un proyecto a los planes de investigación urgente comisionados por el MICINN en relación a la pandemia de gripe (H1N1)2009. La reciente aparición de las plataformas de genotipado que permiten el análisis, con costes relativamente económicos, de polimorfismos como SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) y CNVs (Copy Number Variants) en densidades tales que pueden considerarse como la captura de todas las variaciones comunes en el genoma humano ha traído un oleada de GWAS (estudios de asociación a nivel genómico). Este enfoque ha sido utilizado con las enfermedades comunes más frecuentes y, en algunos casos, ha conducido al descubrimiento de asociaciones inesperadas de genes que no habrían sido considerados a priori como candidatos probables<sup>16</sup>.

La identificación y caracterización de los determinantes genéticos que intervienen en los outcomes de la infección con el virus de la gripe podría conducir a una mayor comprensión de la fisiopatología del virus y sus estrategias de evasión inmune. Esta visión se traducirá en la identificación de factores de pronóstico y en mejorar la gestión de las personas en riesgo de resultados adversos después de la infección por virus de la gripe. En el caso de una pandemia, sin embargo, la identificación precoz y la intervención sobre los individuos en alto riesgo de enfermedad

grave y muerte como consecuencia de la gripe, debidos a factores de predisposición genética, serían muy beneficiosas. Por lo tanto, nos proponemos realizar un amplio estudio genómico de las asociaciones (GWAS) para descubrir los factores de susceptibilidad genética a la progresión a la gravedad de la gripe A (H1N1) 2009, comparando los perfiles genéticos de la gripe A (H1N1) 2009 en pacientes que requieren hospitalización frente a los pacientes que presentaron síntomas leves y fueron tratados ambulatoriamente. Dado que se dispondrá de información para los factores epidemiológicos en estos mismos pacientes, seremos capaces de diseccionar las posibles interacciones entre factores genéticos del huésped y ambientales implicados en la susceptibilidad y la gravedad de la infección por del virus de la gripe (H1N1) 2009.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.Santa-Olalla Peralta P, Cortés-García M, Vicente-Herrero M, Castrillo-Villamandos C, Arias-Bohigas P, Pachon-Del Amo I, et al. Risk factors for disease severity among hospitalised patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Spain, April - December 2009. *Euro Surveillance*. 2010;15(38):196-67.
- 2.Mubareka S, Palese P. Human genes and influenza. *J Infect Dis*. 2008 Jan 1;197(1):1-3.
- 3.'Brien SJ, Nelson GW. Human genes that limit AIDS. *Nat Genet*. 2004 Jun;36(6):565-74.
- 4.Singh R, Kaul R, Kaul A, Khan K. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol*. 2007 Mar 28;13(12):1770-87.
- 5.Trammell RA, Toth LA. Genetic susceptibility and resistance to influenza infection and disease in humans and mice. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008 Jul;8(4):515-29.
- 6.Konig R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S, et al. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*. 2010 Feb 11;463(7282):813-7.
- 7.Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner KP, Artarini A, Heuer D, et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*. 2010 Feb 11;463(7282):818-22.
- 8.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 Sep 14;14(5):R167.
- 9.Gottfredsson M, Halldorsson BV, Jonsson S, Kristjansson M, Kristjansson K, Kristinsson KG, et al. Lessons from the past: familial aggregation analysis of fatal pandemic influenza (Spanish flu) in Iceland in 1918. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 29;105(4):1303-8.
- 10.Albright FS, Orlando P, Pavia AT, Jackson GG, Cannon Albright LA. Evidence for a heritable predisposition to death due to influenza. *J Infect Dis*. 2008 Jan 1;197(1):18-24.
- 11.Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. 1996;273:1516-7.
- 12.Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med*. 2002 Mar-Apr;4(2):45-61.
- 13.Sikora M, Ferrer-Admetlla A, Laayouni H, Menendez C, Mayor A, Bardaji A, et al. A variant in the gene FUT9 is associated with susceptibility to placental malaria infection. *Hum Mol Genet*. 2009 Aug 15;18(16):3136-44.
- 14.Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996 Sep 27;273(5283):1856-62.
- 15.Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996 Aug 22;382(6593):722-5.
- 16.The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun 7;447(7145):661-78.