



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

LA RESPUESTA TH17 INCREMENTADA EN PACIENTES ASMÁTICOS
DETERMINA DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y
HUMORAL A LA VACUNACIÓN CONTRA INFLUENZA.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

ANDREA AIDA VELASCO MEDINA

TUTOR

DRA. ROSA MARÍA WONG CHEW
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

DR. JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ADOLFO CHAVEZ NEGRETE
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. JUAN GARDUÑO ESPINOSA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. CÉSAR R. GONZÁLEZ BONILLA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Rosa María Wong Chew, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella, por haber tenido la paciencia necesaria para ayudarme, por transmitirme su conocimiento y por ser siempre accesible.

Al Dr. Miguel Leonardo García León por su asesoría en las técnicas de laboratorio y el análisis de muestras.

Al CONACYT por la beca que me proporcionaron, porque gracias a ello, fue posible mi estancia en este posgrado.

Al Posgrado de la UNAM, por la oportunidad de seguir adelante en mi formación y por el gran apoyo brindado durante este tiempo.

A la Unidad de Medicina Experimental de la UNAM, por la oportunidad y facilidades para la elaboración de este proyecto.

ÍNDICE

Resumen estructurado	1-3
Palabras Clave	3
Marco teórico	4
Asma Bronquial	4-5
Asma bronquial e Infecciones virales	5
Respuesta Inmune contra el virus de Influenza	5 - 7
Respuesta Inmune innata	5 - 6
Respuesta inmune humoral	6
Respuesta inmune celular	6 - 7
Respuesta inmune de memoria	7
Respuesta inmune a la vacuna de influenza	7 - 8
Respuesta Th17 en pacientes asmáticos	8 – 9
Respuesta Th17 y su efecto sobre la inmunidad contra infecciones virales	9
Citocinas Th17 y la respuesta a la vacunación contra influenza	9 - 10
Efectos adversos a la vacunación contra influenza	10 - 11
Planteamiento del problema	11
Pregunta de investigación	11
Objetivos	12
Justificación	12
Hipótesis	13
Tipo y diseño del estudio	13
Definición de las variables a evaluar y forma de medirlas	13 - 14
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	15
Población de estudio	15
Vacuna de Influenza	15 - 16
Cálculo del tamaño de la muestra	16
Procedimiento	16 - 17
Estudios de laboratorio	17 – 19
Análisis estadístico	20
Consideraciones éticas	20

Resultados	21 – 30
Discusión	31 - 33
Conclusiones	34
Anexo 1. Carta de consentimiento bajo información	35 - 37
Anexo 2. Hoja de recolección de datos	38
Bibliografía	39 - 43

RESUMEN

Antecedentes. El asma bronquial es un trastorno inflamatorio crónico de la vía aérea inferior considerado actualmente como una enfermedad heterogénea con participación de otras poblaciones celulares como las Th17, caracterizadas por la producción de IL-17 e IL-23 que participan en el reclutamiento de neutrófilos a la vía aérea, relacionados con inflamación crónica.

Uno de los factores desencadenantes de exacerbaciones en pacientes asmáticos en niños y adultos, son infecciones virales como la influenza, por lo que se recomienda la vacuna contra este virus en asmáticos.

La aplicación de la vacuna contra influenza estimula la producción de anticuerpos y la respuesta inmune de tipo celular. La respuesta inmune celular puede correlacionarse con la protección contra el virus, siendo ésta probablemente de mayor duración que los niveles séricos de inmunoglobulinas específicas.

Los pacientes asmáticos, con un aumento en la producción de citocinas Th17 pueden tener una mejor respuesta inmune y mayor eficacia con la vacunación contra influenza. Al investigar esta respuesta a la vacunación en esta población y compararla con población sana proporcionará evidencia inmunológica y clínica del beneficio de la vacunación contra influenza en pacientes asmáticos con una respuesta Th17 incrementada.

Pregunta de investigación ¿Es mayor la cantidad de células T CD4+ y T CD8+ de memoria (Inmunidad celular) y los niveles de anticuerpos específicos (Inmunidad humoral) posterior a la vacunación contra influenza en pacientes asmáticos con un fenotipo Th17 comparado con adultos sanos?

Hipótesis Si la respuesta inmune a la vacunación contra influenza se relaciona con un aumento en la producción de citocinas de tipo Th17 en pacientes asmáticos, entonces se encontrarán mayores niveles de anticuerpos específicos contra influenza y células T CD4+ y CD8+ de memoria posterior a la vacunación contra este virus en pacientes asmáticos comparados con sanos.

Objetivo General Comparar la respuesta inmune celular y humoral a la vacunación contra influenza en pacientes asmáticos y sanos, mediante la medición de anticuerpos específicos contra el virus y células B, T CD4+ y TCD8+ de memoria específica antes y 1, 3, 6 y 12 meses después de la vacunación.

Metodología Estudio clínico experimental, controlado, prospectivo. Se incluyeron 25 pacientes asmáticos adultos que acudieron al Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital General de México. El grupo de sujetos sanos serán 25 estudiantes adultos sanos que acudieron al Servicio de Alergia a tomar clases de diferentes universidades. Se colectaron muestras de sangre antes, 4 y 12 meses después de la inmunización con influenza, determinándose anticuerpos específicos contra el virus y células B, T CD4+ y CD8+ de memoria específica mediante marcadores de superficie. También se determinaron los patrones de citocinas Th1, Th2 y Th17 en

cultivos de CMSP de ambas poblaciones. Se realizó un análisis descriptivo con medidas de tendencia central y un análisis comparativo de los niveles de anticuerpos y las frecuencias de las poblaciones de CD4+, CD8+ y B de memoria antes y después de la inmunización. Para las variables cualitativas se utilizó chi cuadrada o Fisher, y para las cuantitativas con distribución normal t de Student o con distribución no normal U de Mann Whitney. Se utilizó la prueba de Friedman para determinar diferencias en las medias de anticuerpos y las poblaciones celulares de memoria en mediciones repetidas a lo largo del tiempo entre el grupo de asmáticos y sanos.

Resultados

Incluimos 25 sujetos asmáticos y 25 sanos, entre 18 a 45 años de edad. Se observaron diferencias en la media de linfocitos B de memoria para los tres serotipos de Influenza entre

controles y asmáticos en la medición basal: 1.89 ± 0.93 vs 3.01 ± 1.26 ($p = 0.001$) para H1N1, 2.15 ± 1.47 vs 2.8 ± 1.12 ($p = 0.01$) para H3N2 y 2.03 ± 1.31 vs 2.60 ± 1.12 ($p = 0.02$) para Influenza B respectivamente. A los 12 meses: 5.10 ± 6.35 vs 6.24 ± 1.89 ($p = 0.002$) para H1N1, 4.77 ± 6.28 vs 5.45 ± 2.18 ($p = 0.002$) para H3N2 y 4.04 ± 4.85 vs 6.03 ± 1.73 ($p < 0.001$) para Influenza B entre controles y asmáticos respectivamente. Se observa un aumento en la proliferación para los tres serotipos de influenza en los controles y asmáticos a lo largo del tiempo, con diferencias estadísticamente significativas a los 4 y 12 meses entre los grupos. La proliferación celular para H1N1 fue 0.83 ± 0.74 vs 0.87 ± 0.74 (0.82) basal, 0.78 ± 0.99 vs 1.20 ± 0.73 ($p = 0.002$) a los 4 meses y 5.33 ± 5.27 vs 3.93 ± 1.85 ($p = 0.02$) a los 12 meses; para H3N2 fue de 0.97 ± 0.98 vs 0.93 ± 0.63 ($p = 0.67$) basal, 1.30 ± 2.39 vs 1.09 ± 0.55 ($p = 0.05$) a los 4 meses y 5.36 ± 3.90 vs 5.44 ± 2.45 ($p = 0.73$) a los 12 meses; para Influenza B fue de 0.77 ± 1.17 vs 0.62 ± 0.47 ($p = 0.44$) basal, 0.98 ± 2.19 vs 1.06 ± 0.76 ($p = 0.004$) a los 4 meses y 4.51 ± 3.96 vs 3.26 ± 1.65 ($p = 0.03$) a los 12 meses, para controles y asmáticos respectivamente. Los títulos de inhibición de la hemaglutinación fueron similares en ambos grupos, aumentando en ambos a los 4 meses y manteniéndose elevados o disminuyendo ligeramente a los 12 meses. El porcentaje de seropositividad aumenta a los 4 y más aún a los 12 meses. Se detectó IL-17 en el sobrenadante de CMSP en 2 pacientes asmáticos y un paciente control con sobrepeso.

Conclusiones

Todos los pacientes tanto controles como asmáticos tenían memoria contra influenza A H1N1, AH3N2 y B previa a la vacunación, lo que sugiere que todos los pacientes han estado en contacto con los 3 virus por enfermedad o vacunación previa. Se observa el efecto de refuerzo a la vacunación en ambos grupos. Las células T CD4 y T CD8 de memoria y los títulos de anticuerpos aumentan a los 4 meses y disminuye a los 12 pero se mantienen por arriba del basal. El porcentaje de seroconversión aumenta a los 4 meses y lo hace todavía más a los 12 meses manteniendo la protección a la vacunación. La proliferación celular específica contra influenza aumenta en ambos grupos a los 4 y 12 meses después de la vacunación, con diferencias significativas a los 4 y 12 meses. Los linfocitos B de memoria

aumentan 4 y 12 meses después de la vacunación y se encuentran en mayor cantidad en los asmáticos en forma basal y a los 12 meses. El patrón de citocinas sólo mostró diferencias significativas con interferón, siendo mayor en los pacientes asmáticos, lo que sugiere un patrón Th1 predominante en éstos pacientes, probablemente por el efecto de la inmunoterapia o un efecto Th17 no detectado.

Palabras clave: asma bronquial, virus de influenza, vacuna de influenza, linfocitos Th17

MARCO TEÓRICO

Asma Bronquial

El asma bronquial es una enfermedad que se presenta desde la infancia hasta la edad adulta. Es un trastorno inflamatorio crónico de la vía aérea en donde participan diversas células del sistema inmune. Ésta inflamación crónica es responsable de la hiperreactividad bronquial que se manifiesta como episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos y se asocian con obstrucción de la vía aérea que es reversible espontáneamente o con tratamiento.¹

Recientemente se ha observado un aumento en la prevalencia de enfermedades atópicas y en particular de asma bronquial, sobre todo en países industrializados, aunque también en países en vías de desarrollo. En México se reporta una prevalencia del 6%, cifra inferior a otros países de Latinoamérica.²

Tradicionalmente se consideraba al asma bronquial como una patología con un fenotipo Th2 e inflamación de predominio eosinofílica.³ Actualmente se le considera una enfermedad heterogénea, con una participación por parte de otras poblaciones celulares, en particular aquellas productoras de IL-17 (Th17).⁴

Las células Th17 se caracterizan por la activación en presencia de la combinación de IL-17b e IL-23^{4,5}, relacionándose con diversas enfermedades inflamatorias crónicas como psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, asma bronquial y dermatitis atópica.^{6,7} Su papel en el asma es motivo de intenso estudio actualmente. Se ha observado que en los pacientes con asma, la presencia de neutrófilos en la vía aérea se correlaciona con la severidad de la enfermedad⁸⁻¹⁰, demostrándose el papel de la IL-17 en el reclutamiento de neutrófilos en la vía aérea¹¹, que, junto con las células Th2, participan en la inflamación crónica.

Varios estudios en pacientes asmáticos demuestran la presencia de neutrófilos y un aumento moderado en la IL-17 en muestras de lavado broncoalveolar (LBA), esputo y suero.¹² En otros estudios se ha observado que además de un aumento en las células Th2 productoras de IL-4, se encuentra un aumento en las células Th17 circulantes en pacientes asmáticos comparados con pacientes sanos. Además del aumento en el número de células Th17 en el pulmón de pacientes con asma severa, las concentraciones plasmáticas de IL-17 e IL-22 aumentan junto con la severidad de la enfermedad.¹³

El papel de las células Th17 tiene implicaciones terapéuticas de acuerdo con estudios recientes en los que se ha asociado estas células con resistencia a los corticosteroides, el cual constituye el pilar del tratamiento del asma. McKinley y colaboradores reportan que las células Th17 son resistentes a los esteroides in vitro y que la hiperreactividad bronquial inducida por la transferencia de células Th17 en un modelo murino es

resistente a estos fármacos.¹⁴ En contraste, otros estudios muestran que la IL-17 puede ser protectora al demostrar que la administración de IL-17 en la fase crónica disminuye la producción de citocinas de tipo Th2, reduce la eosinofilia y la hiperreactividad bronquial.¹⁵

Asma bronquial e infecciones virales

Las exacerbaciones asmáticas se deben con frecuencia a infecciones virales. Los mecanismos por los que interactúan el asma y las infecciones virales no está completamente definido pero se ha sugerido que este tipo de infecciones en personas atópicas las expone a un aumento de la respuesta inflamatoria de la vía aérea.¹⁶ Una de las medidas encaminadas a evitar este tipo de infecciones es el uso de vacunas.

La infección por influenza ocasiona morbilidad tanto en niños como adultos y la vacunación puede prevenir su desarrollo y complicaciones por lo que se recomienda su aplicación en pacientes con asma. Se ha relacionado la aplicación de esta vacuna con la presencia de exacerbaciones asmáticas, sin embargo existen estudios en los que se ha demostrado su seguridad en esta población.¹⁷ Se ha recomendado por la Academia Americana de Pediatría y el Panel de Expertos en el Diagnóstico y Tratamiento del Asma en Estados Unidos, que los pacientes con asma reciban esta vacuna de manera anual.^{18,19}

El riesgo de complicaciones, hospitalizaciones y muerte por Influenza son mayores en personas de 65 años de edad en adelante, niños de 6 a 59 meses, y personas de cualquier edad con ciertas condiciones de salud subyacentes. Estas incluyen: enfermedades crónicas pulmonares y cardiovasculares incluyendo asma, enfermedades metabólicas crónicas como diabetes mellitus, disfunción renal, hemoglobinopatías o inmunodeficiencias como las causadas por neoplasias, por medicamentos o por el virus de inmunodeficiencia humana.¹⁹⁻²⁷

En Estados Unidos en niños menores de 5 años, el rango de hospitalización varía de 500/100,000 niños con condiciones médicas de alto riesgo hasta 100/100,000 niños sin condiciones médicas subyacentes.²⁸⁻³¹ La hospitalización en niños menores de 24 meses es comparable con la tasa reportada entre personas mayores de 65 años.^{30,31} Durante una epidemia de influenza, entre 5 y 15% de la población adulta es afectada, y puede haber hasta un millón de muertes (35).

Respuesta inmune contra el virus de influenza

Respuesta inmune innata

Los mecanismos de resistencia innatos participan de manera muy importante en el control inicial de los virus a través del reconocimiento de estos a través de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) como los receptores tipo Toll (TLRs) presentes ya sea en la células presentadoras de antígeno (APC) como es el caso de las células dendríticas. El reconocimiento mediado por los PRRs tiene como consecuencia la activación celular

caracterizada por la producción de interferones, citocinas, quimiocinas, moléculas coestimuladoras que participan activamente en la eliminación del virus. Sin embargo, la extraordinaria capacidad de replicación del virus y sus mecanismos de evasión muchas veces le permiten escapar de la acción de estos mecanismos. A pesar de esto, las APC procesan los antígenos virales y migran a los órganos linfoides secundarios en donde hacen accesible el antígeno a los linfocitos B y le presentan los antígenos virales a los linfocitos T dando origen así a la respuesta inmune adaptativa.^{32,33}

Respuesta inmune humoral

Los antígenos virales llegan al órgano linfóide secundario local en donde se encuentran con los linfocitos B específicos, el reconocimiento de estos a través del receptor específico del linfocito B da origen a la activación de la respuesta inmune de anticuerpos. La inmunidad contra los antígenos de superficie, particularmente la hemaglutinina, reduce la probabilidad de infección y severidad de la enfermedad si hay infección.³² Los anticuerpos contra un tipo o un subtipo de virus de Influenza confieren protección limitada o nula contra otro tipo o subtipo de Influenza. Los anticuerpos contra una variante antigénica de Influenza pueden no proteger por completo contra una variante antigénica nueva del mismo tipo o subtipo.³³ El desarrollo frecuente de variantes antigénicas a través de la deriva antigénica es la base virológica para las epidemias estacionales y la razón de la incorporación de una o más cepas nuevas en cada vacuna de influenza anual. Existen cambios antigénicos más dramáticos con menor frecuencia que puede dar como resultado un nuevo virus de Influenza con el potencial de causar una pandemia.

Respuesta inmune celular

Los linfocitos T CD8⁺ tienen un papel importante en la inmunidad contra Influenza, estudios en ratones demuestran que pueden promover la recuperación de infecciones letales en ratones con deficiencias de anticuerpos y en ratones deficientes en CD8⁺ hay una falla para eliminar el virus.³⁴ En ratones, después de la infección intranasal, hay una sensibilización, activación y expansión de células T CD8⁺ vírgenes específicas contra influenza en los nódulos mediastinales. La replicación se da en el epitelio respiratorio en donde las células T CD8⁺ tienen su función efectora, produciendo citocinas antivirales y lisando células blanco que presentan determinantes virales para los cuales tienen un receptor de células T específico. La lisis de células infectadas se realiza mediante la exocitosis de gránulos que contienen granzimas y perforinas. La respuesta secundaria de células T específica contra influenza se da más rápido que la respuesta primaria. En ratones a los que se les eliminó los TCD8⁺ la respuesta a Influenza está disminuida, lo que sugiere que TCD8⁺ tienen un papel importante en la respuesta de memoria. En contraste, el papel de los linfocitos T CD4⁺ en la respuesta a influenza es poco conocido. Se sabe que es importante su papel en la ayuda para la inmunidad adaptativa y el desarrollo de TCD8⁺ de memoria.³⁴

Existen experimentos en ratones que sugieren que la respuesta inmune celular contra las cepas de Influenza circulantes (H1N1, H3N2) puede ser protectora contra la cepa H5N1 que es de las cepas más virulentas y que causo tantas muertes en Asia en 2003 al 2006.³⁴

Respuesta de memoria

Los linfocitos T CD8+ tienen un papel importante en la respuesta de memoria a Influenza y aparentemente los T CD4+ también son importantes. Se sabe que hay poblaciones de linfocitos T de memoria CD4+ y CD8+ en tejidos no linfoides como el parénquima pulmonar, intestino, riñones, hígado, tejido adiposo y cerebro. Algunas de éstas células T de memoria persisten en un estado activado y en caso de las TCD8+ son citolíticas. Este estado activado ha llevado a designarlas como células T “efectoras” para distinguirlas de las células T “centrales” que se encuentran en órganos linfoides secundarios.³⁵ Se ha postulado que el mantenimiento de la población de linfocitos T CD8+ de memoria depende de las interleucinas 7 y 15, y de los precursores CD8 $\alpha\alpha$.³⁶ Se describen 3 etapas en el desarrollo de linfocitos T de memoria. Primero, la expansión clonal, que se inicia en tejidos linfoides donde se ponen en contacto células T vírgenes con el antígeno y se diferencian en células efectoras. Semanas después de la eliminación del patógeno, 90% de las células efectoras mueren, ésta fase se denomina fase de contracción o muerte. Las células que sobreviven entran en la fase de memoria, en el que las células T de memoria se estabilizan y se mantienen por largos periodos de tiempo, en el caso de las células T CD8+ se ha postulado que se pueden detectar mediante el receptor de IL-7 CCR7 ya que éste se encuentra expresado en menor proporción en el caso de TCD8 de memoria en comparación con CCR7 alto en caso de células efectoras.³⁷ Fenotípicamente, las células T de memoria y efectoras expresan marcadores de adhesión y disminución del receptor CD62L mismo que favorece su migración hacia órganos linfoides. Funcionalmente, las células de memoria y efectoras producen en forma rápida citocinas efectoras. La heterogeneidad en la expresión de los receptores CD62L y CCR7 define por lo menos 2 grupos de células T de memoria, las células T de memoria central (T_{CM}; CD62L^{alto} CCR7⁺) y las células de memoria efectora (T_{EM}; CD62L^{bajo} CCR7⁻) que migran a tejidos linfoides y no linfoides respectivamente.³⁸ Los linfocitos B tienen el marcador CD19 en su superficie, que junto con CD27 se describen como linfocitos B de memoria.³⁹ Estos marcadores permiten medir una población de linfocitos de memoria generados en respuesta a un antígeno específico, en éste caso la vacuna de influenza.

Respuesta inmune a la vacuna de influenza

Las recomendaciones actuales de la ACIP de Estados Unidos (Advisory Committee on Immunization Practices) para vacunación con Influenza son aplicar la vacuna a toda la población mayor de 6 meses de edad.¹⁸ La Norma oficial Mexicana recomienda la vacunación a menores de 5 años y mayores de 60 años, y a toda la población que tiene factores de

riesgo como embarazo, obesidad, cardiopatías, neumopatías, incluyendo pacientes con asma. Se ha comprobado la efectividad de la vacunación contra influenza, desde el punto de vista clínico, se ha observado menor frecuencia de infección por influenza confirmada por laboratorio, así como síntomas similares a influenza.⁴⁰

La respuesta a la vacunación contra influenza se puede determinar por la presencia de anticuerpos contra los tres componentes de la vacuna (A/H3N2, A/H1N1, y B), lo cual se mide mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH). Se define una protección adecuada con un título de IH mayor o igual a 40, lo cual se consigue a las 2 semanas de la inmunización, con un pico a las 4-6 semanas.⁴¹ La duración de la protección por anticuerpos circulantes ha sido considerada como un parámetro de efectividad de la vacunación, encontrando niveles de seroprotección a las 20 semanas posteriores a la vacunación.⁴² Con respecto a la persistencia de esta protección posterior a la vacunación, se ha encontrado que los niveles de anticuerpos disminuyen en los 6 meses posteriores a su aplicación, sobre todo en personas mayores de 50 años de edad. Esta protección tiene mayor duración en aquellas personas de menor edad y con títulos de IH mayores antes de la vacunación.⁴³ En algunos reportes se menciona incluso que estos anticuerpos disminuyen con mayor rapidez en los pacientes de la tercera edad, encontrándose por debajo de los niveles de seroprotección a los 4 meses.⁴⁴

Además de la inmunidad humoral en la defensa contra la infección viral, la inmunidad celular juega también un papel muy importante. Esta inmunidad celular mediada por subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ contribuyen con la vigilancia contra el virus de la influenza, por medio de la modulación con citocinas y la reactividad cruzada que existe con linfocitos T citotóxicos.⁴⁵ La persistencia de linfocitos T CD8+ específicos del antígeno viral les confiere la habilidad de eliminar la infección.⁴⁶ Estas respuestas mediadas por linfocitos T se sugiere que pueden correlacionar con la protección proporcionada con la vacunación y no tan sólo la inmunidad humoral.⁴⁷

El estudio de la inmunidad celular y humoral es posible mediante la identificación de marcadores de superficie celular. Las células T de memoria se identifican mediante la expresión baja de CD62L y CCR7 en su superficie y los linfocitos B de memoria mediante la identificación de CD19 y CD27 en su superficie.⁴⁸

Respuesta celular Th17 en pacientes asmáticos

Las enfermedades alérgicas tienen como fondo inmunológico un predominio en la producción de citocinas Th2 que favorecen la producción de IgE, lo que lleva a una reacción de hipersensibilidad tipo I. Se han estudiado otro tipo de linfocitos T CD4 que pueden contribuir en la etiopatogenia del asma bronquial. Uno de estos tipos celulares es el de los linfocitos Th17, los cuales intervienen en la inflamación crónica.⁴⁹ Los estudios en pacientes asmáticos han mostrado que la expresión de IL-17A es mayor que en no asmáticos, en muestras de expectoración, lavado broncoalveolar o suero.⁵⁰

La IL-17A y F inducen inflamación a nivel local al estimular la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1B, G-CSF y CXCL8/IL-8 por parte de los fibroblastos bronquiales, células epiteliales y musculares de la vía aérea.⁵¹ Esta sobreproducción de citocinas proinflamatorias y de quimiocinas, producen una acumulación de neutrófilos a la vía aérea, característica de algunos fenotipos de asma.⁴

No sólo se han encontrado un aumento de IL-17 a nivel local, también se encuentra en sangre periférica de pacientes con asma, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y poliposis nasal.⁵² En esta última población de pacientes, se observa que sólo está elevada la IL-17 en pacientes con un fondo atópico y no en pacientes con poliposis nasal de otra etiología.⁵³

Respuesta Th 17 y su efecto sobre la inmunidad contra infecciones virales

Las células T CD4+ son importantes mediadores de la inmunidad adaptativa. Tradicionalmente se consideraban únicamente dos fenotipos de acuerdo con las citocinas secretadas y sus factores de transcripción, el tipo Th1 y el Th2. Actualmente se considera que otro fenotipo, el Th17, participa también en la respuesta inmune contra infecciones.⁵⁴

Las células Th17 pueden iniciar una respuesta inflamatoria principalmente por neutrófilos. Esta respuesta inmune es particularmente importante en la superficie de epitelios, incluyendo las barreras mucosas.⁵⁵ Esto se demuestra en pacientes con mutación de STAT3, uno de los factores de transcripción relacionado con la respuesta Th17, quienes presentan infecciones recurrentes.

Las células Th17 también tienen influencia sobre la respuesta del sistema inmunológico a las infecciones virales. Este tipo de infecciones aumentan la producción de células de tipo Th17 y células T reguladoras.⁵⁶ La IL-21, producida por células Th17 puede contribuir con el mecanismo por el que las células CD4+ dirigen la respuesta del sistema inmune contra las infecciones virales y se sobrepone a ella. En ausencia de IL-21, la respuesta de las células T CD4+ y CD8+ son anuladas durante la infección viral aguda o crónica y se altera la eliminación del virus.^{56,57} Estos efectos moduladores de las células Th17 son mediados por las células T reguladoras.⁴⁵

En pacientes geriátricos, la disminución de la eficacia a la vacunación contra influenza se relaciona con enfermedades crónicas y con el envejecimiento del sistema inmune. Este proceso se relaciona con la involución gradual del timo que resulta en insuficiencia de linfocitos T, mientras que la función de las células B permanece casi intacta.

Citocinas Th17 y la respuesta a la vacunación contra influenza

La infección por el virus de la influenza es causa importante de morbilidad y mortalidad. El estudio de la respuesta inmune contra el virus ha

mostrado la producción de citocinas proinflamatorias con un extenso infiltrado inflamatorio y daño pulmonar severo.⁵⁸

La IL-17 producida por las células del sistema inmune innato y adaptativo funciona como una potente citocina proinflamatoria tanto en padecimientos autoinmunes como en la defensa contra patógenos pulmonares.⁵⁹ Se ha demostrado que la IL-17 tiene un papel benéfico contra la defensa de diversos agentes como *Mycobacterium bovis* y *Klebsiella pneumoniae*.^{60,61} El papel de esta citocina en la protección contra el virus de la influenza también se ha considerado al observarse que su presencia protege contra la infección letal por este virus, acompañándose de un mayor número de neutrófilos en el pulmón.⁵⁸

En reportes recientes con respecto a la infección por el virus de la influenza AH1N1 se observa un aumento en la producción de citocinas de tipo Th17 (IL-8, IL-9, IL-17, IL-6) en pacientes con un cuadro clínico severo. El aumento en este tipo de citocinas es proporcional a la severidad de la enfermedad, sin embargo, en aquellos pacientes en estado crítico se observaron niveles casi indetectables de estas citocinas, sugiriendo un papel protector. Además del aumento en citocinas de tipo Th17 se observó un aumento en citocinas de tipo Th1, lo que puede reflejar una respuesta antiviral del hospedero necesaria para la eliminación del virus.⁶²

En pacientes asmáticos se encuentra un aumento en los niveles de citocinas de tipo Th17, sin embargo, se desconoce el efecto de este tipo de citocinas sobre la respuesta inmunológica a la vacunación contra influenza en esta población. De acuerdo con reportes recientes, si este fenotipo se correlaciona con una mejor respuesta inmune de tipo celular contra la infección por influenza, se esperaría mayor eficacia a la vacunación contra este agente en esta población.

Con respecto a la inmunidad humoral posterior a la vacunación contra influenza en pacientes asmáticos, se reporta una mejor respuesta en estos pacientes, comparada con pacientes sanos. En los pacientes asmáticos se observó un mayor porcentaje de seroprotección que en otros grupos de pacientes con enfermedades crónicas y personas sanas.⁶³

Con base en estos antecedentes el objetivo del estudio es investigar la respuesta a la vacunación contra influenza en pacientes asmáticos con un predominio de respuesta de tipo Th17 comparado con personas sanas, ya que la influenza puede ser una infección concomitante que puede exacerbar el cuadro del paciente asmático, y con éste estudio se documentaría la evidencia inmunológica y clínica del beneficio de la vacunación con influenza y su mayor respuesta en éste tipo de pacientes con una respuesta Th17 incrementada.

Efectos adversos a la vacunación contra Influenza

La vacunación contra influenza esta recomendada por las guías internacionales para la población general, haciendo énfasis en

poblaciones de alto riesgo como los pacientes con patología respiratoria, embarazadas, personal de salud.⁴⁴ A pesar de ser una vacuna segura de aplicar, se han reportado efectos secundarios como son anafilaxia en 0.7 casos por millón de dosis o el Síndrome de Guillain –Barré en 1-2 casos por millón de dosis. Con frecuencia se reportan únicamente efectos secundarios locales como son dolor, eritema e induración o sistémicos leves como fiebre, mialgias y artralgias.⁴⁴

Planteamiento del problema

La efectividad de la vacunación contra influenza se ha valorado mediante la cuantificación de anticuerpos posterior a su aplicación, encontrando que sus niveles disminuyen a la mitad de sus valores máximos en promedio en un año. La respuesta inmune celular es importante en el control de infecciones virales incluyendo influenza, y podría ser un marcador de memoria a la vacunación contra este virus. Este tipo de respuesta depende del balance entre las citocinas reguladoras y las Th17. Los pacientes asmáticos presentan un aumento en la respuesta inmune de tipo Th17, pero se desconoce si el aumento en este tipo de citocinas mejora la respuesta inmune celular y humoral a la vacunación contra influenza en pacientes asmáticos, comparada con pacientes sanos quienes carecen de este fenotipo.

Pregunta de investigación

¿Es mayor la cantidad de células T CD4+ y CD8+ de memoria (Inmunidad celular) y los niveles de anticuerpos específicos (Inmunidad humoral) posterior a la vacunación contra influenza en pacientes asmáticos con un fenotipo Th17 comparado con adultos sanos?

Objetivos

General

Comparar la respuesta inmune celular y humoral a la vacunación contra influenza en pacientes asmáticos y sanos.

Específicos

- Comparar los niveles de anticuerpos específicos contra influenza A H1N1, H3N2 y B, antes y después de la vacunación contra influenza en pacientes asmáticos y sanos a los 0, 4 y 12 meses después de la inmunización
- Comparar las frecuencias de células T CD4 y CD8 de memoria específica contra influenza A H1N1, H3N2 y B, en pacientes asmáticos y sanos posterior a la vacunación contra influenza a los 0, 4 y 12 meses después de la inmunización
- Comparar las frecuencias de células B de memoria específica contra influenza A H1N1, H3N2 y B, en pacientes asmáticos y sanos posterior a la vacunación contra influenza a los 0, 4 y 12 meses después de la inmunización
- Comparar la proliferación celular in vitro ante el estímulo con el virus de influenza A H1N1, H3N2 y B antes y a los 4 y 12 meses posteriores a la vacunación contra influenza
- Medir y comparar los patrones de citocinas Th1, Th2 y Th17 en asmáticos y en el grupo control
- Reportar la frecuencia de efectos adversos a la vacunación contra influenza

Justificación

Los paciente asmáticos tienen mayor susceptibilidad a infecciones virales, la presencia de éstas desencadenan las crisis de asma, por lo que se recomienda aplicar la vacuna contra influenza en forma rutinaria en ésta población. Estos pacientes asmáticos tienen una respuesta Th17 incrementada.

Es importante la respuesta inmune, tanto humoral como celular, en la valoración de la efectividad a la vacunación contra influenza. Este tipo de respuesta se ha relacionado con el aumento en las concentraciones de citocinas de tipo Th17, como puede observarse en pacientes asmáticos.

Se desconoce el efecto de estas citocinas sobre la respuesta inmunológica a la vacunación contra influenza en pacientes asmáticos. La comparación de la respuesta inmune celular y humoral posterior a la vacunación contra influenza, en pacientes asmáticos, aportará nuevos

conocimientos sobre la efectividad de la vacunación contra influenza en esta población.

Hipótesis

Si la respuesta inmune a la vacunación contra influenza se relaciona con un aumento en la producción de citocinas de tipo Th17 en pacientes asmáticos, entonces se encontrarán mayores niveles de anticuerpos específicos contra influenza y células T CD4+ y CD8+ de memoria posterior a la vacunación contra este virus en pacientes asmáticos comparados con sanos.

Metodología:

Tipo y diseño del estudio

Estudio clínico experimental, prospectivo, comparativo, abierto.

Definición de las variables a evaluar y forma de medirlas

Variables independientes

- Pacientes adultos asmáticos que acuden al servicio de Inmunología y Alergia del HGM y adultos sanos voluntarios
 - o Definición conceptual: paciente asmático es el que presenta síntomas recurrentes caracterizados por disnea, tos, sibilancias y opresión torácica que ceden solos o con el uso de broncodilatadores. Los adultos sanos carecen de estos síntomas respiratorios.
 - o Definición operacional: determinar por medio del cuadro clínico si la persona tiene asma bronquial o está sano
 - o Escala de medición: asmático o sano
 - o Categoría: cualitativa dicotómica

Variables dependientes

- Linfocitos T CD8+ CCR7⁻ CD62L⁻
 - o Definición conceptual: frecuencia de linfocitos T CD8+ de memoria específica
 - o Definición operacional: Frecuencias de linfocitos CD8+ con doble marcador para CD62L^{bajo} y para el receptor de citocinas 7^{bajo}, por citometría de flujo en muestras de pacientes antes de la inmunización, 4 y 12 meses después de la inmunización.
 - o Escala de medición.- Media de poblaciones celulares de memoria antes, 4 y 12 meses después de la vacunación
 - o Categoría.- Cuantitativa continua
- Linfocitos T CD4+ CCR7⁻ CD62L⁻

- Definición conceptual: Frecuencias de linfocitos TCD4+ CCR7⁻ CD62L⁻
 - Definición operacional: Frecuencias de linfocitos CD4+ con doble marcador CCR7^{bajo} y CD62L^{bajo}, por citometría de flujo en muestras de pacientes antes de la inmunización, 4 y 12 meses después de la inmunización.
 - Escala de medición.- Media de poblaciones celulares de memoria antes, 4 y 12 meses después de la vacunación
 - Categoría.- Cuantitativa continua
- Linfocitos B CD19+ CD27+
- Definición conceptual: frecuencia de linfocitos B CD19+ CD27+
 - Definición operacional: frecuencia de linfocitos CD19+ y CD27+, por citometría de flujo en muestras de pacientes antes de la inmunización, 4 y 12 meses después de la inmunización
 - Escala de medición: Media de poblaciones celulares de memoria antes, 4 y 12 meses después de la inmunización.
 - Categoría.-Cuantitativa continua

2. Anticuerpos contra influenza

- Definición conceptual: anticuerpos de tipo IgG específicos del virus de influenza
- Definición operacional: Nivel de anticuerpos contra influenza mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación
- Escala de medición: títulos medios geométricos del nivel de anticuerpos contra influenza antes, 4 y 12 meses después de la vacunación y porcentaje de seroconversión definida como un aumento de 4 veces el nivel basal de anticuerpos o la positividad en la segunda muestra postvacunación con una muestra basal negativa y seropositividad
- Categoría: cuantitativa continua y cualitativa

VARIABLES DEMOGRÁFICAS:

1. Edad

- Definición conceptual: tiempo que ha vivido una persona, medido en años
- Definición operacional: calcular de acuerdo con fecha de nacimiento
- Escala de medición: años
- Categoría: cuantitativa continua

2. Género

- Definición conceptual: conjunto de seres que tiene uno o varios caracteres comunes
- Definición operacional: determinar mediante el fenotipo de cada paciente a qué género pertenece
- Escala de medición: masculino o femenino
- Categoría: cualitativa nominal

Criterios de inclusión

1. Pacientes adultos de 18 a 45 años de edad, con diagnóstico de asma bronquial de acuerdo con los criterios de GINA (Iniciativa Global para el Asma)
2. Pacientes adultos de 18 a 45 años de edad sanos
3. Pacientes de ambos géneros

Criterios de exclusión

1. Pacientes con exacerbación del asma bronquial
2. Pacientes con antecedente de reacción adversa a la aplicación de la vacuna de influenza
3. Pacientes con infección por influenza en el momento de la evaluación inicial
4. Pacientes con enfermedad respiratoria de etiología bacteriana o viral
5. Pacientes con alergia a las proteínas de huevo
6. Pacientes con inmunodeficiencias primarias o secundarias
7. Pacientes en tratamiento con corticosteroides sistémicos
8. Mujeres embarazadas
9. Pacientes que no firmen el consentimiento informado

Criterios de eliminación

3. Pacientes que no acudan a sus citas de seguimiento
4. Falta de muestra de sangre en las valoraciones subsecuentes para medir los parámetros inmunológicos

Población de estudio

El estudio se realizó con pacientes asmáticos adultos que acuden al Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital General de México El grupo de pacientes sanos se conformó por la población que acude al servicio ya sea como trabajador o acompañantes una vez corroborado que no padecen alguna enfermedad alérgica.

Vacuna de influenza

La vacuna que se aplicó es Fluarix de GlaxoSmithKline, que es una vacuna anti-influenza inactivada (virión fragmentado), que contiene antígenos (propagados en huevos embrionados) equivalente a los siguientes tipos y subtipos: virus tipo A/California/7/2009 (H1N1)-like, virus tipo A/Perth/16/2009 (H3N2)-like y virus tipo B/Brisbane/60/2008-like. Esta vacuna cumple con las cepas recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el hemisferio sur en la temporada 2011-

2012. Cada dosis de 0.5 ml de vacuna contiene 15 mcg de hemaglutinina de cada una de las cepas recomendadas. Fluarix cumple los requisitos de la OMS para sustancias biológicas y vacunas antiinfluenza y los requisitos de la Farmacopea Europea para vacunas antiinfluenza. Los excipientes asociados

a la vacuna son: Cloruro de sodio; Fosfato disódico dodecahidrato; Polysorbate 80 (Tween 80)/Octoxinol 10 (Triton X-100); Fosfato monobásico de potasio; RRR- a -Tocopheril hydrogeno succinato; Cloruro de potasio; Cloruro de Magnesio Hexahidrato; Agua para las inyectables (65)

Cálculo del tamaño de la muestra

Para el cálculo del tamaño de la muestra se tomó la información obtenida de la literatura con respecto a la respuesta inmune humoral en pacientes asmáticos comparado con sanos.⁶³ Dado que no existen datos en la literatura con respecto a la evaluación de la respuesta inmune celular, no se consideró esta variable para el cálculo.

Se calculó utilizando la fórmula de proporciones, tomando en cuenta una diferencia entre los grupos del 0.2, con α del 5% y β del 90%.

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}{e^2}$$

Con estos datos se considera necesario incluir 18 pacientes asmáticos y 18 adultos sanos en el grupo control. Se aumento en un 20 % considerando la posibilidad de pérdidas, con lo que se estableció el tamaño de la muestra en 22 pacientes por grupo.

Procedimiento

El estudio se llevó a cabo con pacientes que acudieron al Servicio de Alergia e Inmunología del Hospital General de México, O.D., en conjunto con la Unidad de Medicina Experimental de la UNAM. Se formaron dos grupos de pacientes: uno con asma bronquial y otro sin patología respiratoria, que cumplan con los criterios ya mencionados.

Se invitó a participar a los pacientes asmáticos y si estuvieron de acuerdo, se solicitó su firma en el consentimiento informado. A ambos grupos se les realizó su historia clínica completa y se les tomó una muestra de sangre periférica (12 ml) un tubo con heparina y un tubo seco para el análisis de anticuerpos específicos contra influenza, células T de memoria y células B de memoria específicas contra influenza.

Se aplicó la vacuna contra influenza en la Visita 1. Se les citó una semana después para corroborar si se presentaron efectos secundarios a la vacunación contra influenza. Posteriormente se les citó a los 4 y 12 meses

posteriores para revisión y nueva toma de muestra de sangre periférica (12 ml) para la determinación de los parámetros inmunológicos ya comentados.



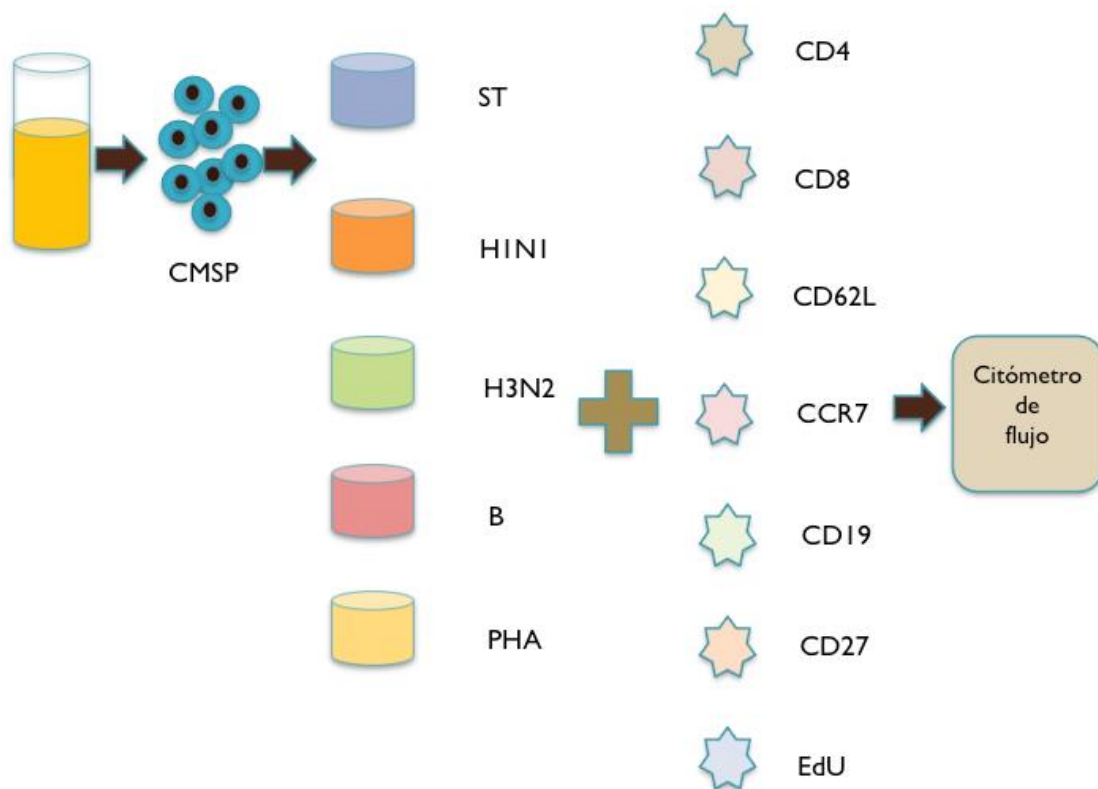
ESTUDIOS DE LABORATORIO

Ensayos de inmunidad mediada por células

Proliferación celular. Los ensayos de proliferación de células T se realizaron en el laboratorio de Infectología e Inmunología del Departamento de Medicina Experimental, UNAM. Se midió la respuesta inmune celular mediante frecuencias celulares de linfocitos ante el estímulo con Influenza A H1N1, A H3N2 y B.

Las células mononucleares de sangre periférica (MNSP) se separaron de la sangre completa por medio de un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque y se colocan en micropozos de placas de 96 a concentraciones de 3.0×10^5 /pozo en RPMI 1640 (Gibco, Gaithersburg, MD) y suero humano normal al 40% (Sigma, St. Louis, MO). El antígeno de influenza preparado de lisados de células MDCK infectadas con el virus de influenza AH1N1, A H3N2 y B, o un preparado de células no infectadas como control se agregaron a concentraciones de 1:16 en pozos por triplicado. Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 5 días. Se utilizó fitohematoglutinina (Difco, Detroit, MI) como control mitógeno positivo para respuesta a antígenos. Se agregó EDU-Click Alexa Fluor 488 para medir linfoproliferación durante 18 horas y se cosecharon las células para teñirlas y medir las poblaciones celulares mediante citometría de flujo. El porcentaje del pozo estimulado con antígeno se restó el porcentaje del pozo de células estimuladas con medio.

Linfocitos T de memoria. En la literatura se reportan a las células T CD8+ y CD4+ con marcadores de activación como CCR7- y CD62L- como poblaciones de memoria efectora periférica, así como los linfocitos con marcadores CD19+ y CD27+ como células B de memoria. Se tiñeron las células en cultivo con anticuerpos monoclonales contra CD8-PE Cy7, CD4-PE Cy5, CD62L-APC, CCR7-PE, CD19-APC-Cy7 y CD27 FITC para determinar los linfocitos T de memoria (Pharmingen, Becton Dickinson) y se midió por citometría de flujo en el citómetro (Facs Canto II, Becton Dickinson). Se comparó la media de las células estimuladas con el antígeno de influenza y la media entre los grupos asmáticos y sanos antes, 4 y 12 meses después de la vacunación.

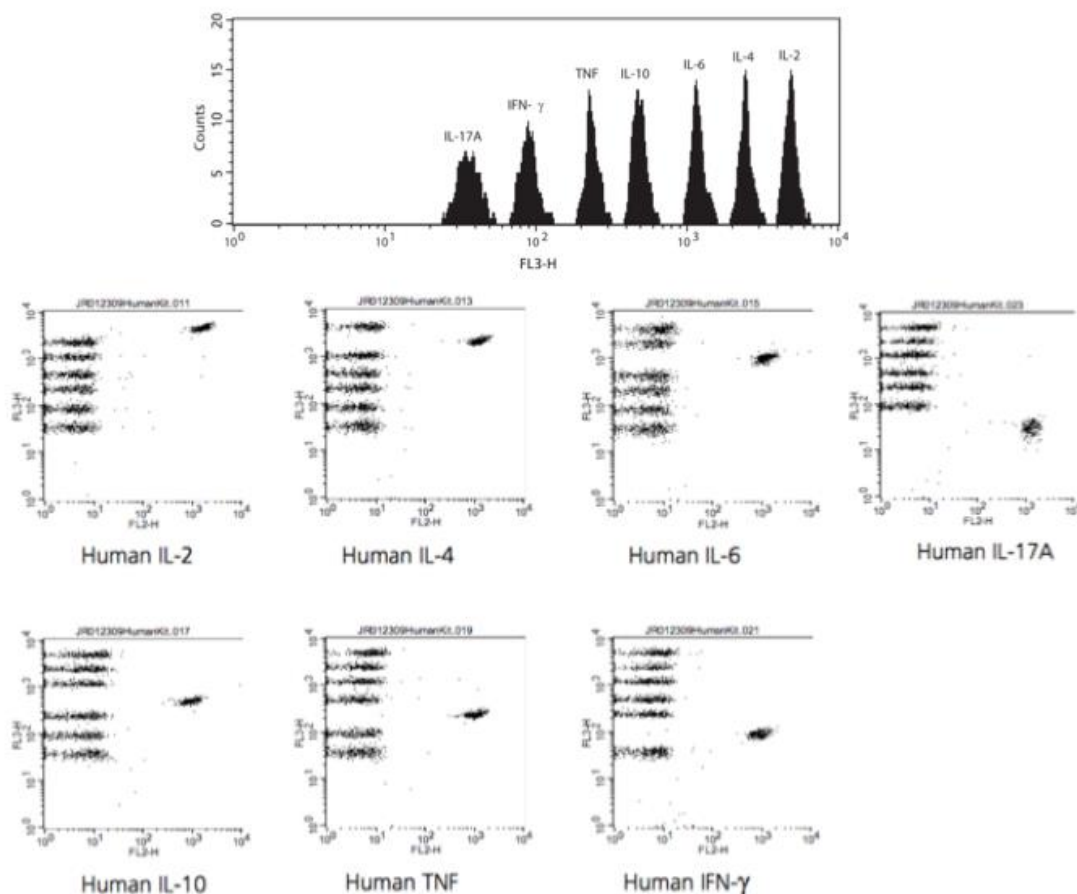
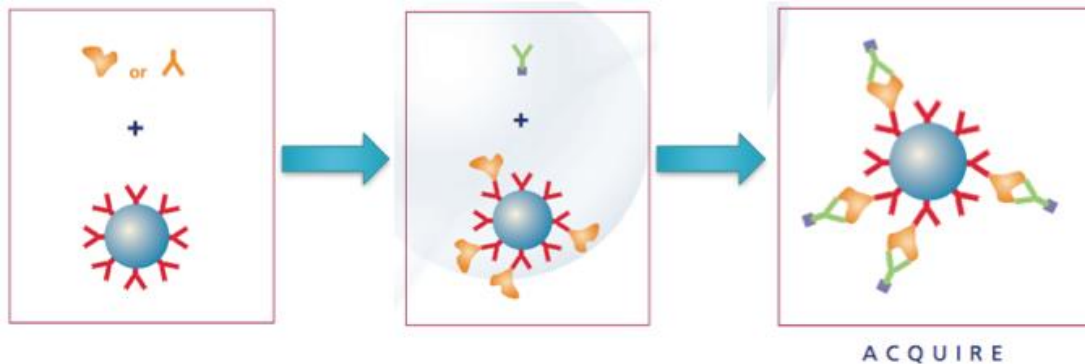


Ensayos de inmunidad mediada por anticuerpos

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Se determinaron los niveles de anticuerpos contra influenza en muestras antes, 4 y 12 meses después de la vacunación con influenza mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación utilizando un ensayo estándar de microtitulación con eritrocitos de pavo; después de remover inhibidores no específicos y aglutininas frías. Los títulos de inhibición de la hemaglutinación se midieron en un rango de <math><10</math> a >640. Las muestras de suero fueron guardadas a -20°C hasta ser medidas en forma pareada antes y después. Un título ≥ 40 fue considerado como protector y se considero como seroconversión un aumento de 4 veces el título basal o la positividad de la segunda muestra con una muestra basal negativa.

Determinación de citocinas mediante arreglos de perlas medido por citometría

Kit de CBA para Th1/Th2/Th17. Se utilizó un kit de arreglos de perlas de distinto tamaño, marcadas con Ficoeritrina (CBA Human Th1/Th2/Th17 Kit, BD Biosciences) y el citómetro de flujo para cuantificar los niveles de citocinas del perfil Th1, Th2 y TH17. Las perlas se encuentran marcadas con anticuerpos para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN- γ e IL-17.



Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las características demográficas de los pacientes asmáticos y de los controles sanos tomando en consideración el género, la edad, el peso, la talla y el índice de masa corporal.

Se realizó un análisis comparativo de las frecuencias de las poblaciones de linfocitos TCD4+, CD8+ y B de memoria antes y después de la inmunización utilizando U de Mann Whitney. Utilizando la misma prueba estadística, se comparó el porcentaje de proliferación celular basal y posterior a la vacunación contra influenza.

Los niveles de citocinas en ambos grupos se compararon mediante U de Mann Whitney.

Se utilizó la prueba de Friedman para determinar diferencias en las medias de anticuerpos y las poblaciones celulares de memoria en mediciones repetidas a lo largo del tiempo entre el grupo de asmáticos y sanos.

El número de asmáticos y controles que tuvieron seroconversión posterior a la vacunación se comparó mediante χ^2 .

Consideraciones éticas

Se trató de una investigación con riesgo menor al mínimo ya que los procedimientos implicados se realizan de manera habitual. La toma de muestra de sangre periférica tiene escasos efectos secundarios como puede ser dolor local y equimosis. La aplicación de la vacuna de influenza es una medida recomendada por la OMS para la población general, con énfasis en los pacientes en riesgo como lo son los asmáticos.

Este protocolo se apegó a los lineamientos establecidos por la Ley General de Salud en materia de investigación en seres humanos y la Declaración de Helsinki.

En todo momento se mantuvo la confidencialidad de los datos, y la información sólo es conocida por los investigadores participantes. Se utilizó un código alfanumérico para la identificación de cada paciente y su almacenamiento en formato electrónico.

El sujeto de la investigación no recibió un beneficio al participar en el estudio, sin embargo, con la información obtenida se comprenderán otros aspectos de la inmunidad a la vacunación en pacientes asmáticos. El consentimiento informado se obtuvo por un médico del Servicio de Alergia, que no fue el médico tratante. La selección de los sujetos se dio mediante un muestreo no probabilístico de casos consecutivos, invitando a aquellos que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión.

El protocolo fue sometido y aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital General de México y de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Resultados

Se incluyeron 25 pacientes asmáticos y 25 sujetos sanos. En la tabla 1 se muestran las características demográficas. Existe un predominio de pacientes asmáticos del género femenino (72%), no así en el grupo control en el que la relación de géneros fue de 1:1. Con respecto al peso, no hubo diferencias entre ambos grupos, considerando que el sobrepeso o la obesidad se considera un factor de riesgo para el mal control del asma y que puede tener también un fondo Th 17.

	Controles	Asmáticos	p
N	25	25	NS
Género	F= 12 M= 13	F= 18 M= 7	NS
Edad	30.28 ± 6.31	30.48 ± 7.55	NS
IMC	24.84 ± 4.35	24.32 ± 2.46	NS
Antecedente de vacunación	9 (36%)	17 (68%)	P=0.024

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes y controles

RESPUESTA INMUNE CELULAR

Proliferación celular.

Se realizó la medición de la proliferación celular mediante la medición de la incorporación del análogo de nucleósido 5-etinil-desoxiuridina (EdU), el cual se incorpora al DNA durante la síntesis del mismo. Posteriormente se detecta mediante una reacción covalente catalizada por cobre entre una azida, unida al EdU y un alquino unida al Alexa Fluor 488, un fluorocromo. Este fluorocromo es detectado mediante citometría de flujo. En la Figura 2 se muestra un representativo de la imagen del citómetro de flujo en la que se demuestra la proliferación celular posterior al estímulo con Influenza A H1N1, A H3N2 y B, así como el control negativo y positivo con fitohemaglutinina (PHA) en un sujeto control. La región P3 delimita la región positiva para proliferación celular.

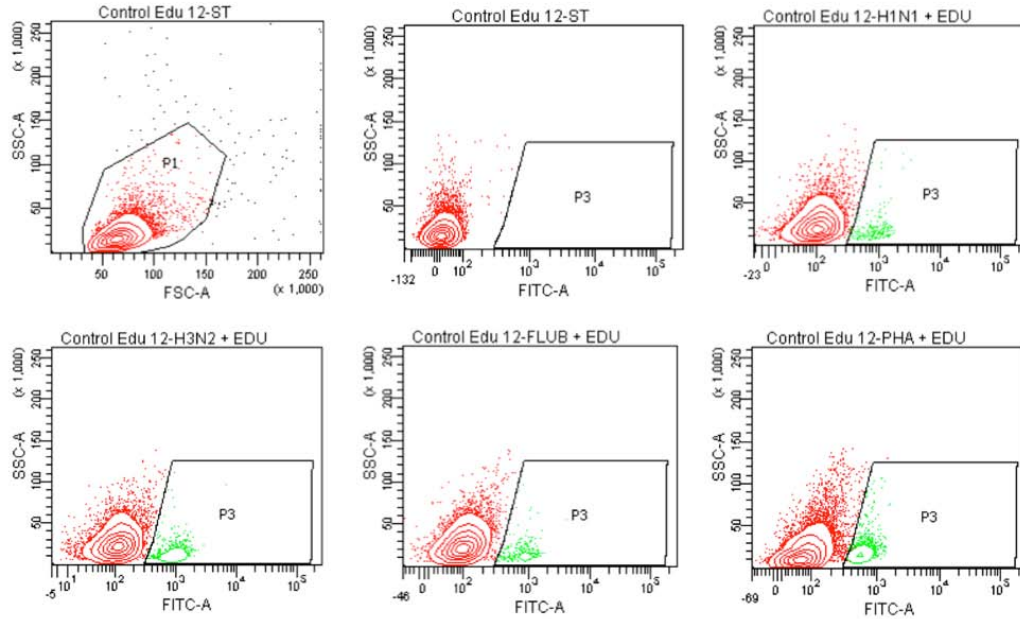


Figura 2. Representativo del análisis de proliferación celular mediante la incorporación de EdU en un sujeto control. El área P3 delimita la región positiva para proliferación celular

Se observa un aumento en la proliferación celular para los tres serotipos de influenza en los controles así como en los asmáticos como se observa en la Figura 3. En los controles se observó que para H1N1 la proliferación basal tuvo una media de 0.83 ± 0.74 , a los 4 meses: 0.78 ± 0.99 y a los 12 meses: 5.33 ± 5.27 ; $p < 0.001$. Para H3N2 se obtuvo una media basal de: 0.97 ± 0.98 , a los 4 meses: 1.30 ± 2.39 y a los 12 meses: 5.36 ± 3.90 ; $p < 0.001$. Para Influenza B la media basal fue de: 0.77 ± 1.17 , a los 4 meses: 0.98 ± 2.19 y a los 12 meses: 4.51 ± 3.96 ; $p < 0.001$.

En los asmáticos, para H1N1 la media basal fue de: 0.87 ± 0.74 , a los 4 meses: 1.20 ± 0.73 y a los 12 meses 3.94 ± 1.85 ; $p < 0.001$. Para H3N2 la media basal fue de: 0.93 ± 0.63 , a los 4 meses: 1.09 ± 0.55 y a los 12 meses: 5.44 ± 2.49 ; $p < 0.001$. Para Influenza B la media basal fue de: 0.63 ± 0.47 , a los 4 meses: 1.06 ± 0.74 y a los 12 meses: 3.26 ± 1.65 ; $p < 0.001$.

Al comparar los resultados de la proliferación celular entre los controles y asmáticos se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre ellos a los 12 meses para los tres virus de influenza ($p < 0.05$) y a los 4 meses para Influenza A H1N1 y B ($p < 0.05$)

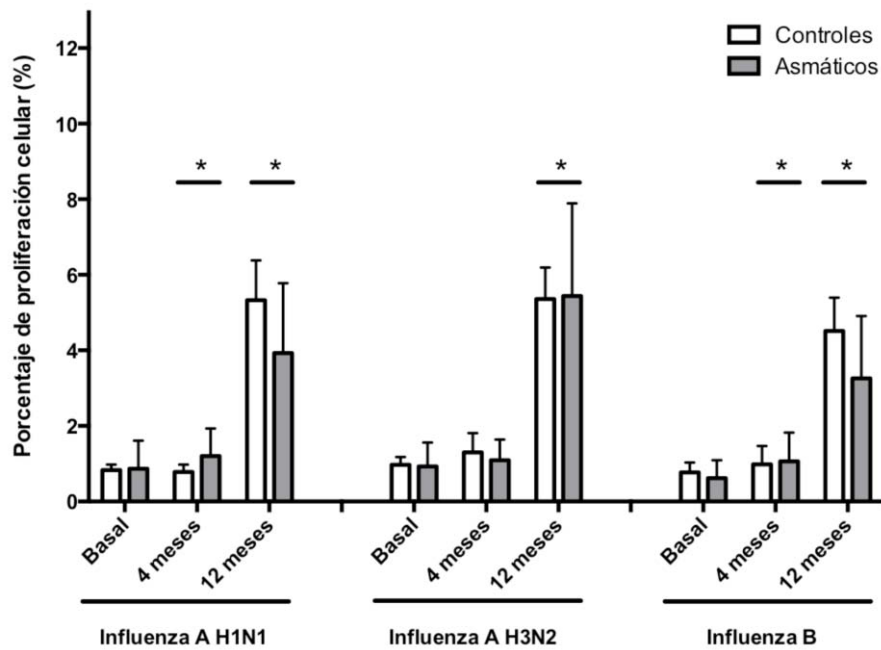


Figura 3. Proliferación celular basal, a los 4 y 12 meses ante el estímulo con influenza A H1N1, A H3N2 y B en asmáticos y controles.

- Poblaciones celulares de memoria

Las células de memoria fueron cuantificadas mediante anticuerpos que reconocen las moléculas de superficie CD4+, CD8+, CD62L- y CCR7- para los linfocitos T y CD19+ y CD27+ para los linfocitos B, en MNSP estimulados por 5 días con el antígeno específico de influenza AH1N1, AH3N2 y B. Se utilizó el citómetro de flujo para su medición. En la figura 4 se muestra una imagen representativa de esta medición.

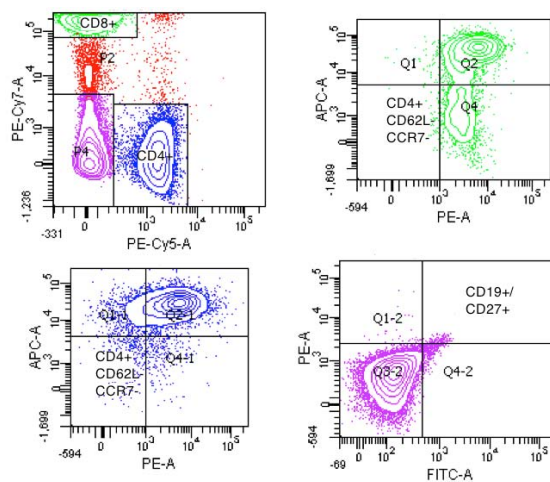


Figura 4. Representativo de la determinación de linfocitos T y B de memoria por medio de citometría de flujo

Se observaron diferencias en la media de linfocitos B de memoria para los tres serotipos de Influenza entre controles y asmáticos en la medición basal: 1.89 ± 0.93 vs 3.01 ± 1.26 ($p = 0.001$) para H1N1, 2.15 ± 1.47 vs 2.8 ± 1.12 ($p = 0.01$) para H3N2 y 2.03 ± 1.31 vs 2.61 ± 1.12 ($p = 0.02$) para Influenza B respectivamente, siendo mayor en los pacientes asmáticos.

A los 12 meses también se observan diferencias en los linfocitos B de memoria siendo la media de 5.10 ± 6.35 vs 6.24 ± 1.89 ($p = 0.002$) para H1N1, 4.77 ± 6.28 vs 5.45 ± 2.18 ($p = 0.002$) para H3N2 y 4.04 ± 4.85 vs 6.03 ± 1.73 ($p < 0.0001$) para Influenza B entre controles y asmáticos respectivamente, manteniéndose elevados en los segundos. (Figura 5)

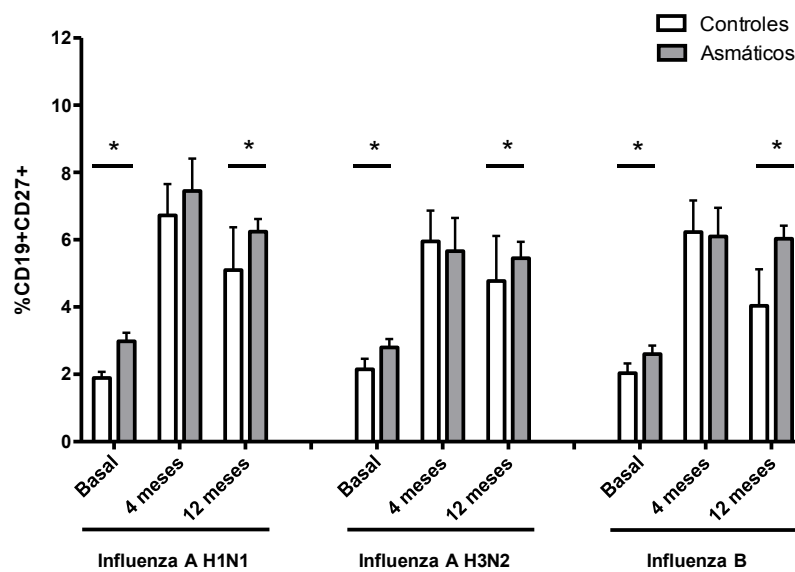


Figura 5. Linfocitos B de memoria basales, a los 4 y 12 meses posteriores a la vacunación contra influenza entre asmáticos y controles.

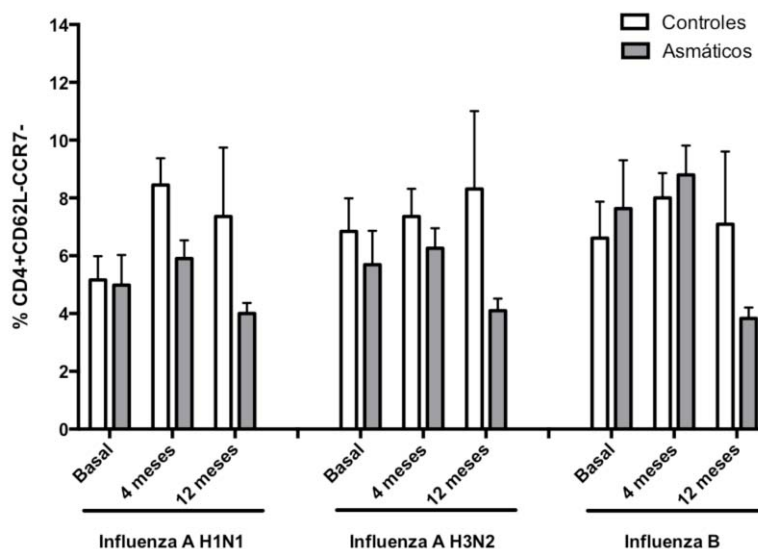


Figura 6. Linfocitos T CD4+ de memoria basales, 4 y 12 meses posteriores a la vacunación contra influenza entre asmáticos y controles

Con respecto a los linfocitos T CD4+ y TCD8+ de memoria, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de asmáticos y los controles ya sea en la medición basal o a los 4 y 12 meses posteriores a la vacunación contra influenza como se muestra en la Figura 7.

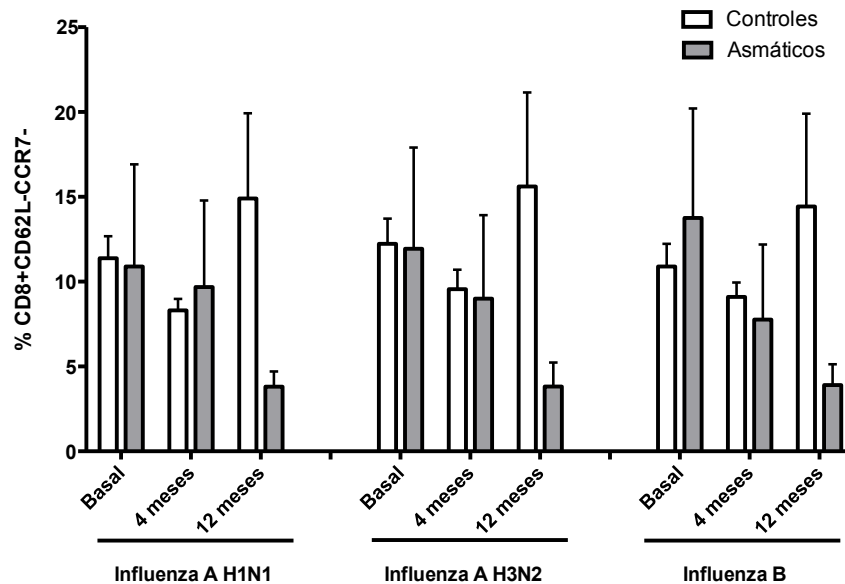


Figura 7. Linfocitos T CD8+ de memoria basales, 4 y 12 meses posteriores a la vacunación contra influenza entre asmáticos y controles

Al analizar los cambios que se presentaron en cada grupo, se observa que si hubo un aumento en la producción de células de memoria a los 4 meses, con disminución posteriormente. En los controles se obtienen resultados significativos con la prueba de Friedman para las células CD4+ para A H1N1, H3N2 y B ($p < 0.05$); así como para las CD8+ para H1N1 ($p < 0.01$) y células B para H1N1 ($p < 0.0001$).

En los pacientes asmáticos se observa la misma tendencia a aumentar a los 4 meses y disminuir a los 12, con resultados estadísticamente significativos para las células T CD4+, CD8+ y B, y para los 3 serotipos de Influenza ($p < 0.001$)

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Se realizó la determinación de anticuerpos para Influenza A H1N1, sin observar diferencias en cuanto a la media de títulos de inhibición de la hemaglutinación en la medición basal que fue de 50.76 ± 47.15 vs 46.00 ± 63.63 ($p = 0.34$), a los 4 meses de 89.52 ± 105.99 vs 63.15 ± 74.68 ($p = 0.63$), y a los 12 meses de 71.00 ± 136.53 vs 46.31 ± 72.05 ($p = 0.28$) entre los controles y asmáticos, respectivamente. (Figura 8)

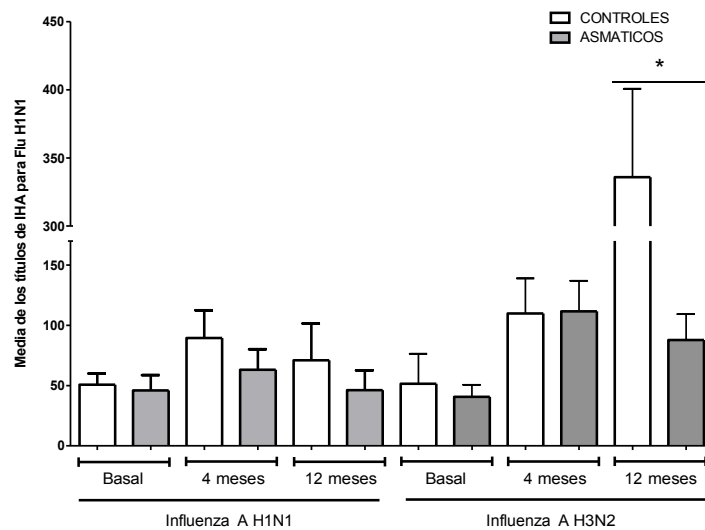


Figura 8. Comparación entre la media de títulos de inhibición de la hemaglutinación para el Virus de Influenza A H1N1 basal, a los 4 y 12 meses posteriores a la vacunación entre asmáticos y controles.

Se determinó la seropositividad para Influenza A H1N1 antes de la vacunación, observándose un 57.6% vs 44% entre controles y asmáticos y aumentando a 66.6% vs 52.6% a los 4 meses y 73.68% vs 42.1 % a los 12 meses, respectivamente. (Figura 9)

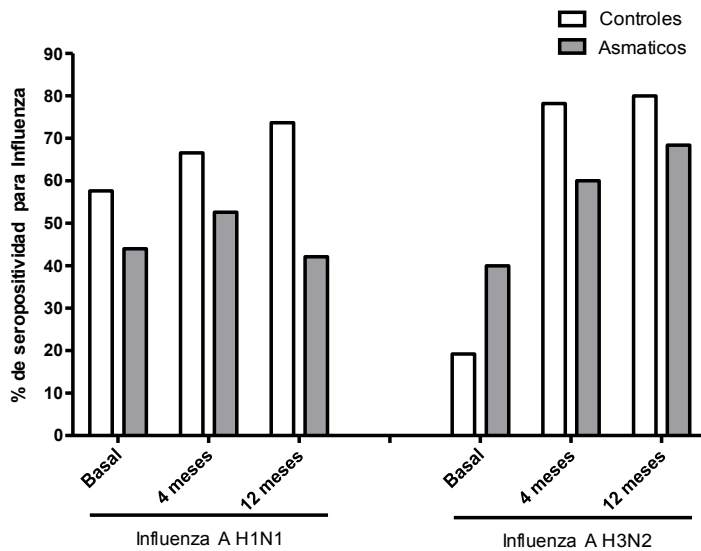


Figura 9. Porcentaje de seropositividad en controles y Asmáticos para Influenza A H1N1 y H3N2 basal, a los 4 meses y 12 meses.

Tomando en cuenta la seropositividad, no hubo diferencias entre ambos grupos, ya que no se obtienen resultados estadísticamente significativos con la prueba de X^2 a los 4 meses ($p = 0.21$) ni a los 12 meses ($p=0.46$).

Para Influenza A H3N2 se observa que no hay diferencias en la media de títulos de inhibición de la hemaglutinación en la medición basal siendo de 51.53 ± 127.01 vs 40.80 ± 49.32 ($p = 0.29$) y a los 4 meses de 110.00 ± 133.37 vs 111.57 ± 110.66 ($p = 0.91$). En la medición a los 12 meses si se encuentran diferencias entre ambos grupos con una media de 336.00 ± 290.48 vs 87.89 ± 93.72 ($p = 0.018$) entre los controles y asmáticos, respectivamente. (Figura 8)

Se determinó la seropositividad para Influenza A H3N2 antes de la vacunación, observándose un 57.6% vs 44% entre controles y asmáticos y aumentando a 66.6% vs 52.6% a los 4 meses y 73.68% vs 42.1 % a los 12 meses, respectivamente. (Figura 9)

Con respecto a la seroconversión para el virus H3N2, no se observan diferencias entre asmáticos y sanos por medio de X^2 a los 4 ($p = 0.79$) y 12 meses ($p = 0.07$).

- Determinación de Citocinas

Se determinaron los niveles de citocinas (ng/ml) Th1/Th2/Th17 en muestras de sobrenadantes de células en cultivo las cuales fueron estimuladas con Cytostim® y en un control sin estímulo. Se compararon los niveles entre asmáticos y sanos mediante U de Mann Whitney. En la Tablas 2 se muestran las medias de citocinas y se observa que sólo hay diferencias entre los asmáticos y sanos, ya sea con y sin estímulo, en la media de Interferón gamma. El resto de las citocinas son iguales en ambos grupos.

En la figura 10 se muestra una comparación de los niveles de citocinas entre ambos grupos

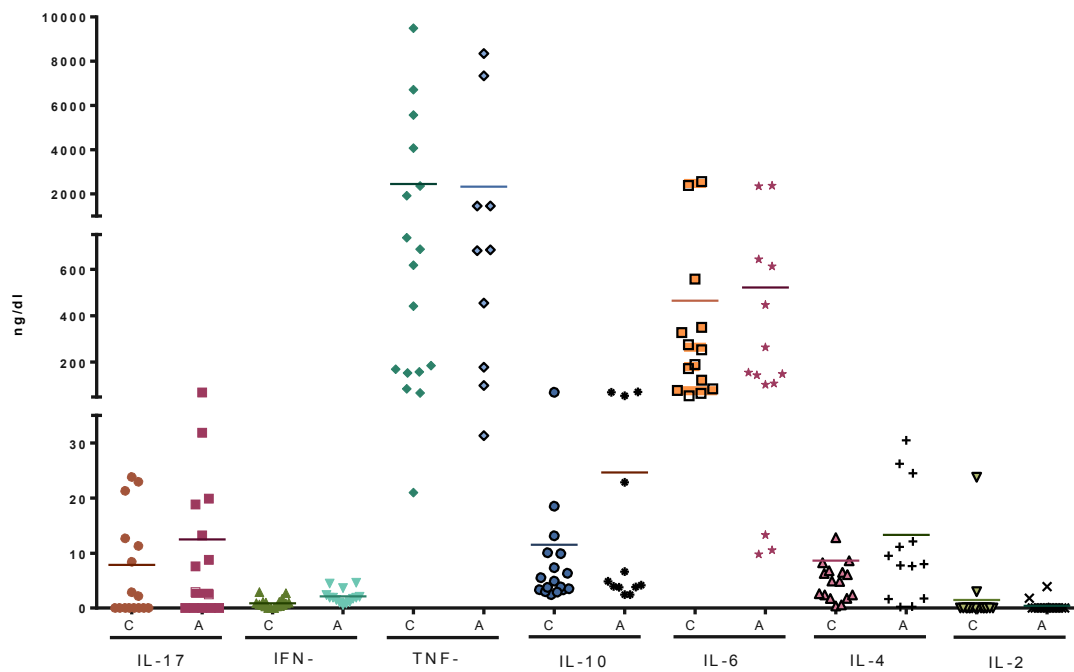


Figura 10. Comparación de los niveles de citocinas Th1/Th2/Th17 entre asmáticos y controles en cultivos de células sin estímulo y posterior al estímulo con Cytostim® en muestras de pacientes asmáticos y sanos

EFFECTOS SECUNDARIOS A LA VACUNACIÓN

Se le aplicó la vacuna de influenza a los sujetos asmáticos y a los controles, vigilando la presencia de efectos secundarios a la misma. Se observó únicamente reacción adversa local caracterizados por dolor local en el 44% de los controles y 36% de los asmáticos, así como eritema en 32% y 16%, respectivamente. Sólo en uno de los sujetos control se presentó fiebre. Ninguno presentó reacciones adversas severas como anafilaxia o Síndrome de Guillain-Barré. En la tabla 2 se muestran los efectos secundarios a la vacunación.

	Controles	Asmáticos	p
N	25	25	NS
Dolor local	11 (44%)	9 (36%)	NS
Eritema	8 (32%)	4 (16%)	NS
Fiebre	1 (4%)	0 (0%)	NS
Anafilaxia	0 (0%)	0 (0%)	NS

Tabla 2. Efectos secundarios a la vacunación contra Influenza

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune a la vacunación contra influenza en pacientes asmáticos y compararla con sujetos sanos, con base en el conocimiento de las diferencias en el sistema inmunológico que presenta esta población. El asma bronquial es una enfermedad crónica en la que existe un desbalance en las poblaciones de células T que propician la inflamación crónica característica de esta patología.

Es común que al estudiar la respuesta inmune a la vacunación, se considere únicamente la respuesta inmune humoral, es decir, la presencia de anticuerpos protectores. La respuesta inmune celular es igualmente importante como medida para determinar la protección que confiere la aplicación de una vacuna ya que se ha observado en modelos animales que este tipo de respuesta inmune protege contra serotipos distintos de un virus y lo hace por un tiempo mayor⁶⁴.

Las características demográficas de la población estudiada no difiere en los dos grupos. Se observa que los pacientes y los controles tienen una edad similar, lo que es importante ya que el sistema inmune se modifica con el paso del tiempo y la respuesta a la vacunación podría ser distinta únicamente por este factor^{65,66}. Tampoco hubo diferencias en el IMC, el cual se encuentra dentro de lo normal ya que el sobrepeso y la obesidad también son enfermedades que modifican el sistema inmune al encontrarse en un estado de inflamación crónica, a excepción de una persona del grupo control que sí tenía sobrepeso y en la cual se detectaron niveles de IL 17 en sobrenadantes de MNSP.

Con respecto a la evaluación de la respuesta a la vacunación, se observa que la proliferación celular medida por la incorporación de un análogo de nucleósido, aumentó con respecto a los niveles basales tanto en los pacientes asmáticos como los controles, a los 4 y 12 meses, esto para los tres virus de influenza. Hubo diferencias significativas con respecto a los niveles basales en ambas poblaciones lo que nos indica que la vacunación tuvo un efecto sobre la inmunidad celular, haciéndola mayor a lo largo del tiempo. Al comparar el grupo de asmáticos con el de sanos, no se observan diferencias con respecto a la proliferación celular de manera basal ni a los 4 meses posteriores a la vacunación. Ésto sí es distinto a los 12 meses, únicamente para el virus de Influenza B en donde se observa que en los pacientes asmáticos se tuvo una proliferación menor comparada con los sanos. Este efecto de aumento en la proliferación específica contra virus aumenta significativamente a los 12 meses, a pesar que los niveles de anticuerpos disminuyen, si bien se mantienen por arriba de los valores iniciales. Esto puede sugerir que con la vacunación, la respuesta efectora celular dependiente de las células de memoria incrementa con el tiempo y se mantiene después de la vacunación con influenza⁶⁷. Además, es posible que tanto los controles como los pacientes asmáticos hallan tenido infecciones previas o el efecto de la vacunación previa por lo que desde el inicio se observa proliferación específica contra el virus de influenza. Este antecedente es importante porque se sabe que un segundo contacto con un antígeno,

como puede ser con la vacunación, produce una reacción más rápida y de mayor intensidad⁶⁸.

Posteriormente se analizó el porcentaje de células de memoria, tanto linfocitos B y T CD4+ como CD8+, para los tres serotipos de influenza. Se observa diferencias con respecto a los linfocitos B de memoria para los 3 virus de Influenza. Es posible que los pacientes asmáticos hayan tenido un mayor número de infecciones o contacto con este virus por lo que desde el principio se observa que tienen más células de memoria comparado con los sujetos sanos, y esta diferencia se mantiene a lo largo del tiempo³⁷. Si tomamos en cuenta el porcentaje de sujetos con vacunación previa, el 68% de los asmáticos tienen antecedentes de vacunación con influenza comparado con el 36% de los controles sanos, esto también podría estar condicionando las diferencias basales en el número de linfocitos B de memoria específica contra influenza.

Si analizamos las poblaciones de células T de memoria se observa que a los 4 meses se observa un incremento comparado con el basal, pero a los 12 meses vuelven a disminuir pero manteniéndose por arriba de los valores iniciales. Esto es de esperarse ya que se sabe que en estudios sobre las poblaciones de memoria, éstas tienen este tipo de comportamiento. Inicialmente proliferan con lo que se expande su número ya que se convierten en células efectoras y posteriormente se contrae la población permaneciendo únicamente las de memoria^{38,69,70}. Esto es lo que observamos en esta muestra tanto de pacientes asmáticos como en los sanos.

Con respecto a la inmunidad humoral, observamos un patrón similar a lo que se comenta sobre las células de memoria. Se observa que los títulos de anticuerpos se incrementa a los 4 meses con respecto al basal, pero se mantienen elevados o por arriba del basal a los 12 meses. Esto es distinto a lo que se comenta en la literatura, donde se establece que los anticuerpos disminuyen a niveles basales a los 12 meses³⁷.

Al considerar el porcentaje de seropositividad, se observa un aumento del mismo. Si bien los títulos de anticuerpos disminuyen ligeramente a los 12 meses, los controles y asmáticos mantienen títulos protectores al año posterior a la vacunación. Esto es distinto a lo reportado previamente ya que se ha considerado que esta protección conferida por la vacunación, disminuye a los 12 meses en por lo menos 50% de las poblaciones vacunadas⁴³. En nuestra población se observó un incremento del porcentaje de seropositividad que permanece en el tiempo.

Se analizaron los patrones de citocinas Th1, Th2 y Th17 en ambas poblaciones con el propósito de explicar las posibles diferencias en la respuesta inmune entre ambos grupos. Los patrones de citocinas fueron iguales en las dos poblaciones. Esto se explica al considerar que los pacientes asmáticos reciben, además del tratamiento farmacológico, tratamiento con inmunoterapia específica. Este tipo de tratamiento es capaz de modificar el patrón de citocinas, favoreciendo un fenotipo Th1 como lo podemos observar, ya que los pacientes asmáticos tuvieron mayores niveles de IFN que los sujetos sanos⁷¹. Con respecto a las citocinas Th2 y Th17, no se observan diferencias entre los grupos, probablemente por el efecto de la inmunoterapia, pero cabe resaltar que antes de la inmunoterapia podrían

haber cursado con un fenotipo Th17 que favoreció también un patrón Th1 que es el que se observa en los pacientes asmáticos. Otra probabilidad es que la respuesta Th17 sea local en el caso de los asmáticos, y el fenotipo se realizó con MNSP no en lavados broncoalveolares.

Es importante mencionar que en todos los sujetos incluidos en el estudio, tanto asmáticos como sanos, tuvieron respuestas positivas tanto humorales como celulares desde el inicio, lo que nos indica que todos han estado en contacto previamente con alguno de los virus de Influenza.

La aplicación de la vacuna de influenza es una medida recomendada por la OMS para toda la población general, con énfasis en los pacientes asmáticos o con otras patologías respiratorias, así como población en riesgo por su actividad laboral. Se ha relacionado la aplicación de esta vacuna con la presentación del síndrome de Guillain-Barré, sin embargo, existen estudios en los que se demuestra que no existe dicha relación⁷². Principalmente se observan efectos adversos locales, como sucedió con nuestra población en la que tanto los pacientes asmáticos como los controles presentaron eritema y dolor local en un porcentaje semejante. Sólo en uno de los controles se presentó fiebre y ninguno presentó efectos secundarios graves como es la anafilaxia.

CONCLUSIONES

- El 100% de los pacientes, tanto controles como asmáticos tenían memoria inmunológica (humoral y/o celular) contra influenza A H1N1, AH3N2 y B previa a la vacunación, lo que sugiere que todos los pacientes han estado en contacto con los 3 virus por enfermedad o vacunación previa.
- Después de la vacunación con influenza se observa un aumento en la proliferación celular específica contra antígeno a los 4 y aun más a los 12 meses para los 3 virus en ambos grupos, con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a los 4 y 12 meses. Se observa el efecto de refuerzo a la vacunación en ambos grupos.
- La población de linfocitos B de memoria aumenta a los 4 meses después de la vacunación y se mantiene a los 12 meses después de la vacunación. Los pacientes asmáticos tienen más linfocitos B de memoria en forma basal para influenza A H1N1, A H3N2 y B y a los 12 meses para los 3 virus probablemente por el efecto Th1 de la inmunoterapia o por el antecedente previo de vacunación.
- El porcentaje de linfocitos T CD4+ y TCD8+ de memoria aumenta a los 4 meses y disminuye posteriormente a los 12 meses después de la vacunación en ambos grupos. Sin embargo, no observamos diferencias entre los grupos probablemente por el efecto de la inmunoterapia en pacientes asmáticos.
- En el caso de la respuesta inmune humoral se observó un incremento en el nivel de anticuerpos a los 4 meses y que aumentan aún más a los 12 meses, sin encontrar diferencias estadísticas entre los grupos. Esto difiere a lo reportado en la literatura en la que se menciona que los anticuerpos disminuyen a los 12 meses.
- El porcentaje de seropositividad también aumenta a los 4 meses y más aún a los 12, manteniendo la protección conferida por la vacunación a lo largo del tiempo.
- El patrón de citocinas sólo mostró diferencias significativas con interferón, siendo mayor en los pacientes asmáticos, lo que sugiere un patrón Th1 predominante en éstos pacientes, que es un efecto esperado de la inmunoterapia
- No encontramos diferencias en la producción de IL-17 probablemente porque los pacientes asmáticos están bajo tratamiento con inmunoterapia. Sólo se detectó producción de IL-17 en 1 paciente asmático sin inmunoterapia y un control con sobrepeso.

Anexo1. Carta de consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del protocolo: **“La respuesta Th17 incrementada en pacientes asmáticos determina diferencias en la respuesta inmune celular y humoral a la vacunación contra influenza.”**

Investigador principal: **Dra. Andrea Aida Velasco Medina**

Sede donde se realizará el estudio: **Servicio de Alergia e Inmunología clínica del Hospital General de México, O.D., Unidad de Medicina Experimental, UNAM El**

proyecto de investigación corresponde a: **Investigación con riesgo mínimo** Nombre

del Paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

I. Justificación y objetivos del estudio

La aplicación de la vacuna contra Influenza es una recomendación para pacientes asmáticos ya que disminuye la frecuencia de complicaciones relacionadas con la infección por este virus. Se puede medir los niveles de anticuerpos y de células de la respuesta inmune para conocer los niveles de protección contra el virus posterior a la aplicación de la vacuna. Esto tiene importancia para determinar la efectividad a largo plazo contra la infección por el virus de Influenza. No se conoce si este tipo de protección es diferente en los pacientes asmáticos, quienes tienen un tipo de respuesta inmunológica distinta al resto de la población sana.

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos el determinar los niveles de anticuerpos y de células de la respuesta inmune a largo plazo, posterior a la aplicación de la vacuna de influenza en pacientes asmáticos.

II. Procedimientos

En caso de que acepte participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus antecedentes médicos y una exploración física. Se le tomará una muestra de sangre del brazo la cual se estudiará en el laboratorio midiendo las células de la respuesta inmune responsables de la memoria contra infecciones. Se le aplicará la vacuna contra la influenza y un mes, seis y nueve meses después de esta aplicación, se le tomará nuevamente una muestra de sangre para el análisis de estas mismas células de la respuesta inmune.

111. Riesgos esperados.

La aplicación de la vacuna contra influenza es una medida terapéutica ya establecida como segura e incluso recomendada en pacientes asmáticos. Las complicaciones que pueden llegar a presentarse con su aplicación son dolor e inflamación en el sitio de aplicación de la vacuna, fiebre.

La toma de muestras de sangre por venopunción es un procedimiento cotidiano en el medio hospitalario presentando como complicación dolor, inflamación, moretón y sangrado.

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención, ésta se le brindará en los términos que siempre se le ha ofrecido.

IV. Beneficios del estudio

Con este estudio se espera tener un mejor conocimiento de la respuesta del sistema inmunológico a la vacunación contra influenza en pacientes con asma. Esto ayuda a explicar su efectividad para evitar el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones relacionadas.

V. Procedimientos alternativos

Existen otros métodos para valorar la eficacia de la vacunación como lo es la medición de otros marcadores del sistema inmune, aunque también utilizan muestras de sangre obtenida del brazo.

VI. Garantía de recibir respuestas y aclaraciones

En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable. Todas sus preguntas e inquietudes serán contestadas en el momento en que usted las solicite.

VII. Libertad de retirar su consentimiento

Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria y usted puede retirarse del mismo en el momento que lo desee informando las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad y sin que esto afecte su atención subsecuente en este servicio.

VIII. Privacidad

La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

IX. Información actualizada

El equipo de investigadores se compromete a que en caso de obtener información actualizada con respecto al estudio, ésta se le proporcionará, aunque esta pudiera afectar su voluntad para continuar participando en el mismo.

X. Indemnización

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.

XI. Gastos adicionales

En caso de existir gastos adicionales, estos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa a este documento.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante o representante legal _____
Dirección del participante _____
Fecha _____

Firma del testigo _____
Relación con el participante _____
Dirección del testigo _____
Fecha _____

Firma del testigo _____
Relación con el participante _____
Dirección del testigo _____
Fecha _____

Esta parte debe ser completada por el investigador (o representante):

He explicado al Sr.(a) _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar estudios con seres humanos y me apegó a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuesta, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del Investigador

Fecha

En caso de dudas o de requerir información adicional en relación con el proyecto de investigación, usted puede contactar a la Dra. Andrea Aida Velasco Medina del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica en el número de teléfono 2789-2000 extensión 1266, cel: 5536513913; o bien al Dr. Carlos Ibarra Pérez Presidente de la Comisión de Ética del Hospital General de México al teléfono 2789-2000 extensión 1368.

Anexo 2. Hoja de recolección de datos

Título de Proyecto: “La respuesta Th17 incrementada en pacientes asmáticos determina diferencias en la respuesta inmune celular y humoral a la vacunación contra influenza.”

Folio _____

Nombre del paciente _____ Expediente _____ Edad _____ Género _____ F. de Nacimiento _____ Domicilio _____ Teléfono casa _____ Celular _____		
Vacunación con influenza: Previas: SI _____ NO _____ Efectos adversos previos _____ Aplicación de la vacuna _____ Marca: _____ Lote: _____		
Antecedentes patológicos	Toma de muestras:	Efectos adversos
Antecedente de influenza SI _____ NO _____ Asma: Fecha de diagnóstico _____ Tratamiento actual _____ Clasificación: LI _____ LP _____ MP _____ SP _____ Fecha de última exacerbación _____ Uso previo de esteroide sistémico _____ Fecha _____ Rinitis alérgica SI _____ NO _____ Enf. Autoinmunes SI _____ NO _____ Otras enfermedades _____ Tratamiento _____	Fecha: 1° _____ Observaciones _____ 2° _____ Observaciones _____ 3° _____ Observaciones _____ 4° _____ Observaciones _____	Dolor SI _____ NO _____ local Eritema SI _____ NO _____ Edema SI _____ NO _____ Fiebre SI _____ NO _____ Malestar SI _____ NO _____ Gral Mialgias SI _____ NO _____ Ojo rojo SI _____ NO _____ Tos SI _____ NO _____ Urticaria SI _____ NO _____ Angioedema SI _____ NO _____ Disnea SI _____ NO _____ Sibilancias SI _____ NO _____ Cefalea SI _____ NO _____ Rinorrea SI _____ NO _____

Bibliografia

1. Grigg J. Asthma year in review 2006-7. *Paediatric respiratory reviews*. Jun 2008;9(2):134-138.
2. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. Aug 26 2006;368(9537):733-743.
3. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature reviews. Immunology*. Dec 2010;10(12):838-848.
4. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. Aug 2011;66(8):989-998.
5. Souwer Y, Szegedi K, Kapsenberg ML, de Jong EC. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Current opinion in immunology*. Dec 2010;22(6):821-826.
6. Pene J, Chevalier S, Preisser L, et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *Journal of immunology*. Jun 1 2008;180(11):7423-7430.
7. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*. 2009;27:485-517.
8. Woodruff PG, Khashayar R, Lazarus SC, et al. Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Nov 2001;108(5):753-758.
9. Nembrini C, Marsland BJ, Kopf M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. May 2009;123(5):986-994; quiz 995-986.
10. Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. May 2009;123(5):1004-1011.
11. Alcorn JF, Crowe CR, Kolls JK. TH17 cells in asthma and COPD. *Annual review of physiology*. 2010;72:495-516.
12. Ivanov S, Linden A. Th-17 cells in the lungs? *Expert review of respiratory medicine*. Oct 2007;1(2):279-293.
13. Zhao Y, Yang J, Gao YD, Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. *International archives of allergy and immunology*. 2010;151(4):297-307.
14. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *Journal of immunology*. Sep 15 2008;181(6):4089-4097.
15. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *The Journal of experimental medicine*. Nov 27 2006;203(12):2715-2725.
16. Rottem M. Asthma prevalence and exacerbations in children: is there an association with childhood vaccination? *Expert review of clinical immunology*. Nov 2008;4(6):687-694.
17. Tata LJ, West J, Harrison T, Farrington P, Smith C, Hubbard R. Does influenza vaccination increase consultations, corticosteroid

- prescriptions, or exacerbations in subjects with asthma or chronic obstructive pulmonary disease? *Thorax*. Oct 2003;58(10):835-839.
18. Fiore AE, Shay DK, Broder K, et al. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control*. Aug 8 2008;57(RR-7):1-60.
 19. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. Jan 8 2003;289(2):179-186.
 20. Barker WH, Mullooly JP. Impact of epidemic type A influenza in a defined adult population. *American journal of epidemiology*. Dec 1980;112(6):798-811.
 21. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. Sep 15 2004;292(11):1333-1340.
 22. Simonsen L, Clarke MJ, Schonberger LB, Arden NH, Cox NJ, Fukuda K. Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution. *The Journal of infectious diseases*. Jul 1998;178(1):53-60.
 23. Lui KJ, Kendal AP. Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985. *American journal of public health*. Jun 1987;77(6):712-716.
 24. Eickhoff TC, Sherman IL, Serfling RE. Observations on excess mortality associated with epidemic influenza. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. Jun 3 1961;176:776-782.
 25. Barker WH, Mullooly JP. Pneumonia and influenza deaths during epidemics: implications for prevention. *Archives of internal medicine*. Jan 1982;142(1):85-89.
 26. Keren R, Zaoutis TE, Bridges CB, et al. Neurological and neuromuscular disease as a risk factor for respiratory failure in children hospitalized with influenza infection. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. Nov 2 2005;294(17):2188-2194.
 27. Grijalva CG, Craig AS, Dupont WD, et al. Estimating influenza hospitalizations among children. *Emerging infectious diseases*. Jan 2006;12(1):103-109.
 28. Glezen WP, Decker M, Perrotta DM. Survey of underlying conditions of persons hospitalized with acute respiratory disease during influenza epidemics in Houston, 1978-1981. *The American review of respiratory disease*. Sep 1987;136(3):550-555.
 29. Neuzil KM, Wright PF, Mitchel EF, Jr., Griffin MR. The burden of influenza illness in children with asthma and other chronic medical conditions. *The Journal of pediatrics*. Dec 2000;137(6):856-864.
 30. Izurieta HS, Thompson WW, Kramarz P, et al. Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children. *The New England journal of medicine*. Jan 27 2000;342(4):232-239.

31. Neuzil KM, Mellen BG, Wright PF, Mitchel EF, Jr., Griffin MR. The effect of influenza on hospitalizations, outpatient visits, and courses of antibiotics in children. *The New England journal of medicine*. Jan 27 2000;342(4):225-231.
32. Clements ML, Betts RF, Tierney EL, Murphy BR. Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type virus. *Journal of clinical microbiology*. Jul 1986;24(1):157-160.
33. Couch RB, Kasel JA. Immunity to influenza in man. *Annual review of microbiology*. 1983;37:529-549.
34. Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, Doherty PC. Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerging infectious diseases*. Jan 2006;12(1):48-54.
35. Woodland DL. Cell-mediated immunity to respiratory virus infections. *Current opinion in immunology*. Aug 2003;15(4):430-435.
36. Kim SV, Flavell RA. Immunology. CD8alpha and T cell memory. *Science*. Apr 23 2004;304(5670):529-530.
37. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature reviews. Immunology*. Apr 2002;2(4):251-262.
38. Moulton VR, Farber DL. Committed to memory: lineage choices for activated T cells. *Trends in immunology*. Jun 2006;27(6):261-267.
39. Sanz I, Wei C, Lee FE, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in immunology*. Feb 2008;20(1):67-82.
40. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious D. Prevention of influenza: recommendations for influenza immunization of children, 2008-2009. *Pediatrics*. Nov 2008;122(5):1135-1141.
41. Nichol KL. Efficacy and effectiveness of influenza vaccination. *Vaccine*. Sep 12 2008;26 Suppl 4:D17-22.
42. Skowronski DM, Tweed SA, De Serres G. Rapid decline of influenza vaccine-induced antibody in the elderly: is it real, or is it relevant? *The Journal of infectious diseases*. Feb 15 2008;197(4):490-502.
43. Song JY, Cheong HJ, Hwang IS, et al. Long-term immunogenicity of influenza vaccine among the elderly: Risk factors for poor immune response and persistence. *Vaccine*. May 21 2010;28(23):3929-3935.
44. National Advisory Committee on I. Statement on influenza vaccination for the 2006-2007 season. An Advisory Committee Statement (ACS). *Canada communicable disease report = Releve des maladies transmissibles au Canada*. Jun 15 2006;32(ACS-7):1-27.
45. Peters NL, Meiklejohn G, Jahnigen DW. Antibody response of an elderly population to a supplemental dose of influenza B vaccine. *Journal of the American Geriatrics Society*. Jul 1988;36(7):593-599.
46. Barkhordarian A, Iyer N, Shapshak P, Somboonwit C, Sinnott J, Chiappelli F. Influenza 2009 pandemic: Cellular immunemediated surveillance modulated by TH17 & Tregs. *Bioinformatics*. 2011;6(1):39-40.
47. Xing Z, Cardona CJ. Preexisting immunity to pandemic (H1N1) 2009. *Emerging infectious diseases*. Nov 2009;15(11):1847-1849.

48. McElhaney JE, Xie D, Hager WD, et al. T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly. *Journal of immunology*. May 15 2006;176(10):6333-6339.
49. Wang YH, Liu YJ. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. *Current opinion in immunology*. Dec 2008;20(6):697-702.
50. Kolls JK, Kanaly ST, Ramsay AJ. Interleukin-17: an emerging role in lung inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. Jan 2003;28(1):9-11.
51. Linden A, Laan M, Anderson GP. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *The European respiratory journal*. Jan 2005;25(1):159-172.
52. Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S. Th17 and allergy. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. Jun 2008;57(2):121-134.
53. Shen Y, Hu GH, Yang YC, Ke X, Tang XY, Hong SL. Allergen induced Th17 response in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with nasal polyposis. *International immunopharmacology*. Jan 2012;12(1):235-240.
54. Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal immunology*. Sep 2009;2(5):403-411.
55. Wong-Chew RM, Garcia-Leon ML, Espinosa-Torres Torrija B, et al. Increasing the time of exposure to aerosol measles vaccine elicits an immune response equivalent to that seen in 9-month-old Mexican children given the same dose subcutaneously. *The Journal of infectious diseases*. Aug 1 2011;204(3):426-432.
56. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England journal of medicine*. Aug 27 2009;361(9):888-898.
57. Bermejo-Martin JF, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Critical care*. 2009;13(6):R201.
58. Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nature reviews. Immunology*. Jul 2010;10(7):514-526.
59. O'Quinn DB, Palmer MT, Lee YK, Weaver CT. Emergence of the Th17 pathway and its role in host defense. *Advances in immunology*. 2008;99:115-163.
60. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of experimental medicine*. Sep 19 2005;202(6):761-769.
61. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *Journal of immunology*. Mar 15 2007;178(6):3786-3796.
62. Elsaesser H, Sauer K, Brooks DG. IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science*. Jun 19 2009;324(5934):1569-1572.
63. Long CB, Ramos I, Rastogi D, et al. Humoral and cell-mediated immune responses to monovalent 2009 influenza A/H1N1 and

- seasonal trivalent influenza vaccines in high-risk children. *The Journal of pediatrics*. Jan 2012;160(1):74-81.
64. Bonduelle O, Carrat F, Luyt CE, et al. Characterization of pandemic influenza immune memory signature after vaccination or infection. *The Journal of clinical investigation*. Jul 1 2014;124(7):3129-3136.
 65. Scheifele DW, McNeil SA, Ward BJ, et al. Safety, immunogenicity, and tolerability of three influenza vaccines in older adults: results of a randomized, controlled comparison. *Human vaccines & immunotherapeutics*. Nov 2013;9(11):2460-2473.
 66. Haq K, McElhaney JE. Immunosenescence: Influenza vaccination and the elderly. *Current opinion in immunology*. Aug 2014;29:38-42.
 67. Sridhar S, Begom S, Bermingham A, et al. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nature medicine*. Oct 2013;19(10):1305-1312.
 68. CA S. Vaccine Immunology. In: Plotkin SA OW, Offit PA, ed. *Vaccines*: Saunders; 2008:17 - 36.
 69. Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell*. Dec 13 2002;111(6):837-851.
 70. Masopust D, Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. The role of programming in memory T-cell development. *Current opinion in immunology*. Apr 2004;16(2):217-225.
 71. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*. Oct 2006;6(10):761-771.
 72. Romio S, Weibel D, Dieleman JP, et al. Guillain-Barre syndrome and adjuvanted pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccines: a multinational self-controlled case series in Europe. *PloS one*. 2014;9(1):e82222.