



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“EVALUACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4⁺ Y TCD8⁺
ESPECÍFICAS AL VIRUS DE INFLUENZA A H1N1
PANDÉMICO EN SUJETOS SANOS DESPUÉS DE LA
VACUNACIÓN CON EL VIRUS A H1N1 ATENUADO SIN
ADYUVANTE”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIOLOGA**

P R E S E N T A :

Gabriela Marisol Cruz Miranda

**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Yolanda González Hernández**

2013



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.

Dedicatoria

Dedico la presente tesis a todas aquellas personas que, de alguna manera, han influido en mi formación, tanto académica como personal.

A mis padres, David y Gabriela, por ser el motor que impulsa mis sueños y anhelos, por estar siempre presentes y hacerme saber que cuento con su amor y comprensión en cada decisión que he tomado, por ayudarme a ver lo que aún no he visto y a pensar antes de actuar, por la maravillosa lección de vida que me dan a diario y por cada sacrificio que han hecho para lograr que hoy esté donde estoy.

A mi hermana Ana, el principio de muchas satisfacciones que tendremos en nuestro camino como profesionalistas, el recordatorio de que cualquier cosa que queramos podemos lograrla con suficiente esfuerzo y dedicación.

A ti Fernando, el primero de muchos logros que culminarán con una vida plena y gratificante juntos, cualquier cosa será fácil para mi si cuento con tu apoyo y tu aliento como hasta ahora.

A mis abuelos, Concepción, Rosario y Luis por ser parte de mi ejemplo de gente humilde y honesta, por las muestras constantes de amor a la familia que me ayudan a recordar lo que realmente es importante, por el tiempo que dedicaron a cuidarnos a mi hermana y a mi y ser parte importante en la constancia de mis estudios.

Agradecimientos

Al personal del Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, por las facilidades que me brindaron para realizar esta tesis, por todas sus enseñanzas y por la experiencia adquirida durante mi estancia ahí.

A la Doctora Martha Torres Rojas por permitirme iniciar mi formación como profesionista.

A la Doctora Yolanda González Hernández quien fue la tutora de esta tesis por su paciencia, sus enseñanzas y su sencillez para conmigo.

Índice

Abreviaturas	5
Resumen.....	7
I. Introducción.....	9
II. Antecedentes	
III. Justificación.....	27
IV. Hipótesis.....	27
V. Objetivos	28
VI. Material y métodos	28
a. Criterios de inclusión.....	28
b. Toma de muestra de sangre periférica.....	28
c. Separación de las células mononucleares de sangre periférica.....	29
d. Congelamiento de células.....	29
e. Descongelamiento de células.....	29
f. Conteo celular.....	30
g. Tinción con carboxifluoresceín succimidil éster CFSE.....	30
h. Estimulación de células	30
i. Citometría de Flujo	32
j. Adquisición en el citómetro de flujo.....	32
k. Ensayo de proliferación celular.....	32
l. Análisis estadístico.....	33
VII. Resultados	33
VIII. Discusión	42
IX. Conclusión	44
X. Bibliografía	45

Abreviaturas

ARN: Ácido Ribonucléico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CFSE: carboxifluoresceín succinimidil éster

CPA: Células presentadoras de antígeno

HA: Hemaglutinina

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

HLA-A: Antígenos Leucocitarios Humanos de clase I tipo A

HLA-B: Antígenos Leucocitarios Humanos de clase I tipo B

HLA-C: Antígenos Leucocitarios Humanos de clase I tipo C

HLA-DP: Antígenos Leucocitarios Humanos de clase II tipo DP

HLA-DQ: Antígenos Leucocitarios Humanos de clase II tipo DQ

HLA-DR: Antígenos Leucocitarios Humanos de clase II tipo DR

IFN- γ : Interferón gama

Ig_M: Inmunoglobulinas isotipo M

IL-1: Interleucina 1

IL-2: Interleucina 2

IL-2 R: Receptores de interleucina 2

IL-3: Interleucina 3

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-9: Interleucina 9

IL-10: Interleucina 10

IL-13: Interleucina 13

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NA: Neuraminidasa

NP: Nucleoproteína

OMS: Organización Mundial de la Salud

PHA: Fitohemaglutinina

PMN: Células polimorfonucleares

T_C: Linfocitos T citotóxicos

TCR: Receptor de células T

T_H: Linfocitos T ayudadores o cooperadores

TNF-β: Factor de necrosis tumoral beta

T-NK: Linfocitos asesinos naturales (natural killer)

Resumen

En febrero del 2009, una nueva variante del virus de influenza estacional, nombrado como influenza tipo A H1N1/09 pandémico por la Organización Mundial de la Salud (OMS), causó una pandemia a mitad de ese mismo año, la rapidez con la que se expandió el virus a nivel mundial hizo que surgiera la necesidad de contar con una nueva vacuna que pudiera generar una protección inmunológica en gran parte de la población. A finales de septiembre de 2009, los laboratorios Sanofi desarrollaron una vacuna contra el nuevo virus, la cual fue aplicada en México en diciembre-enero del 2009/ 2010.

Este trabajo de tesis evaluó los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ específicos hacia este virus después de la aplicación de la vacuna en 33 voluntarios sanos que laboraban en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias INER, para lo cual se tomó una muestra de sangre periférica de cada individuo inmediatamente antes de la aplicación de la vacuna y un mes después de la misma.

Después de separar las células mononucleares, se estimularon por una semana con cinco secuencias de péptidos específicos a diferentes virus de influenza de las cuales las primeras dos corresponden a dos regiones diferentes del virus de influenza A H1N1/09 pandémico, una es específica al virus de influenza A H1N1 estacional, otra es específica al virus de influenza A H3N2 estacional y la última corresponde a una secuencia homóloga entre los 3 virus de influenza antes mencionados.

Usando técnicas de tinción celular y herramientas de proliferación celular en el citómetro de flujo FACS CANTO II se encontró proliferación de linfocitos CD8⁺ antes de la aplicación de la vacuna contra el virus de influenza A H1N1/09 pandémico sin adyuvante en el 12% de las células de los voluntarios sanos estimuladas con las secuencias 1 o 2 específicas al virus de influenza A H1N1/09 pandémico, ésta proliferación se notó en el 18% de voluntarios antes de la aplicación de la vacuna para células estimuladas con la secuencia específica al virus de influenza A H1N1 estacional y en el 24.24% de los voluntarios para la secuencia específica al virus de influenza A H3N2 estacional. Se generó una respuesta proliferativa de linfocitos CD8⁺ un mes después de la vacunación en el 87% de los individuos para las secuencias específicas

hacia el virus de influenza A H1N1/09 pandémico y el porcentaje de los individuos que respondieron hacia alguna de las influencias estacionales se mantuvo, lo que indica que no se generó una reacción cruzada con la vacuna contra el virus de influenza AH1N1/09 pandémico.

Este análisis de proliferación también permitió evaluar qué tan potente fue la generación de linfocitos con lo que determinamos que el 48% de individuos mostraron una respuesta de memoria. Así pues en esta tesis se demuestra que la vacuna contra el virus de influenza AH1N1/09 pandémico estimula la proliferación de linfocitos CD8⁺ específicos en sujetos sanos.

I. Introducción:

Por largo tiempo y en todo el mundo, la influenza ha sido una enfermedad de memoria corta. Normalmente la enfermedad crea una gran inquietud social cuando ocurre en forma de epidemias con gran mortalidad. En todo el registro escrito de la enfermedad humana es evidente la cortedad de las descripciones de epidemias de influenza; comparada con enfermedades como la malaria, la viruela o la peste, el volumen de información debido a la influenza es mínimo. Esta falta de interés se puede explicar por el hecho de que la influenza es una enfermedad estacional, relativamente benigna, autolimitada y con incrementos en su morbilidad y mortalidad poco frecuentes. Por esas razones, la influenza nunca ha sido un tema de investigación arraigada en México y en otras partes del mundo. En tiempos recientes, sin embargo, se ha marcado un cambio con respecto al pasado. Existe ahora una diferencia cuantitativa y cualitativa en cuanto al interés en el estudio de la influenza. Esto presenta un cambio de actitud probablemente definitivo, la razón de esto es el surgimiento de numerosas enfermedades infecciosas emergentes y el surgimiento de nuevas formas de influenza (aviar) con elevadas tasas de mortalidad. Es posible que este cambio sea más duradero, debido a que la influenza ahora es una amenaza más real de lo que fue en el pasado[1].

Existen descripciones de influenza muy antiguas en el Viejo Continente, se cuenta con información de numerosas epidemias de influenza en Europa desde por lo menos el año de 1173, sin embargo la primera epidemia de la que se tiene noticia en el Nuevo Mundo es la que inició en 1627 en Europa del norte y fue introducida a América por las costas de Massachussets, de donde se distribuyó a todo el continente hasta Chile. En México, se han podido identificar 13 epidemias de influenza severas, con tasa de mortalidad relativamente elevadas de las que destaca la epidemia de influenza de 1918; la cual ocurrió en tres ondas epidémicas, la primera entre abril y mayo de 1918, la segunda entre octubre y diciembre de ese mismo año y la tercera entre enero y febrero de 1920 [2].

En Abril de 1918, la entrada de la primera onda epidémica se inició en los estados fronterizos; en el curso de las semanas invadió todo el país. El impacto global de la epidemia fue aproximadamente de 436,200 defunciones; un estimado de la

morbilidad nos indica que por lo menos existieron entre 4 y 8 millones de casos, en una población de 14 millones de habitantes [2].

La influenza es una enfermedad respiratoria, febril y muy contagiosa, que es provocada por uno de los tres tipos de virus de la familia *Orthomixoviridae* (A, B y C). Estos virus están clasificados como virus de ácido ribonucleico (ARN virus) y son virus que poseen una cápside, es decir, están envueltos. Su genoma es único entre los virus, ya que tiene la propiedad de ser segmentado, lo cual contribuye a la capacidad de variación que poseen. Se sabe que una de las características de ésta familia de virus es la aparición frecuente de nuevas variantes antigénicas, que dan lugar a las epidemias y pandemias. La influenza por lo general es una enfermedad autolimitada, pero en algunas ocasiones puede ser muy severa, e incluso fatal.[3,4,5]

Durante el siglo pasado tres principales pandemias por el virus de influenza azotaron a la humanidad, dejando un número impresionante de muertes. La primera y más devastadora es la antes mencionada “influenza española” que tuvo lugar en 1918-1919, fue causada por el virus de influenza A subtipo H1N1, y originó de 20 a 50 millones de muertes. En el cuadro 1 se muestran algunas de las pandemias causadas por el virus de influenza [2].

Tabla 1 Pandemias importantes del siglo XX causadas por el virus de influenza A. Tomado de [2]

Año	Nombre común y subtipo de virus	Defunciones
1918	Influenza Española/ A H1N1	20-50 millones
1957	Influenza asiática	Dos millones
1968	Influenza de Hong Kong	Un millón

Los virus de influenza se agrupan en la familia *Orthomixoviridae*. Este nombre se le dio debido a la capacidad de los virus de unirse y disgregar el moco de la célula (*ortho*, verdadero y *myxo*, moco). Con base en las diferencias inmunológicas de las nucleoproteínas y proteína de matriz, son clasificados en tres tipos o géneros: A, B y C [6]. Los virus de influenza del tipo A tienen la capacidad de infectar a diferentes especies animales de aves y mamíferos, incluyendo al hombre [7,8,9]; originan desde pequeños brotes hasta pandemias. Los virus de la influenza tipo B únicamente infectan

al humano, originando epidemias, mientras que los virus del tipo C sólo originan pequeños brotes.[6]

Los virus de influenza son pleiomórficos, miden de 80 a 120 nm, de simetría helicoidal, con genoma de ARN segmentado. El genoma del ARN es de polaridad negativa (es decir, no actúa como ARNm), de cadena sencilla, fragmentado (8 fragmentos en los tipos A y B y 7 en C), empaquetado en la nucleoproteína (NP). Para la replicación del ARN se requiere de la ARN polimerasa II celular. Presenta una alta tasa de error y todos los virus de influenza presentan una envoltura, formada por una bicapa lipídica con composición similar a la membrana de las células que infectan. De la envoltura, se proyectan proteínas transmembranales, con funciones importantes. La hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), son glicoproteínas cuyas diferencias antigénicas definen a los subtipos virales. La tercera proteína de membrana es la proteína M. La nucleocápside está constituida por el genoma viral (ARN), proteínas de empaquetamiento y nucleoproteínas. Además, se ha caracterizado el receptor como moléculas compuestas de ácido siálico, que se encuentra en mucopolisacáridos y glicoproteínas de las membranas celulares [10], como se puede observar en la figura 1.

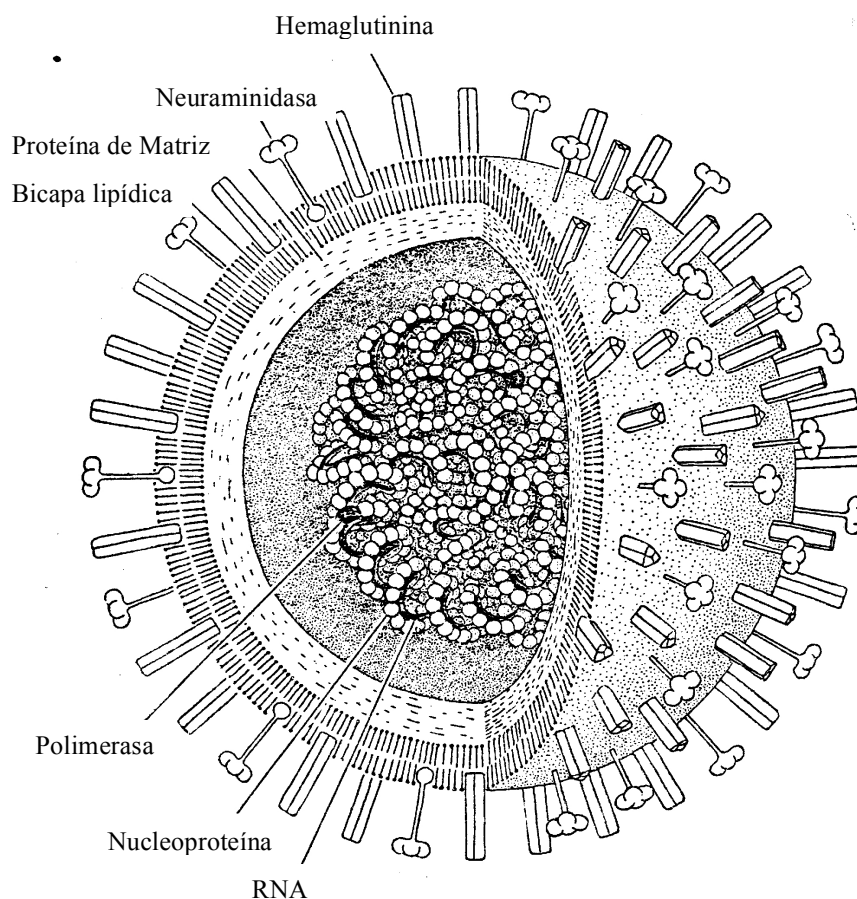


Figura 1 Representación esquemática del virus de influenza. Virus envuelto, los tipos A y B tienen ocho segmentos de ARN; el tipo C sólo tiene 7. Cada segmento codifica para una proteína, dos de las cuales no son estructurales y tres son transmembranales, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), ambas glicoproteínas.

Los virus tipo A contienen información para la síntesis de 10 proteínas, estas proteínas son sintetizadas a partir de diferentes fragmentos del ARN, los cuales se ordenan de acuerdo a su peso molecular: los fragmentos 1, 2 y 3 codifican para las proteínas P (son 3, conocidas como PB1, PB2 y PA), las 3 proteínas forman parte del complejo de la polimerasa, que es requerida para la síntesis del ARN. El segmento 4 de ARN tiene información para codificar a la HA, que es un trómero de 10 a 40 nm de largo. Esta glicoproteína tiene importancia en la patogenia del virus. Entre sus funciones están ser la unión al receptor celular y la fusión con las membranas del endosoma, aglutina eritrocitos de algunas especies animales e induce la respuesta inmune del hospedero [11]. La disposición de la HA permite que sea el blanco para la generación de variantes antigénicas.

En el fragmento 5 del ARN se codifica la NP, que forma un complejo con el ARN. La NP rodea al genoma y lo protege del medio ambiente. El segmento 6 tiene la información de la NA, glicoproteína de la superficie de virus de influenza A y B [12]. La función de esta proteína es enzimática y es la encargada de remover los residuos de ácido siálico de la membrana celular infectada, disolviendo el moco, con lo que permite que los viriones recién sintetizados puedan ser liberados por gemación sin que se auto agreguen. También es importante en la respuesta inmune del hospedero [11,13].

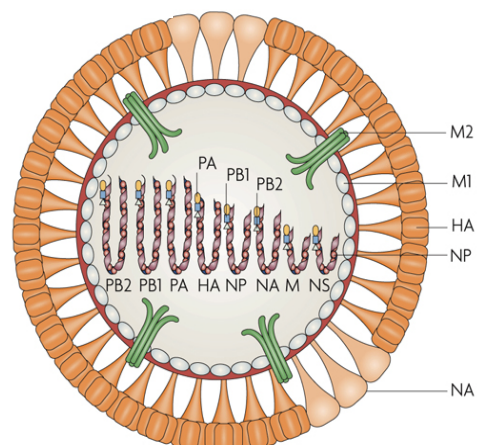


Figura 2 Esquemización donde se muestran los diferentes fragmentos de ARN y las proteínas a las que codifica, además de la distribución de las proteínas en el virus.

El primer paso en el ciclo de la replicación es la absorción, que es la unión de las espículas de la HA a regiones específicas del receptor de ácido siálico de la célula huésped; el receptor es específico de cada especie. El virus entra a la célula por el mecanismo de endocitosis, forma una vesícula que luego es transferida a un endosoma. En este paso es importante la participación de la HA, que promueve la fusión de la cubierta viral con la membrana del endosoma, liberando la nucleocápside en el citoplasma. En este paso es imperioso que la HA sea activada, lo cual es un factor importante en la patogenicidad del virus. Se origina un cambio conformacional de la HA, que forma un canal iónico. En el siguiente paso, el dominio hidrofóbico de la HA interactúa con la bicapa lipídica de la célula blanco. Después de lo cual, la nucleocápside migra hacia el núcleo, donde se realiza la transcripción para la cual es necesaria la participación de la ARN polimerasa II celular, ya que la polimerasa del virus es incapaz de generar el ARNm requerido. El ARNm de polaridad positiva es traducido en proteínas virales, participando una replicasa, PB2 y NP, que generarán el ARN de polaridad negativa, que será el genoma viral. En el citoplasma de la célula huésped se sintetizan las proteínas virales. Las proteínas que se sintetizan en el núcleo migran hacia el citoplasma, donde se encuentran a la HA, NA y M2 y se inicia el evento de la maduración del virus, el proceso lleva unas cuatro o cinco horas después de la infección. La participación de la NA es esencial para la liberación del virus, que se encarga de eliminar los residuos del ácido siálico y permitir la salida de los viriones [14] como puede observarse en la Figura 3.

El virus se transmite por el aire, en gotas de saliva y moco que expelen los individuos infectados al toser, hablar o estornudar; el virus de la influenza puede permanecer activo fuera de su huésped desde minutos hasta horas en diversas superficies, dependiendo de las condiciones. Un individuo puede contagiarse con el virus de influenza si respira las microgotas de saliva de otro contagiado, si toca superficies contaminadas con las manos y las lleva hacia los ojos, nariz o boca. Las células blanco son las células epiteliales secretoras de moco y las células ciliadas. La HA se une al receptor de ácido siálico que se encuentra sobre la membrana de la célula epitelial del huésped. El virus tiene un tiempo de incubación de uno a tres días. Después de este lapso, el virus se multiplica apresuradamente y trasciende a células contiguas [15]. Este virus es citopático, destruye y causa necrosis celular, con la elevada

descamación de células ciliadas se altera la actividad ciliar con aumento de la secreción de moco. Para salir e infectar otras células, la NA reduce la viscosidad de la película de moco al romper los residuos del ácido siálico [16].

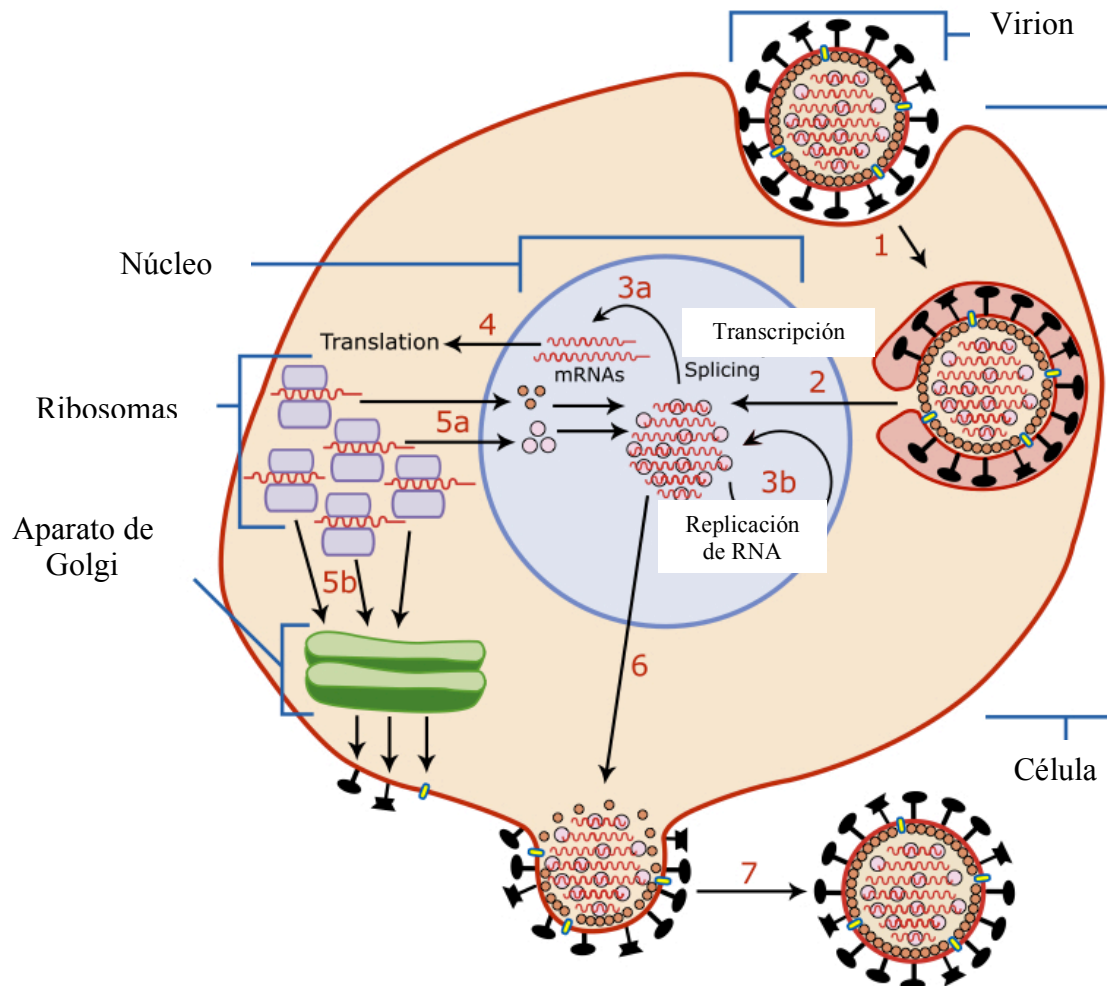


Figura 3 Representación del ciclo de replicación del virus de influenza. El primer paso es la unión al receptor por medio de la hemaglutinina (HA), entra por endocitosis (1). Ya dentro de la célula, se forma un endosoma en el que el pH permite la continuación del ciclo y se libera el ARN al citoplasma (2) El ARN entra al núcleo, para que se sintetice el ARNm para las proteínas (3a). Una vez formados los ARNm de PB1, PB2, M1, NS1, HA, NA, M2, NS2 y PA, migran a los ribosomas citoplasmáticos (4). Las proteínas PB, PA, PB2 y NP regresan al núcleo (5a). Se sintetiza el ARN genómico segmentado de polaridad negativa (3b) y migra hacia el citoplasma para ser ensamblado (6). Las proteínas HA y NA después de pasar por el aparato de Golgi, migran hacia la membrana citoplasmática (5b). Finalmente la partícula completa es liberada, con ayuda de la neuraminidasa (NA) que remueve los residuos de ácido siálico (7).

La descamación del epitelio origina los signos y síntomas respiratorios, implica a la respuesta natural del tracto y favorece la incorporación bacteriana. El proceso de inflamación puede irrumpir bronquios, bronquiolos y regiones alveolares. Todos estos eventos originan los síntomas iniciales característicos de la infección como fiebre, escalofríos, dolores generalizados, particularmente musculares, cefalea, anorexia y postración. Los monocitos y linfocitos locales son la respuesta principal y el interferón es efectivo contra el virus [17]. El virus induce una respuesta humoral efectiva que es

importante en la recuperación, pero hay que considerar que la respuesta de anticuerpos es específica para cada variante del virus, mientras que la de linfocitos T y macrófagos es general y, dependiendo del daño y de la condición del hospedero, la reparación del epitelio puede tardarse hasta un mes. En el inicio, el virus infecta vías respiratorias superiores, pero puede alcanzar vías bajas, causando bronquitis, bronquiolitis y neumonía [17].

En el humano se han identificado los subtipos H1, H2, H3 y N1-N2; en tanto que en el cerdo se han caracterizado los subtipos H1 y H3, y N1-N2; pero en las aves todos los subtipos conocidos del virus de influenza A se han identificado, y son numerosas las especies de aves que pueden ser infectadas por el virus, incluyendo a aves domésticas de corral, jaulas y gallineros, aves que migran y aves acuáticas. En la mayoría de las aves el virus suele ser inocuo, pero cuando es virulento, causa enfermedad en las aves y se puede transmitir fácilmente y, en algunas ocasiones, es mortal. En aves se encuentran los 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 de la NA (N1-N9). Considerando que estos virus se pueden recombinar fácilmente y que un virus sólo puede tener una HA y una NA pueden existir diferentes combinaciones del virus de influenza A (145). Estos hallazgos sugieren que las aves son el reservorio natural del virus de influenza A. La mayoría de los virus infectan de manera preferente a una sola especie; sin embargo, cuando un virus de influenza A sufre un cambio que le infiera la capacidad de infectar a otra especie, se dice que el virus a dado un “salto de especie” [18].

En 1996, en Asia, el subtipo de influenza A H5N1 empezó a causar daño en aves de corral y silvestres y en 1997 la enfermedad llegó al humano. Posteriormente, se extendió hacia numerosos países en Asia, Europa y África, infectando aves y humanos con una extensa diseminación y millones de aves muertas [19].

Desde 1930 se reconocieron los virus de influenza de origen porcino, y uno de los primeros aislamientos de estos virus en humanos se realizó en 1974; desde entonces se tienen numerosos registros de la circulación de los virus de influenza porcina en el humano [20]. Y es que los cerdos son susceptibles tanto al virus de la influenza A de origen aviario como de humano; por lo tanto, pueden ser infectados directamente por estos virus y cuando dos virus, uno de origen aviario y otro de origen humano, infectan a un cerdo al mismo tiempo, surge una mezcla de virus por recombinación, donde

fragmentos completos se pueden combinar, dando origen a virus completamente nuevos, con características diferentes, entre las que se encuentran la capacidad de dar “el salto de especie” como se observa en la Figura 4.

Como se trata de virus nuevos, el sistema inmune no tiene memoria de protección contra ellos; por lo tanto, es incapaz de detener y reparar la infección. En la actualidad se tienen caracterizados 4 subtipos principales del virus en cerdos: H1N1, H1N2, H3N2 y H3N1, de los cuales H1N1 es el de mayor circulación. [20]

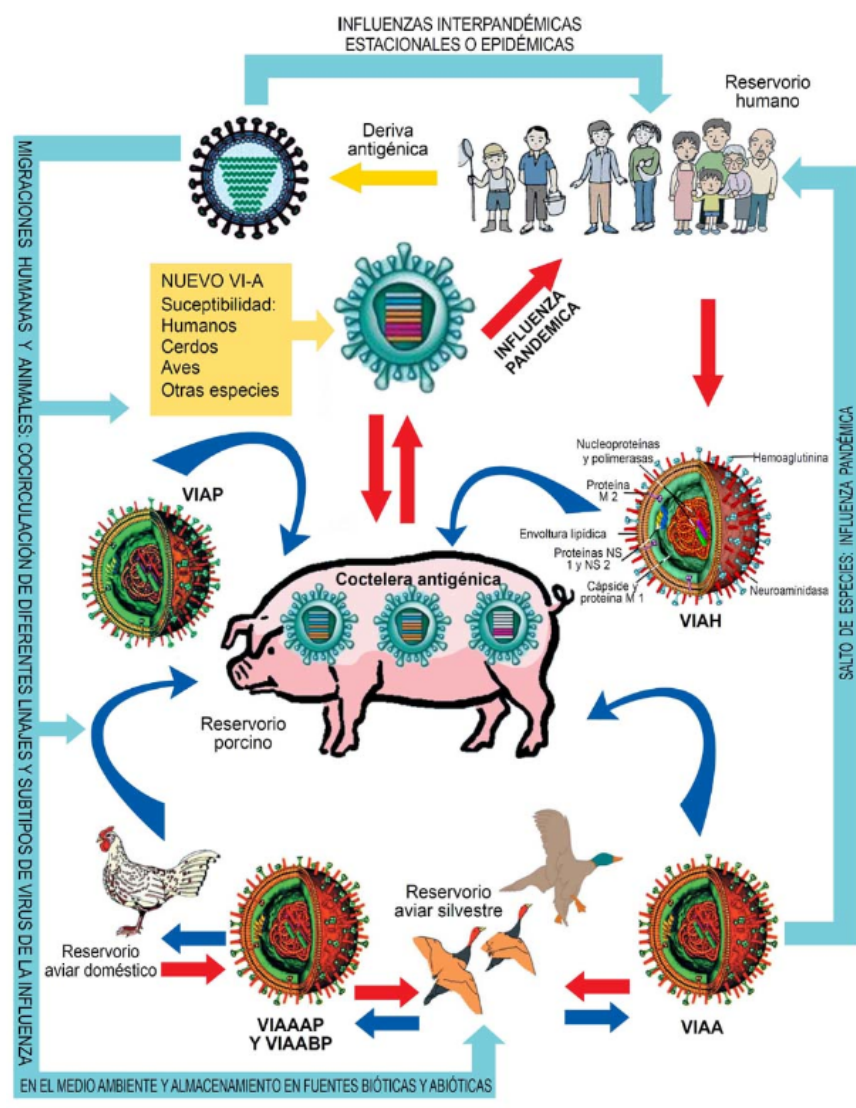


Figura 4 Los reservorios de los virus de influenza A del linaje humano, aviar y porcino interactúan en un medioambiente común. En estas condiciones los virus de influenza A siguen caminos de derivas antigénicas o cambios antigénicos menores, así como reordenamientos o cambios antigénicos mayores. En el caso de los reordenamientos de virus de influenza A, el cerdo posee receptores para los virus de influenza A aviar (VIAA) y virus de influenza A humano (VIAH), por consiguiente puede infectar simultáneamente ambos linajes y el suyo mismo sirviendo de coctelera antigénica. En ciertas oportunidades los virus de influenza A pueden saltar directamente de una especie a otra como lo observado con el VIAA H5N1.

Respuesta inmune en las infecciones virales.

Los elementos protectores con los que cuenta un individuo hacia las infecciones son diversos. La primer forma de clasificarlos es considerar si se trata de una respuesta de células o de moléculas solubles. Según el momento de su participación, se ha propuesto dividir a los mecanismos protectores hacia agentes infecciosos en dos fases: 1) inespecífica, no es inducible y carece de memoria e interviene de forma inmediata ante la sola presencia del agente. 2) Es específica, inducible y con memoria y corresponde a la respuesta inmune adaptativa [21].

Tabla 2 Fases de los mecanismos protectores con sus elementos moleculares y celulares.

Fases	Elementos moleculares	Elementos celulares
Fase I No inducida	Moléculas neutralizantes,	
Sin memoria	microbio estáticas y	Células NK
Inespecífica	microbidas	
	Mediadores de la	Leucocitos, células
	inflamación	polimorfonucleares (PMN),
	Citocinas	Monocitos-Macrófagos,
		Células NK
Fase II Inducida		
Con memoria	Anticuerpos	Linfocitos T Citotóxicos
Específica		

En las infecciones virales es de gran importancia que se genere una respuesta inmune adaptativa de memoria para que el contacto subsecuente con el mismo antígeno provoque una respuesta más rápida y de mayor magnitud. Cuando un antígeno entra por primera vez a un individuo sólo estimula a los escasos linfocitos con los receptores más complementarios a sus epítomos por lo cual la respuesta es lenta, de poca magnitud y de corta duración. La respuesta inmunitaria adaptativa se debe a que los linfocitos T y los linfocitos B constitutivamente tienen receptores de membrana que, al reconocer los

determinantes antigénicos o epítomos del antígeno, se activan, proliferan y forman una clona celular con células diferenciadas. Adicionalmente, estos procesos requieren de otros estímulos dados principalmente por citocinas producidas por la misma u otras células. En cada clona linfocitaria hay dos tipos de células: unas son las efectoras, que cesan de multiplicarse y están diferenciadas fisiológica y morfológicamente y además son la causa de los fenómenos relacionados a la respuesta inmune y el resto son células de memoria que tienen una vida media prolongada [21].

La activación e inducción de una respuesta inmune adaptativa por los virus inicia por un mecanismo conocido como presentación antigénica por medio de la interacción de las células presentadoras de antígenos (CPA) principalmente los macrófagos alveolares con los linfocitos T y B. Los linfocitos constituyen una colección de células fisiológicamente heterogéneas que morfológicamente son similares. En primera instancia se producen en el saco vitelino, hígado y bazo fetales y después del nacimiento en la médula ósea. Por acción de citocinas, los linfocitos maduran y se diferencian como linfocitos T en el timo y como linfocitos B en la médula ósea de los mamíferos. Después emigran a otros órganos linfoides periféricos (bazo, ganglios linfáticos, apéndice, amígdalas, tejido linfoide asociado a bronquios, tejido linfoide asociado a intestino, etc.) donde se localizan en regiones particulares.

Los linfocitos maduros se mantienen en un estado permanente de recirculación sangre- órganos linfoides- circulación linfática. El reconocimiento antigénico que realizan los linfocitos T se efectúa por receptores membranales para el TCR (receptor de células T, del inglés: *T-cell receptor*) y hay dos tipos de linfocitos T según la estructura de su TCR, unos son alfa-beta y otros gamma- delta. Los linfocitos T con TCR alfa-beta son abundantes en el medio interno y no pueden reconocer antígenos intactos, si no que éstos deben ser fragmentados y sus epítomos deben presentarse en asociación con moléculas clase I o clase II presentes en las superficies de ciertas CPA.

Funcionalmente, hay tres subpoblaciones de linfocitos T, una contribuye a la activación de células inmunológicas, por lo que se les llama cooperadoras o T_H (del inglés: *helper*, que ayuda); la segunda subpoblación incluye a los linfocitos que destruyen a otras células después de haber reconocido antígenos en su membrana, por lo que se les denomina citotóxicas o T_C y las terceras eliminan la inmunidad mediada por

células al final de la reacción inmune y células T auto-reactivas que escaparon al proceso de selección negativa en el timo y se conocen como T_{reg} . Puesto que el TCR es estructuralmente similar en los T_H , y en los T_C , es necesaria la participación de otras moléculas que funcionan como correceptores y dirigen el reconocimiento hacia uno u otro tipo de linfocitos. Los linfocitos $CD4^+$ interactúan con células que presentan antígenos exógenos asociados a moléculas HLA clase II, ya que $CD4^+$ es complementario a esa molécula presentadora. Los linfocitos que tienen la molécula $CD8^+$ interactúan con células que presentan epítomos endógenos en moléculas HLA de clase I. Aunque la mayoría de los linfocitos $CD4^+$ son T_H hay algunos que tienen capacidad citotóxica y su papel principal es el de realizar funciones de cooperación con los linfocitos $CD8^+$ [22]. Los linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ para poder activarse y proliferar tienen que reconocer a los antígenos virales a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las moléculas MHC son de 2 tipos, las de clase I y clase II. En el humano los genes del MHC están ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 y sus productos se conocen como moléculas HLA (antígenos leucocitarios humanos, del inglés: *Human Leukocyte Antigens*); las de clase I son HLA-A, HLA-B y HLA-C, en tanto que las de clase II son HLA-DR, HLA-DQ, HLA- DP. Todas estas moléculas son muy polimórficas y sus variantes son heredadas, de modo que cada individuo tiene un juego de moléculas HLA que prácticamente, le es único [23].

Las moléculas de clase I se encuentran en todas las células nucleadas del organismo. Tiene dos cadenas: alfa y beta-2 microglobulina. La cadena alfa está codificada en la región génica 6p y sus dos primeros dominios extracelulares conforman un surco donde puede acomodarse un péptido de unos 12 aminoácidos. Debido a la presencia de posiciones variables de aminoácidos en el surco, su capacidad de unión a epítomos diferentes es sumamente elevada. Las moléculas de clase I se asocian a péptidos de proteínas que son procesados por la célula, por medio de moléculas especializadas en el transporte de esos péptidos. Tales proteínas se originan a partir del genoma del propio sujeto o de un ácido nucleico ajeno, generalmente de origen viral, alojado en esa célula. La proliferación de la célula $CD8^+$ genera la clona que incluye a los linfocitos T_C , y sus células de memoria. Los T_C conservan el TCR y la $CD8^+$ y producen cantidades bajas de algunas citocinas [24].

Las moléculas de clase II se expresan constitutivamente en las células presentadoras de antígeno (CPA) típicas; tienen dos cadenas (alfa y beta) ambas

codificadas en el MHC y sus dominios más exocitoplásmicos conforman un surco similar al descrito para las moléculas de clase I donde también se asocian péptidos pequeños de unos 15 residuos. En general las CPA que capturan antígenos los procesan y los fragmentos proteínicos resultantes se asocian a moléculas de clase II. La interacción es estabilizada por el correceptor $CD4^+$ y otras moléculas de adhesión. Simultáneamente las CPA producen interleucina-1 (IL-1), que contribuye a estimular a las células T_H que así sintetiza la interleucina-2 (IL-2) y expresa receptores de membrana para esta molécula (IL-2R). Esto conduce a la expansión clonal de la célula con la formación de dos subpoblaciones: T_{H1} y T_{H2} , con sus correspondientes células de memoria. Para la generación de células T_{H1} se requiere de IL-1 que proviene de las CPA y para que se formen células T_{H2} es necesaria la IL-4 cuyo origen puede ser una célula cebada o una subpoblación escasa de linfocitos T llamadas T-NK. Los linfocitos T_{H1} producen las citocinas IL-2, el factor de necrosis tumoral beta ($TNF-\beta$) y el interferón gamma ($IFN-\gamma$). Los linfocitos T_{H2} también producen IL-3 y otras con funciones primordialmente cooperadoras para linfocitos B (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13) o reguladoras para las células T_{H1} (IL-10) [24,23].

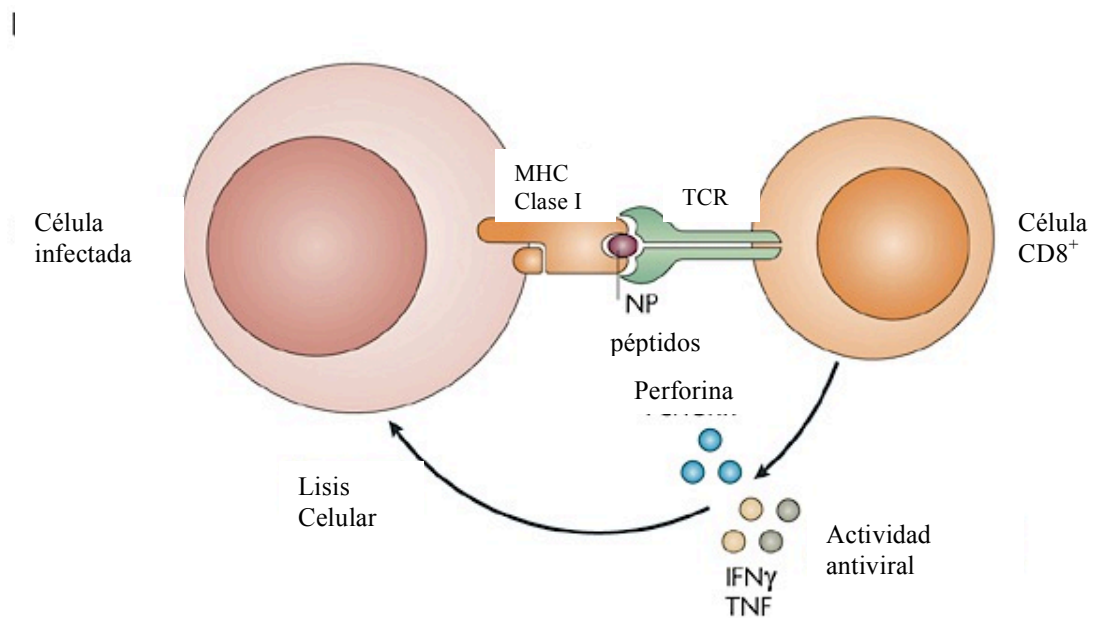


Figura 5 Esquemización de la inmunidad mediada por células. Una célula infectada por un virus, procesa y presenta por el MHC Clase I los péptidos del agente infeccioso a una célula $CD8^+$, la cual produce citocinas como perforinas, Interferón gamma y factor de necrosis tumoral (TNF) como actividad antiviral provocando la lisis celular de las células infectadas.

En el hombre la inmunidad celular contra los virus de influenza está menos definida que la inmunidad humoral. Está basada en la respuesta de los linfocitos CD8⁺ (MHC-I), la cual aparece dentro de los primeros 3 o 4 días después de la infección [25].

Los linfocitos CD8⁺ citotóxicos detectan y lisan las células hospederas infectadas por el virus y su especificidad pudiera estar dirigida contra epítomos de la HA, NP, M y PB2, que son altamente conservados con respecto a aquellos relacionados con la inmunidad humoral. Los linfocitos CD4⁺ (MHC-II) facilitan ambas respuestas, la humoral y la celular, además ellas pueden producir los efectos citolíticos, aunque mucho menos efectivos que los linfocitos CD8⁺ [4]. Las funciones y ubicación de los diferentes tipos de linfocitos pueden observarse mejor en la Tabla 3.

Tabla 3 Actividad, efecto y ubicación de los diferentes tipos de linfocitos

Linfocitos	Actividad	Efecto	Ubicación
T _H 1 TCR α-β CD4 ⁺ CD8 ⁻	Producción de: IL-3, IL-2, TNF-β INF- γ	Leucopoyesis Inflamación Activación Celular Regulación de T _H 2	Medio Interno
T _H 2 TCR α-β CD4 ⁺ , CD8 ⁻	Producción de: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10	Leucopoyesis Inflamación Activación celular Regulación de T _H 1	Medio Interno
T _C TCR α-β CD8 ⁺ , CD4 ⁻	Producción de perforinas	Citotoxicidad directa Regulación de CPA	Medio interno

Respecto a la respuesta celular mediada por las células B es distinta a la de las células T. Estas células son capaces de reconocer antígenos sin que éstos tengan que ser presentados y su combinación con las inmunoglobulinas de clase M (IgM) inicia su endocitosis, procesamiento y presentación en productos de clase II. Así, el linfocito B actúa como una CPA típica y establece una asociación con un linfocito CD4⁺. Éste se transforma en una T_H2 cuya cooperación es indispensable para la síntesis de la inmensa mayoría de los anticuerpos y en su ausencia sólo se secreta Ig_M sin formación de células de memoria. La clona de linfocitos T_H2, produce las citocinas necesarias para que el

linfocito B complete su proliferación y diferenciación en células de memoria y en células plasmáticas que, más adelante, cambian el isotipo de Ig secretada [16].

El marcador principal para la resistencia y la recuperación de la enfermedad por el virus de influenza son los anticuerpos, los cuales son de especificidad complementaria a los antígenos HA y NA del virus. Los anticuerpos anti-HA restringen al virus por neutralización de la infectividad y los anticuerpos anti-NA restringen la diseminación del virus, interfiriendo el paso de la liberación de las nuevas partículas de las células infectadas. La pérdida de anticuerpos complementarios, por consecuencias naturales o por la acumulación de pequeños cambios antigénicos, puede disminuir la inmunidad humoral.

Vacunación contra el virus de influenza.

Desde hace más de sesenta años se ha contado con vacunas contra la influenza. En este largo periodo la experiencia obtenida ha demostrado su seguridad y eficacia. En poblaciones con riesgo de complicaciones graves, es bien sabido que la vacunación reduce los ingresos hospitalarios y las muertes. Por tanto, la vacunación es la piedra angular de la prevención de la enfermedad. Dado que los virus de influenza evolucionan constantemente, las vacunas se producen cada año y su composición se basa en las cepas más importantes de virus que se han identificado, gracias al sistema de vigilancia mundial [1].

La inmunidad individual redundante en la salud pública comunitaria, ya que, al reducirse el número de sujetos susceptibles, se limita la diseminación de los agentes infecciosos, en especial para este agente no existen reservorios no humanos. Cuando este es el caso, no es indispensable que la vacunación cubra a toda la población susceptible, basta su disminución por debajo de una cantidad crítica para impedir que el agente circule y quede así erradicado. Cuando existen reservorios no humanos como en el caso de la influenza, la erradicación del agente es prácticamente imposible y la vacunación debe cubrir a toda la población susceptible para conseguir que la enfermedad sea controlada [1].

Aún así siempre hay el riesgo de aparición de casos en los individuos no vacunados, o en los que sí lo fueron pero no quedaron adecuadamente inmunizados, o cuando alteraron su inmunocompetencia en forma secundaria por otra causa [23]. El ideal sería lograr una vacuna barata, de preferencia múltiple, que requiera una sola dosis, que comprenda los epítomos protectores de todas las variantes del agente, que confiera inmunidad permanente a todos los susceptibles y que no provoque reacciones adversas [3,22].

Respuesta inmune protectora inducida por vacunación.

La inmunidad resultante de la administración de vacunas ocurre por la interacción de diversos mecanismos inmunológicos. Gracias a las campañas mundiales de vacunación cada vez son más los sujetos que han sido vacunados oportunamente. La inmunidad adquirida artificialmente no sólo es importante para sustituir la necesidad de un contacto natural con el agente, el cual siempre representa un riesgo para la salud y, a veces, para la vida, sino que muchas veces otorga un estado de protección que no podría obtenerse por ningún otro medio [5].

Las vacunas son preparaciones que mimetizan el proceso inmunológico que naturalmente ocurre en una infección, con la salvedad de que se trata de un procedimiento esencialmente inocuo. La respuesta es un proceso dinámico que puede dividirse en dos fases, una es la inducción de la respuesta y la otra es la generación de los elementos celulares y moleculares efectores. El estado de inmunidad así adquirido es una consecuencia de la segunda fase y es mediado por tres tipos de elementos efectores: 1) Moléculas que se combinan específicamente con el antígeno inductor (anticuerpos), 2) células que matan a otras células (citotoxicidad celular) y, 3) Citocinas activadoras de funciones celulares [21].

Las moléculas inductoras de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa se llaman antígenos, todos ellos son macromoléculas orgánicas, principalmente proteínas y polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos. Algunas moléculas orgánicas de bajo peso molecular no son inmunogénicas por ellas mismas, pero sí lo son después de conjugarlas espontáneamente con otras de mayor peso, generalmente proteínas.

En los antígenos de naturaleza proteínica hay dos grandes tipos de epítomos: los secuenciales, determinados por su estructura primaria, que son relativamente escasos y preferentemente los reconocen linfocitos T y los conformacionales, que dependen de su disposición en el espacio, son más abundantes e inducen principalmente respuestas de anticuerpos [26]. Un factor que es conveniente destacar en la inmunización es la potencialización de la inmunogenicidad al adicionar a los antígenos materiales adyuvantes, tales como el fosfato o el hidróxido de aluminio, emulsiones aceite-agua, detergentes, partículas de bentonita o látex, algunas moléculas microbianas, por mencionar sólo algunos de los compuestos que en modelos animales han resultado muy efectivos [10].

Durante el curso de una infección natural, los linfocitos $CD8^+$ antígeno específicas se expanden y proliferan hasta incrementar su número, lo cual es seguido por una contracción y generación de un número estable de células de memoria. Algo importante y que hay que destacar de los linfocitos $CD8^+$ es que proveen una resistencia hacia la re-infección por el mismo virus y se ha observado una correlación entre el número de linfocitos $CD8^+$ de memoria con el nivel de protección contra la re-infección. Es por eso que las vacunas designadas a promover la inmunidad celular lógicamente deben enfocarse en provocar la proliferación del mayor número de estas células de memoria para la óptima protección [1].

Se ha observado que en modelos de influenza en ratón los linfocitos $CD4^+$ no son esenciales para proporcionar inmunidad protectora cuando los linfocitos $CD8^+$ y las células B están presentes, sin embargo, desempeñan una función importante en la respuesta inmune al virus de la influenza manteniendo a los linfocitos $CD8^+$ citotóxicos e induciendo la transición a la fase de memoria y cooperando con las células B para la producción de anticuerpos debido a las citocinas inflamatorias y quimiocinas producidas durante la etapa temprana de la infección. En humanos el papel de los linfocitos $CD4^+$ en respuesta al virus de la influenza no se conocen bien. En un estudio realizado por Wilkinson y cols demostraron que los linfocitos $CD4^+$ memoria específicas al virus de la influenza contribuyen a la protección de la enfermedad en humanos [27]. Otros grupos han encontrado que la reacción cruzada de los linfocitos $CD4^+$ contra la glicoproteína de superficie HA inducidas previamente durante una infección y/o vacunación tienen el potencial de mediar en la protección contra un

subtipo diferente de la influenza A virus [28,29,30,31].

La mayoría de las vacunas están diseñadas para inducir la formación de anticuerpos que protejan al hospedero neutralizando a los patógenos o bloqueando la entrada de éstos a las células sin embargo hay una reconocida necesidad de diseñar vacunas que además de inducir una respuesta inmune de anticuerpos estimulen fuertemente los componentes de los linfocitos CD8⁺ de la respuesta inmune adaptativa además de los anticuerpos. Las citocinas inflamatorias inducidas por infección o por vacunas con adyuvante actúan directa o indirectamente en los linfocitos CD8⁺ para modular su expansión, contracción y adquisición de características de memoria de manera importante. El entendimiento de cómo es que las citocinas inflamatorias regulan la diferenciación de los linfocitos CD8⁺ de memoria puede ser una guía para nuevas estrategias para un diseño de vacuna racional [17]. Por otro lado, la respuesta celular mediada por los linfocitos CD4⁺ es de gran importancia debido a que estudios previos han demostrado que los linfocitos CD4⁺ poseen un papel muy importante en la defensa del hospedero en contra de la infección de virus de influenza, en parte lo hace regulando la producción de anticuerpos neutralizadores de linfocitos B [17].

La administración del virus de influenza por medio de vacunas con los linfocitos CD8⁺ antígeno específicas juegan un papel muy importante en la protección del hospedero contra infecciones provocadas por patógenos intracelulares como son los virus, algunas bacterias y parásitos.

Desarrollo y prevención de la pandemia por influenza A H1N1.

Los virus de influenza humana A y B causan brotes de influenza cada invierno en todo el país [32,6,32]. En abril del 2009, el CDC y la Dirección General de Epidemiología en México identificaron varios casos severos de infección de una nueva cepa viral, la cual emergió rápido y se diseminó desde el territorio Mexicano hacia el resto del mundo [33,32].

Ésta cepa viral conocida como influenza de origen porcino, gripa porcina y más tarde denominada influenza A H1N1/09 pandémica por la OMS, causó más de 18,000 muertes en todo el mundo. En el Otoño del 2010, la OMS, declaró la entrada al periodo

post-pandémico estimando que el virus de influenza AH1N1/09 pandémico se convertiría en poco tiempo en una influenza estacional más, la cual seguiría circulando en los próximos años.

Las características antigénicas de éste virus son diferentes a las que posee el virus de influenza estacional A H1N1 y la población, en especial la joven que generalmente carece de inmunidad hacia este nuevo virus contrario a lo que se espera de la población en las influencias estacionales [33,34,35]. Sin embargo la infección en adultos mayores no es tan severa a comparación de la población en general [35,36,37]. Se ha sugerido en varios artículos que los adultos mayores que estuvieron expuestos a la influenza AH1N1 a principios del siglo XX pudieran poseer protección de anticuerpos preexistentes conferida por una reacción cruzada [38,39] ya que el virus de influenza pandémica de 1918 es antigénicamente similar a la influenza pandémica del 2009 [40,41].

La diseminación tan rápida de este virus a nivel mundial, en menos de 2 meses, llevo a la OMS a incrementar el nivel de alerta de la influenza pandémica de fase 3 donde predominan infecciones animales y muy pocas infecciones humanas, a fase 6 donde existe una diseminación de infección humana. La intervención social como el cierre de escuelas o las múltiples medidas de salud para evitar infecciones dieron buenos resultados al principio de la pandemia, sin embargo fueron obsoletas una vez que el virus de influenza se estableció en la comunidad. Una pandemia de influenza no puede ser totalmente eliminada hasta que exista una barrera inmune en la mayoría de la población, la mejor vía en la prevención de la infección por los virus de influenza es la vacunación, la cual funciona por la exposición del sistema inmune a cepas inactivas del virus que no pueden provocar enfermedad [42]

Para Septiembre del 2009 los laboratorios SANOFI Pasteur Inc. desarrollaron una vacuna monovalente contra el virus de influenza A H1N1/09 pandémico, la cual está compuesta por el virus de influenza inactivado, y fue aplicada en México en los meses de diciembre y enero del 2010-2011 como parte de la vacunación hacia los sectores de la población de alto riesgo, que incluye a niños, mujeres embarazadas, adultos mayores y personas que laboran en el Sector Salud, según la Guía de la OMS para el uso de vacunas y antivíricos en las pandemias de influenza [2].

III. Justificación

Durante el curso de una infección natural por virus de influenza, los individuos inmunocompetentes desarrollan una respuesta inmune celular mediada por linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ al reconocer a los antígenos virales se diferencian en células efectoras que se expanden para incrementar su número, en este paso el papel de los linfocitos CD8⁺ es esencial ya que éstos tienen mecanismos citotóxicos para matar a las células infectadas. Simultáneamente se genera un repertorio estable de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de memoria antígeno específicos, los cuales adquieren un fenotipo de larga duración que protegen contra una re-infección hacia el mismo virus. Debido a que el virus de Influenza A H1N1/09 pandémico fue capaz de infectar a personas inmunocompetentes y a que los estudios disponibles sobre la eficacia de las vacunas se realizaron por ensayos de anticuerpos, es importante conocer si la vacuna es capaz de generar una respuesta celular de memoria.

IV. Hipótesis

La vacuna con el virus de influenza A H1N1/09 pandémico es capaz de generar linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ específicos en sujetos sanos.

V. Objetivos

Objetivo General

Evaluar los linfocitos T específicos a péptidos A H1N1 en células mononucleares de sujetos sanos antes y después de la vacunación contra el virus de influenza AH1N1.

Objetivos Específicos

1. Evaluar las células T CD4⁺ y T CD8⁺ específicas a dos secuencias consenso de la Hemaglutinina del virus AH1N1/09 pandémico en sujetos sanos antes de la vacunación utilizando ensayos de proliferación celular por citometría de Flujo.
2. Evaluar las células T CD4⁺ y T CD8⁺ específicas a dos secuencias consenso de la Hemaglutinina en sujetos sanos un mes después de la vacunación contra el Virus AH1N1/09 pandémico.

VI. Materiales y Métodos

Criterios de Inclusión

Este protocolo fue revisado y aprobado por el comité de Ciencia y Bioética del INER. Se incluyeron 45 sujetos sanos de 21 a 52 años de edad ocupacionalmente expuestos al virus de influenza A H1N1/09 pandémico y que dieron su consentimiento de participación en el estudio por escrito, de ambos sexos.

Toma de muestra de sangre periférica.

A cada individuo se le extrajeron 20 ml de sangre periférica por la técnica de flebotomía en tubos Vacutainer conteniendo heparina como anticoagulante (BD Vacutainer, NJ USA) justo antes de aplicarles la vacuna contra la influenza AH1N1/09 pandémica sin adyuvante de Sanofi Pasteur Inc. siguiendo la guía de la OMS para el uso de vacunas y antivíricos en las pandemias de influenza. Una segunda muestra de 20 ml

de sangre fue tomada un mes después de la aplicación la vacuna y se almacenó en una hielera para su posterior purificación.

Separación de las células mononucleares de sangre periférica.

Cada muestra se diluyó 1:1 con medio RPMI (BioWhittaker) a temperatura ambiente en tubos cónicos de 50 ml (Falcon), se colocó una pipeta pasteur (Corning) hasta el fondo del tubo y se agregaron 10 ml de ficol hypaque (Lymphoprep) a través de ella con ayuda de una jeringa, una vez terminado el procedimiento se retira la pipeta. En seguida se centrifugó la sangre a 1200 rpm a temperatura ambiente por 45 min sin freno. Una vez centrifugadas se separó el anillo leucocitario por aspiración con pipeta pasteur y se colocó en otro tubo de 50 ml. Se lavaron los linfocitos por centrifugación tres veces con RPMI G+G (L- Glutamina Gibco; Gentamicina, Sigma). Se resuspendió el botón en 20 a 30 ml de RPMI G+G y se procedió al conteo celular.

Congelamiento de las células

Para el congelamiento de las células se requiere preparar una mezcla de dimetil sulfóxido (DMSO hibrimax-SIGMA) al 10% en suero fetal bovino (Biowittaker) descomplementado por 30 minutos a 56°C en baño maría. Se centrifugaron las suspensiones de células a congelar durante 15 minutos a 1200 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se agitaron suavemente en vortex, con una pipeta de 10 ml se les agregó la mezcla de SFB-DMSO 10% a las células siempre sobre cama de hielo, se resuspendieron bien subiendo y bajando un par de veces la mezcla y después con la misma pipeta se fueron colocando 1 ml de la mezcla dentro de cada vial, una vez que se terminaron de llenar los viales se cerraron bien, se colocaron en una caja de cartón y se almacenaron a -20°C por un día; al siguiente se pasaron a -70°C.

Descongelamiento de las células

Para cada muestra a descongelar se tomó un tubo de 14 ml y se colocaron 9 ml de RPMI G+G 10% SFB el cual se introdujo a un baño maría que estaba a 37°C durante 15 minutos, en seguida se transportaron en hielo seco la cantidad de viales que contenían las células de cada voluntario y se descongelaron agitando ligeramente cada

vial dentro del baño maría hasta notar que se desprendía el botón celular. Enseguida se transportaban los viales junto con el tubo de 14 ml a la campana de flujo y dentro de ella se transfirió 1 ml de medio proveniente del tubo a cada uno de los viales para posteriormente transferir todo el contenido de los viales de vuelta al tubo de 14 ml. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, luego se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de solución de carboxifluoresceín éster (CFSE) para proceder al conteo celular.

Conteo celular.

Se realizó tinción para observar viabilidad celular por medio de azul de tripano. Se coloca 1 volumen de la suspensión por un volumen de colorante y se homogeniza por pipeteo. Se colocan 10 μ l en una cámara de Neubauer. Se contaron tres series (superior, medio e inferior) de 5 filas y se calculó el número total de células obtenidas y su viabilidad de acuerdo al fabricante.

Tinción con carboxifluoresceín succinimidil éster CFSE.

Se ajustaron las células a una concentración de $1-10 \times 10^6$ en un volumen de 1 ml de buffer para la tinción de CFSE (Buffer de fosfatos salino PBS Biowittaker al 0.1% de suero fetal bovino SFB) y se colocaron en tubos de 14 ml, se adicionaron 2 μ l del stock de CFSE (5mM) por cada 1×10^6 células/ml, se agitó vigorosamente por 1 minuto y se taparon los tubos hasta el primer tope para su posterior incubación a 37°C/ 5% CO₂ durante 10 min. La reacción se detuvo adicionando 5 volúmenes más de RPMI 10% SFB G+G a 4°C y se colocaron en baño de hielo por 5 min. Se centrifugaron las células a 1000 rpm durante 10 min. a 4°C, se decantaron y se resuspendieron en medio RPMI G+G 10% SFB ajustando a una concentración de $1-2 \times 10^6$ células/ml [43].

Estimulación de células.

Cálculo de estímulos.

Las células mononucleares de cada individuo fueron estimuladas con diferentes polipéptidos diseñados por nuestro grupo y sintetizados por Enzo Life Sciences (An

Arbor, MI). La selección de las secuencias de péptidos se realizó con base a una secuencia de la hemaglutinina (HA) que se encuentra presente entre los serotipos de influenza A H1N1 pandemia 2009, el serotipo H1N1 estacional y el serotipo H3N2. Las secuencias se seleccionaron con base a los datos de HA disponibles en el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI), los datos de las secuencias se descargaron y alinearon utilizando el paquete Clustal W (FASTA). Las secuencias de la HA se generaron y analizaron de forma independiente para cada subtipo de virus para seleccionar una secuencia distintiva para cada subtipo de virus y una secuencia común para los tres subtipos. Con los paquetes de predicción SYFPEITHI y ProPred MHC II predictor se evaluó que las secuencias seleccionadas fueran reconocidas por moléculas de MHC de clase I y clase II y con afinidad para los alelos HLA en la población mexicana. Las secuencias y concentraciones de dichos péptidos fueron las siguientes: 1 (Secuencia exclusiva de H1N1 pandémico MKAILVLLYTFATAN), 2 (Secuencia exclusiva de H1N1 pandémico RFEIFPKTSSWPNHDSNKG), 3 (Secuencia homóloga FGAIAGFIEGGWTGMVDGWY), 4 (Secuencia exclusiva del virus de Influenza AH1N1 estacional GIINSNAPMDECDKACQTPQ), y 5 (Secuencia exclusiva del virus de Influenza H3N2 estacional QASGRITVSTKRSQQTVI) se encontraban a una concentración de 10µg/µl y la fitohemaglutinina (PHA) se encontraba a 1µg/ µl. Para cada pozo estimulado se utilizó una concentración final de 5µg/ 500µl de cada una de las secuencias y una concentración de 2.5 µg/ 500µl del PHA respectivamente.

Estimulación de células

Se utilizaron placas de 48 pozos de fondo plano en donde se colocaron 500µl de la suspensión celular por pozo (Costar 3548) y se estimularon con 500µl de cada uno de los siguientes estímulos: 1) Medio RPMI G+G 10% SFB, 2) Secuencia 1, 3) Secuencia 2, 4) Secuencia 3, 5) Secuencia 4, 6) Secuencia 5 y 7) PHA (Sigma), se observó la placa al microscopio para descartar cualquier tipo de contaminación, se cubrió la placa con aluminio y se incubó a 37°C/ 5% de CO₂ durante 6 días; al sexto día se revisó la placa para descartar problemas de contaminación y se re-estimularon las células de la misma forma y con los mismos polipéptidos a excepción del Medio RPMI G+G 10% SFB y PHA, y se incubaron durante 16 horas más a 37°C/ 5% de CO₂.

Citometría de flujo.

Después de la incubación se transfirieron las células a tubos de citometría 2058 (Becton Dickinson). Se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min a 4°C y se guardó el sobrenadante de cada muestra por duplicado en tubos eppendorf de 0.6 ml y se resuspendió el botón celular por vortex. Se les agregaron 100µl de solución de lavado y se creó un tubo para el isotipo de las células estimuladas con Medio RPMI G+G 10% SFB al cual se le transfirieron 20 µl del tubo donde estaban las células con Medio RPMI G+G 10% SFB. En seguida se les adicionó a cada tubo 2µl de los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-humano APC/ C y 7 CD4 (BioLeyend), anti-humano PE/C y 7 CD8 (BioLeyend) y anti-humano CD3 PE- Texas Red Conjugate (Invitrogen) a excepción del isotipo medio, se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente protegidos de la luz con aluminio, se lavaron adicionando 1 ml de solución de lavado y centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl de solución de lavado para su posterior adquisición.

Adquisición celular en Citómetro de Flujo

En un lapso no mayor de 24 horas, se adquirieron 100,000 eventos de cada muestra en un citómetro de flujo FACS CantoII (BD Biosciences, CA USA)

Ensayo de proliferación celular.

El análisis de proliferación se realizó en el software Flow Jo (Treestar* v.), con la herramienta de proliferación celular. Este análisis se realizó con el objetivo de cuantificar a las células T específicas hacia la vacuna de influenza AH1N1/09 pandémica, y para esto brevemente se seleccionó la región de células CD3⁺, CD4⁺ y CD3⁺, CD8⁺ en una gráfica de puntos y posteriormente se aplicó la función de proliferación, esta función generó un histograma donde muestra el número de células que proliferan en 7 generaciones (Figura 6).

En el tubo control que solo contenía medio se fijó el fondo de proliferación y fue aplicado a los tubos subsecuentes de la misma muestra. Los datos que generó el programa fueron dos el número de células y el porcentaje de proliferación en cada

división. Los datos se reportaron como porcentajes de proliferación en cada división y como proliferación total los cuales corresponde a la suma de generaciones .

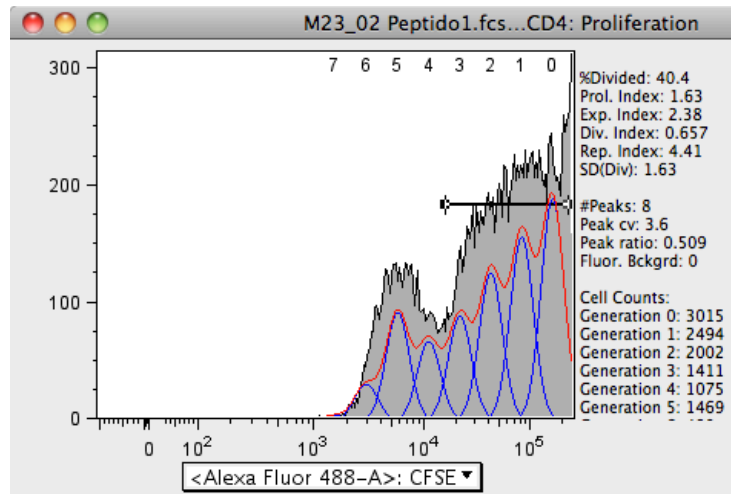


Figura 6 Histograma tipo del programa Flow Jo. En la figura se muestran las divisiones celulares y el número de células para cada división.

Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó en el Software Prisma 6 para Mac OS X Versión 6.0 donde se analizaron los datos para ver si se comportaban como una población normal, los datos no se comportaron de manera normal y se decidió hacer una prueba t de Mann-Whitney donde se comparó la proliferación celular antes y después de la vacuna y el valor de p para definir si se trató de un valor significativo es ≤ 0.05 .

VII. Resultados

De los 45 voluntarios iniciales, se descartaron aquellos que tuvieran menos de 95% de viabilidad celular y a aquellos que no contaron con el número de células necesarias para realizar el ensayo de proliferación. Se analizaron 33 sujetos sanos trabajadores de salud, las características demográficas se muestran en la Figura 2. El rango de edad es de 21 a 52 años, la relación F:M fue de 1.4. El área de adscripción está representada por los departamentos de Investigación en microbiología y Microbiología Clínica.

Estrategia de análisis de proliferación.

Para el análisis de proliferación, se seleccionaron en una gráfica de puntos CD3⁺ vs granularidad a aquellas células que fueran CD3⁺, de esta población se identificaron las subpoblaciones CD4⁺ y aquellos que fueran CD8⁺ para finalmente utilizar en cada una de estas su poblaciones la herramienta de proliferación celular, con la cual se realizó un histograma con las cuentas totales de células por generación. (Fig. 7)

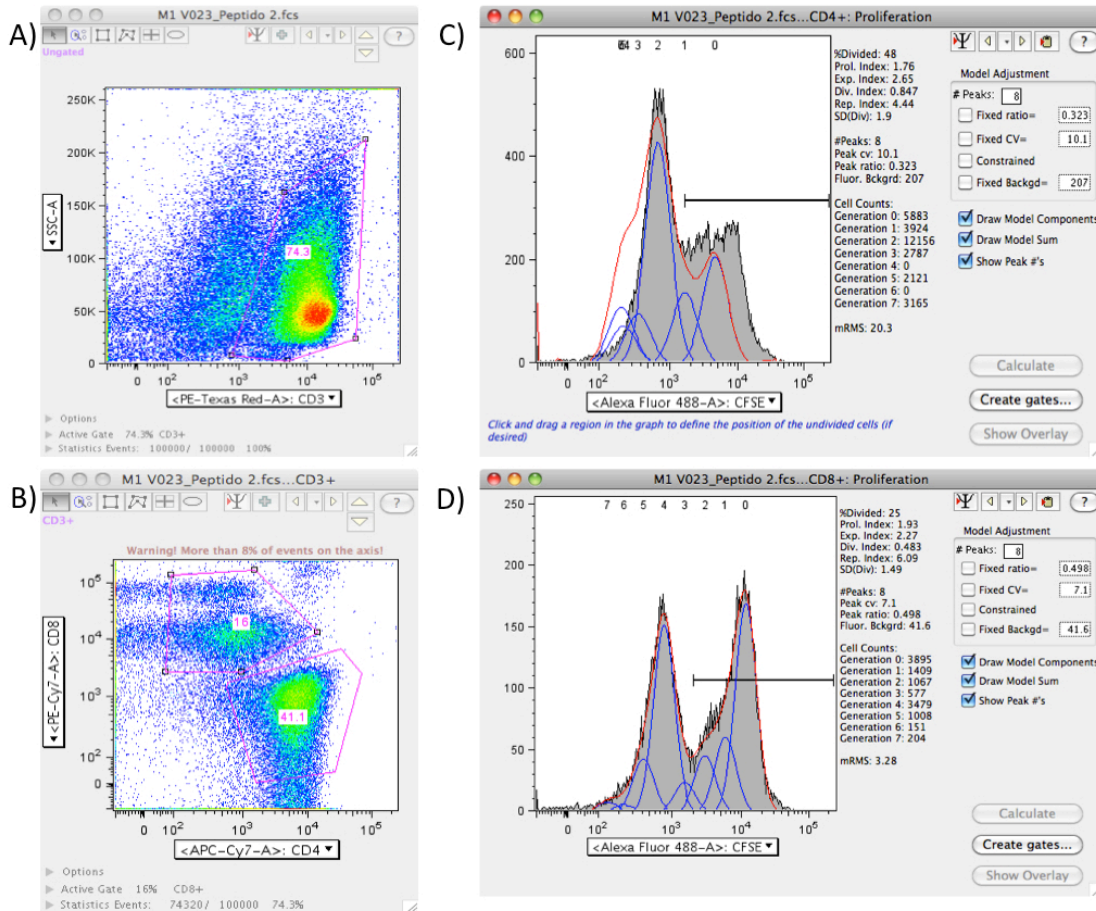


Figura 7 Estrategia de análisis de proliferación. En A) podemos observar la región de linfocitos CD3⁺ en una gráfica de CD3⁺ (Pe Texas Red) vs granularidad, de esa subpoblación en B) seleccionamos las regiones CD4⁺ y CD8⁺ en una gráfica de puntos de CD4 (APC Cy7) vs CD8 (PE Cy7). En cada una de las subpoblaciones se utilizó la herramienta de proliferación del software Flow Jo . En C) Se muestra la proliferación de la subpoblación de células CD4 y en D) Se muestra la proliferación de la subpoblación de células CD8. En ambas gráficas se calcula el número y porcentaje de células que hay por generación.

Proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en respuesta a secuencias de ADN específicas para el virus de influenza AH1N1/09 pandémico.

Para conocer la respuesta inmune de linfocitos T generada por la vacuna de influenza AH1N1/09 pandémica, se analizó la proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ específicas en una muestra sanguínea antes y después de la vacunación en adultos sanos. Los porcentajes de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en respuesta a la secuencia S1 del virus de influenza AH1N1/09 pandémico se muestran en las figuras 8 y 9. En cada figura se muestran 8 gráficas que corresponden a la proliferación de los linfocitos T en cada una de las 7 generaciones o divisiones y la suma de todas las generaciones que corresponde a la proliferación total. En la figura 8 se observa la proliferación de las linfocitos CD4⁺ específicas antes y después de la aplicación de la vacuna sin diferencias significativas. En contraste en la figura 9 se observa la proliferación de linfocitos CD8⁺ específicos y un incremento significativo posterior a la vacunación a partir de la generación o división 3 y en la suma de las generaciones.

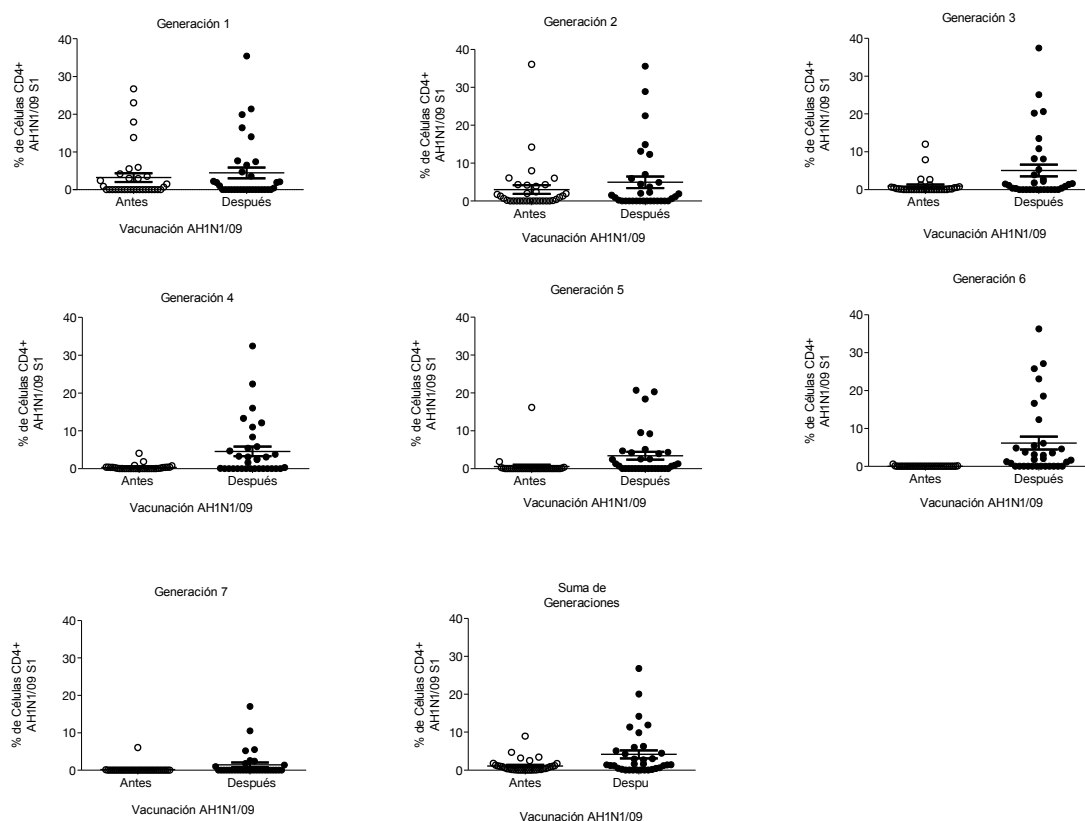


Figura 8 Proliferación de linfocitos CD4⁺ antes y después de la aplicación de la vacuna contra el virus de la influenza A H1N1 en células estimuladas con la secuencia 1 del virus A H1N1/09 pandémico, cada gráfica muestra una generación celular, la última muestra la proliferación total. Cada punto en la gráfica representa a un individuo

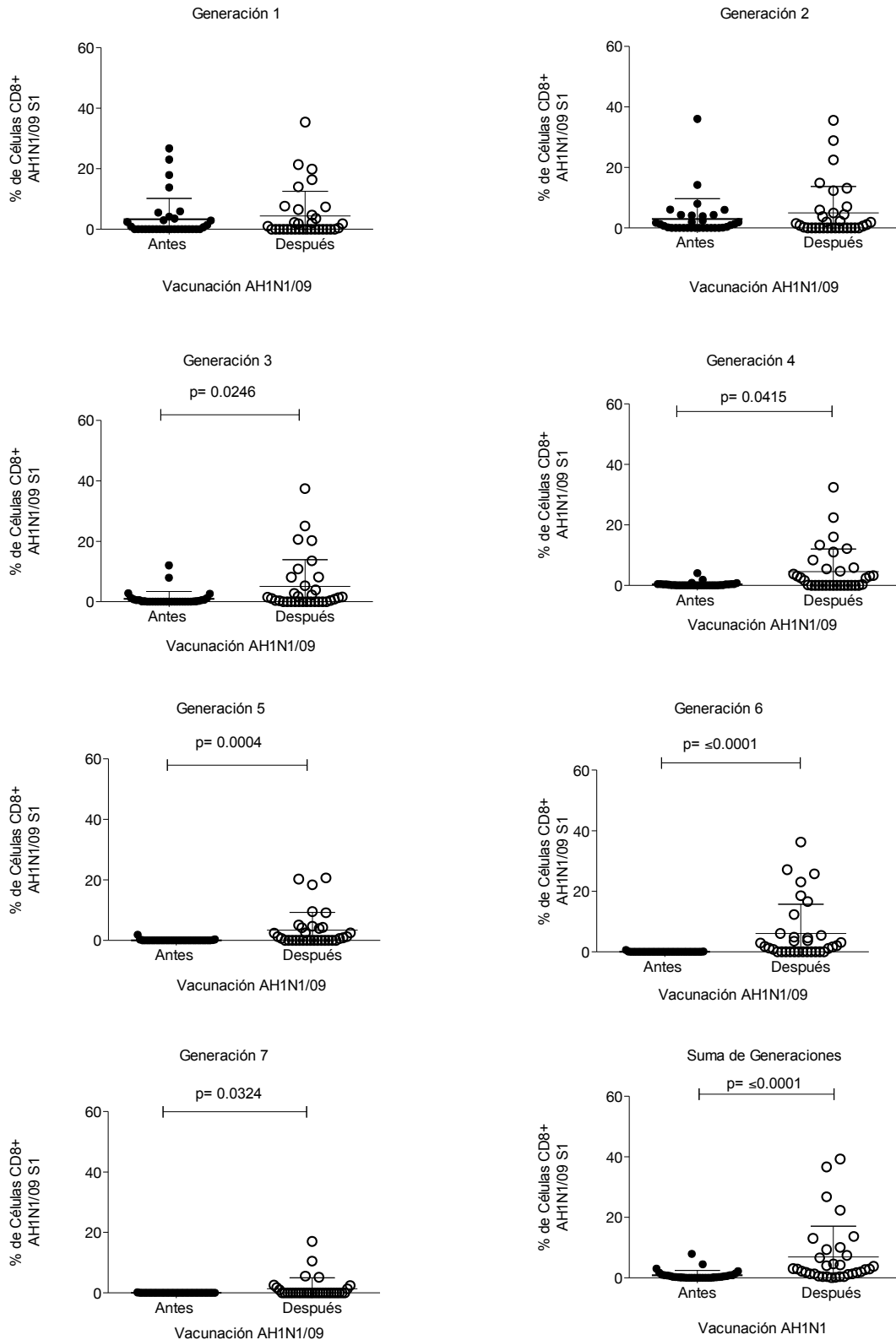


Figura 9 Proliferación de linfocitos CD8⁺ antes y después de la aplicación de la vacuna contra el virus de la influenza A H1N1 en células estimuladas con la secuencia 1 del virus A H1N1/09 pandémico, cada gráfica muestra una generación celular, la última muestra la proliferación total. Cada punto en la gráfica representa a un individuo

Los porcentajes de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en respuesta a la secuencia S2 del virus de influenza A H1N1/09 pandémico se muestran en las figuras 10 y 11. En la

figura 10 no hay diferencia significativa en la proliferación de linfocitos CD4⁺, mientras que en la figura 11 se observa que hay un incremento significativo en los linfocitos CD8⁺ a partir de la cuarta generación o división y en la suma de las generaciones.

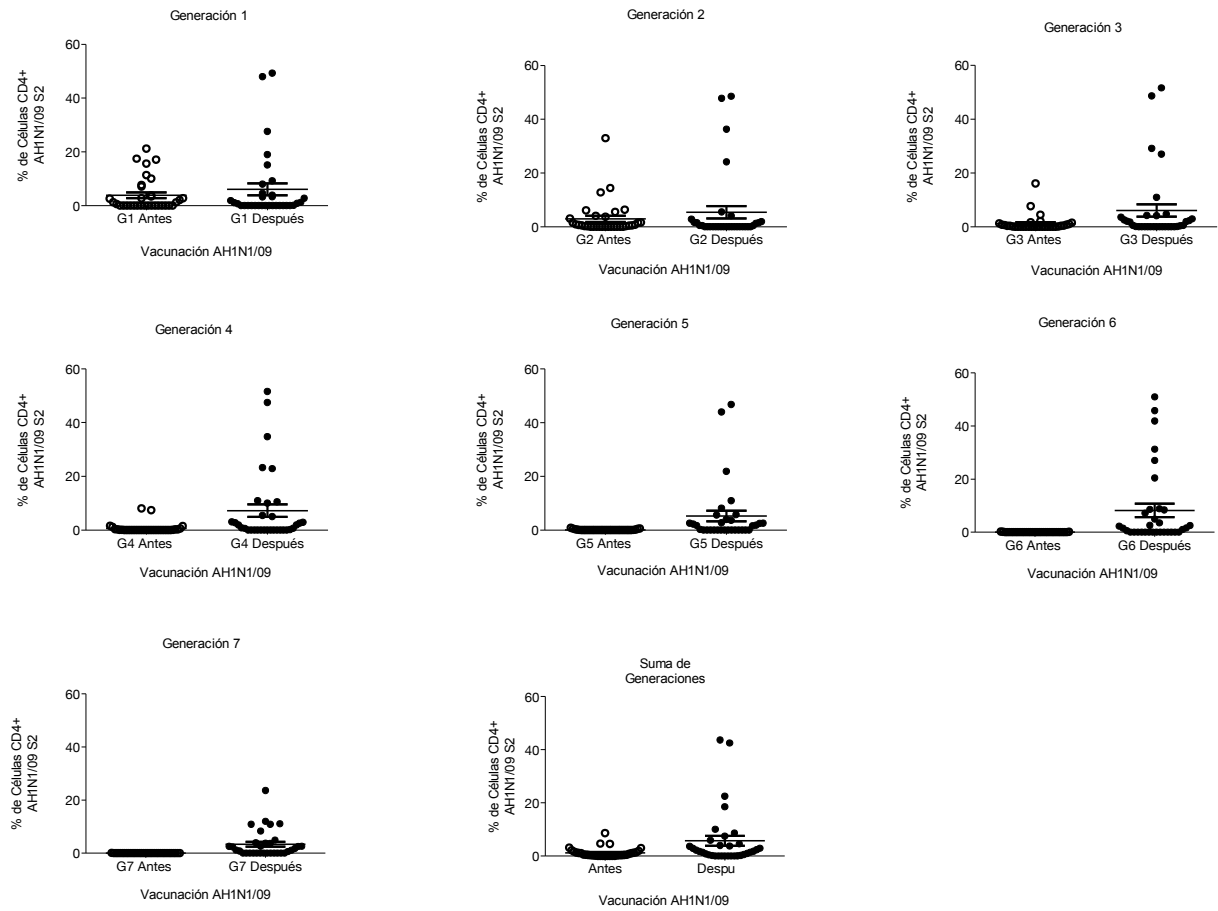


Figura 10 Proliferación de linfocitos CD4⁺ antes y después de la aplicación de la vacuna contra el virus de la influenza A H1N1 en células estimuladas con la secuencia 2 del virus A H1N1/09 pandémico, cada gráfica muestra una generación celular, la última muestra la proliferación total. Cada punto en la gráfica representa a un individuo.

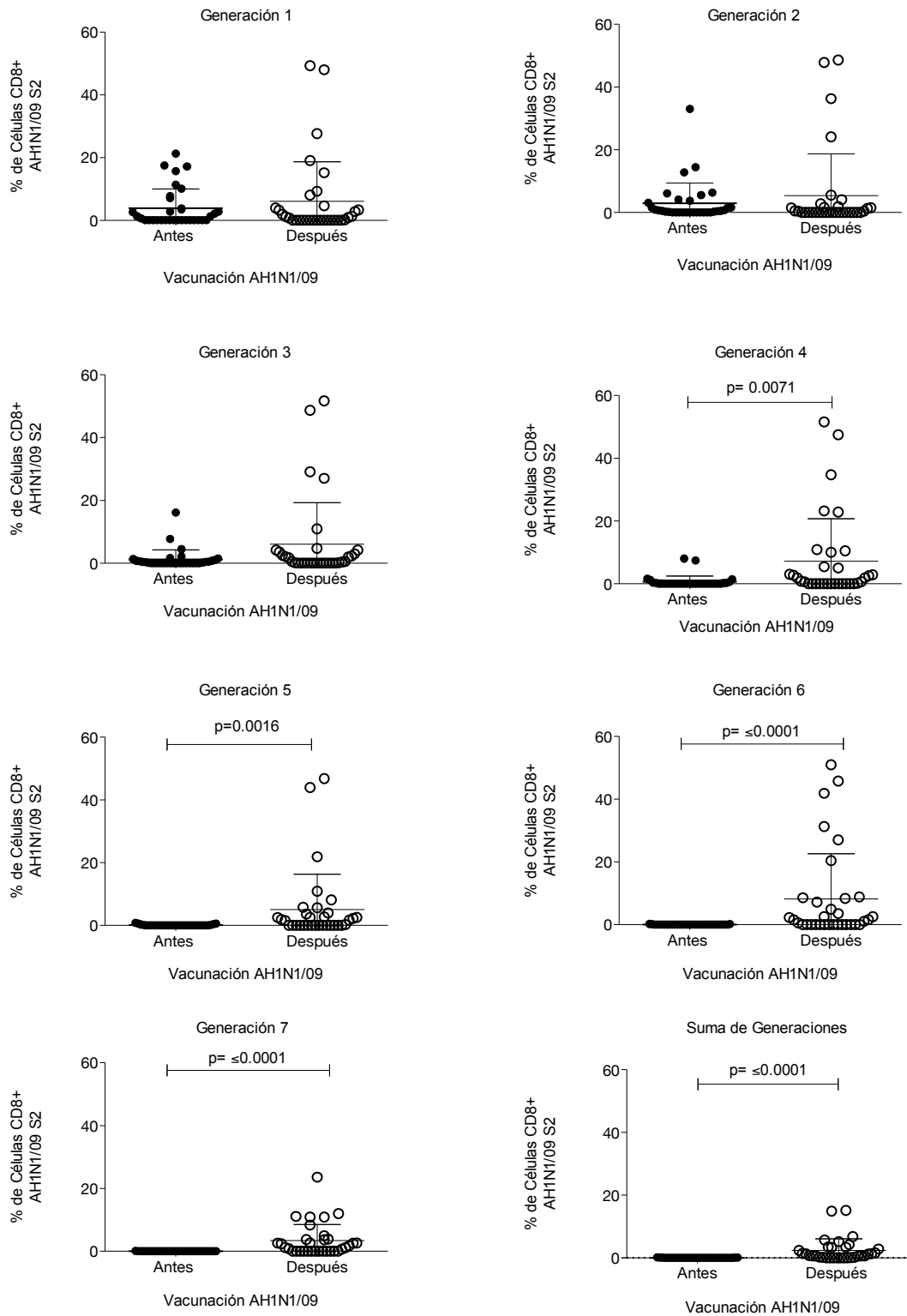


Figura 11 Proliferación de linfocitos CD8+ antes y después de la aplicación de la vacuna contra el virus de la influenza A H1N1 en células estimuladas con la secuencia 1 del virus A H1N1/09 pandémico, cada gráfica muestra una generación celular, la última muestra la proliferación total. Cada punto en la gráfica representa a un individuo.

Porcentajes de proliferación total de los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ en respuesta a la secuencia homóloga a los virus de influenza A H1N1/09 pandémico, A H1N1 estacional y A H3N2.

En la figura 12 el panel A muestra la proliferación de los linfocitos CD4⁺ antes y después de la aplicación de la vacuna sin diferencias significativas, mientras que en el panel B se observa una proliferación significativa de linfocitos CD8⁺.

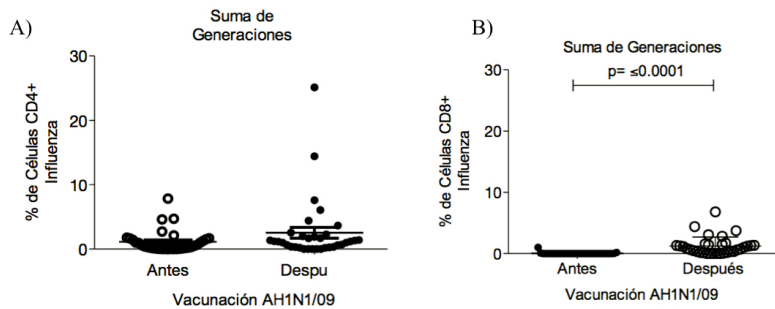


Figura 12 Proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ antes y después de la aplicación de la vacuna contra el virus de influenza A H1N1 en células estimuladas con la secuencia homóloga a los virus de influenza A H1N1/09 pandémico, A H1N1 estacional y A H3N2, cada gráfica muestra la proliferación total, los datos fueron comparados con una prueba t no paramétrica de Mann Whitney con un $p < 0.005$, cada punto en las gráficas representa a un voluntario.

Porcentajes de proliferación total de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en respuesta a la secuencia del virus de influenza A H1N1 estacional y A H3N2.

En la figura 13 se muestran en el panel A la proliferación de los linfocitos CD4⁺ antes y después de la aplicación de la vacuna sin diferencias significativas. En el panel B se observa una respuesta significativamente más alta de proliferación de los linfocitos CD8⁺ antes de la vacunación.

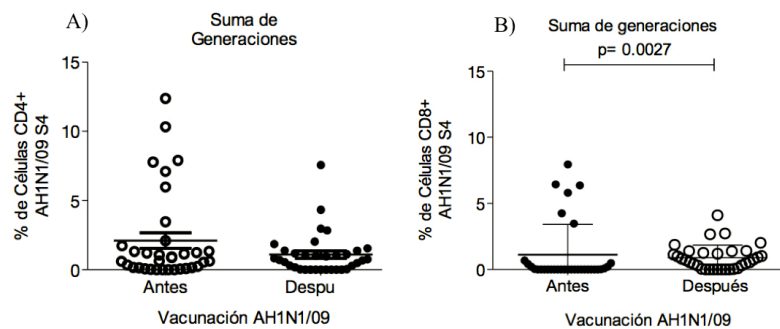


Figura 13 Proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ antes y después de la aplicación de la vacuna contra el virus de influenza A H1N1 en células estimuladas con la secuencia del virus A H1N1 estacional, cada gráfica muestra la proliferación total, los datos fueron comparados con una prueba t no paramétrica de Mann Whitney con un $p < 0.005$, cada punto en las gráficas representa a un voluntario.

Porcentaje de individuos vacunados que mostraron una respuesta proliferativa de linfocitos CD8⁺ Ag-específicos hacia las secuencias específicas del virus de influenza A H1N1/09 pandémico.

Para evaluar la respuesta proliferativa de la vacuna en los voluntarios se tomaron como positivos o respondedores a aquellos sujetos que mostraron una proliferación total células CD8⁺ Ag-específicas mayor al 2% después de la vacunación hacia la secuencia 1, secuencia 2 o a una de las dos secuencias específicas del virus de influenza A H1N1/09 pandémico. El valor de 2% se consideró de acuerdo al doble de respuesta que se observó en las células sin estímulo. Con base a previos reportes, en nuestro estudio definimos como "respondedores" a aquellos individuos que presentaron una respuesta proliferativa a al menos uno de los dos péptido de la influenza A H1N1/09 (1).

En la figura 15 se muestra los porcentajes de proliferación de linfocitos CD8⁺ específicos hacia el virus de influenza A H1N1/09 pandémico antes y después de la vacunación. El porcentaje de proliferación de linfocitos CD8⁺ antes de la vacunación hacia la secuencia 1, secuencia 2 o a una de las dos secuencias específicas del virus de influenza A H1N1/09 pandémico fue de 1.27% , 0.02% y 1.27% respectivamente, y estos porcentajes se incrementaron significativamente al 10.44%, 6.11% y 10.44% después de la vacunación. Estos porcentajes corresponden a 17.4%, 0% y 12% de individuos que presentaron respuesta proliferativa mayor al 2% antes de la vacunación y este porcentaje se incrementó al 87%, 47% y 87% después de la vacunación contra el virus de influenza AH1N1/09 pandémico.

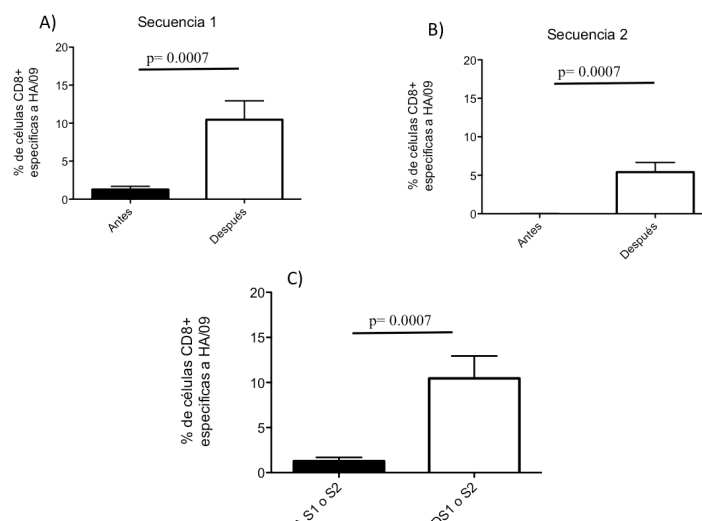


Figura 15 Porcentajes de proliferación de linfocitos CD8⁺, en el panel A) se muestra el porcentaje de linfocitos CD8⁺ que proliferaron al ser estimulados con la secuencia 1 del virus de influenza AH1N1/09 pandémico antes y después de la aplicación de la vacuna, en el panel B) los linfocitos fueron estimulados con la secuencia 2 específica al virus de influenza A H1N1/09 pandémico y en el panel C) se muestran los linfocitos de los individuos que tuvieron una respuesta hacia la secuencia 1 o 2 del virus de influenza AH1N1/09 pandémico los datos fueron comparados con una prueba t no paramétrica de Mann Whitney con un $p < 0.005$

VIII. Discusión

En este estudio se encontró que la aplicación de la vacuna contra el virus de influenza AH1N1/09 pandémico sin adyuvante en voluntarios sanos generó una respuesta proliferativa de células CD8⁺ un mes después de la vacunación.

Debido a que la aplicación de la vacuna en la población del sector salud se realizó posterior a la pandemia, para realizar este estudio tomamos una muestra sanguínea antes de la aplicación de la vacuna para evaluar aquellos individuos que tenían linfocitos T específicos al virus de influenza A H1N1/09 pandémico. En esta muestra observamos que el 12% de los voluntarios mostraron una respuesta proliferativa de los linfocitos CD8⁺ antes de la aplicación de la vacuna que probablemente corresponden a que tuvieron una exposición previa con éste virus y desarrollaron linfocitos y CD8⁺ de memoria. Otra causa puede deberse a una reacción cruzada hacia una vacunación previa contra los virus de influenza estacionales como lo sugiere el artículo publicado por Iorio et al 2012 en donde observa que en niños y adultos que fueron vacunados en 2008/ 2009 presentaron una respuesta de células T hacia el virus de influenza A H1N1. [36]

Un mes después de la aplicación de la vacuna, no se observó incremento en la generación de linfocitos CD4⁺ específicos hacia el virus de influenza A H1N1/09 pandémico, sin embargo se generaron linfocitos CD8⁺ específicos hacia el virus de influenza A H1N1/09 pandémico en el 87% de los individuos. Una causa por la que observamos esta respuesta de linfocitos CD8⁺ puede deberse a que las secuencias específicas utilizadas en este estudio sean más afines a su presentación por MHC Clase I. Con base al estudio previo reportado por Wang et al 2010 en donde demuestran que dependiendo de las secuencias evaluadas tienen afinidad por moléculas HLA Clase I o por moléculas HLA Clase II, nosotros elegimos secuencias que generaran la proliferación de linfocitos CD8⁺ con alta afinidad y CD4⁺ de baja afinidad debido a que los linfocitos CD8⁺ tienen un papel importante en la protección hacia virus y los linfocitos CD4⁺ aun que se desconoce su papel en humanos hay estudios que sugieren que contribuyen a la protección contra virus.[28, 29, 30, 31, 32, 33, 37]

El análisis de proliferación de los linfocitos CD8⁺ nos permite evaluar que tan potente fue la generación de linfocitos y esto depende del número de divisiones que se observa en las células en las primeras divisiones, de la 1 a la 3 es una respuesta de células efectoras y las divisiones posteriores corresponderían a una respuesta de memoria. [35] Nosotros observamos que 48% de individuos mostraron una respuesta de memoria.

Estudios previos han mostrado que existe una reacción cruzada entre los diferentes serotipos virales, [38] por lo cual adicionalmente, en este estudio se evaluó si la aplicación de la vacuna contra el virus de influenza AH1N1/09 pandémico generaba linfocitos T específicos contra otros virus estacionales, por lo que utilizamos secuencias del virus A H3N2 y A H1N1 estacional. Encontramos que para la influenza estacional se observó una respuesta de 18% antes de la aplicación de la vacuna hacia el virus de influenza A H1N1 estacional y de 24% hacia el virus de influenza A H3N2 estacional. Estos datos sugieren que estos individuos tuvieron una exposición previa hacia estos virus o que presentaran una reacción cruzada hacia las vacunas estacionales debido a que el 87.4% de los voluntarios habían recibido la vacuna estacional 2008/ 2009. Después de la aplicación de la vacuna no observamos un incremento en el porcentaje de respuesta de linfocitos CD8⁺ hacia ninguno de éstos virus lo que indica que no se generó una reacción cruzada con la vacuna contra el virus de influenza AH1N1/09 pandémico.

Limitaciones del estudio.

Entre las limitaciones del estudio pueden estar por un lado que la falta de respuesta observada de linfocitos CD4⁺ podría deberse en parte a que las secuencias de péptidos utilizadas en este estudio podrían estar restringidos porque tienen alta afinidad moléculas MHC clase I y baja afinidad por moléculas MHC clase II. Otra limitación es que los péptidos analizados podrían no ser representativos del repertorio de antígenos presentes en el virus completo por lo que es posible que los porcentajes de respuesta de linfocitos CD8⁺ hacia el virus de influenza A H1N1/09 pandémico esté subestimado. Otra limitación del estudio fue el número de individuos analizados, aunque se tenía una muestra representativa de individuos expuestos (84 sujetos) solo se pudo realizar el análisis de la mitad de estos sujetos ya que se excluyeron aquellos que no

proporcionaron una segunda muestra sanguínea al mes de la vacunación, no contar el número de células suficientes y/o tener una viabilidad celular menor al 95% después de que se descongelaron las muestras.

IX. Conclusión

La aplicación de la vacuna contra el virus de influenza A H1N1/09 pandémico induce una respuesta proliferativa de linfocitos CD8⁺ hacia secuencias específicas del virus en el 87% de los individuos y sin respuesta proliferativa cruzada hacia los virus estacionales.

X. Bibliografía:

- [1] Pérez Padilla J.R., Palomar Lever A., Salas Hernández J., Vázquez García J.C. Influenza por el nuevo virus A H1N1 Un panorama integral. *Graphicmedic* 2010; -499.
- [2] Ramírez Rancaño M. La epidemia de influenza española en México 1918. *RGM Medios* 2009;
- [3] Bernstein E, Kaye D, Abrutyn E, Gross P, Dorfman M, Murasko DM. Immune response to influenza vaccination in a large healthy elderly population. 1999; 1:82-94.
- [4] Dowdle WR, Davenport FM, Fukumi H, Schild GC, Tumova B, Webster RGet al. *Orthomyxoviridae*. 1975; 5:245-51.
- [5] Lang PO, Samaras D, Samaras N, Govind S, Aspinall R. Influenza vaccination in the face of immune exhaustion: is herd immunity effective for protecting the elderly? 2011; 419216.
- [6] Palese P, Young JF. Variation of influenza A, B, and C viruses. 1982; 4539:1468-74.
- [7] Kanegae Y, Sugita S, Shortridge KF, Yoshioka Y, Nerome K. Origin and evolutionary pathways of the H1 hemagglutinin gene of avian, swine and human influenza viruses: cocirculation of two distinct lineages of swine virus. 1994; 1-2:17-28.
- [8] Ottis K, Sidoli L, Bachmann PA, Webster RG, Kaplan MM. Human influenza A viruses in pigs: isolation of a H3N2 strain antigenically related to A/England/42/72 and evidence for continuous circulation of human viruses in the pig population. 1982; 2:103-8.
- [9] Sugita S, Yoshioka Y, Itamura S, Kanegae Y, Oguchi K, Gojobori Tet al. Molecular evolution of hemagglutinin genes of H1N1 swine and human influenza A viruses. 1991; 1:16-23.
- [10] Dormitzer PR, Galli G, Castellino F, Golding H, Khurana S, Del GGet al. *Influenza vaccine immunology*. 2011; 1:167-77.
- [11] Krug RM, Yuan W, Noah DL, Latham AG. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. 2003; 2:181-9.
- [12] Krystal M, Elliott RM, Benz EW, Jr., Young JF, Palese P. Evolution of influenza A and B viruses: conservation of structural features in the hemagglutinin genes. 1982; 15:4800-4.
- [13] Young JF, Desselberger U, Palese P. Evolution of human influenza A viruses in nature: sequential mutations in the genomes of new H1N1. 1979; 1:73-83.
- [14] Murphy RB, Webster RG. *Orthomyxoviruses*. Lippincott-Raven Publishers 1996; 1397-445.
- [15] Young JF, Elliott RM, Berkowitz EM, Palese P. Mechanisms of genetic variation in human influenza viruses. 1980; 135-41.
- [16] Braciale TJ, Sun J, Kim TS. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. 2012; 4:295-305.
- [17] Duvvuri VR, Moghadas SM, Guo H, Duvvuri B, Heffernan JM, Fisman DNet al. Highly conserved cross-reactive CD4+ T-cell HA-epitopes of seasonal and the 2009 pandemic influenza viruses. 2010; 5:249-58.
- [18] Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish Aet al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. 2009; 5937:197-201.

- [19] Claas EC, Osterhaus AD, van BR, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. 1998; 9101:472-7.
- [20] Cohen J, Enserink M. Swine flu. After delays, WHO agrees: the 2009 pandemic has begun. 2009; 5934:1496-7.
- [21] Biron CA. More things in heaven and earth: defining innate and adaptive immunity. 2010; 12:1080-2.
- [22] Bevan MJ. Understand memory, design better vaccines. 2011; 6:463-5.
- [23] Reiss CS. Innate immunity in viral infections. 2009; 5:395-6.
- [24] Air GM, Feng J, Chen T, Joachims ML, James JA, Thompson LF. Individual antibody and T cell responses to vaccination and infection with the 2009 pandemic swine-origin H1N1 influenza virus. 2011; 5:900-12.
- [25] Reed WP, Olds JW, Kisch AL. Decreased skin-test reactivity associated with influenza. 1972; 4:398-402.
- [26] Duvvuri VR, Heffernan JM, Moghadas SM, Duvvuri B, Guo H, Fisman DNet et al. The role of cellular immunity in influenza H1N1 population dynamics. 2012; 329.
- [27] Wilkinson TM, Li CK, Chui CS, Huang AK, Perkins M, Liebner JC et al. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. 2012; 2:274-80.
- [28] Alam S, Sant AJ. Infection with seasonal influenza virus elicits CD4 T cells specific for genetically conserved epitopes that can be rapidly mobilized for protective immunity to pandemic H1N1 influenza virus. 2011; 24:13310-21.
- [29] Ge X, Tan V, Bollyky PL, Standifer NE, James EA, Kwok WW. Assessment of seasonal influenza A virus-specific CD4 T-cell responses to 2009 pandemic H1N1 swine-origin influenza A virus. 2010; 7:3312-9.
- [30] Richards KA, Topham D, Chaves FA, Sant AJ. Cutting edge: CD4 T cells generated from encounter with seasonal influenza viruses and vaccines have broad protein specificity and can directly recognize naturally generated epitopes derived from the live pandemic H1N1 virus. 2010; 9:4998-5002.
- [31] Babon JA, Cruz J, Ennis FA, Yin L, Terajima M. A human CD4+ T cell epitope in the influenza hemagglutinin is cross-reactive to influenza A virus subtypes and to influenza B virus. 2012; 17:9233-43.
- [32] Kaplan MM, Webster RG. The epidemiology of influenza. 1977; 6:88-106.
- [33] Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. 2009; 25:2605-15.
- [34] Girard MP, Tam JS, Assossou OM, Kieny MP. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. 2010; 31:4895-902.
- [35] Louie JK, Acosta M, Winter K, Jean C, Gavali S, Schechter R et al. Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California. 2009; 17:1896-902.
- [36] Louie JK, Jean C, Acosta M, Samuel MC, Matyas BT, Schechter R. A review of adult mortality due to 2009 pandemic (H1N1) influenza A in California. 2011; 4:e18221.
- [37] Skowronski DM, Hottes TS, McElhaney JE, Janjua NZ, Sabaiduc S, Chan T et al. Immuno-epidemiologic correlates of pandemic H1N1 surveillance observations: higher antibody and lower cell-mediated immune responses with advanced age. 2011; 2:158-67.

- [38] Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. 2009; 20:1945-52.
- [39] Wrammert J, Koutsoukos D, Li GM, Edupuganti S, Sui J, Morrissey M et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. 2011; 1:181-93.
- [40] Trifonov V, Khiabani H, Greenbaum B, Rabadan R. The origin of the recent swine influenza A(H1N1) virus infecting humans. 2009; 17
- [41] Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Hai R, Crowe JE, Jr., Wilson IA. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. 2010; 5976:357-60.
- [42] Zhan Y, Yang Z, Li L, Ye D, Wu H, Fu R et al. Immunogenicity and safety of a China-made monovalent pandemic (H1N1) 2009 influenza A vaccine in healthcare workers in Guangzhou, China. 2011; 3:190-4.
- [43] Haining WN, Evans JW, Seth NP, Callaway GD, Wucherpfennig KW, Nadler LM et al. Measuring T cell immunity to influenza vaccination in children after haemopoietic stem cell transplantation. 2004; 3:322-5.