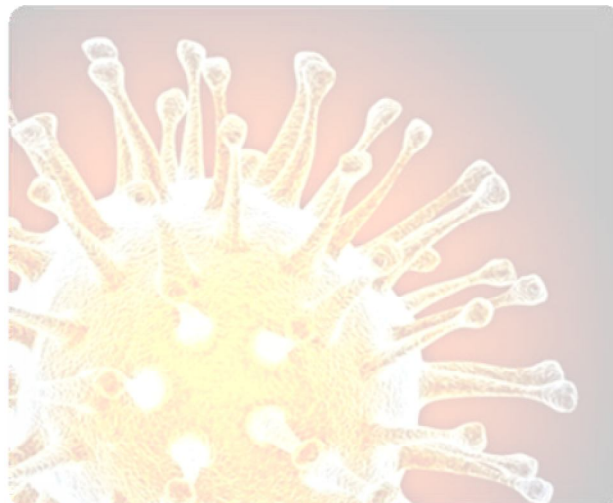
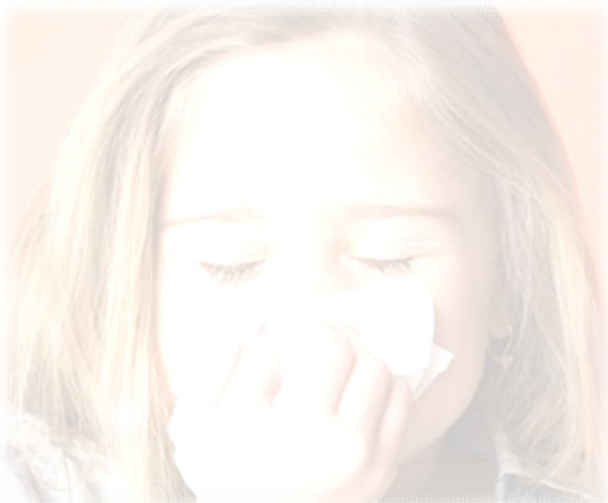


**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**



**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DA RESPOSTA IMUNE DE
VOLUNTÁRIOS IMUNIZADOS CONTRA INFLUENZA A (H1N1)pdm09**



por

Sarah Giarola da Silva



Belo Horizonte

Março/ 2015

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DA RESPOSTA IMUNE DE
VOLUNTÁRIOS IMUNIZADOS CONTRA INFLUENZA A (H1N1)pdm09**

por

Sarah Giarola da Silva

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do
Título de Mestre em Ciências na área de
concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientação: Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo
Coorientação: Dr. Alexandre de Magalhães Vieira
Machado

Belo Horizonte

Março/ 2015

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S586c Silva, Sarah Giarola.
2015

Caracterização fenotípica e funcional da resposta imune de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09/ Sarah Giarola da Silva. – Belo Horizonte, 2015.

xxiii, 100 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 109 – 123

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Vírus da Influenza A Subtipo H1N1 2. Vacinas contra Influenza/ imunologia 3. Adjuvantes Imunológicos/ análise I. Título. II. Araújo, Márcio Sobreira Silva (Orientação). III. Machado, Alexandre de Magalhães Vieira (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.203

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DA RESPOSTA IMUNE DE
VOLUNTÁRIOS IMUNIZADOS CONTRA INFLUENZA A (H1N1)pdm09**

por

Sarah Giarola da Silva

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo (Presidente)

Profa. Dra. Ester Roffê Santiago

Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Suplente: Profa. Dra. Soraya Torres Gaze Jangola

Dissertação defendida e aprovada em: 06/03/2015

COLABORADORES

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ/ MG, e contou com a colaboração de:

- ❖ Dr. Olindo Assis Martins Filho
- ❖ Dra. Andréa Teixeira Carvalho
- ❖ Dra. Jordana Graziela Coelho dos Reis
- ❖ Dra. Vanessa Peruhype Magalhães
- ❖ Dra. Silvana Maria Elói Santos
- ❖ Dra. Marina de Moraes Mourão
- ❖ Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli
- ❖ Dr. José Geraldo Leite Ribeiro
- ❖ Dra. Ana Carolina Campi Azevedo
- ❖ Dra. Danielle Zauli
- ❖ Dra. Maria Luíza Silva
- ❖ Msc. Amanda Cardoso de Oliveira Silveira Cassette
- ❖ Msc. Maurício Azevedo
- ❖ Msc. Fabiana Rocha
- ❖ Erick Eidy Nakagaki Silva

“Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre ramos muito leves, sentem-nos ceder, mas cantam! Eles sabem que possuem asas.”

Vitor Hugo

*Dedico este trabalho aos meus pais, Denise e Aldiney, à minha irmã Bianca e à minha madrinha
avó Belinha.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meus caminhos, trazendo tantas graças e possibilitando a concretização dos meus sonhos!

Ao Dr. Márcio Sobreira, pela confiança e oportunidade. Obrigada por abrir as portas do laboratório para que eu pudesse participar deste trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos, motivação e apoio que foram fundamentais no desenvolvimento do estudo e na minha formação. E agradeço ainda, sua boa vontade, paciência, tranquilidade, compreensão e amizade, que superam o papel de orientador, tornando o trabalho e a convivência mais leves e agradáveis!

Ao Dr. Alexandre, por compartilhar seus conhecimentos e experiências que tanto enriqueceram este estudo. Obrigada por toda contribuição e disponibilidade!

À Dra. Andréa Teixeira, agradeço os ensinamentos, disponibilidade e incentivo, que foram fundamentais para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Olindo por me conceder o privilégio de fazer parte de um grande grupo de pesquisa e por compartilhar de sua sabedoria e competência. Seu olhar sob os dados e sua experiência foram essenciais neste trabalho!

À Dra. Jordana Reis e à Dra. Marina Mourão pela boa vontade, por toda colaboração e pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os colegas do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) pela convivência agradável e pelos momentos de descontração.

A todas as amigas do LBDM, Marcela Moreira, Amanda Cardoso, Paula Monalisa, Christiane Costa, Gláucia Diniz, Raquel Gontijo, Tatiane Moraes, Carla Costa e Ludmila Cardoso, que tornaram meus dias de trabalho mais alegres e agradáveis! Obrigada pela amizade, carinho e incentivo!

À Dra. Christiane Matos, ao José Eloy e ao Dr. João Carlos Pinto Dias, por todos os ensinamentos e incentivo desde a iniciação científica. Obrigada por me despertarem para a vida acadêmica. Vocês foram fundamentais no meu amadurecimento pessoal e profissional!

Aos professores e funcionários da pós-graduação.

À diretora do Centro de Pesquisa René Rachou, Dra. Zélia Profeta da Luz.

A todos os voluntários que participaram do estudo pela disponibilidade, colaboração e persistência!

À Biblioteca do CPqRR, em prover acesso gratuito à informação técnico-científica em saúde, integrando o rol de referências desta dissertação. Agradeço à Núzia e Segemar por toda ajuda e disponibilidade!

Aos meus familiares e amigos pela constante torcida e momentos de descontração.

Às minhas queridas amigas Lais, Dani, Carlinha, Tieta e Mariana que, de alguma forma, estão sempre ao meu lado! Vocês são muito especiais para mim, obrigada por tornarem minha vida mais colorida!

Ao Rafael pelo companheirismo e incentivo. Obrigada por todo apoio durante meu mestrado e em tantos momentos da minha vida!

Às minhas amigas Agnes e Luíza, verdadeiros presentes que a vida me deu ao ingressar na pós-graduação! Obrigada por todos os momentos que passamos juntas, pelo companheirismo, amizade, carinho e motivação!

À minha grande amiga Raissa, por todos os momentos compartilhados e experiências trocadas nestes dois anos de convivência. Sua amizade foi essencial nesta etapa e vou levá-la por toda vida! Obrigada pelas longas conversas, conselhos e risadas! E por tornar meus dias mais leves e divertidos!

Ao Diego por entrar na minha vida e encher meus dias de momentos agradáveis, felizes e especiais! Obrigada por todo apoio e por estar tão presente nesta etapa final tão difícil e importante!

Aos meus pais, Denise e Aldiney, e minha irmã Bianca, pelo amor incondicional, sem o qual minha vida e minhas conquistas não fariam o menor sentido! Obrigada pelo incentivo, pela compreensão, por estarem sempre ao meu lado apoiando minhas escolhas e oferecendo toda ajuda e suporte! Vocês foram essenciais na concretização desta etapa! Muito obrigada!

Aos órgãos financiadores, instituições e programas que possibilitaram a realização desse trabalho:

- ❖ CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)
- ❖ FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais)
- ❖ CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa)
- ❖ FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz)
- ❖ CPqRR (Centro de Pesquisas René Rachou)
- ❖ Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (CPqRR/ FIOCRUZ-MG)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE QUADROS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvii
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiii
1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 Os vírus influenza	27
3.2 Breve histórico das pandemias de influenza	29
3.3 Pandemia de 2009: aspectos epidemiológicos	30
3.4 A doença causada pelo vírus influenza A (H1N1)pdm09: transmissão e manifestações clínicas	33
3.5 Resposta imunológica contra os vírus Influenza	34
3.6 A profilaxia e seus desafios durante a pandemia	37
3.7 Imunidade desencadeada pelas vacinas contra influenza	40
3.8 Adjuvantes vacinais	42
4 MÉTODOS	47
4.1 Grupos de estudo	47
4.2 Vacinas utilizadas no estudo	48
4.3 Plano de coleta das amostras biológicas	49
4.4 Avaliação dos parâmetros clínicos e reações adversas	49
4.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos	50
4.6 Quantificação dos níveis de anticorpos pelo Ensaio de Inibição da hemaglutinação (HAI) ...	50
4.6.1 Tratamento do plasma	50
4.6.2 Padronização de antígenos	50
4.6.3 Ensaio HAI	51

4.6.4 Leitura do ensaio HAI	51
4.7 Análise imunofenotípica dos leucócitos do sangue periférico no contexto <i>ex vivo</i>	52
4.7.1 Protocolo de imunofenotipagem celular por citometria de fluxo	52
4.7.2 Estratégias para análises imunofenotípicas de leucócitos circulantes.....	54
4.7.2.1 Análise convencional	55
4.7.2.2 Análise de células T CD4 ⁺ CD25 ^{High}	55
4.7.2.4 Análise de monócitos pró-inflamatórios	57
4.7.2.5 Análise de marcadores constitutivos em monócitos	59
4.7.2.6 Análise do marcador constitutivo CD32 em linfócitos B.....	59
4.8 Microcultura de células de sangue periférico e marcação de superfície e de citocinas intracitoplasmáticas.....	60
4.8.1 Estratégias de análises de citocinas intracitoplasmáticas em subpopulações de leucócitos circulantes	63
4.8.1.1 Análise de citocinas intracitoplasmáticas em células NK	63
4.8.1.2 Análise de citocinas intracitoplasmáticas em subpopulações de linfócitos T	65
4.8.1.3 Análise de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos B	66
4.9 Análise dos níveis plasmáticos de citocinas	67
4.10 Análises estatísticas.....	69
4.11 Redes de correlação.....	69
5 RESULTADOS	70
5.1 Reações adversas e alterações hematológicas de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09.....	70
5.1.1 Reações adversas pós-imunização	70
5.1.2 Alterações hematológicas dos voluntários imunizados.....	71
5.2 Níveis de anticorpos anti-H1N1 no plasma de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09.....	72
5.3 Perfil <i>ex vivo</i> das alterações fenotípicas da imunidade celular em leucócitos do sangue periférico de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09.....	73
5.4 Padrão de citocinas intracitoplasmáticas de leucócitos do sangue periférico de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09	78
5.5 Cinética do perfil de citocinas no plasma de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09.....	81

5.6 Redes de correlações	82
6 DISCUSSÃO	86
7 CONCLUSÕES E EVIDÊNCIAS	102
APÊNDICE A	104
APÊNDICE B	105
APÊNDICE C	106
APÊNDICE D	108
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

LISTA DE FIGURAS

Figura da capa. Criança gripada, vírus influenza, ato de vacinação e realce de pulmões humanos.....	i
Figura 1. Desenho esquemático do vírus influenza A.....	28
Figura 2. Origem do vírus influenza A (H1N1) pandêmico.....	30
Figura 3. Evolução epidemiológica de casos e óbitos durante a pandemia por influenza A (H1N1)pdm09 no ano de 2009.....	31
Figura 4. Situação epidemiológica durante a pandemia por influenza A (H1N1)pdm09 em fevereiro de 2010.....	32
Figura 5. Ciclo de replicação viral e mecanismos da resposta imune adaptativa contra o vírus influenza.....	35
Figura 6. Representação esquemática dos principais conceitos de adjuvanticidade.....	44
Figura 7. Esquema experimental da pesquisa.....	47
Figura 8. Interpretação do ensaio HAI.....	52
Figura 9. Ilustração da análise convencional de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.....	55
Figura 10. Ilustração da sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T CD4 ⁺ CD25 ^{High} por citometria de fluxo.....	56
Figura 11. Ilustração da sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais das subpopulações CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ e CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ por citometria de fluxo.....	57
Figura 12. Ilustração da sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de monócitos pró-inflamatórios (CD14 ⁺ CD16 ⁺ HLA-DR ⁺⁺⁺) por citometria de fluxo.....	58
Figura 13. Ilustração da sequência de procedimentos utilizados para a avaliação da intensidade média de fluorescência de marcadores constitutivos em monócitos por citometria de fluxo.....	59

Figura 14. Ilustração da sequência de procedimentos utilizados para a avaliação da intensidade média de fluorescência de marcadores constitutivos em linfócitos por citometria de fluxo.....	60
Figura 15. Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por células NK do sangue periférico por citometria de fluxo.....	64
Figura 16. Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por subpopulações de linfócitos T do sangue periférico por citometria de fluxo.....	66
Figura 17. Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos B do sangue periférico por citometria de fluxo.....	67
Figura 18. Representação esquemática da análise de citocinas, através do ensaio de CBA.....	68
Figura 19. Parâmetros hematológicos dos voluntários pós-imunização contra influenza A (H1N1)pdm09.....	72
Figura 20. Quantificação do nível de anticorpos no plasma de voluntários submetidos à imunização contra influenza A (H1N1)pdm09.....	73
Figura 21. Análise imunofenotípica de voluntários pós-imunização contra influenza A (H1N1)pdm09.....	76, 77
Figura 22. Citocinas intracitoplasmáticas em leucócitos circulantes de voluntários submetidos à imunização contra influenza A (H1N1)pdm09.....	80
Figura 23. Níveis de citocinas plasmáticas de voluntários submetidos à imunização contra influenza A (H1N1)pdm09.....	82
Figura 24. Redes de correlação entre diferentes fenótipos celulares e citocinas plasmáticas e intracitoplasmáticas de voluntários submetidos à imunização contra influenza A (H1N1)pdm09.....	84

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.....	53,54
QUADRO 2. Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados para análise de populações e subpopulações de leucócitos do sangue periférico.....	62
QUADRO 3. Anticorpos monoclonais utilizados para identificação de citocinas intracelulares em leucócitos do sangue periférico.....	62,63
QUADRO 4. Número de relatos de determinada reação adversa nos grupos que receberam as vacinas sem e com adjuvante.....	70,71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α – Alfa

β – Beta

γ – Gama

μg – Micrograma

μL – Microlitro

APC – *Allophycocyanin*

APC – *Antigen-presenting Cell*

ATP – *Adenosine Triphosphate*

Bcl – *B-Cell Lymphoma*

BCR – *B Cell Receptor*

BD – *Becton Dickinson*

BSA – *Bovine Serum Albumin*

CBA – *Cytometry Beads Array*

CCR – *CC Chemokine Receptor*

CD – *Cluster of Differentiation*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CIC – *Citocinas Intracitoplasmáticas*

CO₂ – *Dióxido de Carbono*

CPqRR – *Centro de Pesquisas René Rachou*

CR – *Complement Receptor*

CXCR – *CXC Chemokine Receptor*

CyQ – *Cyanine*

DC – *Dendritic Cell*

e. g. – *exempli gratia*

EDTA – Etilenodiaminotetracético

EMA – *European Medicines Agency*

EUA – Estados Unidos da América

FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorter*

Fc – *Fragment Crystallizable*

FCA – *Freund Complete Adjuvant*

FcγR – *Fc Gamma Receptor*

FDA – *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FITC – *Fluorescein Isothiocyanate*

FL – Fluorescência

FSC – *Forward Scatter*

g – Grama

GlyCAM – *Glycosylation-Dependent Cell Adhesion Molecule*

GSK – *GlaxoSmithKline*

HA – Hemaglutinina

HAI – *Hemagglutination inhibition*

HAU – *Hemagglutinating Unit*

HLA-DR – *Human Leukocyte Antigen*

ICAM – *Intercellular Adhesion Molecule*

IFN – *Interferon*

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

ITIM – *Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif*

L – Litro

LAM – *Leukocyte Adhesion Molecule*

LBP – *Lipopolysaccharide-Binding Protein*

LFA – *Lymphocyte Function-Associated*

M – *Matrix Protein*

Mac – *Membrane Attack Complex*

MFI – *Mean Fluorescence Intensity*

mg – Miligrama

MHC – *Major Histocompatibility Complex*

mL – Mililitro

mM – Mili Molar

mm – Milímetro

mRNA – *Messenger Ribonucleic Acid*

NA – Neuraminidase

NaCl – Cloreto de Sódio

NAD – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

NCAM – *Neural Cell Adhesion Molecule*

NIH – *National Institutes of Health*

NK – *Natural Killer Cell*

NKT – *Natural Killer T Cell*

NP – *Nucleoprotein*

NS – *Non-structural Protein*

NUST – Núcleo de Saúde do Trabalhador

NY – *New York*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PA – *Polymerase Acidic Protein*

PB – *Polymerase Basic Protein*

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PC – *Phycoerythrin-Cyanin*

pdm – Pandêmico

PE – *Phycoerythrin*

PerCP – *Peridinin Chlorophyll*

pg – Picograma

pH – Potencial Hidrogeniônico

PR – *Puerto Rico*

PRR – *Pattern Recognition Receptor*

RDE – *Receptor Destroying Enzyme*

RNA – *Ribonucleic Acid*

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute* (Meio de cultura)

SSC – *Side Scatter*

T0 – Tempo 0 (antes da vacinação)

T1 – Tempo de 1 dia após a vacinação

T3 – Tempo de 3 dias após a vacinação

T30 – Tempo de 30 dias após a vacinação

T7 – Tempo de 7 dias após a vacinação

TAPA – *Target of the Antiproliferative Antibody*

TC – *Tricolor*

TCR – *T Cell Receptor*

Th – *T Helper Cell*

TNF – *Tumor Necrosis Factors*

™ – *Trade Mark*

UFMG – *Universidade Federal de Minas Gerais*

USA – *United States of America*

vRNA – *Viral Ribonucleic Acid*

WHO – *World Health Organization*

RESUMO

A primeira pandemia de gripe do século XXI foi declarada em junho de 2009 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e representou uma grande ameaça à saúde da população mundial. E uma vez que as primeiras vacinas foram licenciadas, tornou-se iminente a busca de informações mais aprofundadas sobre os mecanismos imunológicos desencadeados por estas vacinas, considerando ainda a presença ou ausência de adjuvante em sua formulação. Neste contexto, o presente trabalho objetiva avaliar aspectos fenotípicos e funcionais das imunidades celular e humoral em indivíduos vacinados contra o vírus da Influenza A (H1N1)pdm09. Para isso, 20 voluntários saudáveis foram imunizados contra H1N1 pandêmico, na presença (n=10) ou ausência (n=10) de adjuvante (óleo em água), e avaliados nos tempos 0, 1, 3, 7, 30 dias pós-imunização. Desta forma, diversos parâmetros foram utilizados para caracterizar a imunidade desenvolvida por estas vacinas, dentre os quais, avaliação clínica e hematológica, sorologia, imunofenotipagem celular e análise de citocinas intracelulares e plasmáticas. Coletivamente, os resultados demonstraram um perfil imunológico bastante distinto desencadeado pelas vacinas, embora ambas tenham induzido níveis semelhantes de anticorpos e persistência destes 6 meses após a vacinação. A vacina com adjuvante foi capaz de induzir uma resposta mais intensa de células da imunidade inata, com significativa ativação da imunidade celular, principalmente de linfócitos T CD4⁺ e aumento na frequência de linfócitos B. Além disso, esta vacina induziu uma expressiva produção de citocinas, apresentando um padrão misto de resposta Th1/ Th2 neste grupo. Por outro lado, a vacina sem adjuvante, desencadeou uma resposta mais discreta e tardia, com menor ativação da imunidade inata e fraca indução de linfócitos T, porém com elevada ativação de linfócitos B. Esta vacina também causou uma menor produção de citocinas, desencadeando um perfil pouco inflamatório neste grupo. Em suma, as vacinas induziram perfis distintos de respostas imune inata e adaptativa, o que parece estar relacionado à presença ou ausência de adjuvante. Contudo, é importante enfatizar que ambas as vacinas foram capazes de induzir uma resposta eficaz no que diz respeito à imunogenicidade, o que sugere imunidade protetora contra o vírus H1N1 pandêmico.

ABSTRACT

The first pandemic flu of the 21st century was declared on June, 2009 by the World Health Association (WHO) and represented a great threat to the health of global population. Once the first vaccines were licensed, it became important to search for more detailed information about the immunological mechanisms triggered by these vaccines, also considering the presence or absence of adjuvant in the formulation. In this context, this research aims to evaluate phenotypic and functional aspects of cellular and humoral immunity in individuals vaccinated against influenza virus A (H1N1)pdm09. For such, twenty healthy volunteers with no history of previous pandemic H1N1 vaccination received the H1N1 vaccine in the presence (n=10) or absence (n=10) of adjuvant (oil-in-water), and were evaluated at 0/1/3/7/30 days post-immunization. Thus, several parameters were used to characterize the immunity developed by these vaccines, among which clinical and hematological evaluation, serology, cell immunophenotyping and analysis of intracellular and plasma cytokines. Collectively the results showed a very different immunological profile unleashed by both vaccines, although both vaccines have induced similar antibody levels and their persistence for 6 months after immunization. The vaccine with adjuvant was able to induce a more intense response of the innate immunity cells, with significant activation of cellular immunity, particularly of CD4⁺ T lymphocytes and an increase in the frequency of B lymphocytes. Besides that, this vaccine induced a significant cytokine production, presenting a mixed pattern of response Th1/ Th2 in this group. On the other hand, the vaccine without adjuvant caused a late and more discrete response, with less activation of innate immunity and weak induction of T lymphocyte, but with high B lymphocyte activation. This vaccine also caused a lower production of cytokines, presenting a less inflamed profile in this group. In conclusion, both vaccines were accompanied by distinct profiles on innate and adaptive immune compartment, which might represent a phenomenon directly related to the presence/absence of adjuvant in the H1N1 vaccines. However, it is important to emphasize that both vaccines were able to induce an effective response regarding immunogenicity, which suggests a protective immunity against the pandemic H1N1 virus.

1 INTRODUÇÃO

Os vírus influenza representam uma ameaça à saúde pública mundial devido a sua alta transmissibilidade, capacidade de causar doença grave e potencial pandêmico (Domingues *et al.*, 2012). Estes vírus causam uma infecção respiratória no homem, comumente conhecida por gripe, cuja gravidade pode variar desde uma doença branda ou assintomática, até uma infecção grave do trato respiratório inferior, com ou sem a presença de complicações, em que a evolução pode ser fatal (WHO, 2009a; WHO, 2009b). Todos os anos a influenza sazonal atinge aproximadamente 90 milhões de pessoas no mundo causando cerca de 250 a 500 mil óbitos e o que em épocas de pandemia pode ser muito mais grave (Rappouli & Dormitizer, 2012). A “Gripe Espanhola” (1918), por exemplo, causou uma mortalidade em torno de 100 vezes maior ao que ocorre nas epidemias sazonais, sendo a maior pandemia de influenza já registrada na história (Marks & Beatty, 1976; Patterson & Pyle, 1991; Taubenberger & Morens, 2006).

A primeira pandemia do século XXI aconteceu no ano de 2009, causada por um novo isolado de influenza A (H1N1) de origem suína que se adaptou aos seres humanos e passou a ser transmitido de maneira eficiente entre as populações (CDC, 2009a; Neumann & Kawaoka, 2011). Este vírus se propagou rapidamente ao redor do mundo, infectando milhares de pessoas em vários países de diferentes continentes, causando grande preocupação para as autoridades em saúde (OMS, 2009; Cohen & Enserink, 2009).

E considerando a importância da influenza no cenário global, sabe-se que a vacinação é o principal meio de reduzir o seu impacto, interferindo tanto na morbidade, quanto na considerável perda econômica em decorrência dos atendimentos hospitalares, absenteísmo ao trabalho, entre outros (Neumann & Kawaoka, 2011). Devido a isso, as primeiras vacinas contra o vírus pandêmico H1N1 foram aprovadas em setembro de 2009 e em sua formulação monovalente poderiam ser compostas por vírus vivo atenuado ou inativado, fragmentado ou subunidade, contendo ou não adjuvante (CDC, 2009e; Pada & Tambyah, 2011).

Os adjuvantes de vacinas são substâncias capazes de ampliar e modular a resposta imunológica vacinal e seu uso possibilita poupar a dose de antígeno necessária para desencadear a imunidade. E embora sua utilização tenha se difundido entre os fabricantes de vacinas, os mecanismos imunológicos desencadeados por estes agentes ainda não foram completamente

elucidados (Schijns, 2000; Schijns, 2003; Degen *et al.*, 2003; Kumru *et al.*, 2014; Egli *et al.*, 2014). Neste contexto, conhecer melhor as vias da imunidade induzidas pelos adjuvantes é o primeiro passo para o avanço no desenvolvimento de vacinas “sob medida”, capazes de modular seletivamente a resposta do sistema imune atendendo aos preceitos de segurança e eficácia, o que significa baixo risco e proteção almejada (Schijns, 2000; Schijns, 2002; Singh & O’Hagan, 2003).

Adicionalmente, há poucos estudos que avaliam uma ampla gama de variáveis para a caracterização da imunidade desenvolvida após a vacinação. Os trabalhos presentes na literatura são geralmente pontuais, utilizando poucos biomarcadores de fenotipagem celular e um reduzido repertório de citocinas. Neste sentido, a escassez de informações detalhadas acerca da resposta vacinal e as implicações com o uso de adjuvantes, considerando a intensa aplicação das vacinas em programas de controle de âmbito mundial, são o que motivaram o desenvolvimento deste estudo.

Desta forma, a investigação minuciosa dos eventos pós-vacinais e a caracterização do perfil de resposta imune específica, além de contribuir para o avanço no conhecimento científico, permitem elucidar os mecanismos imunológicos associados à eficácia vacinal e à profilaxia isenta de eventos adversos graves. O estudo destes mecanismos associados à presença e ausência de adjuvante, pode ainda fornecer subsídios para melhorias no desenvolvimento de novas vacinas e possibilitar uma escolha mais adequada dos seus componentes. Além disso, pesquisas que avaliam diversos aspectos da resposta vacinal e que podem formar conhecimento sobre a segurança e eficácia das vacinas são essenciais na geração de informações não apenas para a comunidade científica, mas também para a população que muitas vezes se mostra bastante insegura e resistente quanto à utilização de novas vacinas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar aspectos fenotípicos e funcionais das imunidades celular e humoral no sangue periférico de indivíduos vacinados contra o vírus influenza A (H1N1)pdm09, na presença e ausência de adjuvante.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar a ocorrência de reações adversas e alterações no perfil hematológico de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09;
- ❖ Quantificar os níveis de anticorpos anti-H1N1 no plasma de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09;
- ❖ Analisar o perfil *ex vivo* das alterações fenotípicas da imunidade celular em leucócitos circulantes de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09;
- ❖ Caracterizar o padrão de citocinas intracitoplasmáticas de leucócitos circulantes de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09;
- ❖ Avaliar o perfil de citocinas no plasma de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Os vírus influenza

Os vírus influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae* e são os principais responsáveis por causar infecção respiratória no homem, que resulta em uma doença comumente conhecida por gripe. Há três tipos de vírus influenza capazes de infectar humanos, classificados por suas diferenças genéticas e antigênicas: tipos A, B e C. Os vírus A são capazes de infectar uma ampla gama de hospedeiros e causar infecção respiratória no homem, que pode variar desde leves sintomas a uma doença grave e fatal. Os vírus B infectam apenas humanos, principalmente crianças, e normalmente causam doença branda, mas podem ser responsáveis por surtos de gripe na população em geral. Os vírus C raramente infectam seres humanos e não são capazes de causar epidemias (Palese & Shaw, 2007; Wright *et al.*, 2007). Os vírus A são, portanto, considerados de maior risco para a saúde pública, sendo responsáveis por diversas epidemias e pandemias ao longo da história (Kuiken *et al.*, 2012; Bradley-Stewart *et al.*, 2013; Short *et al.*, 2014).

O genôma do vírus influenza A compreende 8 segmentos de RNA de fita única e polaridade negativa que codifica no mínimo 10 proteínas e a replicação dos segmentos de RNA viral (vRNA) ocorre no núcleo das células infectadas. Estes vírus possuem duas glicoproteínas de superfície responsáveis por sua virulência e antigenicidade, a hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). São descritos atualmente 18 subtipos de HA (H1-18) e 11 subtipos de NA (N1-11). A HA é a glicoproteína responsável pela fixação do vírus ao receptor celular, as moléculas de ácido siálico, e penetração na célula hospedeira. A NA atua removendo o ácido siálico que recobre as células epiteliais do trato respiratório e do próprio vírus, evitando assim a aglutinação das partículas virais entre si e facilitando a sua propagação no meio extracelular. As proteínas PB1, PB2 e PA, compõem o complexo polimerase, responsável pela replicação do genoma viral. Adicionalmente, são codificadas: a nucleoproteína (NP), proteína de ligação ao RNA e que regula a importação nuclear; a proteína de matriz (M_1), que regula a interação da ribonucleoproteína viral, a exportação nuclear e o brotamento viral; a proteína transmembrana de canal iônico (M_2), que controla o desnudamento e montagem viral; e as proteínas não-estruturais (NS_1 e NS_2), sendo que a NS_1 é uma proteína antagonista de interferon e que regula a expressão

gênica do hospedeiro e a NS₂ regula a exportação nuclear (Palese & Shaw, 2007; Wright *et al.*, 2007; Bouvier & Palese, 2008; Tong *et al.*, 2013) (Figura 1).

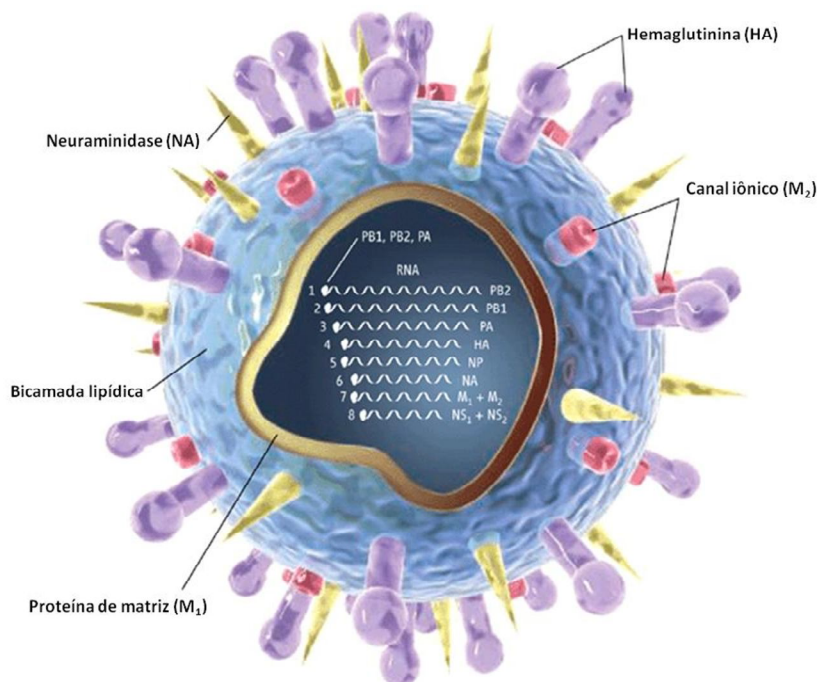


Figura 1. Desenho esquemático do vírus influenza A. A superfície do vírus influenza A é constituída por duas glicoproteínas denominadas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), ancoradas sobre uma bicamada lipídica, que compõe o envelope viral. Revestindo a parte interna do envelope encontra-se a proteína de matriz M₁ e ainda, integrando o envelope viral a proteína transmembrana de canal iônico M₂. No interior do vírus estão os 8 segmentos de RNA fita única e polaridade negativa que codificam as proteínas: PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M₁, M₂, NS₁ e NS₂. Fonte: modificado de Kaiser, (2006).

Os vírus influenza são pouco estáveis e podem sobreviver apenas por algumas horas no ambiente dependendo das condições, uma vez que, fatores físicos tais como calor, alterações de pH e ressecamento podem inativar o vírus. O tipo de superfície também pode influenciar na sua sobrevivência, por exemplo, em superfícies duras e não porosas, tais como metal e plástico, os vírus influenza podem permanecer viáveis de 24-48h, enquanto em roupas, papéis e tecidos, sobrevivem <8-12h (Bean *et al.*, 1982). E embora a baixa estabilidade seja uma característica desfavorável para um microorganismo, esses vírus garantem o sucesso evolutivo por sua alta transmissibilidade e capacidade de rearranjo gênico.

A capacidade destes vírus em gerar alterações antigênicas já está bem descrita na literatura e pode ocorrer através de dois mecanismos básicos, o “*drift*” antigênico, em que o acúmulo de mutações de ponto gera um processo gradual e relativamente contínuo de mudanças nas suas glicoproteínas de superfície, ou através do “*shift*” antigênico, em que ocorre troca de um ou mais segmentos destes vírus, o que pode levar ao surgimento de um novo subtipo de influenza, capaz de infectar humanos e causar epidemias e pandemias (Palese & Shaw, 2007; Wright *et al.*, 2007; Bouvier & Palese, 2008).

3.2 Breve histórico das pandemias de influenza

Pandemias de influenza são causadas por vírus para os quais as pessoas têm pouca ou nenhuma imunidade (Neumann & Kawaoka, 2011). Em 1918, a “Gripe Espanhola” foi causada por um vírus influenza A (H1N1) e teve mortalidade estimada em mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. As taxas de letalidade desta pandemia foram superiores a 2,5%, sendo que em outras epidemias e pandemias de influenza, bem como na gripe sazonal, esta porcentagem é geralmente menor que 0,1 (Marks & Beatty, 1976; Patterson & Pyle, 1991; Taubenberger & Morens, 2006). Quase quarenta anos depois, em 1957, um vírus recombinante de aves e humanos de subtipo H2N2 causou uma nova pandemia conhecida por “Gripe Asiática”, que acarretou cerca de 1 a 2 milhões de mortes, desde o oriente até os EUA. Alguns anos depois, em 1968, aconteceu a pandemia de Hong Kong (subtipo H3N2), que ocasionou menor mortalidade que as pandemias anteriores com cerca de 700 mil óbitos. Já em 1977, ressurgiu um novo isolado do vírus H1N1 que muito se assemelhava ao vírus que circulou em meados de 1950, mas que não foi capaz de causar um novo surto provavelmente porque os indivíduos que nasceram antes de 1957 possuíam imunidade pré-existente (Patterson & Pyle, 1991; Johnson & Mueller, 2002). A partir de então, vírus dos subtipos H3N2 e H1N1 circulavam sazonalmente entre humanos, até que no ano de 2009, aconteceu a primeira pandemia do século XXI, causada por um novo isolado de influenza A subtipo H1N1 de origem suína. O surgimento do novo vírus aconteceu através de um rearranjo inicial entre o vírus suíno clássico, com o vírus aviário Norte Americano e o vírus humano H3N2, gerando um vírus influenza triplo recombinante que circulava entre porcos na América do Norte e que sofreu novo rearranjo com um vírus aviário/ suíno da Eurásia, dando origem ao vírus influenza A (H1N1) pandêmico (Neumann & Kawaoka, 2011) (Figura 2).

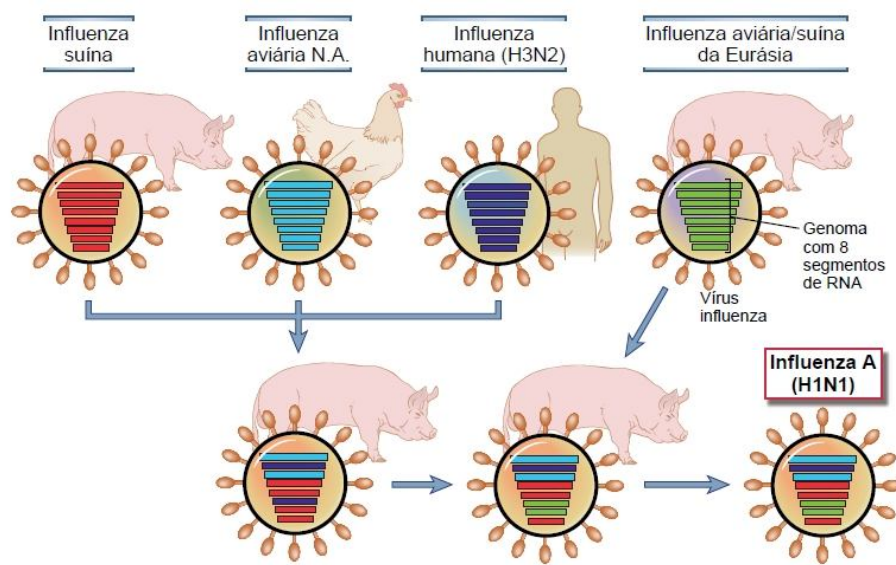


Figura 2. Origem do vírus influenza A (H1N1) pandêmico. O rearranjo entre um vírus suíno clássico com um vírus aviário Norte Americano e outro vírus humano (H3N2), originou um vírus triplo recombinante, que sofreu novo rearranjo com um vírus aviário/ suíno da Eurásia, gerando o vírus influenza A (H1N1) pandêmico. Fonte: Abbas *et al.*, (2012).

3.3 Pandemia de 2009: aspectos epidemiológicos

Em março de 2009 o novo vírus influenza A (H1N1) começou a circular e ser transmitido de maneira hábil entre seres humanos (Neumann & Kawaoka, 2011). Em meados de abril, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) avaliou dois casos de doença respiratória febril que ocorreram em crianças no sudeste da Califórnia, sendo confirmados como infecção por H1N1 pandêmico. Embora este não fosse um novo subtipo de influenza a circular entre seres humanos, o vírus suíno se apresentou como uma grande ameaça uma vez que o novo isolado era substancialmente diferente daqueles que já circulavam em humanos e, provavelmente, a vacina contra influenza sazonal não seria capaz de proteger a população. Além disso, como não foi evidenciada uma exposição destas crianças a porcos, aumentou-se a possibilidade de que havia ocorrido uma transmissão humano a humano (CDC, 2009a). Logo após a detecção do novo vírus nas duas crianças da Califórnia, casos de infecção por H1N1 pandêmico também foram confirmados em vários pacientes no México, onde se registrava um surto de doença respiratória aguda (CDC, 2009b).

Ao final do mês de abril o número de casos confirmados nos Estados Unidos totalizava 64 e a OMS elevou o nível de alerta pandêmico de fase 4 para fase 5, o que indicava que a transmissão humano a humano já estava acontecendo em no mínimo 2 países (CDC, 2009c; CDC, 2009d). Em poucos meses, uma transmissão contínua foi registrada em diferentes continentes, sendo que no mês de junho já haviam quase 30.000 casos registrados em 74 países, o que levou a OMS declarar o maior nível de alerta pandêmico (fase 6) (Cohen & Enserink, 2009). No mês de setembro, quando as primeiras vacinas foram licenciadas, já havia cerca de 300 mil pessoas infectadas ao redor do mundo e em menos de dois meses, ao final de novembro, esse número dobrou para mais de 600 mil casos confirmados distribuídos em mais de 207 países ou territórios (WHOC, 2009/ 2010; WHOD, 2009/2010) (Figura 3). Em fevereiro de 2010, a pandemia já havia alcançado quase todos os países do mundo e o CDC estimava cerca de 59 milhões de casos, com cerca de 270 mil hospitalizações e 12 mil mortes (WHOC, 2009/2010; WHOD, 2009/2010; CDC, 2010) (Figura 4).

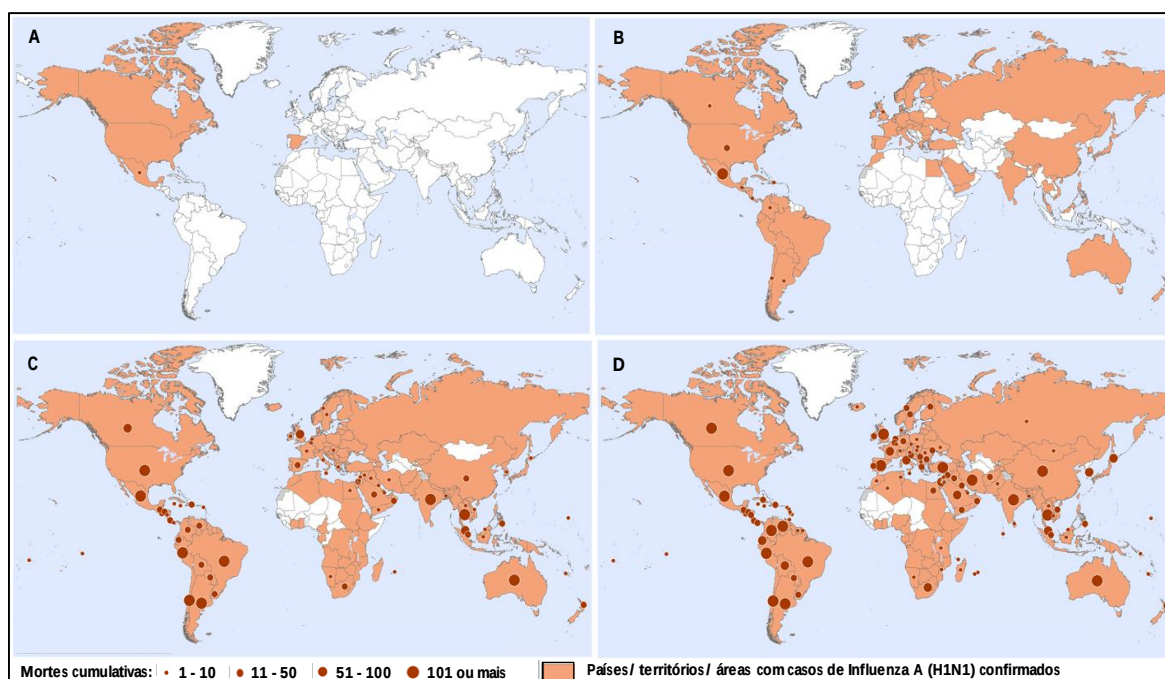


Figura 3. Evolução epidemiológica de casos e óbitos durante a pandemia por influenza A (H1N1)pdm09 no ano de 2009. Os círculos em vinho representam o número de mortes cumulativas proporcional ao seu tamanho especificado na legenda e a área preenchida pela cor laranja representa os países, territórios ou áreas com casos de influenza A (H1N1)pdm09 confirmados por laboratório. A) Situação epidemiológica em 27 de abril; B) Situação

epidemiológica em 17 de junho; C) Situação epidemiológica em 13 de setembro; D) Situação epidemiológica em 29 de novembro. Fonte: WHOd, 2009/ 2010.

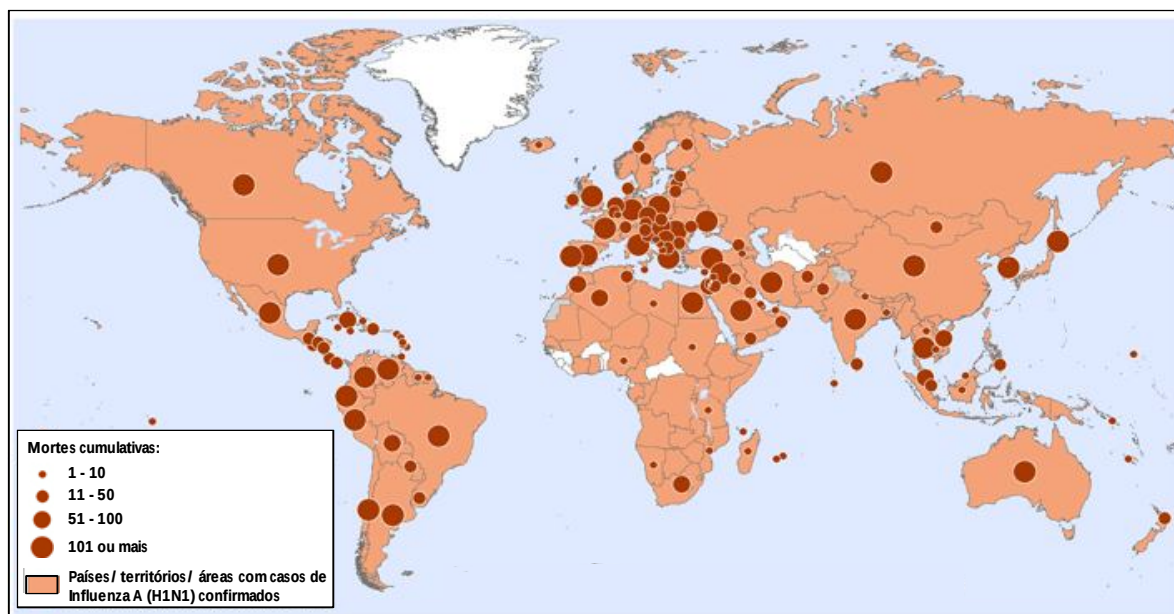


Figura 4. Situação epidemiológica durante a pandemia por influenza A (H1N1)pdm09 em fevereiro de 2010. Os círculos em vinho representam o número de mortes cumulativas proporcional ao seu tamanho especificado na legenda e a área preenchida pela cor laranja representa os países, territórios ou áreas com casos de influenza A (H1N1)pdm09 confirmados por laboratório. Fonte: WHOd, 2009/ 2010.

Durante o curso da pandemia foram estimados cerca de 100 a 400 mil óbitos por influenza A (H1N1)pdm09 em todo o mundo, que ocorreram principalmente entre crianças, adultos jovens e gestantes, apresentando um perfil diferente do que ocorre na influenza sazonal que causa elevada letalidade entre idosos e crianças com menos de 2 anos de idade. Apesar da mortalidade geral durante a pandemia ter sido muito semelhante ao que ocorre nas temporadas de influenza sazonal, o impacto da pandemia foi maior em termos de anos de vida perdidos, uma vez que a maioria dos óbitos ocorreu em pessoas com menos de 65 anos (Viboud *et al.*, 2010; Dawood *et al.*, 2012; Simonsen *et al.*, 2013).

Em agosto de 2010 se iniciou o período pós-pandêmico, em que o vírus circulante assume o comportamento de vírus sazonais, perdendo o caráter dominante, e continua a circular nos anos seguintes. Nesta fase, de 20 – 40% da população em algumas áreas já haviam entrado em contato com o vírus pandêmico e possuíam algum nível de imunidade protetora. Ainda assim, surtos localizados de diferentes magnitudes foram relatados em locais como Nova Zelândia e Índia.

Além disso, geralmente no início desse período os grupos de risco permanecem com risco aumentado, porém o número de casos diminui (WHO, 2010).

3.4 A doença causada pelo vírus influenza A (H1N1)pdm09: transmissão e manifestações clínicas

O vírus pandêmico se propagou de maneira muito semelhante aos vírus influenza sazonais, em que a transmissão ocorre através do contato próximo com pessoas contaminadas que ao tossir, espirrar ou até mesmo falar, liberam grandes quantidades de vírus nas gotículas e secreções providas das vias respiratórias (Girard *et al.*, 2010). A possibilidade de transmissão fecal-oral através do contato com fluidos de indivíduos com sintomas gastrointestinais, ainda que seja rara, também não deve ser descartada (Peiris *et al.*, 2009). O período de incubação do vírus H1N1 é aproximadamente de 2 a 7 dias, mas a maioria dos indivíduos contaminados já começam a eliminar o vírus um dia antes do início dos sintomas, o que se mantém de 5 a 7 dias (De Serres *et al.*, 2010).

De espectro clínico amplo, os indivíduos infectados pelo vírus Influenza A (H1N1)pdm09 podem apresentar desde uma doença subclínica ou branda do trato respiratório superior, com ou sem febre e sintomas gastrointestinais ocasionais, tais como vômito ou diarreia, até graves complicações, tais como pneumonia resultando em falência respiratória, síndrome da angústia respiratória aguda, falência múltipla de órgãos e morte. Os sintomas mais comuns da infecção por este vírus incluem tosse seca, febre (~38°C), dor de garganta, mal-estar e dor de cabeça. E, segundo a OMS, as principais causas de hospitalização por esta infecção durante a pandemia foram pneumonia viral e presença de condições de saúde adjacentes, tais como doença pulmonar crônica (*e.g.* asma), cardiopatias, doença renal e imunossupressão. Além desses, obesidade e gravidez foram considerados grupos de risco atípicos observados na pandemia de 2009 (WHO, 2009a; WHO, 2009b).

A principal complicação na infecção por influenza é a pneumonia viral que, em grande parte dos casos, ocorre concomitante ou seguida de uma pneumonia bacteriana e aumenta substancialmente o risco de morte (Hussell *et al.*, 2009). Considerando esta importância, pesquisadores do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH) avaliaram amostras de tecido pulmonar *post mortem* e dados publicados de uma série de autópsias, e observaram que a maioria

dos óbitos ocorridos na pandemia de influenza de 1918-1919 foi causada por uma infecção bacteriana secundária por bactérias comuns ao trato respiratório superior (Morens *et al.*, 2008). Neste contexto, as bactérias mais comuns nas coinfeções por influenza são *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* (Hussell *et al.*, 2009).

Alguns subtipos virais podem ser mais ou menos patogênicos, causando uma doença que pode variar quanto aos sinais e sintomas, sendo que os mecanismos responsáveis por tais diferenças na manifestação clínica da influenza ainda não foram completamente elucidados. Sabe-se que a gravidade da doença está relacionada tanto a fatores de virulência virais quanto àqueles relacionados ao próprio hospedeiro, como uma resposta imunológica excessiva ou desbalanceada do indivíduo (Kuiken *et al.*, 2012).

3.5 Resposta imunológica contra os vírus Influenza

Os mecanismos gerais da resposta imune aos vírus influenza já estão bem caracterizados na literatura, porém cada subtipo viral pode desencadear uma resposta particular, o que depende também da antigenicidade de cada vírus. Sobre o que se tem documentado, a resposta imune adaptativa ao influenza é responsável pelo *clearance* viral durante a infecção, enquanto que os anticorpos pré-existentes conferem resistência a novas infecções. Sabe-se que as glicoproteínas HA e NA são os principais determinantes antigênicos, porém a porção externa da proteína de matriz M₂ também possui certa antigenicidade, sendo assim alvo de anticorpos. Segundo Subbarao *et al.*, (2006), os principais mecanismos das imunidades celular e humoral contra o vírus influenza são: a produção de anticorpos contra HA, uma vez que esta proteína está relacionada com a adsorção do vírus ao receptor celular, estes anticorpos são capazes de bloquear a ligação do vírus e/ou fusão na célula hospedeira; produção de anticorpos contra NA, que apesar de não prevenirem a infecção podem limitar a liberação do vírus pelas células, reduzindo a gravidade da infecção; produção de anticorpos contra o domínio externo altamente conservado da proteína M₂, que restringem o transporte de prótons bloqueando o desnudamento e prejudicando a replicação viral, além de possuírem alta reação cruzada contra outros subtipos virais; e por fim, a resposta de células T CD8⁺ específicas a determinadas proteínas, tais como nucleoproteína (NP) ou proteínas do complexo polimerase (PB2 e PA), que reconhecem peptídeos virais apresentados por MHC de classe 1, resultando na liberação de citocinas com atividade antiviral

(IFN- γ e TNF- α) e perforinas, que medeiam a citólise de células infectadas, diminuindo a quantidade de vírus liberados pelas células (Figura 5).

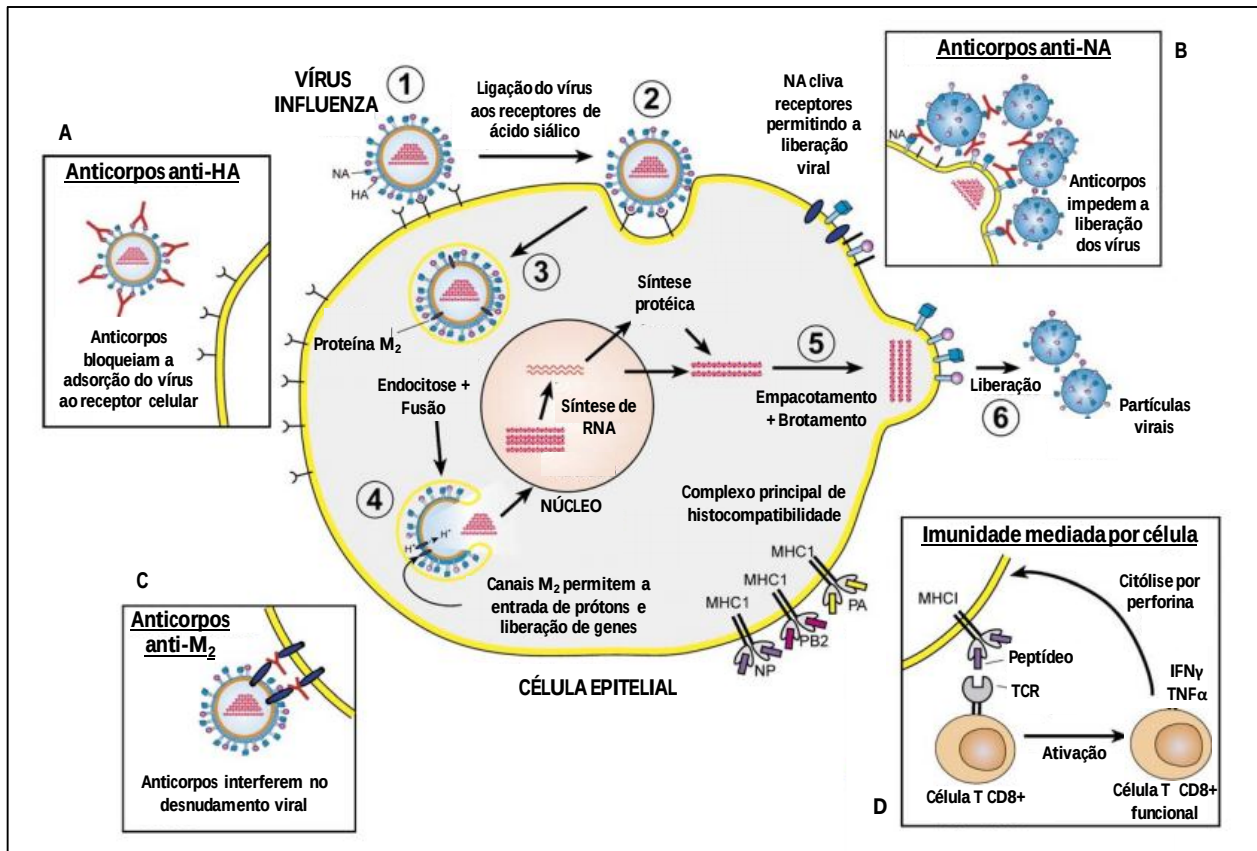


Figura 5. Ciclo de replicação viral e mecanismos da resposta imune adaptativa contra o vírus influenza. A HA do vírus se liga aos receptores de ácido siálico presente na superfície da célula hospedeira (1,2), sendo internalizado por endocitose e fusão (3). A abertura dos canais M₂ permite o fluxo de próton através da membrana viral (4), provocando a fusão da membrana viral e endossomal e liberando os genes no citoplasma, de onde eles migram para o núcleo da célula. A síntese de RNA acontece dentro do núcleo e a produção de proteínas no citoplasma, onde também ocorre o empacotamento e brotamento através da membrana celular, gerando a progênie viral (5). E então as novas partículas virais são liberadas (6), com a participação da proteína NA, que cliva os receptores de ácido siálico da membrana celular. Os mecanismos de resposta ao vírus influenza incluem a produção de anticorpos contra a proteína HA, bloqueando a ligação do vírus à célula (A), produção de anticorpos contra a proteína NA, impedindo a liberação de novos vírus (B), produção de anticorpos contra a proteína M₂, que interferem no desnudamento, restringindo a replicação viral (C), e por fim, resposta de células T CD8⁺ a componentes virais conservados, que está relacionado ao *clearance* de células infectadas pelo vírus, através da ativação de células T CD8⁺ funcionais, responsáveis pela produção de citocinas e citólise (D). Fonte: modificado de Subbarao *et al.*, (2006).

Com relação ao vírus pandêmico de 2009, Hillaire *et al.*, (2011) observaram uma rápida resposta de células T de memória nos indivíduos infectados, o que os autores acreditam estar relacionado a um contato prévio destas pessoas com outros subtipos de influenza. Este trabalho demonstra que a população de linfócitos T citotóxicos diminui assim que ocorre o *clearance* viral, mas diversas subpopulações de células T de memória persistem, estando aptas a responder a uma infecção subsequente por influenza A. Hikono *et al.*, (2006) reforçam que a resposta de memória nos pulmões envolve principalmente a participação de células T CD8⁺ específicas ao antígeno. Neste contexto, embora esteja bem estabelecido que os linfócitos T citotóxicos exerçam o papel principal na imunidade celular em infecções por vírus respiratórios, Woodland *et al.*, (2001) destacam a importante participação das células T CD4⁺ em mediar a resposta humoral, induzindo uma intensa produção de anticorpos contra o vírus. Sobre a persistência de anticorpos específicos, Sridhar *et al.*, (2015) evidenciaram que a infecção natural pelo influenza é capaz de manter níveis constantes de imunoglobulinas, acima do limiar considerado protetor, por até 1 ano e meio após o contato com o vírus.

Sobre outras características desta infecção, foi demonstrado que o vírus influenza promove linfopenia relativa com ou sem monocitose, revelando em alguns casos, uma razão de linfócitos por monócitos do sangue periférico abaixo de 2 (Merekoulis *et al.*, 2010). Além disso, Bermejo-Martin *et al.*, (2009) evidenciaram o papel de mediadores pró-inflamatórios, em resposta à infecção pelo H1N1 grave. Neste trabalho, respostas exacerbadas do tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-15, IL-12p70) ou tipo Th17 (IL-8, IL-9, IL-17, IL-6) foram destacadas, mostrando a participação de mediadores muito semelhantes aos de outras patologias, tais como asma ou doenças autoimunes (de Castro *et al.*, 2010). Outro estudo sobre a imunopatogênese da infecção por H1N1 também relatou uma resposta imune alterada em pacientes com formas graves da doença, com exacerbada secreção de citocinas pró-inflamatórias e imunomodulatórias na fase inicial de resposta inata, bem como pela desregulação de respostas de células T durante o desenvolvimento da imunidade adaptativa (Almansa *et al.*, 2012). E ainda, alguns trabalhos sobre resposta imune humoral frente à infecção pelo H1N1 demonstraram que indivíduos com evidência sorológica de prévia exposição ao vírus pandêmico, apresentaram importante reação cruzada de célula B de memória específica à HA, para H1N1 sazonal e para o vírus aviário H5N1 (Chiu *et al.*, 2012; Mahallawi *et al.*, 2013).

3.6 A profilaxia e seus desafios durante a pandemia

No último século, a prática da vacinação reduziu drasticamente a morbidade e mortalidade por doenças infecciosas tanto na população humana quanto entre espécies veterinárias e, por isso, o desenvolvimento e a busca de novas e efetivas vacinas são uma prioridade em saúde pública. Com relação à influenza, sabe-se que a vacinação é o principal meio de reduzir o impacto deste agravo (Schijns, 2003; Clark *et al.*, 2009; Broadbent & Subbarao, 2011).

O processo de fabricação de uma vacina contra um vírus influenza pandêmico se inicia quando um Centro de Referência e Pesquisa em Influenza identifica um novo subtipo ou isolado zoonótico de vírus influenza circulando na população humana, atingindo diferentes países e continentes e, então, relata este achado para a Organização Mundial de Saúde (OMS). Assim, inicia-se um laborioso processo industrial, o qual consiste primeiramente na adaptação desses isolados ao substrato para a produção de vacinas (ovo embrionado ou cultura celular), além de procedimentos para atenuar sua virulência.

A maioria das indústrias utiliza ovos de galinha embrionados como substratos para a produção de vacinas. Desta forma, no intuito de melhorar a multiplicação do vírus influenza em ovos e torná-lo menos virulento, é realizada uma inoculação simultânea do vírus contra o qual se pretende desenvolver a vacina e o vírus A/PR8/34 (PR8; H1N1), uma amostra adaptada aos ovos embrionados e não virulenta para os seres humanos. Dentre os vários rearranjos possíveis, são selecionados vírus que expressam as proteínas de superfície HA e NA do isolado contra o qual se deseja imunizar, e que possuam elevada capacidade de multiplicação em ovos embrionados. Ou seja, o híbrido formado deve conter componentes internos da cepa de laboratório e componentes externos da cepa pandêmica. Esse procedimento é feito por um mecanismo de contra-seleção utilizando anticorpos anti-PR8, etapa esta que demora cerca de três semanas. Em seguida, é necessário testar o híbrido para certificar se ele realmente produz as proteínas externas da cepa pandêmica, é seguro e capaz de crescer em ovos. Após a conclusão deste processo, que leva cerca de mais três semanas, a cepa vacinal é distribuídas para os fabricantes de vacinas.

Em paralelo, os centros colaboradores da OMS produzem os reagentes (substâncias padronizadas), que são distribuídos a todos os produtores de vacinas. Estas substâncias permitem mensurar e padronizar os vírus que estão sendo produzidos e garantir que a dose correta da

vacina esteja sendo envasada. Todo este processo requer pelo menos três meses. Além disso, os fabricantes de vacinas demoram ainda cerca de três semanas para testar as diferentes condições de crescimento em ovos, a fim de encontrar as melhores.

Na maioria dos processos de fabricação de vacinas de influenza são utilizados ovos fertilizados de nove a doze dias. O vírus vacinal é então injetado em milhares de ovos e estes são incubados de dois a três dias, tempo durante o qual o vírus se multiplica. Após esta etapa, os vírus são retirados dos ovos e as partículas virais parcialmente puras são inativadas com produtos químicos. As proteínas externas dos vírus passam, então, por um processo de purificação e o resultado são centenas ou milhares de litros de antígeno vacinal. A produção de cada lote de antígeno leva aproximadamente duas semanas e um novo lote pode ser iniciado em poucos dias. O tamanho de cada lote depende da quantidade de ovos que o fabricante pode obter, inocular e incubar, além do rendimento de cada ovo.

O controle de qualidade se inicia apenas depois que os reagentes forem fornecidos pelos laboratórios da OMS. Desta maneira, cada lote é testado e a esterilidade do antígeno é verificada, o que demora cerca de duas semanas. O lote é então diluído para se obter a concentração desejada do antígeno, envasado em frascos ou seringas e etiquetados. Algumas alíquotas são, então, utilizadas para confirmar a esterilidade e concentração de proteínas, bem como para realizar testes de segurança em animais, o que leva cerca de duas semanas.

Antes de ser vendida ou administrada em pessoas, uma aprovação regulatória é necessária, porém cada país tem sua própria agência regulatória e regras. Se a vacina é produzida pelos mesmos processos utilizados para a vacina de influenza sazonal, isto pode ser bem rápido, cerca de um a dois dias. Em alguns países, a cada nova vacina de influenza produzida, um ensaio clínico é requerido para avaliar a resposta induzida por essa vacina, o que leva mais quatro semanas para a conclusão desta etapa. Em outros países esta etapa pode não ser exigida, uma vez que vários ensaios clínicos já foram realizados para preparações semelhantes da vacina anual, e supõe-se que a nova vacina irá se comportar de maneira muito semelhante. O processo completo, em condições favoráveis pode ser finalizado em cinco a seis meses, quando o primeiro lote da vacina se torna disponível para distribuição e uso (WHO 2009e).

As primeiras vacinas contra o vírus pandêmico H1N1 foram aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em setembro de 2009. Em sua formulação monovalente, poderiam ser compostas por vírus vivo atenuado ou inativado, sendo que este último ainda poderia ser fragmentado ou subunidade, contendo a cepa A/California/7/2009(H1N1)pdm. Estudos iniciais demonstraram que a imunogenicidade e segurança destas vacinas eram similares às aquelas vacinas para influenza sazonal (CDC, 2009e; Pada & Tambyah, 2011).

Considerando o exposto, os principais desafios na produção de vacinas durante a pandemia foram o curto tempo em que a vacina precisava ser fabricada e distribuída, e a disponibilidade de vacinas a nível global, considerando que a capacidade de produção era insuficiente para cobrir grande parte da população ao redor do mundo. Além disso, a produção do antígeno vacinal em ovos e em cultura de células foi abaixo do esperado, e o uso de adjuvantes para poupar a quantidade de antígeno por dose foi considerado. Logo, esses componentes foram utilizados nas formulações de vacinas em alguns países, dentre os quais, o Brasil (Girard *et al.*, 2010; Broadbent & Subbarao, 2011; Neumann e Kawaoka, 2011; Domingues *et al.*, 2012;).

Diante tais dificuldades, autoridades em saúde perceberam a necessidade de selecionar grupos de maior prioridade para imunização, sendo eles: trabalhadores da saúde, gestantes, crianças (6 a 23 meses) e indivíduos com condições de saúde subjacentes, tais como doenças cardiovasculares ou respiratórias, desordens autoimunes e diabetes (Girard *et al.*, 2010; Broadbent & Subbarao, 2011; Domingues *et al.*, 2012).

No Brasil, a primeira fase da campanha se iniciou em novembro de 2009, priorizando os grupos de risco. E no ano seguinte, houve a maior campanha de vacinação da história do país, em que foi ampliada a faixa etária alvo, resultando na administração de mais de 89 milhões de doses entre março e julho de 2010, superando a meta do Ministério da Saúde de cobrir 80% dos grupos prioritários. Esta experiência evidenciou não apenas a capacidade do país em viabilizar as estratégias de controle, mas também de disseminar informações para a população, o que possibilitou o sucesso da campanha (Pada & Tambyah, 2011; Domingues *et al.*, 2012).

3.7 Imunidade desencadeada pelas vacinas contra influenza

Uma resposta imunológica de memória eficaz e duradoura, envolvendo ambos os compartimentos, celular e humoral, é primordial na proteção contra futuras infecções por influenza (Bonduelle *et al.*, 2014). Neste sentido, sabe-se que a presença de anticorpos neutralizantes é um parâmetro básico para avaliar a eficácia vacinal, porém a avidez de anticorpos e a polifuncionalidade das células T, são aspectos igualmente relevantes associados à proteção e, portanto, devem ser considerados (Gulati *et al.*, 2005; Seder *et al.*, 2008).

Um dos primeiros trabalhos sobre a resposta vacinal durante a pandemia avaliou uma vacina composta de vírus inativado/ fragmentado contra o H1N1 pandêmico, em adultos de 18 a 64 anos, residentes na Austrália. Os autores observaram que 21 dias após a primeira dose da vacina, 95% dos indivíduos que receberam uma dose de 15µg apresentaram títulos de anticorpos $\geq 1:40$ (considerado protetor) no ensaio de inibição da hemaglutinação (HAI). Além disso, não houve nenhuma reação adversa grave nesta dose, que foi considerada segura e imunogênica em adultos (Greenberg *et al.*, 2009).

Sobre a atividade de linfócitos T após a vacinação, sabe-se que o desenvolvimento da imunidade protetora por anticorpos acontece, principalmente, pela participação de linfócitos T auxiliares. Neste sentido Nayak *et al.*, (2013) destacaram a alta correlação entre células T CD4⁺ e a resposta de anticorpos na vacinação contra o influenza pandêmico, demonstrando que a expansão clonal dessas células após a vacinação é primordial para o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. Os autores sugerem ainda que abordagens capazes de facilitar ou induzir o recrutamento de linfócitos T CD4⁺ possam aumentar a produção de anticorpos neutralizantes em resposta às vacinas contra novas estirpes do vírus.

Considerando a importância destas respostas, vários estudos enfatizam a interferência da vacinação sazonal na imunidade desenvolvida pela vacina contra o vírus pandêmico. Schmidt *et al.*, (2012) observaram que a resposta de células T CD4⁺ e a produção de anticorpos induzida pela vacinação contra o H1N1 pandêmico foram menos pronunciadas quando os indivíduos haviam sido pré-vacinados contra o influenza sazonal. Neste sentido, Herrera *et al.*, (2013) avaliaram 60 indivíduos saudáveis, trabalhadores de um hospital, vacinados contra o influenza pandêmico na ausência de adjuvante e observaram que metade deles apresentava níveis basais de

IFN- γ produzidos por células T contra peptídeos do vírus influenza H1N1 e células T CD4⁺ específicas a peptídeos deste vírus, os quais não sofreram aumento significativo após a vacinação, e apenas uma significativa proliferação de células T CD8⁺ pós-vacinação foi observada. Logo, os autores acreditam que uma reação cruzada da resposta imune celular, após a vacinação contra o vírus pandêmico, esteja acontecendo nos indivíduos já vacinados ou expostos a vírus influenza sazonais. Corroborando com os trabalhos supracitados, Roy-Ghanta *et al.*, (2014) mostraram que indivíduos vacinados anteriormente contra influenza sazonal apresentaram uma menor resposta de anticorpos, de células T CD4⁺ e células B de memória após a vacinação contra H1N1 pandêmico. Contudo, os autores destacaram a importância dos adjuvantes vacinais que parecem ajudar a superar essa interferência imunológica entre as vacinas contra a gripe. De maneira controversa, alguns autores afirmam que a vacinação contra influenza sazonal fornece um “preparo” para a imunização contra o H1N1 pandêmico, o que justificaria a necessidade de apenas uma dose para induzir a imunidade em indivíduos previamente vacinados. Outros autores acreditam também que a vacinação sazonal seja capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, que reagem de forma cruzada com o vírus pandêmico (Del Giudice *et al.*, 2009; Corti *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Broadbent & Subbarao, 2011).

Com relação à resposta vacinal em idosos, um estudo conduzido em Singapura, mostrou que pessoas ≥ 60 anos apresentaram um menor aumento dos níveis de anticorpos pós-vacinação do que indivíduos com idade inferior, mas por outro lado foi observado um maior aumento da resposta de células T nestes indivíduos (Hsu *et al.*, 2012).

Em outro tipo de abordagem, Li *et al.*, (2014) avaliaram o uso da vacina viva atenuada de administração intranasal em ensaio com camundongos e observaram que esta vacina foi capaz de induzir significativa proteção quando realizado o desafio com o vírus PR8, não presente na formulação. Este resultado sugere o potencial uso deste tipo de imunoprevenção no desenvolvimento de uma vacina universal. Neste trabalho, foi evidenciada ainda, a importância da imunidade mediada por células T e o significativo aumento das citocinas IFN- γ e IL-2 no fluido alveolar dos pulmões de camundongos imunizados. Vajdy *et al.*, (2007) demonstraram também a importância da vacinação com o vírus vivo atenuado, via intranasal, na indução de uma resposta de mucosa localizada, uma vez que a vacina intramuscular, apesar de induzir alta

resposta de células T e altos títulos de anticorpos, não é capaz de induzir qualquer resposta de anticorpos nas secreções nasais ou nos linfonodos cervicais que drenam a mucosa nasal.

3.8 Adjuvantes vacinais

Adjuvantes vacinais são substâncias capazes de promover uma resposta imune vacinal mais precoce, intensa e duradoura, ativando e direcionando células das imunidades inata e adaptativa, auxiliando assim, o desenvolvimento de uma resposta imunológica mais efetiva contra o antígeno (Schijns, 2000; Schijns, 2003; Degen *et al.*, 2003; Petrovsky & Aguilar, 2004; Aguilar & Rodriguez, 2007).

A nova geração de vacinas produzidas com antígenos preferencialmente inativados, com subunidades cada vez mais purificadas ou sintéticas, visa maior segurança e diminuição de efeitos colaterais na imunoprofilaxia. No entanto, a imunogenicidade destas vacinas se torna comprometida e o uso de adjuvantes pode ser necessário para induzir a resposta imune almejada. Além de amplificar a resposta imunológica, os adjuvantes podem modular seletivamente as respostas imune celular e humoral, direcionando-as para o tipo de imunidade protetora que se deseja alcançar em cada situação (Edelman & Tacket, 1990; Audibert & Lise, 1993; Schijns, 2003).

A compreensão dos mecanismos pelos quais esses potentes imunomoduladores podem induzir seletivamente o sistema imunológico é de grande importância no desenvolvimento de novas estratégias vacinais, como também no desenho racional de vacinas e escolha do tipo de adjuvante a ser utilizado em sua formulação. Contudo, ainda são necessários mais estudos para melhor caracterizar e compreender as vias de ação destes componentes (Schijns, 2000; Schijns, 2002; Kumru *et al.*, 2014).

Vários são os mecanismos de ação propostos e diferentes classificações já foram sugeridas para facilitar o entendimento das vias imunológicas em que os adjuvantes podem atuar. Neste contexto, diversos estudos destacam as vantagens no uso de adjuvantes, bem como as diferentes maneiras pelas quais estes componentes podem melhorar a resposta imunológica contra o antígeno (Singh & O'Hagan, 2003; Petrovsky & Aguilar, 2004; Aguilar & Rodriguez, 2007; Kumru *et al.*, 2014; Egli *et al.*, 2014). Em suma, os trabalhos propõem que os adjuvantes

podem potencializar a imunogenicidade de fracos imunógenos, evitando assim a necessidade de imunizações de reforço; aumentar a velocidade e duração da resposta imunológica; modular a avidéz, especificidade, isotipos ou distribuição das subclasses de anticorpos; estimular linfócitos T citotóxicos; induzir o inflamassoma; promover a o desenvolvimento da imunidade de mucosa; aprimorar a resposta imune em crianças e idosos; diminuir a dose de antígeno para reduzir custos na produção de vacinas, além de atender a situações pandêmicas, em que a demanda de vacina excede a capacidade de produção; e ainda, ajudar a controlar a competição de antígenos em vacinas combinadas. De maneira mais específica, Schijns, (2000) sugere cinco mecanismos básicos pelos quais os adjuvantes podem atuar na resposta imunológica contra o antígeno: aumentando e facilitando a captação, transporte, e apresentação do antígeno por células de captura e processamento de antígeno no local de injeção da vacina e no linfonodo drenante, o que o autor denomina como conceito geográfico de imunidade; prolongando a liberação do antígeno para os tecidos linfóides, através da retenção do antígeno em células dendríticas (DCs) foliculares dentro de linfonodos, conhecido como efeito de depósito; sinalizando através de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), que ativam as células da imunidade inata a liberar as citocinas necessárias para o aumento da regulação de moléculas coestimuladoras, ativando assim o chamado “sinal 0” na resposta imune; induzindo um sinal de perigo pelo dano ou estresse tecidual, o que causa uma reação local que ativa o sistema imune, aumentando a capacidade de captura e apresentação de antígeno pelas APCs, ao mesmo tempo em que estas células estimulam maior regulação de moléculas coestimuladoras; e por fim, sinalizando através de citocinas recombinantes ou moléculas coestimuladoras, o que pode simular uma atividade adjuvante clássica, fornecendo o “sinal 2” necessário para uma resposta eficaz contra o antígeno (Figura 6).

de impulsionar as respostas imune celular e humoral, que são necessárias para uma proteção efetiva contra a infecção. Mais especificamente, tem sido observado que o esqualeno provoca um significativo influxo de macrófagos e outras células da imunidade inata para o local da injeção, induzindo a produção de citocinas e quimiocinas (Dupuis *et al.*, 2001). Sobre os adjuvantes, foi demonstrado que o MF59 parece atuar na entrega do antígeno e potencializar a resposta inata no local da injeção, sendo responsável por uma forte indução de citocinas, quimiocinas, receptores de citocinas e quimiocinas e de moléculas de adesão envolvidas na migração de leucócitos, promovendo uma sustentada apresentação de antígenos após a vacinação (Mosca *et al.*, 2008). Além disso, o uso do MF59 foi relacionado ao aumento da liberação de ATP na injeção intramuscular, o que é necessário para a efetiva indução das respostas imune inata e adaptativa, aprimorando a resposta contra o antígeno (Vono *et al.*, 2013). Por sua vez, o adjuvante AS03 é capaz de induzir um aumento da resposta mediada por células T CD4⁺ e da resposta humoral, com níveis superiores de células B de memória e maior persistência de anticorpos, além de fornecer uma proteção cruzada contra estirpes que derivaram da estirpe vacinal (Roman *et al.*, 2011; Moris *et al.*, 2011).

Mas, se por um lado melhoram a imunogenicidade das vacinas, por outro são responsáveis pelo aumento de reações adversas locais e sistêmicas, embora em sua maioria, sejam reações não graves e os perfis de segurança destas vacinas sejam considerados aceitáveis (Walker & Faust, 2010; Clark *et al.*, 2010; Tetsutani & Ishii, 2012;).

Com relação à segurança destes adjuvantes, um estudo conduzido pela indústria *Novartis* analisou uma base de dados contendo informações de mais de 20.000 indivíduos e demonstrou que a vacina contendo o adjuvante MF59 é bem tolerada e induz um bom perfil de segurança. Além disso, não houve aumento na incidência de efeitos adversos quando comparado à vacina sem adjuvante, sendo recomendada para uso em larga escala nas campanhas de imunização, principalmente quando há necessidade de um alto fornecimento de vacinas, como acontece nos casos de pandemia de gripe (Pellegrini *et al.*, 2009). Em outro estudo, apoiado pela GSK, foi demonstrado que uma única dose da vacina contendo adjuvante AS03, com baixo conteúdo de antígeno (3,75µg de HA), foi altamente imunogênica e bem tolerada, além de sua resposta imune humoral persistir por mais de 6 meses após a administração da vacina (Ferguson *et al.*, 2012). Por outro lado, alguns estudos relataram casos de narcolepsia, um raro distúrbio do sono de etiologia

autoimune, associado ao uso da vacina Pandemrix (GSK), que contém o adjuvante AS03 (Partinen *et al.*, 2012; Heier *et al.*, 2013; Szakacs *et al.*, 2013). Outras abordagens, comparando as vacinas Focetria (com MF59) e Pandemrix (com AS03), demonstraram que a primeira, contendo MF59, apresenta um melhor perfil de tolerabilidade (van Puijenbroek *et al.*, 2010; Rahier *et al.*, 2011; Fox & Haensler, 2013).

Considerando a importância das vacinas de influenza no controle desta infecção, e o fato de que os adjuvantes podem ser um componente crucial na composição das mesmas, a união de esforços na geração de conhecimento acerca dos mecanismos imunológicos desencadeados por esses agentes é de grande importância no desenvolvimento e aperfeiçoamento de vacinas com a segurança desejada, o que inclui redução de efeitos adversos e riscos, paralela a uma resposta imunológica mais ampliada, duradoura e previsível.

4 MÉTODOS

O estudo foi delineado de acordo com o esquema experimental representado abaixo (Figura 7):

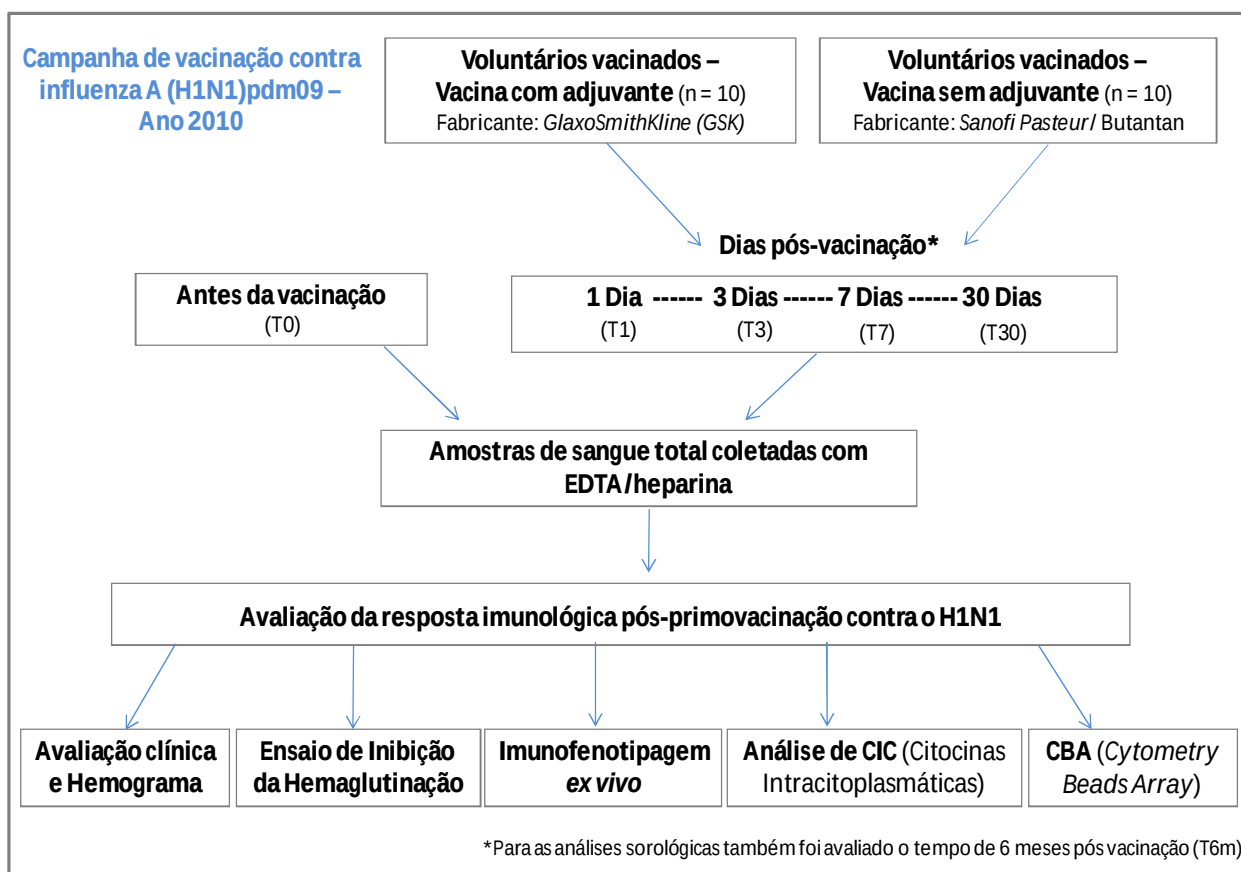


Figura 7. Esquema experimental da pesquisa. Fluxograma que resume as etapas principais da pesquisa.

4.1 Grupos de estudo

Para a realização deste estudo foram selecionados voluntários saudáveis (n=20), trabalhadores do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), idade entre 20-50 anos, de ambos os sexos, sem distinção de cor, classes ou grupos sociais. Os voluntários foram vacinados durante a campanha de vacinação nacional contra influenza A (H1N1)pdm09, no período de abril a junho de 2010. Não foram incluídos na pesquisa: indivíduos vacinados previamente contra influenza A (H1N1)pdm09 ou contra influenza sazonal ou ainda que tenham recebido qualquer outra vacina nos últimos três meses antes da entrada no estudo; indivíduos previamente infectados pelo vírus pandêmico; indivíduos que estavam em uso de qualquer tratamento sistêmico antineoplásico ou

imunomodulador, tais como corticóides, interleucinas, interferons, fatores de crescimento ou imunoglobulina intravenosa, nos últimos 45 dias que antecederam o estudo; indivíduos com histórico de alergia e/ou sensibilidade aos resíduos presentes na vacina (ovo, proteína de frango, ovalbumina, formaldeído, sulfato de gentamicina e deoxicolato de sódio), ao tiomersol ou componentes do adjuvante; indivíduos com doença febril ou infecção aguda no momento da triagem para o estudo e/ou dia da administração da vacina; gestantes, mulheres em aleitamento ou possibilidade de gravidez; e pessoas que afirmavam uso do álcool em quantidades consideradas abusivas. Os voluntários adultos foram recrutados por meio de contatos verbais e todos os participantes receberam explicações a respeito da pesquisa, dos riscos da coleta de sangue, e dos riscos e benefícios da vacinação contra o vírus influenza A (H1N1)pdm09. Após entrevista, os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A), e foram submetidos a uma avaliação clínica pela médica responsável pelo estudo, Dra. Silvana Maria Elói Santos, professora titular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e pesquisadora conveniada do CPqRR. Os voluntários foram divididos em dois grupos de 10 indivíduos, sendo que um dos grupos recebeu a vacina contendo adjuvante (*Pandemrix, GlaxoSmithKline*) e o outro grupo recebeu a vacina sem adjuvante (*Influenza A Monovalent Vaccine, Sanofi Pasteur/ Butantan*). Todo procedimento de vacinação foi conduzido por profissionais de enfermagem do Núcleo de Saúde do Trabalhador (NUST-CPqRR) e supervisionado pela Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética do CPqRR em 26 de abril de 2010 – carta de aprovação nº 11/2010, protocolo CEP – CPqRR nº 13/2010, CAAE: 0011.0.245.000-10 (APÊNDICE B).

4.2 Vacinas utilizadas no estudo

As vacinas utilizadas para imunização dos voluntários foram:

- “*Influenza A (H1N1) 2009 Monovalent Vaccine*”, fabricada por *Sanofi Pasteur/ Butantan*, composta por vírus influenza fragmentado, inativado, contendo antígeno propagado em ovos, cepa A/Califórnia/7/2009 (H1N1)(NYMCX-179A) (15µg de hemaglutinina por dose de 0,5mL). Demais componentes: tiomersal, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato dissódico diidratado, diidrogenofosfato de potássio e água para injeção. Não contém adjuvante.

- “*Pandemrix*” fabricada por *GlaxoSmithKline*, composta por vírus influenza fragmentado, inativado, contendo antígeno propagado em ovos, cepa A/Califórnia/7/2009 (H1N1)(NYMCX-179A) (3,75µg de hemaglutinina por dose de 0,5mL). Demais componentes: tiomersal, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, cloreto de potássio, água para injeção. Contém adjuvante AS03 composto de esqualeno, DL- α tocoferol e polissorbato 80.

4.3 Plano de coleta das amostras biológicas

Amostras de sangue periférico (10mL) foram coletadas em tubos *vacutainer* contendo heparina ou EDTA nos seguintes tempos: antes da vacinação (T0), no 1º dia (T1), no 3º dia (T3), no 7º dia (T7), no 30º dia (T30) e 6 meses (T6m) após primovacinação contra influenza A (H1N1)pdm09. Amostras de plasma, coletadas em heparina, foram utilizadas para quantificação de anticorpos pelo ensaio de inibição da hemaglutinação e para análise *in vitro* de citocinas intracitoplasmáticas em leucócitos periféricos pós-estimulação antígeno-específica. Amostras de sangue total, coletadas em EDTA, foram utilizadas para a realização do hemograma e análise do perfil fenotípico *ex vivo* de células da imunidade inata/ adaptativa e o plasma obtido, para análise do padrão de citocinas plasmáticas.

4.4 Avaliação dos parâmetros clínicos e reações adversas

Todos os voluntários submetidos à primovacinação contra o vírus da influenza A (H1N1)pdm09 foram acompanhados clinicamente pela médica responsável pelo estudo Dra. Silvana Maria Elói Santos. Uma ficha de registro com os seguintes dados foi preenchida antes da vacinação: nome, sexo, endereço, data de nascimento, história ocupacional, histórico de saúde (patologia e/ou alergia prévias, uso de medicamentos, doação de sangue, uso de bebida alcoólica, última vacinação), anamnese (queixas e/ou doenças atuais, gestação, aleitamento ou possibilidade de gravidez) (APÊNDICE C). Após a vacinação, outra ficha foi disponibilizada para o relato de possíveis reações adversas, contendo os seguintes itens: febre, dor local, eritema local, dor muscular, icterícia, mal estar, cefaléia, dor articular, fadiga, náusea, diarreia, sudorese, hiperemia, tremores, linfadenopatia, insônia, dispepsia, desconforto gástrico, prurido, erupção, lombalgia, rigidez muscular, espasmos musculares, astenia, precordialgia e outros (APÊNDICE D).

4.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos

O perfil hematológico dos voluntários imunizados foi determinado por meio do hemograma completo realizado por técnicas convencionais, utilizando um analisador automático de células sanguíneas (*Advia™60, Bayer HealthCare, Tarrytown, NY, USA*).

4.6 Quantificação dos níveis de anticorpos pelo Ensaio de Inibição da hemaglutinação (HAI)

A avaliação dos níveis de anticorpos neutralizantes foi realizada empregando a técnica de inibição da hemaglutinação descrito no *Manual for the Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza*, sem modificações (WHO, 2011).

4.6.1 Tratamento do plasma

As amostras de plasma coletadas com heparina foram tratadas com RDE (*Receptor Destroying Enzyme - Denka Seiken Co., Ltd*), para remover inibidores não específicos da hemaglutinação. Desta forma, foram adicionados 3 volumes de RDE para 1 volume de plasma. Após incubar a 37°C por 18-20 horas, os tubos foram colocados em banho-maria a 56°C por 30 minutos para inativar o RDE. Os tubos foram equilibrados à temperatura ambiente e em seguida foram adicionados 6 volumes de salina fisiológica nos mesmos (0,85% NaCl).

Para remover aglutininas não específicas das amostras de plasma, foi adicionado 1 volume de concentrado de hemácias para 20 volumes da amostra tratada com RDE. Após incubar os tubos à temperatura de 4 a 8°C por 1 hora, homogeneizando periodicamente para ressuspender as células, os tubos foram centrifugados a 400×g por 10 minutos de 4 a 8°C.

4.6.2 Padronização de antígenos

Para os ensaios de inibição de hemaglutinação foi utilizada como antígeno (hemaglutinina) uma amostra de vírus influenza pandêmico isolado de um paciente em 2010 no Brasil. Esta amostra foi cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz – IOC-FIOCRUZ/RJ. E para iniciar a padronização, o primeiro passo foi avaliar o título hemaglutinante dessa amostra. Para isso, foram utilizadas hemácias de peru a 1% em placas de 96 poços com fundo em V. Resumidamente, as hemácias de peru estabilizadas, adquiridas da empresa *Fitzgerald*, foram lavadas 3 vezes com

50ml de PBS e centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50µL de PBS1x foram adicionados a todos os poços da placa, com exceção daqueles que iriam receber a primeira diluição dos vírus e o controle negativo (o qual recebeu 100µL de PBS1x). E então, foram adicionados 100µL da amostra a viral, que foi diluída seriadamente na placa na diluição 1:2. Finalmente, foram adicionados 50µL de solução de hemácias a 1% em cada poço da placa. Após a homogeneização, a placa foi incubada por 40 minutos e em seguida foi realizada a leitura. O título hemaglutinante foi considerado aquele no qual houve completa hemaglutinação das hemácias.

Baseado na unidade de hemaglutinina (HAU), determinado pelo o ensaio de hemaglutinação, título hemaglutinante da nossa amostra viral foi padronizados a 8 HAU/ 50mL. A fim de verificar se o antígeno estava a 8 HAU/ 50mL, foi realizada um novo ensaio de hemaglutinação (contratitulação). Desta forma, o título hemaglutinante é igual a 8 HAU/ 50ml quando as três primeiras diluições do vírus apresentarem completa hemaglutinação e a quarta em diante apresentar parcial ou nenhuma hemaglutinação.

4.6.3 Ensaio HAI

Após adicionar 50µL de soro tratado com RDE na primeira linha da placa de microtitulação, foram adicionados 25µL de PBS a partir da segunda linha. Realizou-se uma diluição seriada 1:2, homogeneizando 3 a 5 vezes, começando na primeira linha e descartando 25µL na última. Em seguida, foram adicionados 25µL de antígeno padronizado em todos os poços com amostras de soro diluído, e após a homogeneização da placa, a mesma foi incubada à temperatura ambiente por 15 a 30 minutos. Por fim, foram adicionados 50µL de hemácias de peru a 1% em todos os poços com antígeno mais soro, e após a homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 30 a 60 minutos, procedeu-se à leitura. O soro coletado antes da vacinação corresponde ao soro controle. Os poços correspondentes ao controle negativo continham 50µL de hemácia a 1% + 50µL de PBS. Os poços correspondentes ao controle de vírus continham 50µL de hemácia a 1% + 25µL de PBS + 25µL de antígeno padronizado.

4.6.4 Leitura do ensaio HAI

O título do HAI é igual à última diluição do antissoro que inibiu a hemaglutinação completamente (Figura 8).

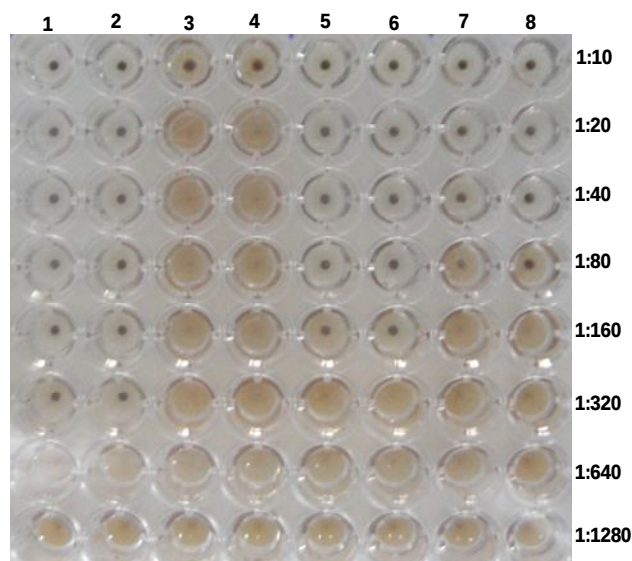


Figura 8. Interpretação do ensaio HAI. As colunas 1 e 2 tem um título HAI de 320, as colunas 3 e 4 tem um título HAI de 10, as colunas 5 e 6 tem um título HAI de 160, a coluna 7 tem um título HAI de 40 e a coluna 8 um título HAI de 80.

4.7 Análise imunofenotípica dos leucócitos do sangue periférico no contexto *ex vivo*

4.7.1 Protocolo de imunofenotipagem celular por citometria de fluxo

Em tubos de poliestireno de 5mL (12x75mm), foram adicionados 2μL do anticorpo monoclonal específico, conjugado com fluorocromo, para o marcador de superfície celular de interesse (Quadro 1). Combinações específicas de anticorpos monoclonais, conjugados com diferentes fluorocromos, foram utilizadas para a análise simultânea de marcadores de superfície celular necessários para a caracterização de subpopulações celulares de interesse. Para cada combinação de anticorpos monoclonais, foram adicionadas alíquotas de 50μL de sangue periférico total coletado em EDTA. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos utilizando 2mL de solução de lise comercial (*FACS™ Lysing Solution – Becton Dickinson (BD)*) diluída 10 vezes em água destilada. Após nova homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (400×g, 10 minutos a 18°C). Então, o sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com 2mL de PBS (0,015M pH 7,4), empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Numa etapa final,

os leucócitos foram fixados com 200µL de solução fixadora (10g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,65g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Logo, as amostras contendo a suspensão celular a ser analisada foram submetidas ao procedimento de aquisição de dados em citômetro de fluxo. A aquisição dos dados (20.000 eventos) foi realizada em citômetro de fluxo - *BD FACScalibur™*, utilizando o *software* do *CellQuest™* e a análise dos resultados foi realizada no *software FlowJo™*, empregando diferentes estratégias.

QUADRO 1. Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.

MARCADOR	FLUOROCROMO	FUNÇÕES/EXPRESSÃO DA MOLÉCULA
Anti-CD3	FITC, PerCP	Associado ao receptor de antígeno de célula T (TCR). Exigido para expressão na superfície celular e para transdução de sinal pelo TCR. Expresso em timócitos e células T.
Anti-CD4	FITC, PE	Correceptor para moléculas do MHC de classe II. Expresso em subgrupos de timócitos, células T (Th1 e Th2), monócitos e macrófagos.
Anti-CD5	FITC	Regula a interação entre linfócitos B e T. Expresso em timócitos, células T, subgrupo de células B.
Anti-CD8	PE, PerCP	Correceptor para MHC de classe I. Expresso em subgrupos de timócitos e células T citotóxicas.
Anti-CD14	PE, PC5	Receptor para complexo de lipopolissacarídeo e proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP). Expresso em células mielomonocíticas.
Anti-CD16	FITC, APC	Componente de baixa afinidade do receptor Fc (FcγRIII). Mede a fagocitose e a citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Expresso em neutrófilos, células NK e macrófagos.
Anti-CD19	APC	Forma complexo com CD21 (CR2) e CD81 (TAPA-1); correceptor para células B. Expresso em células B.
Anti-CD23	PE	Receptor de baixa afinidade para IgE, regula a síntese de IgE. Ligante para o correceptor CD19:CD21:CD81. Expresso em células B maduras, macrófagos ativados, eosinófilos, células dendríticas foliculares e plaquetas.
Anti-CD25	PE	Cadeia α do receptor de IL-2. Expresso em células T ativadas, células B e monócitos.
Anti-CD28	PE	Ativação de células T virgens, receptor para sinal coestimulador (sinal 2), liga CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2). Expresso em subgrupos de células T e células B ativadas.
Anti-CD32	FITC	Receptor Fc (FcγRII) de baixa afinidade para imunoglobulinas agregadas: complexos imunes. Expresso em monócitos, granulócitos, células B e eosinófilos.
Anti-CD38	PE	Glico-hidrolase NAD, aumenta a proliferação de células B.

		Expresso em células T e B precoces, células T ativadas, células B do centro germinativo e plasmócitos.
Anti-CD54	PE	Molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, liga-se com CD11a/CD18, integrina (LFA-1) e integrina CD11b/CD18 (Mac-1). Expresso em células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas.
Anti-CD56	PE	Isoforma da molécula de adesão de células nervosas (NCAM), molécula de adesão. Expresso em células NK.
Anti-CD62L	PE	Molécula de adesão de leucócitos (LAM), liga CD34, GlyCAM, participa das interações de rolamento com o endotélio. Expresso em células B, T e células NK.
Anti-CD64	FITC	Receptor (FcγRI) de alta afinidade para IgG. Mede a fagocitose, a captura do antígeno e a citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Expresso em monócitos e macrófagos.
Anti-CD69	PE	Ativação inicial do antígeno. Expresso em células T e B ativadas, macrófagos ativados e células NK.
Anti-HLA-DR	PE	Molécula de MHC de classe II expressa na superfície de células humanas.
Anti-CCR2	PE	Receptor de quimiocina em monócitos, linfócitos B, células T ativadas, células dendríticas.
Anti-CCR3	FITC	Receptor de quimiocina em eosinófilos, basófilos, subpopulação de células T (tipo 2), células dendríticas, microglia.
Anti-CCR5	FITC	Receptor de quimiocina em subpopulação de linfócitos T (tipo 1) e monócitos.
Anti-CXCR3	FITC	Receptor de quimiocina em subpopulação de linfócitos T (tipo 1), linfócitos B, células NK, monócitos, macrófagos, células endoteliais.
Anti-CXCR4	FITC	Receptor de quimiocina em linfócitos T (tipo 0), linfócitos B, células dendríticas, monócitos e células endoteliais.

Fonte: CD Antigens – Abcam, 2009; Janeway *et al.*, 2010.

4.7.2 Estratégias para análises imunofenotípicas de leucócitos circulantes

Os dados referentes à imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram analisados através de diversas estratégias, dependendo do fenótipo celular rastreado. Assim, empregando os recursos múltiplos do programa *FlowJo*TM foram adotadas diferentes estratégias de análise fenotípica: análise convencional, análise de células T CD4⁺CD25^{High}, análise de células NK maduras e células NKT, análise de monócitos pró-inflamatórios e análise de marcadores constitutivos em monócitos.

4.7.2.1 Análise convencional

A Figura 9 ilustra a sequência de passos para a análise convencional. Este tipo de análise consiste na seleção da população celular de interesse baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (Figura 9A). Após a seleção da região de interesse (R1), o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência (Figura 9B).

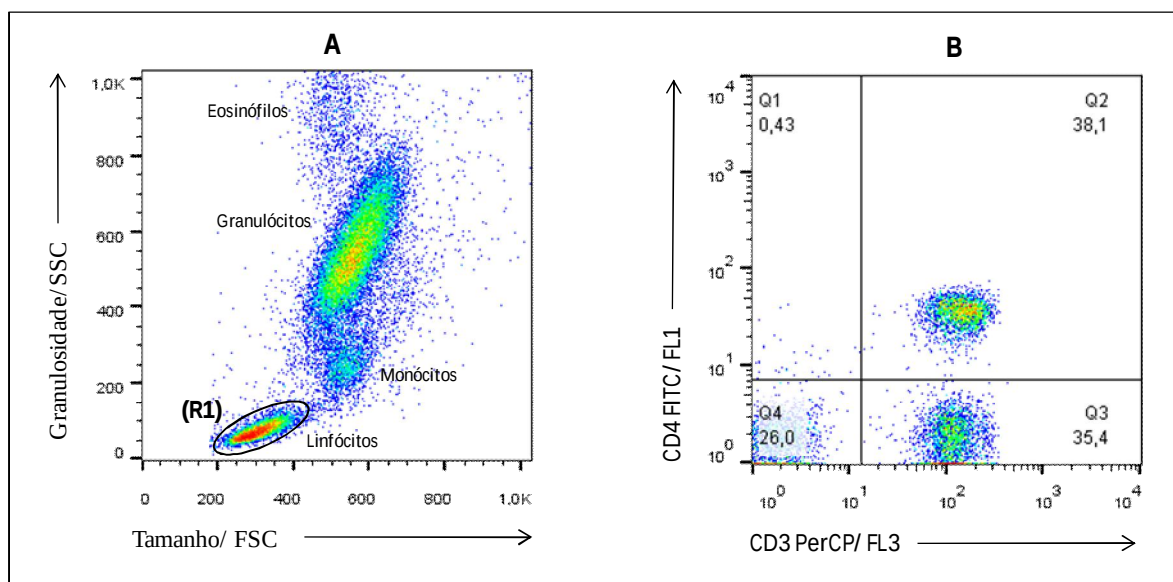


Figura 9. Ilustração da análise convencional de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular considerando tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) para a seleção da população de interesse (R1). B) Perfil de distribuição celular por fluorescência utilizado para quantificar o percentual das populações ou subpopulações celulares específicas, confinadas em R1.

4.7.2.2 Análise de células T CD4⁺CD25^{High}

A Figura 10 ilustra a sequência de procedimentos para a análise de células T CD4⁺CD25^{High}. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (Figura 10A), gráficos de FL1/CD4 *versus* FL2/CD25 foram construídos, permitindo identificar a segregação da população T CD4⁺ em 3 subpopulações: CD4⁺CD25⁻ (R2),

$CD4^+CD25^{Low}$ (R3) e $CD4^+CD25^{High}$ (R4). A fração celular confinada em R4 representa o valor percentual de células T $CD4^+CD25^{High}$ na população de linfócitos totais (Figura 10B).

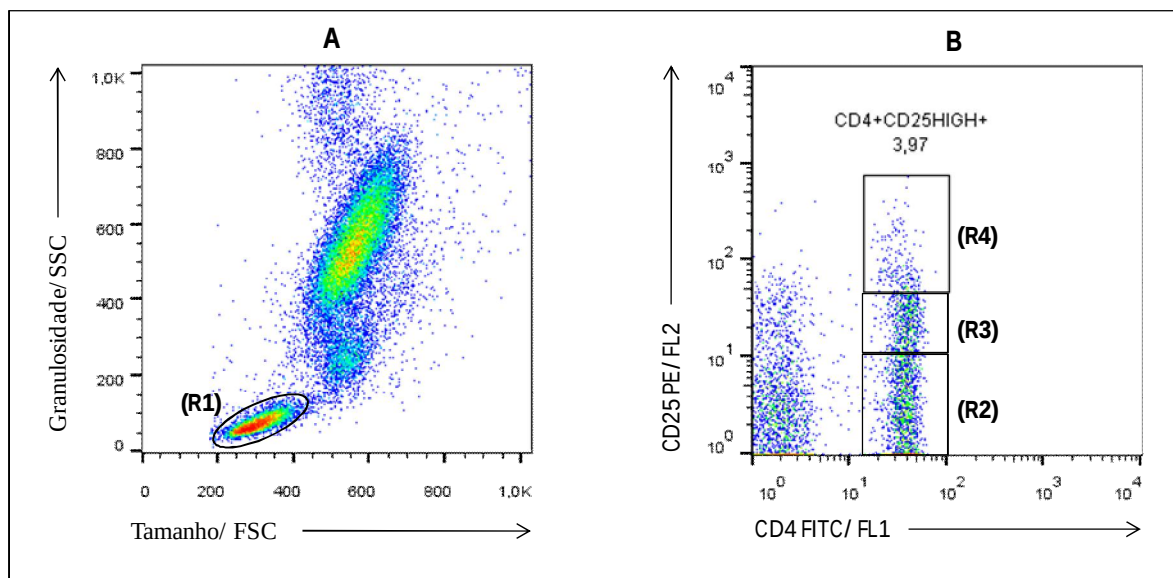


Figura 10. Ilustração da sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T $CD4^+CD25^{High}$ por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular considerando tamanho (FSC) versus granulidade (SSC) para a seleção de linfócitos (R1). B) Perfil de distribuição celular por fluorescência FL1/CD4 versus FL2/CD25 utilizado para quantificar o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}$, confinadas em R4.

4.7.2.3 Análise de células NK maduras e células NKT

A Figura 11 ilustra a sequência de procedimentos para a análise das subpopulações de células NK maduras ($CD3^-CD16^+CD56^+$) e células NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$). Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC) (Figura 11A), foram construídos gráficos de tamanho (FSC) versus FL1/CD3, para a seleção das subpopulações $CD3^-$ (R2) ou $CD3^+$ (R3) (Figura 11B). Após a seleção da região de interesse (R2 ou R3), os percentuais de células NK maduras ou NKT são obtidos através do quadrante duplo positivo em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência CD16 versus CD56 (Figura 11C).

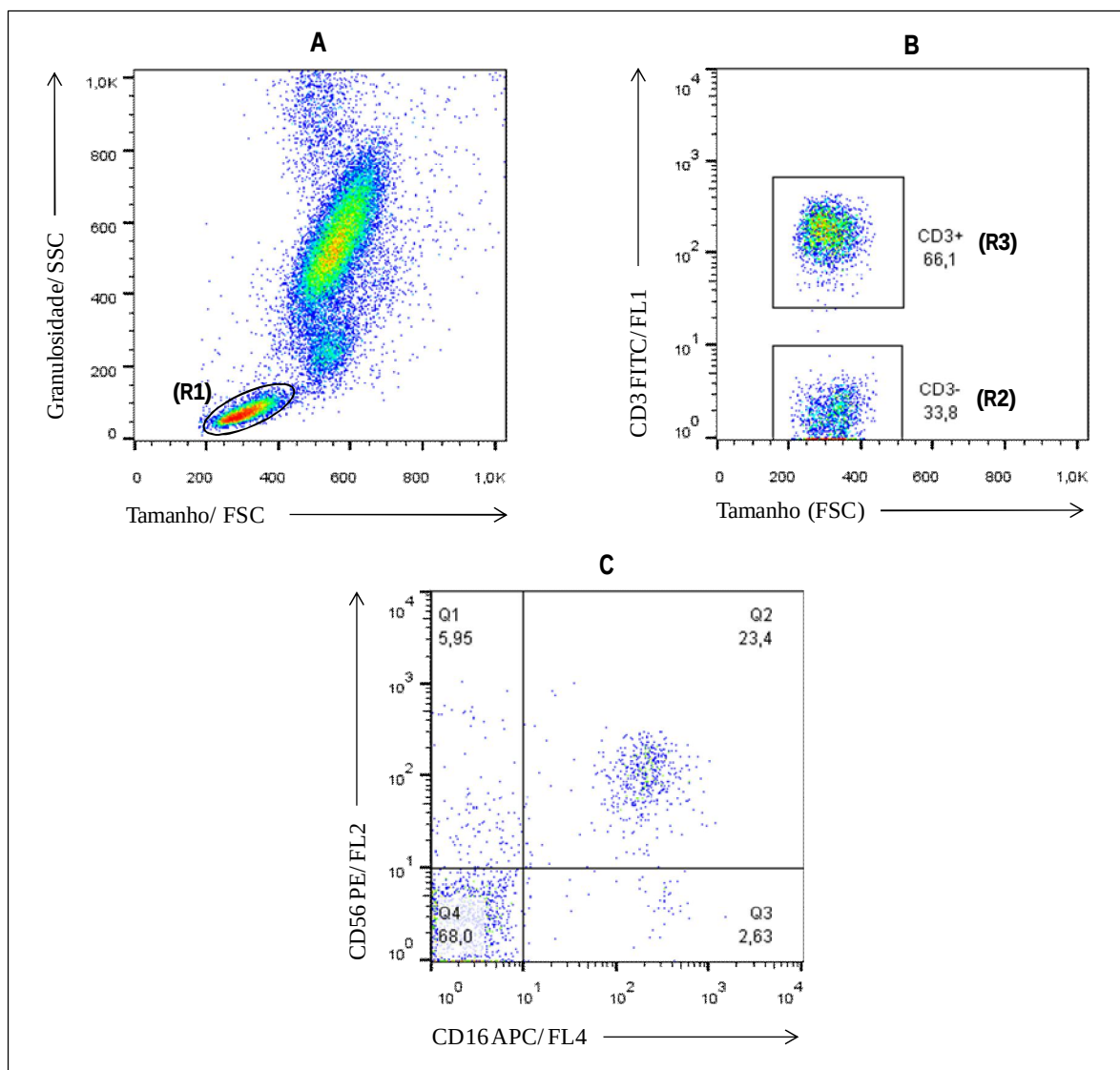


Figura 11. Ilustração da sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais das subpopulações $CD3^-CD16^+CD56^+$ e $CD3^+CD16^+CD56^+$ por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular considerando tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) para a seleção da população de linfócitos (R1). B) Perfil de distribuição celular tamanho (FSC) versus FL1/CD3 utilizado para selecionar as subpopulações celulares $CD3^-$ (R2) e $CD3^+$ (R3). C) Perfil de distribuição celular por fluorescência CD16 versus CD56 utilizado para quantificar as subpopulações de células NK maduras e NKT, confinadas em R2 e R3, respectivamente.

4.7.2.4 Análise de monócitos pró-inflamatórios

A Figura 12 ilustra a sequência de procedimentos para a análise da subpopulação de monócitos pró-inflamatórios. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos e imunofenotípicos, realizada através de gráficos de distribuição pontual de

FL3/CD14 *versus* granulidade (SSC) (Figura 12A), foram construídos gráficos de FL3/CD14 *versus* FL1/CD16, onde uma região (R2) foi construída selecionando a população CD14⁺CD16⁺ (Figura 12B). Após a seleção da região de interesse (R2), o percentual de monócitos pró-inflamatórios é obtido através do quadrante duplo positivo (Q2) em gráficos bidimensionais de distribuição pontual considerando tamanho (FSC) *versus* FL2/HLA-DR (Figura 12C).

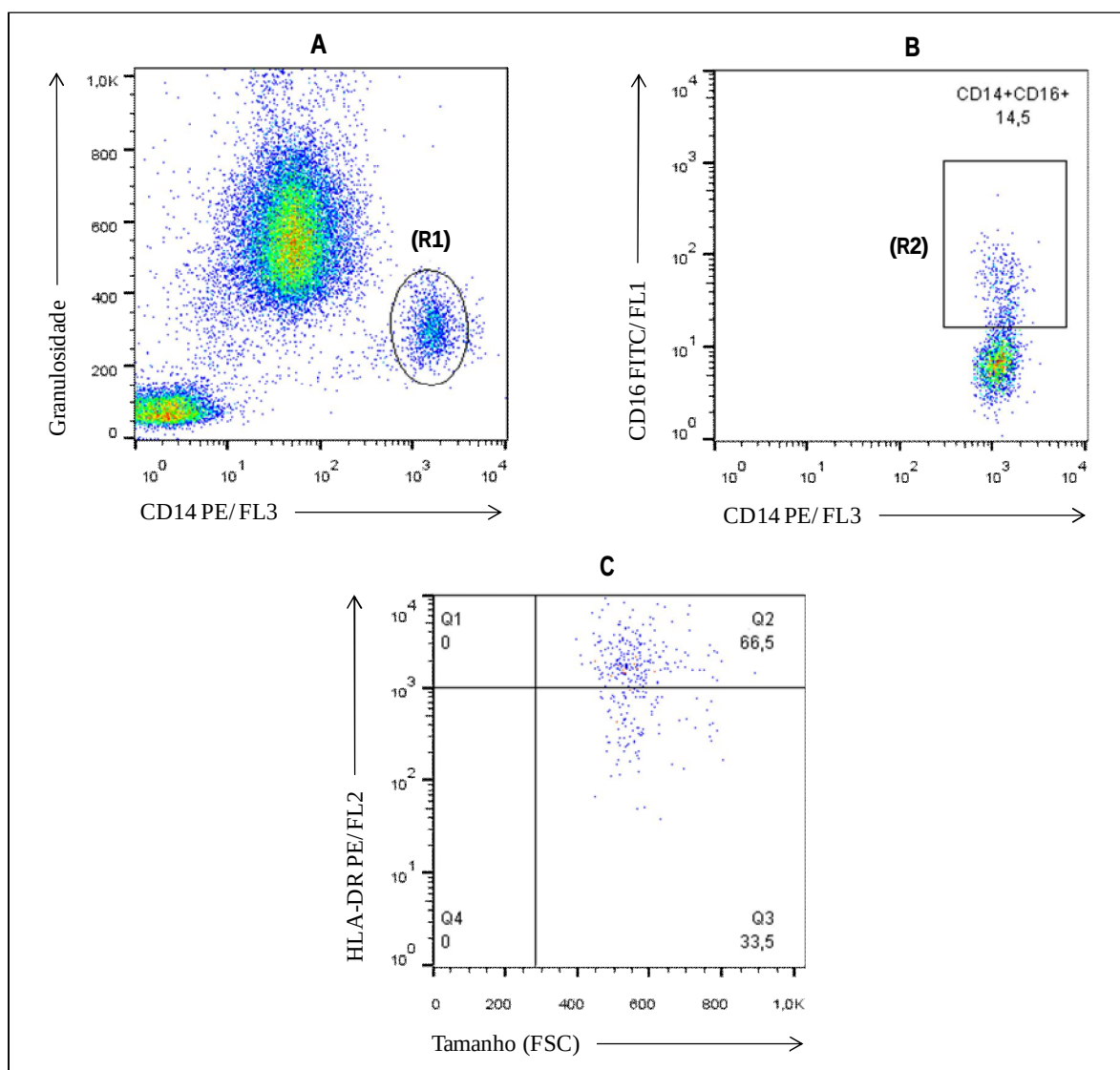


Figura 12. Ilustração da sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de monócitos pró-inflamatórios (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺⁺) por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular FL3/CD14 *versus* granulidade (SSC) utilizado para a seleção da população de células CD14⁺ de granulidade intermediária, correspondente aos monócitos (R1). B) Perfil de distribuição celular FL3/CD14 *versus* FL1/CD16 utilizado para

selecionar a população $CD14^+CD16^+$ (R2). C) Perfil de distribuição celular tamanho (FSC) *versus* HLA-DR utilizado para quantificar a subpopulação de células $CD14^+CD16^+HLA-DR^{+++}$.

4.7.2.5 Análise de marcadores constitutivos em monócitos

A figura 13 ilustra a sequência de procedimentos para a análise de marcadores constitutivos em monócitos. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos e imunofenotípicos, realizada através de gráficos de distribuição pontual de FL2/CD14 *versus* granulosidade (SSC) (Figura 13A), foi calculada a intensidade média de fluorescência (MFI) do marcador avaliado e selecionada a opção de histograma de fluorescência (Figura 13B).

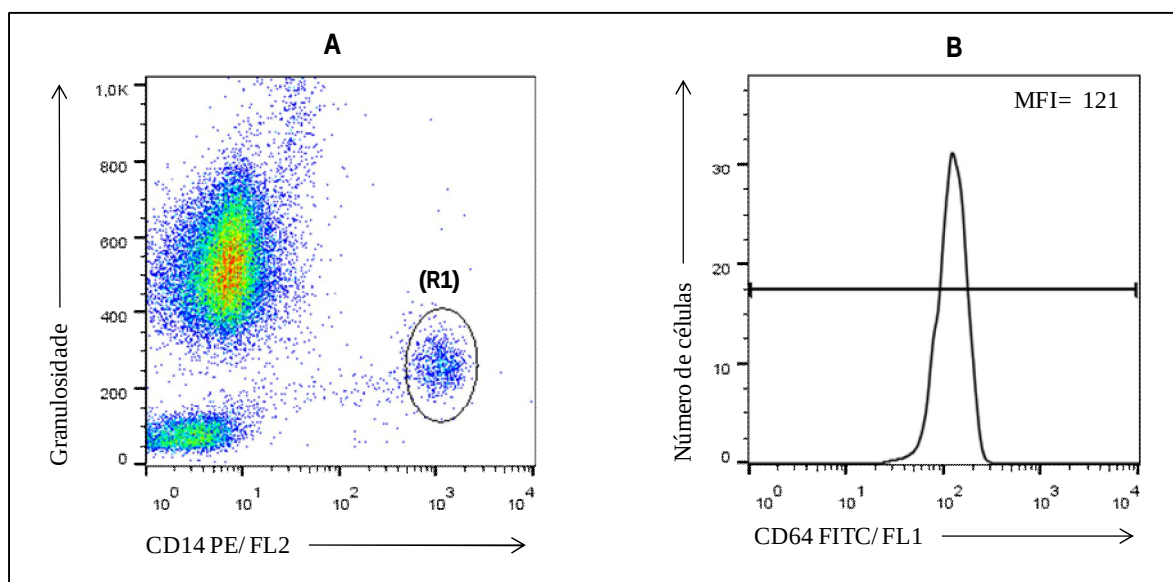


Figura 13. Ilustração da sequência de procedimentos utilizados para a avaliação da intensidade média de fluorescência de marcadores constitutivos em monócitos por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular FL3/CD14 *versus* granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de células $CD14^+$ de granulosidade intermediária, correspondente aos monócitos (R1). B) Histograma unidimensional de fluorescência FL1/CD64 e quantificação da intensidade média de fluorescência do marcador $CD64^+$ na população de células $CD14^+$.

4.7.2.6 Análise do marcador constitutivo CD32 em linfócitos B

A figura 14 ilustra a sequência de procedimentos para a análise do marcador constitutivo CD32 em linfócitos B. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus*

granulosidade (SSC) (Figura 14A), foi calculada a intensidade média de fluorescência (MFI) do marcador avaliado e selecionada a opção de histograma de fluorescência (Figura 14B).

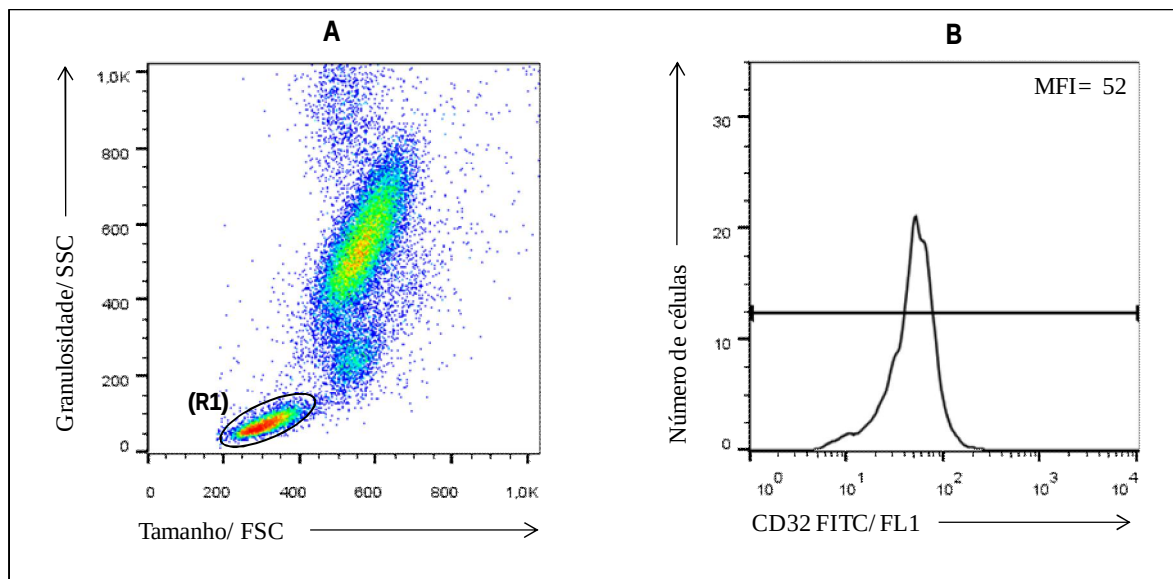


Figura 14. Ilustração da sequência de procedimentos utilizados para a avaliação da intensidade média de fluorescência de marcadores constitutivos em linfócitos por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular considerando tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) para a seleção da população de linfócitos (R1). B) Histograma unidimensional de fluorescência FL1/CD32 e quantificação da intensidade média de fluorescência do marcador CD32⁺ na população linfócitos.

4.8 Microcultura de células de sangue periférico e marcação de superfície e de citocinas intracitoplasmáticas

Para avaliar a produção de citocinas por leucócitos circulantes foram realizadas microculturas de curta duração (16 horas), na ausência de estimulação antigênica (cultura controle) e na presença de antígenos vacinais (cultura estimulada). A metodologia foi realizada como descrito por Peruhype-Magalhães *et al.*, (2006), modificado conforme descrito a seguir.

Alíquotas de 750µL de sangue periférico coletado a vácuo em tubos de 10mL contendo heparina sódica foram adicionadas, em triplicata, em tubos de polipropileno de 14mL, contendo 750µL de RPMI-1640 e 37,5µL de diluente de vacina, os quais foram identificados como cultura controle (não estimulada); e em tubos de polipropileno de 14mL, contendo 750µL de RPMI-1640 e 37,5µL de vacina, identificados como cultura estimulada. As culturas foram incubadas em

estufa de CO₂ com 5% de umidade, a 37°C (*Thermo Scientific*), por 16 horas. Este tempo de incubação foi previamente determinado por estudos comparativos com diferentes tempos de incubação. Após o período de incubação, 15µL de Brefeldina A (SIGMA 1mg/mL concentração final de 10 mg/mL) foram adicionados a todos os tubos de cultura. A utilização da Brefeldina A promove a retenção da citocina no complexo de Golgi, permitindo sua detecção no interior celular. As amostras foram submetidas à incubação por mais 4 horas, em estufa de CO₂ com 5% de umidade, a 37°C. Após esta incubação, 165µL de EDTA (SIGMA) 20mM, obtidos de uma solução estoque de 200mM, diluída 1/10 (concentração final de 2mM), foram adicionados diretamente às culturas. Este procedimento bloqueia eventuais processos de ativação celular e garante a obtenção de resultados padronizados. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Para a realização da marcação imunofenotípica e das citocinas intracitoplasmáticas, as amostras de sangue cultivadas em triplicata foram vertidas em um só tubo, no qual foi acrescentado 6mL de PBS-Wash (PBS-W) (PBS 0,015M, pH 7,4 contendo 0,5% de albumina bovina sérica – BSA e 0,1% de azida sódica – reagentes SIGMA). E as amostras foram centrifugadas a 400×g, por 10 minutos, a 18°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em vórtex e o processo de lavagem foi repetido com 6mL de PBS-W. Após a centrifugação, todo sobrenadante foi aspirado, o volume foi ajustado com PBS-W para 1mL e a suspensão de células foi distribuída em tubos de poliestireno 22x75mm contendo anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos (Quadro 2), conforme descrito a seguir. Foram distribuídos 300µL da cultura para os tubos contendo 8µL anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, 100µL para os tubos com 4µL de anti-CD14 e anti-CD19 e 200µL para os tubos contendo 6µL anti-CD16, anti-CD56 e anti-CD3. Após homogeneização em vórtex, as amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando 4mL de solução de lise comercial (*BD FACSTM Lysing Solution*) por 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, as preparações celulares foram centrifugadas 400×g, por 10 minutos, a 18°C, e após verter o sobrenadante as amostras foram permeabilizadas com 0,5mL de PBS-W e 3mL de PBS-permeabilizante (PBS-P) (PBS 0,015M, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina - reagentes SIGMA) por 10 minutos, à temperatura ambiente. A suspensão celular foi centrifugada a 400×g, por 10 minutos, a 18°C e lavada novamente com 3mL de PBS-W. Posteriormente, 30µL das células permeabilizadas foram incubadas em microplacas de 96

poços, de fundo em “U”, contendo 10µL da respectiva solução de anticorpos anticitocinas marcados com Ficoeritrina (PE), a uma diluição de 1:10 em PBS-P (Quadro 3). As amostras foram novamente incubadas durante 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 120µL de PBS-P e, em seguida, com 150µL de PBS-W. Ao final, foram adicionados 150µL de solução fixadora (10g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio e 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). As amostras contendo a suspensão celular a ser analisada foram transferidas para tubos de 500µL (*Thomas Laboratory Specialities*) e, posteriormente, submetidas ao procedimento de aquisição de dados em citômetro de fluxo. A aquisição dos dados (30.000 eventos) foi realizada em citômetro de fluxo - *BD FACScalibur™*, utilizando o *software CellQuest™* e a análise dos resultados foi realizada utilizando o *software FlowJo™*.

QUADRO 2. Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados para análise de populações e subpopulações de leucócitos do sangue periférico.

MARCADOR	FLUOROCROMOS	CÉLULAS IDENTIFICADAS
Anti-CD3	TC	Linfócitos T
Anti-CD4	CyQ	Linfócitos T auxiliar
Anti-CD8	FITC	Linfócito T citotóxico
Anti-CD16	APC	Células NK
Anti-CD19	FITC	Linfócitos B
Anti-CD56	FITC	Células NK

QUADRO 3. Anticorpos monoclonais utilizados para identificação de citocinas intracelulares em leucócitos do sangue periférico.

MARCADOR	FLUOROCROMOS	FUNÇÕES/ FONTES DAS CITOCINAS
Anti-IFN-γ	PE	Ativação de macrófagos, aumento da expressão de moléculas de MHC e dos componentes do processamento de antígenos, mudança de classe de Ig, supressão de Th2. Produzido por células T e células NK.
Anti-TNF-α	PE	Inflamação local, ativação endotelial. Produzido por macrófagos, células NK e células T.
Anti-IL-4	PE	Ativação de células B, mudança para IgE, induz a diferenciação em células Th2. Produzido por células T e mastócitos.
Anti-IL-5	PE	Crescimento de eosinófilos, diferenciação. Produzido por células T

		e mastócitos.
Anti-IL-6	PE	Crescimento e diferenciação de células B e T, produção de proteínas de fase aguda, febre. Produzido por células T, macrófagos e células endoteliais.
Anti-IL-8	PE	Fator quimiotático para neutrófilos e outros granulócitos. Induz a fagocitose e promove a angiogênese.
Anti-IL-10	PE	Potente supressor das funções dos macrófagos e linfócitos T. Produzido por monócitos.
Anti-IL-12	PE	Ativa células NK, induz a diferenciação das células T CD4 ⁺ em células do <i>Tipo 1</i> . Produzido por macrófagos e células dendríticas.
Anti-IL-13	PE	Crescimento e diferenciação das células B, inibe a produção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos e células Th1, induz alergia e asma. Produzido por células T.
Anti-IL-17	PE	Induz a produção de citocinas pelas células epiteliais, pelo endotélio e por fibroblastos, normalmente pró-inflamatória. Produzido por Th17, células T CD8 ⁺ células NK, células T $\gamma:\delta$ e neutrófilos.

Fonte: Sigal, 2004; Sigal, 2005; Janeway *et al.*, 2010.

4.8.1 Estratégias de análises de citocinas intracitoplasmáticas em subpopulações de leucócitos circulantes

Os dados referentes à pesquisa de citocinas intracitoplasmáticas em leucócitos do sangue periférico foram analisados através de diversas estratégias, dependendo do fenótipo celular rastreado. Assim, empregando os recursos múltiplos do programa *FlowJo*TM, foram adotadas diferentes estratégias para análise funcional das células, descritas a seguir.

4.8.1.1 Análise de citocinas intracitoplasmáticas em células NK

A análise da produção de citocinas por células NK foi feita a partir da construção de gráficos de fluorescência tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) e, os linfócitos discriminados como células FSC^{Low}SSC^{Low} (R1) (Figura 15A). Em seguida, foi realizada seleção da população CD3⁻CD16⁺ (R2) ou CD3⁻CD56⁺ (R3) em gráficos de fluorescência FL3/CD3 TC *versus* FL4/CD16 APC (Figura 15B) e FL3/CD3 TC *versus* FL1/CD56 FITC (Figura 15D), respectivamente. Uma vez selecionada a região de interesse (R2 ou R3), a frequência de células NK produtoras de citocinas foi obtida através do quadrante duplo positivo (Q2) em gráficos bidimensionais de distribuição pontual considerando FL4/CD16 *versus* FL2/anticitocina PE (Figura 15C) ou FL1/CD56 *versus* FL2/anticitocina PE (Figura 15E).

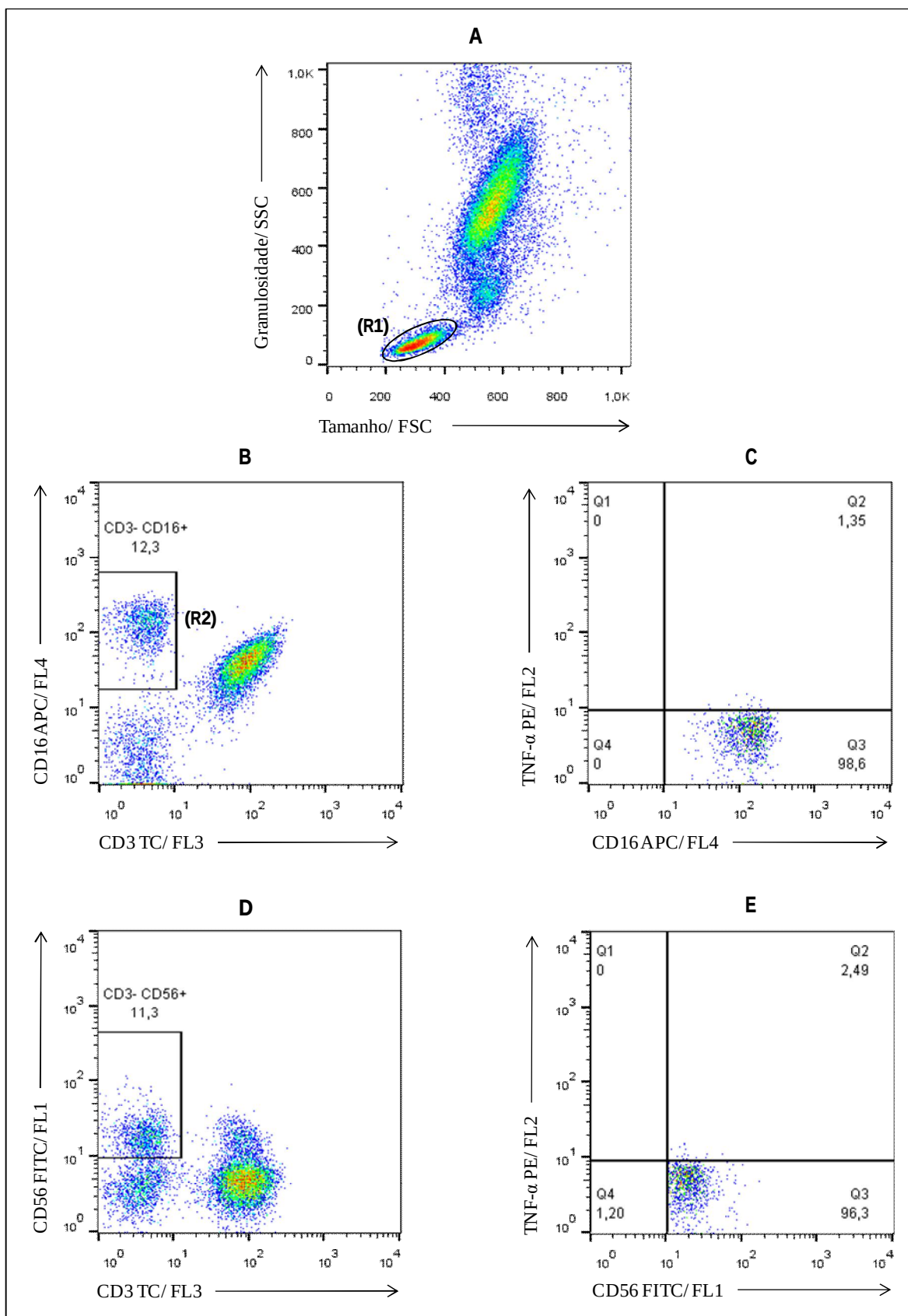


Figura 15. Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por células NK do sangue periférico por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular considerando tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) para a seleção da população de linfócitos (R1). B) Perfil de distribuição celular FL3/CD3 TC *versus* FL4/CD16 APC utilizado para a seleção da população de células NK CD3⁻CD16⁺ (R2). C) Perfil de distribuição FL4/ CD16 *versus* FL2/anticitocina PE utilizado para quantificar a frequência de células NK (CD3⁻CD16⁺) produtoras de citocina. D) Perfil de distribuição celular FL3/CD3 TC *versus* FL1/CD56 FITC utilizado para a seleção da população de células NK CD3⁻CD56⁺ (R3). E) Perfil de distribuição FL1/ CD56 *versus* FL2/anticitocina PE utilizado para quantificar a frequência de células NK (CD3⁻CD56⁺) produtoras de citocina.

4.8.1.2 Análise de citocinas intracitoplasmáticas em subpopulações de linfócitos T

A análise da produção de citocinas por linfócitos T foi feita a partir da construção de gráficos de fluorescência tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) e, os linfócitos discriminados como células FSC^{Low}SSC^{Low} (R1) (Figura 16A). Após a seleção da região de interesse (R1), a frequência linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ produtores de citocinas foi obtida através do quadrante duplo positivo (Q2) em gráficos bidimensionais de distribuição pontual considerando FL3/CD4 *versus* FL2/anticitocina PE (Figura 16B) ou FL1/CD8 *versus* FL2/anticitocina PE (Figura 16C).

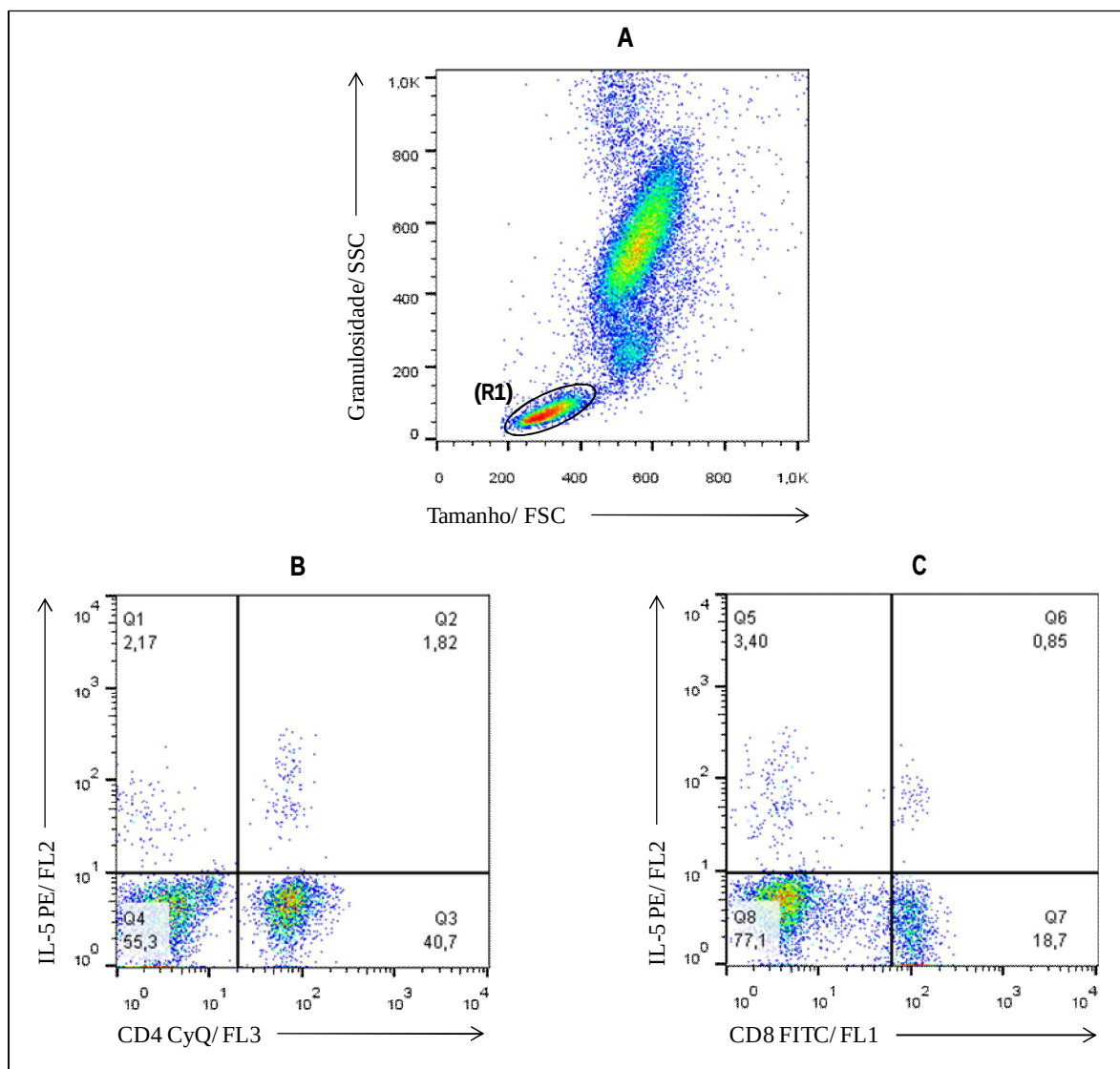


Figura 16. Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por subpopulações de linfócitos T do sangue periférico por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular considerando tamanho (FSC) versus granulidade (SSC) para a seleção da população de linfócitos (R1). B) Perfil de distribuição FL3/CD4 versus FL2/anticitocina PE utilizado para quantificar a frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de citocina. C) Perfil de distribuição FL1/CD8 versus FL2/anticitocina PE utilizado para quantificar a frequência linfócitos T CD8⁺ produtores de citocina.

4.8.1.3 Análise de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos B

A análise da produção de citocinas por linfócitos B foi feita a partir da construção de gráficos de fluorescência tamanho (FSC) versus granulidade (SSC) e, os linfócitos discriminados como células FSC^{Low}SSC^{Low} (R1) (Figura 17A). Após a seleção da região de

interesse (R1), a frequência linfócitos B produtores de citocinas foi obtida através do quadrante duplo positivo (Q2) em gráficos bidimensionais de distribuição pontual considerando FL1/CD19 *versus* FL2/anticitocina PE (Figura 17B).

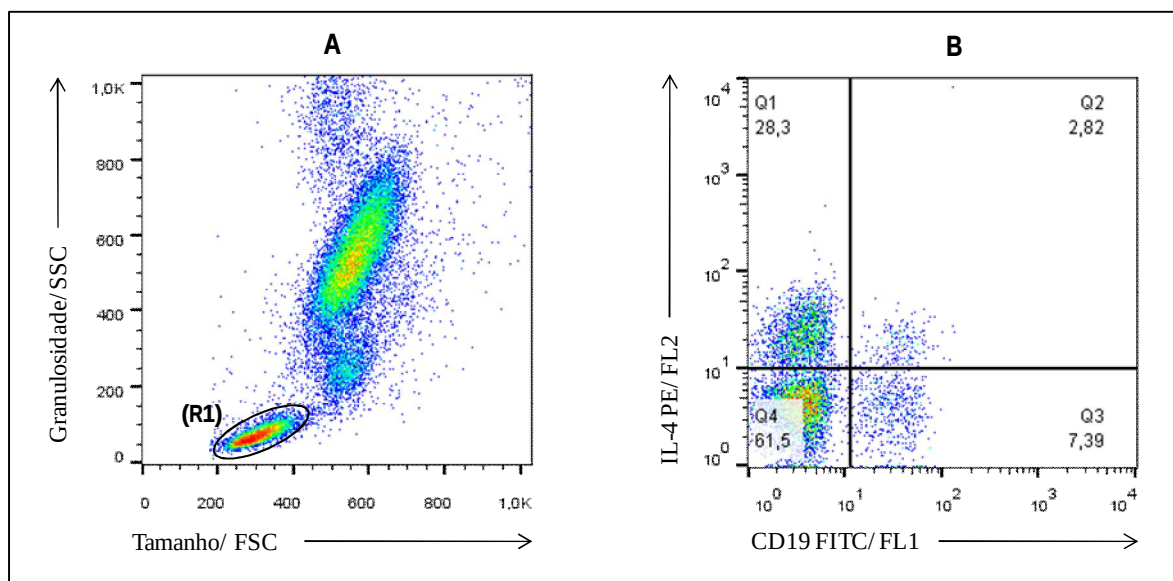


Figura 17. Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos B do sangue periférico por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular considerando tamanho (FSC) *versus* granulidade (SSC) para a seleção da população de linfócitos (R1). B) Perfil de distribuição FL1/CD19 *versus* FL2/anticitocina PE utilizado para quantificar a frequência de linfócitos B produtores de citocina.

4.9 Análise dos níveis plasmáticos de citocinas

A avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF) dos indivíduos imunizados foi realizada através do ensaio com microesferas fluorescentes denominado “*Cytometric Bead Array*” (*Human Inflammation CBA Kit – BD*). A metodologia CBA permite a avaliação simultânea de diversas citocinas/quimiocinas no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Assim, alíquotas de 25 μ L de plasma teste diluído 1:5 com diluente G (reagente presente no kit CBA), alíquotas de 25 μ L dos padrões de citocinas, submetidos à diluição seriada com diluente G (“*Top Standard*” - 5000pg/mL, 1:2 - 2500pg/mL, 1:4 - 1250pg/mL, 1:8 - 625pg/mL, 1:16 - 312,5pg/mL, 1:32 - 156pg/mL, 1:64 - 80pg/mL, 1:128 - 40pg/mL e 1:256 - 20pg/mL) e 25mL de diluente G apenas (Controle Negativo), foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 15 μ L da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IL-1 β , IL-6, IL-8,

IL-10, IL-12p70, TNF, com subsequente incubação por 90 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500µL da solução F (“Wash buffer”, reagente presente no kit CBA) e, o sobrenadante, cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram então reincubadas na presença de 20µL do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos anticitocinas humanas marcadas com PE, por 90 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com 500µL da solução F e, o sobrenadante, cuidadosamente aspirado e descartado. Por fim, as esferas foram ressuspensas em 250µL de reagente F e um total de 1.800 eventos foram adquiridos no *BD FACSCalibur™* e analisados no *software FlowJo™* (Figura 18).

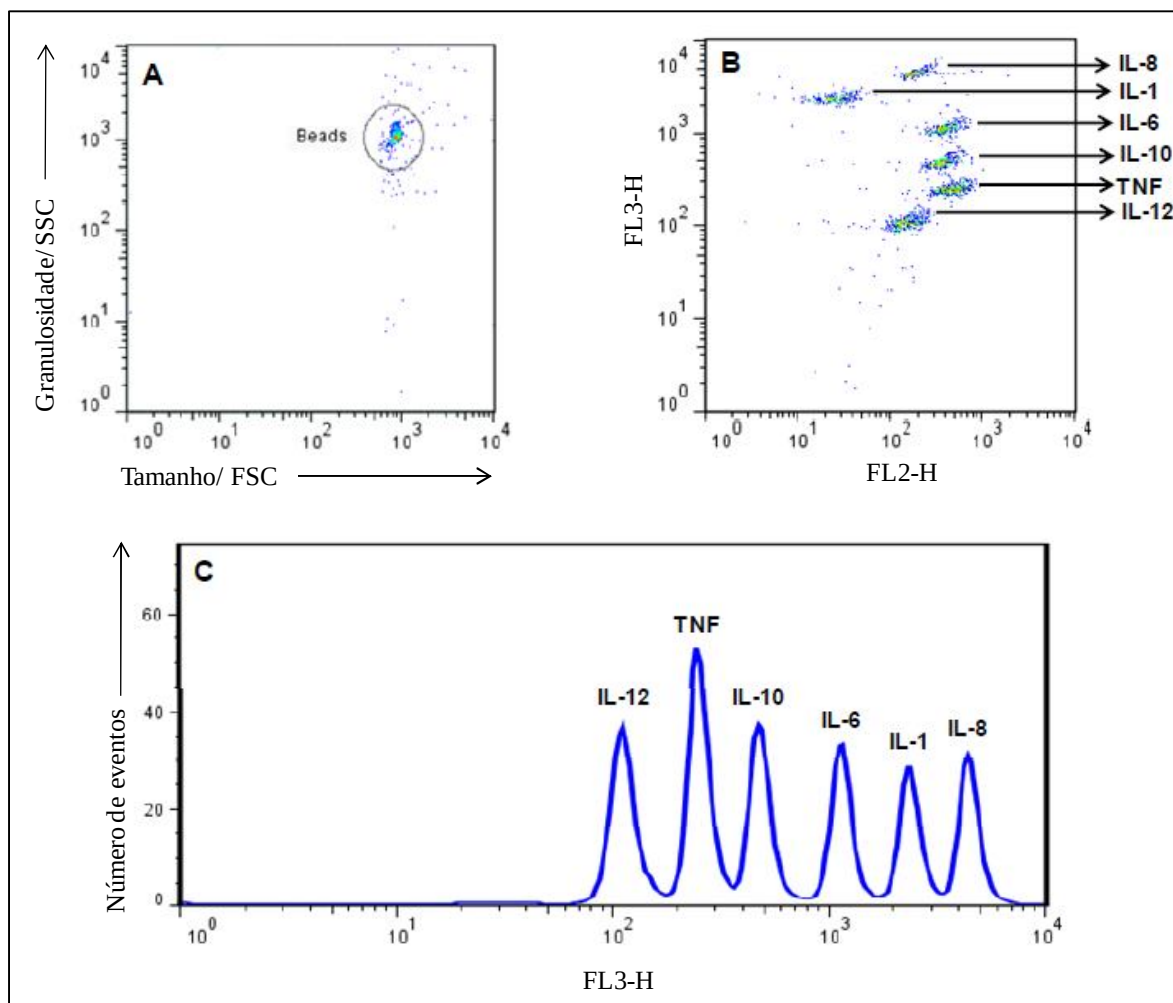


Figura 18. Representação esquemática da análise de citocinas, através do ensaio de CBA. (A) Delimitação da região de microesferas, através de gráficos de densidade de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC). (B) Discriminação das microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura de citocinas com diferentes

intensidades de fluorescência, em gráficos de densidade/FL2 *versus* FL3. (C) Histograma das microesferas, ao longo do eixo X (FL3), no qual se avalia a intensidade de fluorescência 3 (FL3) *versus* número de eventos, capazes de discriminar as diferentes microesferas.

4.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do *software Graph Pad Prism 5.0™* (San Diego, California). Para avaliar as alterações pós-imunização, considerando amostras pareadas não paramétricas, utilizou-se o teste *Wilcoxon*, comparando os dados de cada tempo em relação ao tempo 0 (T0 – antes da vacinação). Para a análise de correlação dos dados utilizou-se o coeficiente de correlação de *Spearman*. Independente da avaliação estatística empregada, os resultados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de *p* foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

4.11 Redes de correlação

Após o cálculo do *r* de *Spearman*, os dados foram filtrados no *Software Microsoft Office Excel™*, sendo selecionados apenas os valores estatisticamente significativos, os quais foram transferidos para uma matriz de correlação construída neste mesmo programa. Esta matriz, além de calcular a intensidade da correlação e caracterizá-la como positiva ou negativa, também gera as tabelas para a leitura pelo programa *Cytoscape™*, onde as redes de correlação são geradas e tratadas.

5 RESULTADOS

Os resultados a seguir estão apresentados de acordo com os objetivos específicos propostos.

5.1 Reações adversas e alterações hematológicas de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09

5.1.1 Reações adversas pós-imunização

A avaliação clínica dos voluntários pós-imunização é de suma importância na identificação de possíveis sinais e sintomas desencadeados após o contato do sistema imunológico do indivíduo com o antígeno vacinal. Desta forma, na avaliação clínica dos voluntários submetidos à vacinação foi possível observar que alguns indivíduos apresentaram uma ou mais reações adversas à vacina. Tais reações, entretanto, foram de intensidade leve a moderada e apenas um voluntário relatou mais de 5 sintomas diferentes. Este indivíduo, que recebeu a vacina sem adjuvante, apresentou um caso atípico relatando as seguintes reações adversas: febre, dor local, dor muscular, mal estar, cefaléia, fadiga, diarreia, sudorese, dispepsia, desconforto gástrico, lombalgia, dor nos olhos e dor de garganta. Nenhum evento adverso grave pós-vacinação foi observado.

No geral, o grupo de voluntários que recebeu a vacina com adjuvante apresentou mais reações adversas à vacina do que o grupo que recebeu a vacina sem adjuvante (QUADRO 4). Neste último, três voluntários relataram 1 ou 2 reações adversas e apenas o indivíduo descrito anteriormente apresentou mais de 5 reações diferentes. No grupo com adjuvante quatro indivíduos relataram 4 ou 5 reações adversas e dois indivíduos relataram 1 ou 2 reações. Os sintomas mais frequentes foram: dor local, dor muscular, mal estar, cefaléia e sudorese.

REAÇÕES ADVERSAS	Nº DE PESSOAS (n=9) (vacina sem adjuvante)	Nº DE PESSOAS (n=10) (vacina com adjuvante)
Febre	0	0
Dor local	0	5
Eritema local	0	2
Dor muscular	0	2
Mal estar	1	3
Cefaléia	1	4

Dor articular	0	1
Fadiga	0	0
Náusea	0	1
Diarréia	0	0
Sudorese	2	1
Linfadenopatia	0	1
Dispepsia	0	0
Desconforto gástrico	0	1
Lombalgia	0	1
Outros	0	0
TOTAL	4	22

Quadro 4. Número de relatos de determinada reação adversa nos grupos que receberam as vacinas sem e com adjuvante. Na primeira coluna estão descritas as reações adversas que estavam contidas na ficha pós-imunização, nas demais colunas estão listados o número de pessoas que relataram determinada reação após a vacinação na ausência e presença de adjuvante. Na última linha está o total de reações adversas relatadas em cada grupo. O caso atípico foi excluído deste quadro por trazer um viés na interpretação da análise.

5.1.2 Alterações hematológicas dos voluntários imunizados

O hemograma é um exame que permite, entre outras análises, uma avaliação geral das alterações no balanço dos componentes celulares do sangue em resposta a estímulos antigênicos. E os parâmetros hematológicos considerados na avaliação do hemograma dos voluntários imunizados foram: contagem de hemácias, plaquetas, leucócitos totais e fração (granulócitos, monócitos e linfócitos).

As análises hematológicas apresentaram alterações estatisticamente significativas apenas no grupo que recebeu a vacina com adjuvante, e os únicos parâmetros que não apresentaram alterações foram hemácias e plaquetas. Nesse grupo observou-se que apenas um dia (T1) após a vacinação houve um aumento significativo no número de leucócitos totais em relação ao tempo zero (T0 – antes da vacinação), seguido de uma queda significativa destas células três dias (T3) após a administração da vacina. Esta elevação de leucócitos parece estar relacionada ao aumento significativo de granulócitos no 1º dia (T1) após a imunização dos voluntários, com consequente queda do percentual de linfócitos neste tempo. Um aumento significativo do percentual de monócitos pode ser observado três dias (T3) após a vacinação (Figura 19).

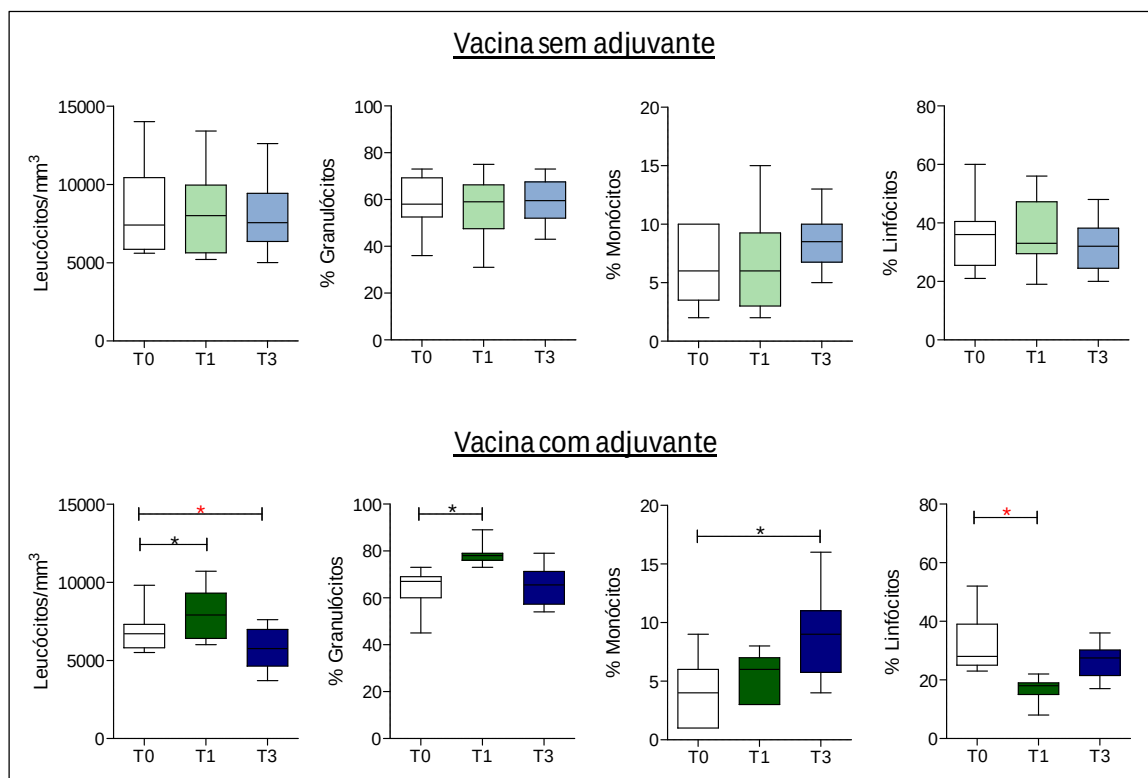


Figura 19. Parâmetros hematológicos dos voluntários pós-imunização contra influenza A (H1N1)pdm09. Os resultados estão apresentados em gráficos *Boxplot*, em que são representados a mediana e intervalos interquartis dos parâmetros celulares avaliados para cada grupo imunizado com as vacinas (com e sem adjuvante), nos tempos: antes da vacinação (T0), 1 dia (T1) e três dias (T3) pós-vacinação. O tempo zero (T0) esta representado pela cor branca, o tempo 1 dia (T1) pela cor verde, o tempo 3 dias (T3) pela cor azul, sendo que a vacina sem adjuvante está representada por tons mais claros e a vacina com adjuvante por tons mais escuros. Após o 3º dia (T3) os parâmetros hematológicos retornaram aos níveis de normalidade e por isso não foram representados na figura. As diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre cada tempo em relação ao tempo zero (antes da vacinação) estão representadas por asterisco (*).

5.2 Níveis de anticorpos anti-H1N1 no plasma de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09

Através do ensaio de inibição da hemaglutinação (HAI), é possível avaliar a soroconversão dos indivíduos vacinados e quantificar o nível de anticorpos inibidores específicos à hemaglutinina viral, através do título de inibição de hemaglutinação. O título considerado protetor é de $\geq 1:40$ (WHO, 2011).

Os resultados do ensaio mostraram que 30 dias (T30) após a vacinação contra influenza todos os voluntários soroconverteram, independente do tipo de vacina administrada, isto é, contendo ou não adjuvante. No geral, os títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação decaíram 6 meses (T6m) após a imunização em ambos os grupos, porém todos os voluntários ainda permaneciam com um título considerado protetor (Figura 20).

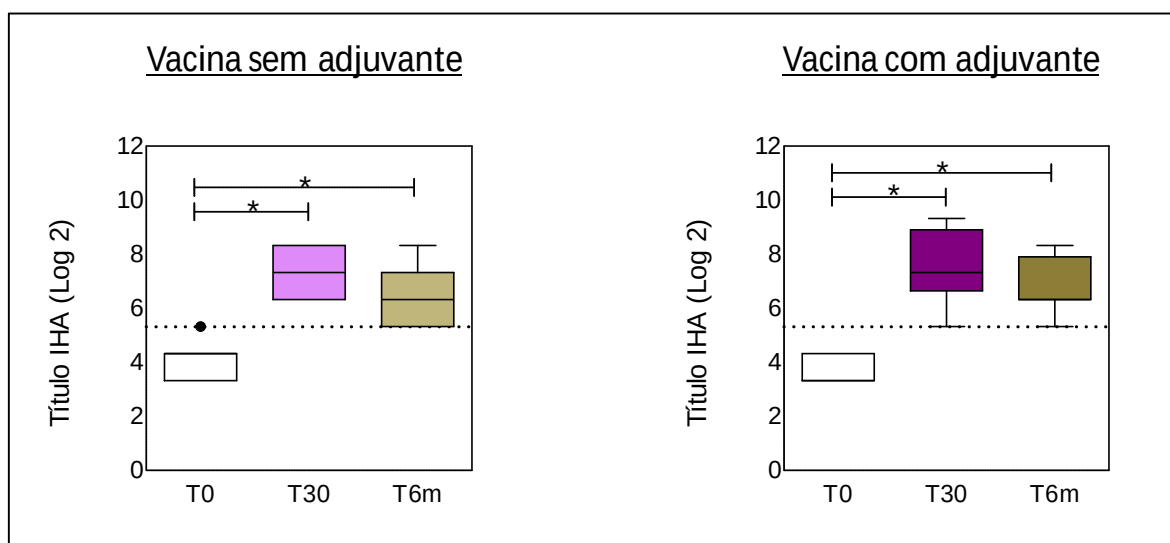


Figura 20. Quantificação do nível de anticorpos no plasma de voluntários submetidos à imunização contra influenza A (H1N1)pdm09. Os resultados estão apresentados em gráficos *Boxplot*, em que são representados a mediana e intervalos interquartis dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação em ambos os grupos imunizados (com e sem adjuvante), antes da vacinação (T0), 30 dias (T30) e 6 meses (T6m) pós-imunização. O tempo 0 (T0) está representado pela cor branca, o tempo 30 dias (T30) está representado em roxo e o tempo 6 meses (T6m) em bege, sendo que a vacina sem adjuvante está representada por tons mais claros e a vacina com adjuvante por tons mais escuros. As diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre cada tempo em relação ao tempo 0 (antes da vacinação) estão representadas por asterisco (*).

5.3 Perfil *ex vivo* das alterações fenotípicas da imunidade celular em leucócitos do sangue periférico de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09

A análise imunofenotípica das células, no contexto *ex vivo*, por citometria de fluxo permite avaliar e quantificar a expressão de diversos marcadores de superfície celular para a identificação de diferentes fenótipos celulares de interesse.

Para apresentação dos resultados desta análise foram construídos gráficos com os valores de *baseline folds* (valor obtido em cada tempo dividido pelo valor obtido no tempo zero

correspondente). O cálculo do *baseline folds* objetiva normalizar os dados eliminando quaisquer diferenças que possam haver entre os tempos zero (T0) dos grupos, possibilitando assim, a observação das diferenças reais entre as vacinas, além de uniformizar a escala, permitindo melhor comparação entre diferentes variáveis. O tempo zero (T0) no *baseline folds* será sempre 1 (100%), sendo que todos os valores acima de 1 indicam que houve um aumento da variável, e valores abaixo indicam diminuição com relação ao tempo zero (T0). A análise estatística foi realizada com os dados brutos e cada tempo foi avaliado em relação ao tempo zero (T0) para cada um dos fenótipos avaliados.

Em uma visão geral dos resultados (Figura 21) fica evidente que a vacina com adjuvante promoveu maior ativação celular refletindo na expressão dos fenótipos avaliados. Esta ativação pode ser observada desde o 1º dia após a vacinação (T1), se mantendo até o 7º dia pós-vacinação (T7). Por outro lado, a vacina sem adjuvante além de induzir poucas alterações fenotípicas estas foram mais tardias e observadas principalmente no 7º dia pós-vacinação (T7). No 30º dia pós-vacinação (T30) não houve muitas alterações na expressão das moléculas avaliadas e o perfil fenotípico observado não parece ter ainda qualquer relação com a vacinação.

Ao realizar uma análise mais acurada das alterações fenotípicas promovidas pelas vacinas podemos verificar que no 1º dia pós-vacinação (T1) a vacina sem adjuvante não foi capaz de induzir alterações significativas na expressão fenotípica de células na imunidade inata, enquanto que, a vacina com adjuvante promoveu aumento na expressão do receptor FcγRI (CD64) e dos receptores de quimiocina CCR2 e CCR5 em monócitos (CD14⁺) e diminuição de células NK maduras (CD3⁻CD16⁺CD56⁺). Com relação à vacina sem adjuvante, as análises da imunidade adaptativa mostram queda na expressão das moléculas HLA-DR e CCR3 em linfócitos T CD4⁺, HLA-DR, CD62L e CCR3 em linfócitos T CD8⁺ e queda de CD32 em linfócitos B (CD19⁺). Por outro lado, as alterações nas expressões fenotípicas de células da imunidade adaptativa ocasionadas pela vacina com adjuvante foram: aumento da população de linfócitos T CD4⁺ e de suas moléculas CD69, HLA-DR, CD28, CD54, CCR3, CCR5, CXCR3 e CXCR4; e nos linfócitos T CD8⁺, o aumento de HLA-DR e CCR3. E por fim, houve um aumento do número de linfócitos B totais (CD19⁺) e das subpopulações B1 (CD19⁺CD5⁺) e B2 (CD19⁺CD23⁺) (Figura 21 – T1).

No 3º dia pós-vacinação (T3) a vacina sem adjuvante induziu um aumento de monócitos pró-inflamatórios ($CD14^+CD16^+HLA-DR^{+++}$), concomitante a uma redução no número de células NK maduras ($CD3^+CD16^+CD56^+$). A vacina com adjuvante, por sua vez, induziu o aumento de monócitos pró-inflamatórios e do receptor $Fc\gamma RI$ ($CD64$) em monócitos ($CD14^+$). Os resultados das análises da imunidade adaptativa mostram que a vacina sem adjuvante levou à queda na expressão do marcador de ativação tardia $HLA-DR$ e aumento da molécula de adesão celular $CD54$ em linfócitos T $CD4^+$, redução do número de linfócitos T $CD8^+$ e novamente, diminuição da expressão de $CD32$ em linfócitos B ($CD19^+$), porém com um expressivo aumento da molécula de ativação inicial $CD69$ nessas células. A vacina com adjuvante foi responsável pelas seguintes alterações nas células da imunidade adaptativa neste tempo: aumento da população de linfócitos totais, aumento de linfócitos T $CD4^+$ e suas moléculas $CD25$, $CD38$, $CD54$ e $CXCR3$; e nos linfócitos T $CD8^+$ o aumento da expressão de $CD69$, $CD25$, $CD38$, $CD62L$, $CCR3$ e $CXCR3$. Nenhuma alteração foi observada em linfócitos B ($CD19^+$) (Figura 21 – T3).

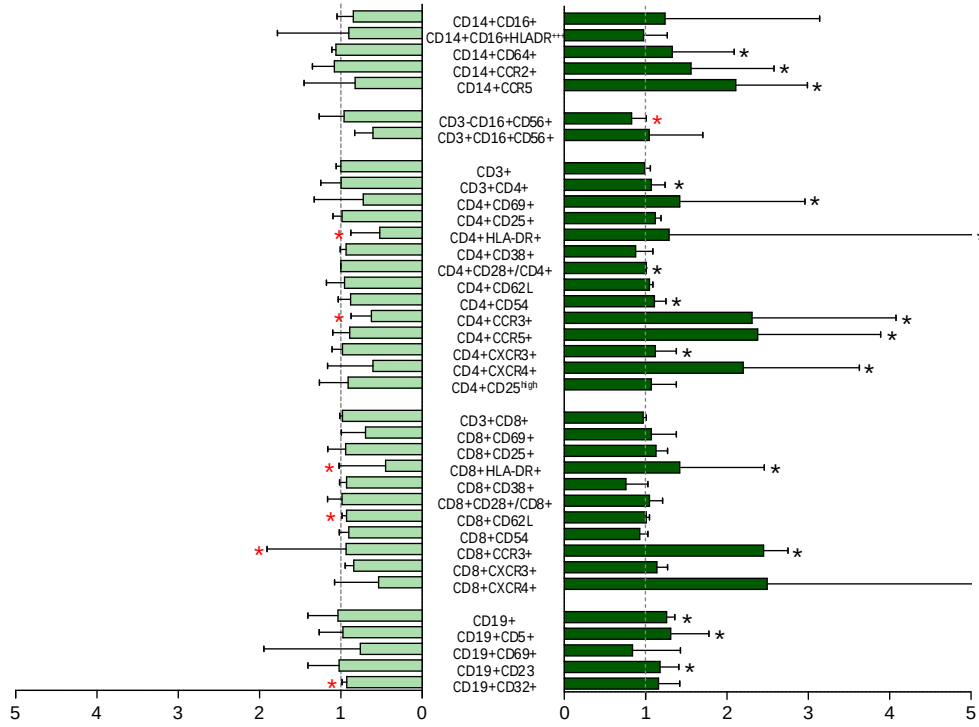
No 7º dia pós-vacinação (T7) a vacina sem adjuvante causou uma queda na expressão do receptor de quimiocina $CCR2$ em monócitos ($CD14^+$) e também uma redução no número de células NK e NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$ e $CD3^+CD16^+CD56^+$). Por outro lado, a vacina com adjuvante induziu o aumento da expressão das moléculas $CD64$ e $CCR2$ em monócitos ($CD14^+$). Com relação aos resultados das análises da imunidade adaptativa, a vacina sem adjuvante causou uma redução na expressão das moléculas $HLA-DR$ e $CD54$ e aumento da molécula coestimuladora $CD28$ em linfócitos T $CD4^+$, além disso, observou-se uma redução no número de linfócitos T $CD8^+$ e de suas moléculas $HLA-DR$, $CD38$, $CD54$, com um aumento também de $CD28$ nessas células. Assim como observado nos tempos anteriores, houve uma redução na expressão de $CD32$ em linfócitos B ($CD19^+$). A vacina com adjuvante, por sua vez, induziu um aumento da expressão de $CD69$, $CD25$, $HLA-DR$ e $CXCR3$ em linfócitos T $CD4^+$, aumento da expressão de $CD69$, $CD25$, $HLA-DR$, $CD28$, $CD62L$ e $CXCR3$ em linfócitos T $CD8^+$ e aumento na frequência de linfócitos B totais ($CD19^+$) (Figura 21 – T7).

No 30º dia pós-vacinação (T30) o perfil de fenotipagem celular possivelmente retornou a níveis basais. Neste tempo, as únicas alterações observadas foram: aumento de $CCR3$ em linfócito T $CD4^+$ e $CD8^+$ na vacina sem adjuvante e aumento de $CD64$ e $CCR2$ em monócitos e $CCR3$ em linfócitos T $CD8^+$ na vacina com adjuvante (Figura 21 – T3).

T1

Vacina sem adjuvante

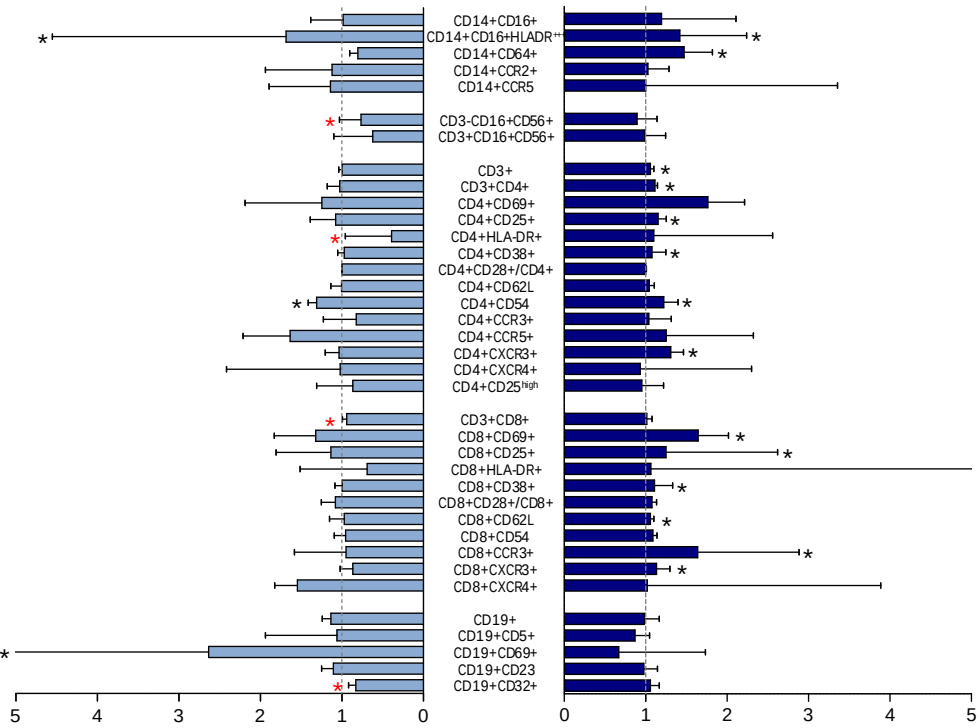
Vacina com adjuvante



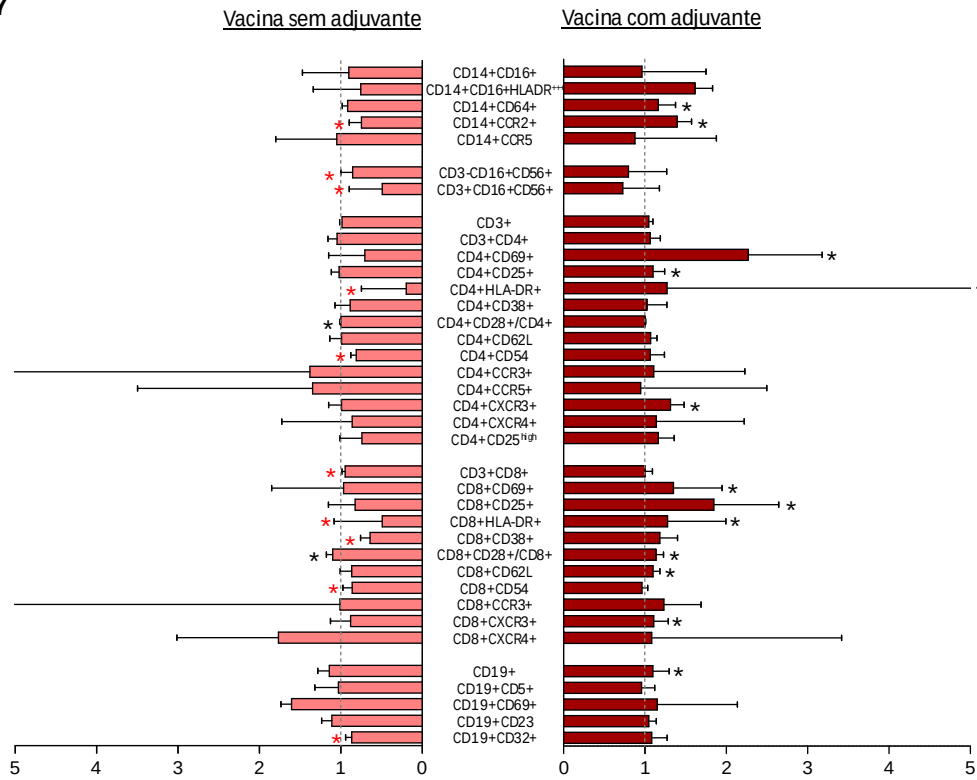
T3

Vacina sem adjuvante

Vacina com adjuvante



T7



T30

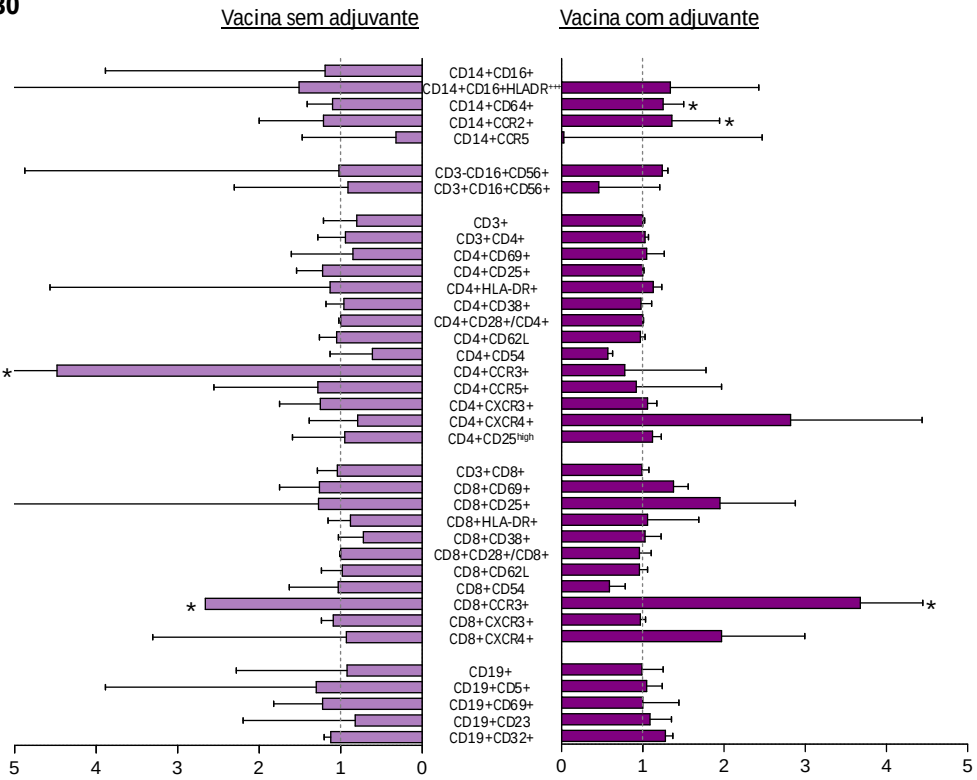


Figura 21. Análise imunofenotípica de voluntários pós-imunização contra influenza A (H1N1)pdm09. Os resultados estão apresentados em gráficos de barras horizontais (mediana com intervalo interquartil), construídos com os valores de *baseline folds* para cada tempo avaliado. O tempo 1 dia (T1) está representado pela cor verde, o tempo 3 dias (T3) pela cor azul, o tempo 7 dias (T7) pela cor vinho e o tempo 30 dias (T30) pela cor roxa. A vacina sem adjuvante está representada à esquerda por tons mais claros e a vacina com adjuvante à direita por tons mais escuros. As subpopulações celulares estão organizadas em grupos, sendo que na parte superior do gráfico se encontram os monócitos seguidos por células NK, que representam as células da imunidade inata, e logo abaixo estão os linfócitos T CD4⁺, seguido por linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B, que representam as células da imunidade adaptativa. No eixo x foi traçada uma linha pontilhada no ponto de corte 1 (100%), em que valores abaixo desta indicam diminuição e valores acima indicam aumento da variável com relação ao tempo zero (T0). As diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre cada tempo em relação ao tempo 0 (antes da vacinação) estão representadas por asterisco (*).

5.4 Padrão de citocinas intracitoplasmáticas de leucócitos do sangue periférico de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09

A análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo possibilita identificar e quantificar a produção de citocinas em leucócitos, após o cultivo *in vitro*, na presença e ausência (controle) de um estímulo antigênico específico.

Os resultados desta análise estão representados por gráficos de radar de assinaturas de citocinas, gerados a partir da porcentagem de indivíduos que apresentaram um valor de *baseline folds* acima da mediana global. Os gráficos de radar construídos apresentam como ponto de corte a porcentagem de 50% e cada raio representa um tipo de célula e a citocina por ela produzida.

No geral, a análise observacional dos dados mostra que o grupo sem adjuvante apresentou menor produção de citocinas tanto pró-inflamatórias quanto reguladoras em todos os tempos avaliados. Considerando o ponto de corte de 50% foi observado o aumento das seguintes populações celulares produtoras de citocinas neste grupo: CD4/IL-17, CD8/IFN- γ , CD4/IL-4 no 1º dia (T1), CD8/TNF- α , CD8/IL-17, CD8/IL-13 no 3º dia (T3), CD16-TNF- α , CD4/TNF- α , CD8/TNF- α , CD19/TNF- α , CD56/IL-4, CD16/IL-4, CD4/IL-5, CD4/IL-13, CD8/IL-4, CD8-IL5, CD8/IL-10 e CD19/IL-4 no 7º dia (T7) e CD56/TNF- α , CD4/IL-4, CD4/IL-13 e CD8/IL-10 no 30º dia (T30). A maior produção de citocinas do grupo sem adjuvante foi no 7º dia após a vacinação (T7), com uma elevação um pouco maior de citocinas reguladoras. Em contrapartida, a vacina com adjuvante promoveu uma alta produção de citocinas tanto pró-inflamatórias quanto

reguladoras, apresentando um perfil misto com um balanço entre citocinas da imunidade inata e da imunidade adaptativa, que variaram um pouco entre os tempos avaliados. Um dia (T1) após a vacinação observa-se uma produção um pouco maior de citocinas reguladoras neste grupo, que se modifica após 3 dias (T3) com um aumento de citocinas pró-inflamatórias da imunidade inata e no 7º dia (T7) com o aumento de citocinas pró-inflamatórias da imunidade adquirida, apresentando um perfil bastante equilibrado no 30º dia (T30). Considerando o ponto de corte estabelecido foi possível notar o aumento das seguintes citocinas no grupo que recebeu a vacina com adjuvante: CD56/IL-8, CD56/IL-6, CD56/IFN- γ , CD16/IL-8, CD8/IFN- γ , CD8/IL-12, CD8/IL-17, CD19/TNF- α , CD56/IL-4, CD16/IL-4, CD4/IL-4, CD4/IL-10, CD4/IL-13, CD8/IL-4, CD8-IL-5, CD8/IL-13, CD19/IL-4 e CD19/IL-10 no 1º dia (T1), CD56/IFN- γ , CD16/IL-8, CD16/IL-6, CD16-TNF- α , CD16-IFN- γ , CD4/IL-12, CD8/IL-12, CD8/IL-17, CD19/TNF- α , CD4/IL-4, CD4/IL-5, CD8/IL-10, CD8/IL-13 e CD19/IL-10 no 3º dia (T3), CD56/IL-6, CD56/IFN- γ , CD16-TNF- α , CD16-IFN- γ , CD4/TNF- α , CD4/IFN- γ , CD4/IL-12, CD4/IL-17, CD8/IFN- γ , CD19/IL-12, CD16/IL-4, CD4/IL-4, CD4/IL-13, CD8/IL-4, CD8/IL-5, CD19/IL-4 e CD19/IL-10 no 7º dia (T7) e, por fim, CD56/IL-8, CD56/IL-6, CD56-TNF- α , CD56/IFN- γ , CD16/IL-8, CD16/IL-6, CD16-TNF- α , CD16-IFN- γ , CD4/TNF- α , CD4/IFN- γ , CD8/TNF- α , CD8/IL-12, CD56/IL-4, CD16/IL-4, CD4/IL-4, CD4/IL-5, CD4/IL-10, CD4/IL-13, CD8/IL-4, CD8/IL-13 e CD19/IL-4 no 30º dia (T30) (Figura 22).

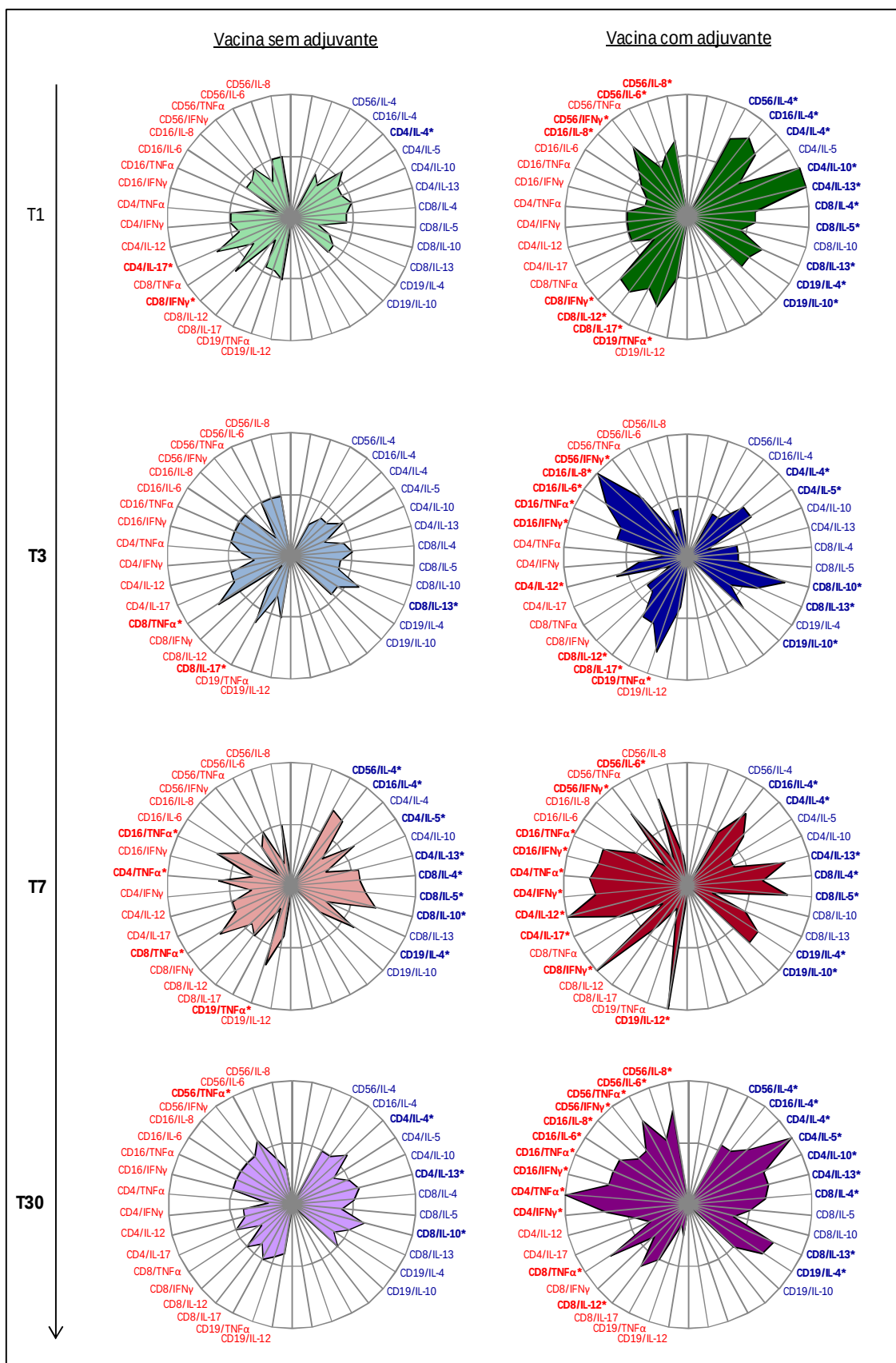


Figura 22. Citocinas intracitoplasmáticas em leucócitos circulantes de voluntários submetidos à imunização contra influenza A (H1N1)pdm09. Os gráficos de radar representam a porcentagem de indivíduos que apresentaram níveis de citocinas intracitoplasmáticas acima da mediana global. A linha central do gráfico é o ponto de corte, fixado em 50%, a linha externa representa 100% e cada raio representa uma citocina intracitoplasmática avaliada. O tempo 1 dia (T1) está representado pela cor verde, o tempo 3 dias (T3) pela cor azul, o tempo 7 dias (T7) pela cor vinho e o tempo 30 dias (T30) pela cor roxa. A vacina sem adjuvante está representada à esquerda por tons mais claros e a vacina com adjuvante à direita por tons mais escuros. As legendas em vermelho representam as citocinas pró-inflamatórias e as legendas em azul representam as citocinas reguladoras. As citocinas intracitoplasmáticas que aumentaram em mais de 50% dos indivíduos avaliados estão marcadas por asterisco (*) e negrito.

5.5 Cinética do perfil de citocinas no plasma de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09

A análise de CBA utiliza *beads* fluorescentes conjugadas a anticorpos de captura específicos para quantificar o nível de citocinas ou quimiocinas secretadas no plasma.

Os resultados desta análise estão representados por gráficos de radar de assinaturas de citocinas, construídos a partir da porcentagem de indivíduos que apresentaram um valor de *baseline folds* acima da mediana global. Os gráficos de radar construídos apresentam como ponto de corte a porcentagem de 50% e cada raio representa uma citocina avaliada nos diferentes tempos.

A análise observacional entre as vacinas demonstra que, no geral, o grupo de indivíduos que recebeu a vacina com adjuvante apresentou níveis mais elevados das citocinas plasmáticas dosadas em todos os tempos avaliados, em relação ao grupo que recebeu a vacina sem adjuvante. Considerando o ponto de corte estabelecido foi observado o aumento das seguintes citocinas no plasma dos voluntários que receberam a vacina sem adjuvante: IL-8 no 1º dia (T1), TNF e IL-10 no 3º dia (T3), TNF no 7º dia (T7) e novamente TNF e IL-10 no 30º dia (T30). Nos voluntários imunizados na presença de adjuvante as citocinas que apresentaram elevação com relação ao ponto de corte foram: IL-8, IL-6, IL-12, IL-10 no 1º dia (T1), IL-1 β , IL-12 e IL-10 no 3º dia (T3), IL-1 β , TNF e IL-12 no 7º dia (T7), IL-1 β e IL-12 no 30º dia (T30) (Figura 23).

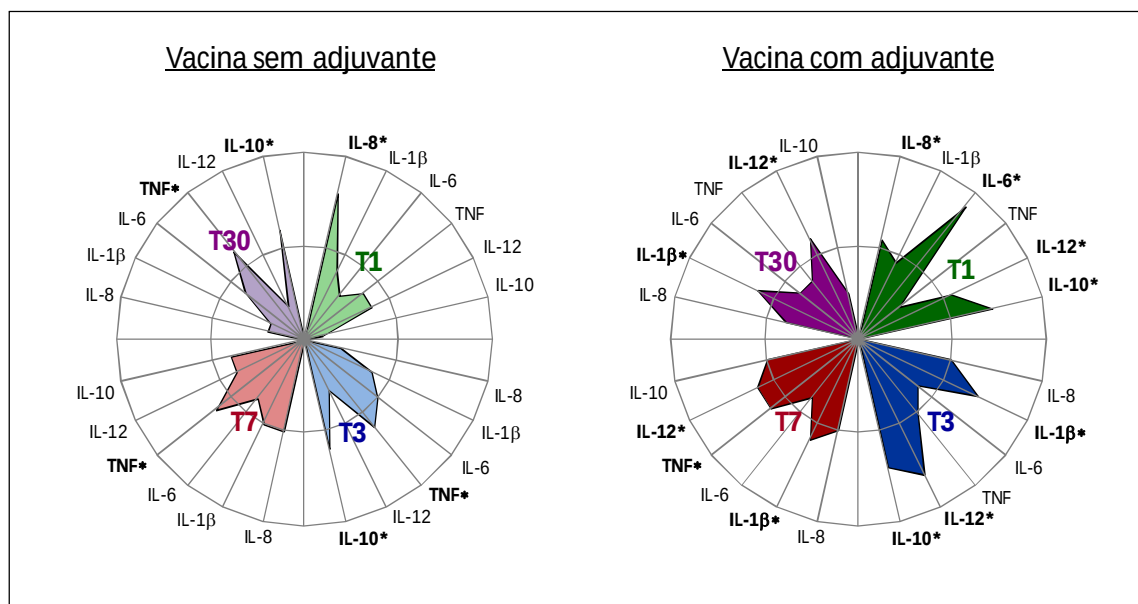


Figura 23. Níveis de citocinas plasmáticas de voluntários submetidos à imunização contra influenza A (H1N1)pdm09. Os gráficos de radar representam a porcentagem de indivíduos que apresentaram níveis de citocinas acima da mediana global, sendo que a linha central é o ponto de corte, fixado em 50%, a linha externa representa 100% e cada raio representa uma citocina avaliada nos diferentes tempos. O tempo 1 dia (T1) está representado pela cor verde, o tempo 3 dias (T3) pela cor azul e o tempo 7 dias (T7) pela cor vinho. A vacina sem adjuvante está representada à esquerda por tons mais claros e a vacina com adjuvante à direita por tons mais escuros. As citocinas que aumentaram em mais de 50% dos indivíduos avaliados estão marcadas por asterisco (*) e negrito.

5.6 Redes de correlações

A análise de correlação permite avaliar os dados de uma forma conjunta, integrando resultados de diversas análises para a geração de redes de intercâmbio de dados. Isto significa que, apesar da subjetividade inerente a este tipo de análise, as redes possibilitam uma visão geral da interação entre resultados de diferentes abordagens. A construção das redes é feita com base nos valores de *Spearman r* que apresentaram significância estatística na análise de correlação de dados. Foram correlacionados dados da imunofenotipagem *ex vivo*, citocinas intracitoplasmáticas e citocinas plasmáticas.

Sob uma visão panorâmica das redes de correlações geradas (Figura 24) foi possível observar que a vacina com adjuvante promoveu a formação de redes mais complexas e com maior número de correlações em todos os tempos avaliados, comparado ao grupo que recebeu a vacina sem adjuvante, principalmente no 7º dia pós-imunização (T7).

A vacina sem adjuvante, no 1º dia (T1), demonstrou menor envolvimento de células da imunidade inata, porém mais correlações entre células da imunidade adquirida, com destaque para um eixo forte entre linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e entre T CD8⁺ e linfócitos B. Foi possível observar uma importante participação dos linfócitos T CD4⁺ nesta rede, que se correlacionou com citocinas plasmáticas e citocinas produzidas pelos próprios linfócitos T CD4⁺. E, além disso, o envolvimento de citocinas de células NK, que se correlacionou com diversos grupos celulares e diferentes citocinas, mas gerando principalmente um eixo mais claro com citocinas de linfócitos T CD4⁺. No 3º dia (T3) é possível notar o importante envolvimento de células da imunidade inata, que parece estar acontecendo de forma mais tardia neste grupo, com destaque para um eixo evidente entre monócitos/ células NK e citocinas de CD4⁺ e entre monócitos/ células NK e citocinas de CD8⁺, além de um importante eixo entre linfócitos T CD4⁺ e citocinas de linfócitos B. No 7º dia (T7), a rede parece retornar ao perfil inicial, com maior envolvimento de células da imunidade adquirida, linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e as citocinas produzidas por estes linfócitos, porém com um eixo mais claro entre monócitos/ células NK e linfócitos B, que começou a se formar no 3º dia após a vacinação (T3).

A vacina com adjuvante, no 1º dia (T1), também apresentou forte participação de células da imunidade adquirida, com destaque para o eixo entre linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, porém com muitas correlações envolvendo células da imunidade inata nesta rede. Foi possível observar um eixo evidente entre monócitos/ células NK e linfócitos T CD4⁺ e entre monócitos/ células NK e linfócitos B, além de um importante eixo entre linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B. Já no 3º dia (T3) foi observado um maior número de correlações entre células da imunidade adquirida, com importante participação dos linfócitos T CD8⁺ e suas citocinas e eixos evidentes entre linfócitos T CD4⁺ e citocinas de T CD8⁺, linfócitos T CD8⁺ e citocinas de T CD8⁺, linfócitos T CD8⁺ e citocinas de células NK, e citocinas de células NK com citocinas de T CD8⁺. Já no 7º dia (T7), se formou uma rede complexa neste grupo, com forte envolvimento de todos os grupos celulares e suas citocinas, mas principalmente com importante participação de células da imunidade adquirida, envolvendo linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e suas citocinas. Além disso, esta rede demonstra muitas correlações entre citocinas de linfócitos B com diversos grupos celulares e citocinas da imunidade inata e adquirida.

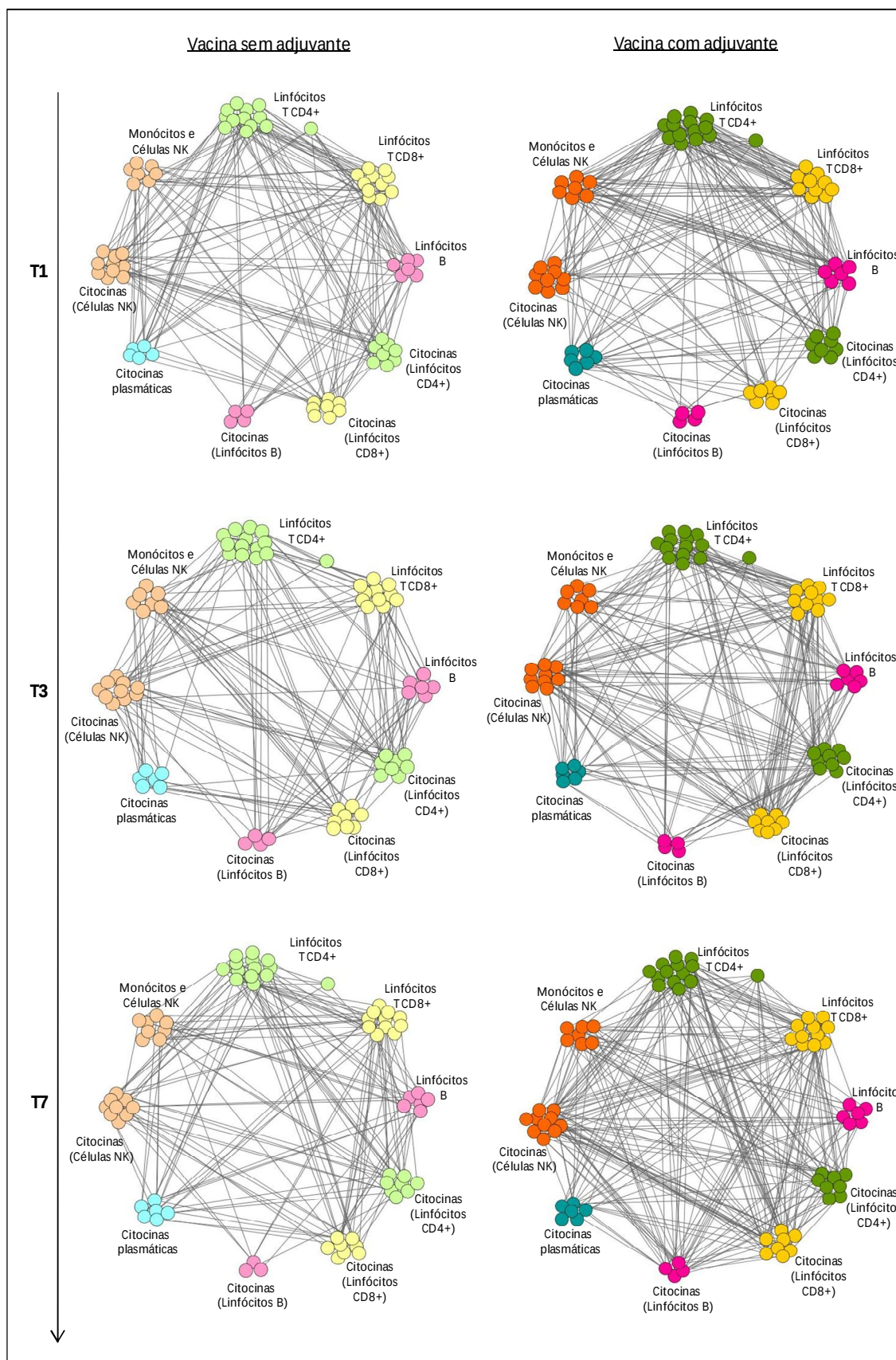


Figura 24. Redes de correlação entre diferentes fenótipos celulares e citocinas plasmáticas e intracitoplasmáticas de voluntários submetidos à imunização contra influenza A (H1N1)pdm09. À esquerda está representada a vacina sem adjuvante e à direita a vacina com adjuvante, nos diferentes tempos avaliados: 1º dia (T1), 3º dia (T3), 7º dia (T7) e 30º dia (T30) pós-imunização. Para análise comparativa observacional foram construídos mini *clusters* de fenótipos celulares e citocinas, sendo eles: monócitos/ células NK, linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺, linfócitos B, citocinas de linfócitos T CD4⁺, citocinas de linfócitos T CD8⁺, citocinas de linfócitos B, citocinas plasmáticas e citocinas de células NK. Os mini *clusters* de tons mais claros representam a vacina sem adjuvante e aqueles de tons mais escuros representam a vacina com adjuvante. Esta representação não diferencia correlações positivas de negativas e não considera a intensidade da correlação.

6 DISCUSSÃO

A gripe acomete milhões de pessoas todos os anos, sendo responsável por alto índice de internação e elevada mortalidade, sobretudo em idosos e crianças. A vacinação contra o vírus influenza é a principal maneira de reduzir o seu impacto e, portanto, o maior instrumento no combate à transmissão durante epidemias e pandemias de gripe. O uso de adjuvantes em vacinas ainda divide muitas opiniões no mundo científico e as vantagens no uso desses agentes, seja em melhorar a resposta imunológica ou poupar antígeno para ampliar a produção e reduzir custos, devem ser consideradas ao lado do perfil de segurança desejado para uma vacina. Além disso, novos adjuvantes surgem periodicamente e o conhecimento mais amplo sobre os mecanismos imunológicos desencadeados por esses agentes se torna essencial no desenvolvimento de vacinas mais eficazes e mais seguras. Neste intuito, realizamos um estudo aprofundado sobre a resposta vacinal, na presença e ausência de adjuvante, a fim de melhor elucidar a resposta imunológica promovida por estas vacinas.

Uma análise clínica dos voluntários foi realizada antes e após a imunização, na qual diversos parâmetros foram avaliados e o relato de possíveis reações adversas pós-vacinação foi considerado. Através da ficha de avaliação pós-vacinação preenchida pelos voluntários realizamos uma análise descritiva, na qual foi possível observar que a vacina com adjuvante provocou mais reações adversas nos indivíduos imunizados do que a vacina sem adjuvante, porém tais reações foram de intensidade média a moderada e nenhuma reação adversa grave foi relatada pelos voluntários. Resultados similares foram observados por Liang *et al.*, (2010) através de um extenso trabalho, realizado na China, envolvendo cerca de 12.500 participantes. Da mesma forma, ao revisar diversos trabalhos, Tetsutani & Ishii, (2012) demonstraram que vacinas com adjuvante causam reações adversas com maior frequência, independente do adjuvante utilizado. E assim como relatado neste trabalho as reações adversas observadas, em sua maioria, foram de gravidade leve a moderada, evidenciando que os adjuvantes presentes em vacinas contra influenza (MF59, AS03 e sais de alumínio) possuem tolerância aceitável pelo organismo. Walker & Faust, (2010) reuniram os principais achados de grandes estudos e mostraram que a vacina contendo o adjuvante AS03 foi mais reatogênica do que a vacina sem adjuvante após a primeira dose, principalmente em crianças. E a porcentagem de adultos que apresentaram determinadas reações adversas foi claramente maior nos indivíduos que receberam a vacina com adjuvante do

que naqueles em que foi administrada a vacina sem adjuvante, dentre as quais foram relatadas vermelhidão (31,7% *versus* 4,5%), inchaço (30,2% *versus* 1,5%) e dor (88,9% *versus* 59,1%) como sintomas locais, e fadiga (41,3% *versus* 27,3%), dor de cabeça (30,2% *versus* 15,2%), artralgia (23,8% *versus* 7,6%) e mialgia (34,9% *versus* 18,2%) como sintomas sistêmicos. Não foi relatado nenhum caso de febre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ em adultos nesses estudos. Crianças de 5 a 12 anos apresentaram mais reações adversas do que os adultos quando administrada a vacina sem adjuvante, porém a vacina com adjuvante também foi responsável por mais reações adversas quando comparada à vacina sem esse componente. Neste trabalho, 7,8% das crianças apresentaram alguma reação local grave à vacina com adjuvante, comparado a 1,1% dentre aquelas que receberam a vacina sem adjuvante. Além disso, 2,8% das crianças que receberam a vacina com adjuvante apresentaram alguma reação sistêmica grave, comparado a 1,4% dentre aquelas receberam a vacina sem adjuvante. E ainda, 7% das crianças que receberam a vacina com adjuvante apresentaram febre $\geq 38^{\circ}\text{C}$, enquanto que no grupo de crianças que receberam a vacina sem adjuvante essa porcentagem foi de 3,1%. Crianças mais novas, de 6 meses a 5 anos, foram as mais susceptíveis aos efeitos da vacinação, apresentando mais reações adversas graves, principalmente quando administrada a vacina com adjuvante. Neste grupo, 3,6% das crianças que receberam a vacina com adjuvante apresentaram alguma reação local grave à vacinação, enquanto nenhuma reação deste tipo foi relatada no grupo de crianças que recebeu a vacina sem adjuvante. E ainda, 6,3% dessas crianças que receberam a vacina com adjuvante apresentaram alguma reação adversa grave, sendo essa porcentagem de 4,7% dentre aquelas que receberam a vacina sem adjuvante. Nos trabalhos avaliados, 15,5% e 10,9% das crianças que receberam as vacinas com e sem adjuvante respectivamente apresentaram febre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ (Waddington *et al.*, 2010; Roman *et al.*, 2010).

O presente trabalho avaliou apenas indivíduos adultos e os sintomas mais relatados foram dor local, dor muscular, mal estar, cefaléia e sudorese. Tais achados foram semelhantes ao observado em diferentes trabalhos (Greenberg *et al.*, 2009; Scheifele *et al.*, 2013). Apenas um voluntário em nosso estudo apresentou febre. Curiosamente, o indivíduo recebeu a vacina sem adjuvante, relatando uma forte reação pós-imunização que incluía sintomas tais como dor local, dor muscular, mal estar, cefaléia, fadiga, diarreia, sudorese, dispepsia, desconforto gástrico, lombalgia, dor nos olhos e dor de garganta. Esse tipo de reação à vacina não é normal,

principalmente se tratando de uma vacina de vírus inativado/ fragmentado sem adição de adjuvante. Acreditamos que este evento isolado aconteceu por motivos relacionados ao próprio indivíduo, que pode estar ligado às características genéticas ou a uma maior sensibilidade aos componentes da fórmula. Além disso, pode ter sido desencadeado por algum evento transitório que afetou seu organismo e culminou em uma maior ativação do sistema imunológico provocando uma forte inflamação, o que levou ao surgimento de diversos efeitos locais e sistêmicos. Ou ainda, tais reações podem estar relacionadas a algum evento não ligado à vacinação, mas que tenha ocorrido de maneira coincidente, como uma intoxicação alimentar, por exemplo.

Com relação aos parâmetros hematológicos analisados através do hemograma, foi possível observar que apenas a vacina com adjuvante causou alterações imunológicas proeminentes capazes de serem detectadas pelo método. Nesta avaliação, houve um aumento dos leucócitos totais logo no primeiro dia após a vacinação, que decaíram significativamente no terceiro dia, o que parece ser efeito de um *feedback* negativo, com vistas à manutenção da homeostase. Não foram encontrados relatos na literatura demonstrando o efeito da vacinação contra influenza sobre os parâmetros do hemograma. Nossos achados mostraram que as alterações hematológicas decorrentes da vacinação com adjuvante são aparentes no hemograma principalmente até o terceiro dia após a administração da vacina com AS03, retornando rapidamente aos níveis basais. Em uma análise mais detalhada, foi possível observar que esta vacina é capaz de alterar o balanço celular com o aumento significativo de células da imunidade inata nos três primeiros dias após a imunização. Esta resposta foi marcada por um significativo aumento da porcentagem de granulócitos logo no primeiro dia após a imunização, o que provavelmente está relacionado a um alto recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para o sítio da injeção ou para o linfonodo drenante, que comumente ocorre com o uso desta vacina. Estes achados corroboram com o trabalho de Morel *et al.*, (2011), que relataram um aumento significativo de neutrófilos e eosinófilos nos linfonodos drenantes 24 horas após a administração da vacina. Esses autores destacam ainda a importância do α -tocoferol, como componente do AS03, no maior recrutamento de granulócitos e aumento da carga de antígeno em monócitos. Observamos ainda, que a porcentagem de monócitos começa a elevar-se no primeiro dia, mas um aumento significativo é detectado apenas no terceiro dia, parecendo que houve uma ativação e recrutamento um pouco mais tardios destas células. Estes dados não correspondem ao que foi

encontrado na literatura, em que o aumento de monócitos juntamente com neutrófilos e/ou células dendríticas foi evidenciado de maneira relevante e precoce quando administrada a vacina com adjuvante, seja o AS03, avaliado neste trabalho, ou o MF59, muito comum nas vacinas de influenza (Dupuis *et al.*, 2001; Morel *et al.*, 2011; Calabro *et al.*, 2011; O'Hagan *et al.*, 2012; Vono *et al.*, 2013). É possível que essa ativação e recrutamento de monócitos já estivessem acontecendo de maneira intensa, porém a elevação relativa de granulócitos pode ter ocultado o aumento de monócitos, que provavelmente seria evidenciado se tivessem sido considerados os valores absolutos na análise.

Com relação à resposta de anticorpos, os dados sorológicos obtidos através do ensaio de inibição da hemaglutinação (HAI) evidenciaram a capacidade de ambas as vacinas em promover uma produção de anticorpos a níveis desejados para uma proteção eficaz contra influenza. Neste contexto, 30 dias após a imunização, todos os voluntários avaliados em nosso estudo apresentaram título de anticorpos $\geq 1:40$, considerado protetor. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos, nos quais foi demonstrada a eficácia da vacina pandêmica na geração de anticorpos contra o H1N1. Na época da pandemia, Greenberg *et al.*, (2009) conduziram um dos primeiros trabalhos sobre a eficácia da vacina monovalente contra o vírus influenza A (H1N1)pdm09, no qual avaliaram um total de 240 indivíduos e demonstraram que 95 – 98% dos voluntários apresentaram títulos $\geq 1:40$ no HAI. Neste estudo foi observado que adultos jovens (18 a 49 anos) apresentaram uma taxa de soroconversão maior do que em indivíduos mais velhos (50 a 64 anos), 96,6% e 93,5% respectivamente. Os autores enfatizam ainda que o padrão de resposta de anticorpos mensurado pelo ensaio de microneutralização foi similar ao avaliado pelo HAI (Greenberg *et al.*, 2009). Outro estudo, conduzido nos EUA, avaliou crianças de 6 a 35 meses e de 3 a 9 anos e encontrou uma baixa porcentagem de soroconversão nestes grupos, 47 – 50% e 65 – 75% respectivamente. Após a segunda dose, no entanto, de 90 – 100% dessas crianças apresentaram títulos $\geq 1:40$. Este trabalho foi o primeiro a avaliar a resposta da vacina monovalente de influenza pandêmica em crianças, ressaltando que a segunda dose da vacina deveria ser recomendada neste grupo etário (Plennevaux *et al.*, 2011). Dados muito semelhantes aos trabalhos acima citados foram encontrados em outros estudos, demonstrando que os resultados gerados através do HAI são bastante reprodutíveis (Zhu *et al.*, 2009; Plennevaux *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2011; Poder *et al.*, 2014; Nolan *et al.*, 2014).

No presente estudo, demonstramos que ambas as vacinas foram capazes de suscitar títulos de anticorpos $\geq 1:40$ em 100% dos voluntários vacinados. Além disso, foi observada uma queda nestes títulos 6 meses após a vacinação, porém os níveis de anticorpos ainda permaneciam acima do limiar considerado protetor. Resultados similares foram observados por Poder *et al.*, (2014), porém em nosso estudo não notamos qualquer diferença significativa entre os grupos com e sem adjuvante (AS03), ao contrário do que foi observado por estes autores. Neste trabalho, a resposta de anticorpos avaliada por HAI foi relativamente maior quando administrada a vacina com adjuvante AS03, que continha quatro ou oito vezes menos antígeno (1,9/ 3,75 μ g) do que a vacina sem adjuvante (15 μ g). Outro estudo que também avaliou o uso do AS03, porém na vacina contra o vírus influenza H5N1, destacou uma resposta vacinal aumentada na presença deste adjuvante, tanto no que diz respeito à magnitude das respostas celular e humoral quanto na persistência de anticorpos quando comparado à vacinação sem adjuvante. Este estudo avaliou os níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação 6 meses após a vacinação e relatou uma taxa de soroconversão de 54% (3,75 μ g de antígeno) e 64% (7,5 μ g de antígeno) no grupo com adjuvante, comparado com 4% (3,75 μ g de antígeno) e 14% (7,5 μ g de antígeno) na formulação sem adjuvante (Moris *et al.*, 2011). Neste contexto, Scheifele *et al.*, (2013) afirmam que o adjuvante AS03 não é capaz de promover uma proteção de longa duração após a vacinação contra o H1N1 pandêmico, demonstrando que de 9 a 10 meses após receberem a vacina, apenas metade dos participantes mantiveram títulos acima de $\geq 1:40$ no HAI. No entanto, quase todos os indivíduos restauraram os níveis de anticorpos após a imunização com a vacina trivalente, com um aumento de três a quatro vezes do título e o mínimo de efeitos adversos. E ainda, os autores correlacionaram os níveis de anticorpos basais antes da vacinação trivalente e o aparecimento de mialgia, destacando que dentre os indivíduos que apresentavam títulos $\leq 1:20$ o relato de mialgia pós-imunização era menos frequente do que dentre aqueles em que o título basal era $\geq 1:80$. Isto provavelmente está relacionado a uma maior inflamação local por ativação da via clássica do complemento mediada por IgG, bem como maior recrutamento e ativação de fagócitos e liberação de citocinas inflamatórias tais como IFN- γ e TNF- α , responsáveis por maiores efeitos adversos. O presente estudo não teve como objetivo comparar a persistência de anticorpos promovida pelas vacinas, com e sem adjuvante. No entanto, observamos que a vacina sem adjuvante pareceu induzir menor persistência de anticorpos nos indivíduos vacinados do que a vacina com AS03. Isso porque nossos dados evidenciam que, embora não haja significância

estatística quando comparado ao nível de anticorpos 30 dias após a vacinação, o grupo que recebeu a vacina sem adjuvante apresentou uma queda de anticorpos um pouco maior seis meses após a vacinação ($p= 0,0975$) do que o grupo que recebeu a vacina com adjuvante ($p= 0,25$).

Sob a perspectiva de uma avaliação mais detalhada, a análise de imunofenotipagem *ex vivo* sugere que a vacina com adjuvante AS03 seja capaz de promover maior ativação e migração celular desde o primeiro até o sétimo dia pós-imunização. Isto porque essa vacina induziu um aumento expressivo de determinadas subpopulações de células, bem como da expressão de marcadores de ativação celular, diversas alterações na cinética de expressão de receptores Fc γ , além do aumento da expressão de receptores de quimiocinas e moléculas de adesão. Além disso, a vacina com adjuvante gerou extensas redes de interações, o que significa maior correlação entre os diferentes compartimentos da imunidade, demonstrando que esta vacina induz um perfil de resposta mais complexo e robusto. Contudo, após 30 dias, poucas alterações significativas em relação ao tempo zero (antes da vacinação) foram observadas e o perfil fenotípico apresentado neste tempo não parece ter relação com a vacinação.

A vacina com adjuvante promoveu mudanças precoces nas características fenotípicas de monócitos, com o aumento do receptor Fc γ CD64 (T1, T3, T7, T30), de monócitos pró-inflamatórios (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺⁺⁺) (T3) e receptores de quimiocina CCR2 (T1, T7, T30) e CCR5 (T1) após a imunização. Além disso, a análise de correlações demonstra a importante participação das células da imunidade inata já no primeiro dia após a administração da vacina, com um eixo importante de correlações entre monócitos/ células NK e linfócitos T CD4⁺. O aumento do receptor Fc γ RI (CD64) foi observado no primeiro dia após a vacinação, permanecendo elevado em todos os tempos avaliados. Sabe-se que a expressão deste marcador está ligada à ativação celular e suas funções estão relacionadas à fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), endocitose, internalização, apresentação de antígeno, produção de superóxido e liberação de citocinas, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e quimiocinas (van de Winkel & Anderson, 1991; Marzocchi-Machado & Lucisano-Valim, 2005). O aumento dos receptores de quimiocina CCR2 e CCR5 caracterizam o perfil pró-inflamatório observado e segundo Martins *et al.*, (2008) todos esses achados estão em concordância com o típico estado de ativação observado em fagócitos após a imunização. Na infecção pelo vírus influenza foi demonstrado que níveis reduzidos de CCL2 (MCP-1) ou CCR2 estão associados com menor

recrutamento de macrófagos e granulócitos, com consequente aumento da carga viral (Dawson *et al.*, 2000; Dessing *et al.*, 2007).

Por outro lado, embora a vacina sem adjuvante tenha sido capaz de induzir um aumento significativo de monócitos pró-inflamatórios no terceiro dia, essa vacina não provocou a expressão significativa dos outros marcadores avaliados, paralelo a uma diminuição de CCR2 no sétimo dia pós-vacinação, o que sugere menor ativação e migração celular. De maneira interessante, observamos que o aumento significativo de monócitos pró-inflamatórios induzido pelas vacinas com e sem adjuvante no terceiro dia pós-vacinação, coincide com o aumento relativo de monócitos no hemograma em ambos os grupos, embora esta observação tenha sido estatisticamente significativa apenas para a vacina com adjuvante. A análise de correlações reforça a maior participação da imunidade inata no terceiro dia após a vacinação, com mais correlações envolvendo monócitos e células NK se relacionando principalmente com citocinas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Foi demonstrado que os monócitos são possivelmente ativados por AS03 e que este adjuvante pode estimular outros componentes do sistema imune capazes de promover maior resposta de anticorpos, dentre os quais um recrutamento mais intenso de granulócitos para o sítio da injeção e para os linfonodos drenantes (Morel *et al.*, 2011). Os monócitos contribuem ativamente para uma maior captura e apresentação de antígeno às células T CD4⁺, com consequente ativação das respostas de linfócitos B, e os granulócitos parecem exercer um papel de suporte no aumento desta resposta (Geissmann *et al.*, 2008; Wang & Weller, 2008). Em ambas as vacinas, notamos uma diminuição transitória da população de células NK maduras (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) e/ou células NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) em diferentes tempos. Estas células exercem um papel essencial na resposta imune contra o vírus influenza e correspondem à primeira linha de defesa contra infecções virais, sendo importante fonte de interferons do tipo I e IFN- γ (Culley, 2009; Schultz-Cherry, 2015). Além de conter a infecção viral destruindo rapidamente as células infectadas, as células NK exercem uma função substancial no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Altfeld *et al.*, 2011). Neste contexto, acreditamos que por serem compostas de vírus inativado e fragmentado, as vacinas avaliadas não foram capazes de promover um aumento dessas células, uma vez que não há replicação viral, infecção das células e viremia. Magnusson *et al.*, (2013) também observaram diminuição de células NK em camundongos vacinados contra influenza na presença do adjuvante

AS03. Por fim, Morel *et al.*, (2011) afirmam que a resposta de anticorpos estimulada por AS03 está associada a uma eficiente indução da resposta imune inata, capaz de impulsionar uma resposta imune adaptativa ampla e direcionada. E desta forma, sugerem que este adjuvante atue não apenas como um sistema de entrega do antígeno, mas também como um imunomodulador.

Em consonância aos achados da resposta imune inata e ao que foi discutido anteriormente, também se observa maior participação da resposta imune adaptativa no grupo de indivíduos que recebeu a vacina com adjuvante. Isso pôde ser evidenciado através do aumento de populações celulares $CD3^+$ (T3), $CD3^+CD4^+$ (T1, T3), de células T expressando marcadores de ativação $CD4^+CD69^+$ (T1, T7), $CD8^+CD69^+$ (T3, T7), $CD4^+CD25^+$ (T3 e T7), $CD8^+CD25^+$ (T3 e T7), $CD4^+HLA-DR^+$ (T1 e T7), $CD8^+HLA-DR^+$ (T1 e T7), $CD4^+CD38^+$ (T3), $CD8^+CD38^+$ (T3), $CD4^+CD28^+/CD4^+$ (T1), $CD8^+CD28^+/CD8^+$ (T7) e $CD4^+CD54^+$ (T1 e T3), bem como maior expressão de receptores de quimiocinas, tais como CCR3 (T1), CCR5 (T1), CXCR3 (T1, T3 e T7) e CXCR4 (T1) em linfócitos T $CD4^+$ e CCR3 (T1 e T3) e CXCR3 (T3 e T7) em linfócitos T $CD8^+$, o que revela um aumento na ativação e migração leucocitária. A vacina com adjuvante promoveu uma ativação precoce tanto de células T $CD4^+$ quanto de células T $CD8^+$, observado pela expressão concomitante de marcadores de ativação inicial (CD69), de ativação intermediária (CD25), de ativação tardia (HLA-DR e CD38) e de coestimulação (CD28), que se alternaram ligeiramente nestas células nos diferentes tempos avaliados (T1, T3, T7). Entretanto, no primeiro dia após a vacinação com adjuvante é possível notar maior ativação e envolvimento de células T $CD4^+$ na resposta. Corroborando com nossos achados, Magnusson *et al.*, (2013) também relataram elevação precoce do marcador de ativação inicial CD69 em linfócitos T $CD4^+$ após a administração da vacina com AS03. CD69 é um receptor transmembrana conhecido por sua expressão transiente e precoce em linfócitos ativados e embora estudos iniciais *in vitro* tenham sugerido que esta molécula exerça uma função pró-inflamatória, recentes estudos *in vivo* indicam que essa molécula atue como um imunossupressor e regulador das respostas de células T, modulando a resposta inflamatória (Marzio *et al.*, 1999; Sancho *et al.*, 2005; de la Fuente *et al.*, 2012; González-Amaro *et al.*, 2013). Neste sentido, acreditamos que o aumento da expressão desta molécula em linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$, em diferentes tempos após a administração da vacina com adjuvante, possa exercer um importante papel no controle da inflamação induzida por esta vacina impedindo uma resposta imune adaptativa desenfreada pelo organismo. Foi possível

notar também que a vacina com adjuvante parece promover um rápido recrutamento de linfócitos T CD4⁺, o que foi evidenciado pelo aumento na expressão da molécula de adesão celular CD54 no primeiro e terceiro dias após a vacinação. Além de atuar na atração de leucócitos para o local da inflamação, esta molécula participa das interações entre APCs e linfócitos T e ativação da cascata inflamatória (Roebuck & Finnegan, 1999; Lawson & Wolf, 2009). Com relação às células T CD8⁺, embora tenha sido observado um aumento do marcador de ativação tardia (HLA-DR) logo no primeiro dia, alterações mais expressivas nos fenótipos avaliados aconteceram no terceiro e no sétimo dia após a vacinação. E, de maneira inesperada, foi observado o aumento da expressão da molécula de adesão L-selectina (CD62L) em linfócitos T CD8⁺ no terceiro e sétimo dias após a administração da vacina. Isoladamente, o significado dessa expressão é bastante controverso considerando as inúmeras funções que a L-selectina pode exercer e a diversidade de ligantes aos quais ela interage. A L-selectina contém um sítio de clivagem enzimática próximo à membrana que resulta na sua liberação da superfície celular após a ativação dos leucócitos, é expressa de maneira constitutiva em linfócitos T *naïve* e seu ligante vascular é expresso predominantemente nas vênulas do endotélio alto dos linfonodos periféricos, o que garante a recirculação e proliferação homeostática de linfócitos (Grailer *et al.*, 2009). Por outro lado, a L-selectina pode também mediar a migração dos leucócitos para tecidos inflamados, induzir a adesão intercelular de leucócitos e regular a migração de células T reguladoras (Steeber *et al.*, 1997; Steeber *et al.*, 1999; Venturi *et al.*, 2007; Grailer *et al.*, 2009). Ainda com relação às células T CD8⁺, nossos dados mostram que não houve aumento na frequência de T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) em nenhum dos tempos avaliados, o que também foi observado por outros autores que relataram a ausência de alterações na frequência de células T CD8⁺ antígeno-específicas após a imunização (Roman *et al.*, 2011).

Por outro lado, a vacina sem adjuvante promoveu poucas alterações fenotípicas nas células da imunidade adquirida, tanto na expressão de moléculas de ativação quanto naquelas associadas à migração celular, o que provavelmente está relacionado à fraca indução da imunidade inata. Ou seja, a baixa indução de subpopulações de monócitos e ausência de alterações na expressão de receptores Fcγ e receptores de quimiocinas nessas células, provavelmente ocasionaram menor ativação e migração das mesmas, com consequente diminuição na captura e apresentação de antígeno e baixa produção de citocinas inflamatórias.

Tais fatores, entre outros, podem afetar o desenvolvimento de uma resposta adquirida robusta contra o antígeno. Neste contexto, foi possível observar um recrutamento celular mais tardio induzido por esta vacina, através do aumento significativo da molécula de adesão celular CD54 em linfócitos T CD4⁺ apenas no terceiro dia após a imunização, o que pode estar associado à resposta inata diminuída neste grupo, conforme mencionado. De maneira interessante, tal achado coincidiu com o aumento de monócitos pró-inflamatórios também no terceiro dia após a administração da vacina. Além disso, nossos dados também demonstram uma ativação mais tardia de células da imunidade adquirida neste grupo, observado pelo aumento da molécula de coestimulação CD28 em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ apenas no sétimo dia após a imunização. Reforçando esse perfil pouco inflamado promovido pela vacinação sem adjuvante, notamos uma diminuição significativa de fenótipos celulares associados à ativação e migração, tais como CD4⁺HLA-DR⁺ (T1, T3 e T7), CD8⁺HLA-DR⁺ (T1 e T7), CD8⁺CD38⁺ (T7), CD4⁺CD54⁺ (T7), CD8⁺CD54⁺ (T7), CD4⁺CCR3⁺ (T1) e CD8⁺CCR3⁺ (T1). Neste contexto, Roman *et al.*, (2011) avaliaram comparativamente as vacinas com adjuvante (AS03) e sem adjuvante e mostraram que a resposta de linfócitos T CD4⁺ aumentou em ambos os grupos em todo o período avaliado. No entanto, essa resposta foi significativamente maior no grupo com adjuvante e se manteve elevada após a segunda dose. E ainda, os autores relacionaram este achado com a diferença na produção de anticorpos entre os grupos avaliados.

Sobre a resposta de linfócitos B, a vacina com adjuvante promoveu a elevação da frequência de células B totais (CD19⁺) já no primeiro dia após a vacinação, sendo detectada também no sétimo dia. Observamos também, no primeiro dia após a administração da vacina, o aumento de subpopulações de células B conhecidas por células B-1 (que induzem IgM na ausência de estímulo antigênico) e B-2, linfócitos B maduros (que respondem especificamente ao antígeno), caracterizados por CD19⁺CD5⁺ e CD19⁺CD23⁺ respectivamente. O aumento destas células indica a capacidade do adjuvante em estimular a proliferação de linfócitos B e garantir uma adequada resposta humoral contra o antígeno. Portanto, conforme discutido anteriormente, nossos dados concordam com a literatura sobre a capacidade do adjuvante AS03 em induzir respostas humorais robustas, com elevada produção e certa persistência de anticorpos (Roman *et al.*, 2011; Morel *et al.*, 2011; Van Damme *et al.*, 2013; Poder *et al.*, 2014). A vacina sem adjuvante, por sua vez, apesar de não promover um aumento na frequência de linfócitos, induziu

um perfil de maior ativação celular, com o aumento expressivo do marcador de ativação inicial CD69 no terceiro dia após a imunização. E ainda, houve uma diminuição significativa do receptor FcγRII (CD32) no primeiro, terceiro e sétimo dias após a imunização. Mais especificamente, existem dois tipos de CD32 (FcγRII), FcγRIIa e FcγRIIb, este último apresenta um motivo de inibição celular (ITIM) no seu domínio citoplasmático, sendo considerado um correceptor negativo capaz de inibir a ativação de células B, controlar a produção de anticorpos por estas células, bem como inibir a ativação celular dependente do receptor de antígeno da célula B (BCR) (Marzocchi-Machado & Lucisano-Valim, 2005). Embora este estudo não tenha avaliado de maneira diferencial os dois tipos de receptores, no contexto da resposta, é provável que esteja ocorrendo a diminuição do receptor que regula negativamente as respostas de linfócitos B. Além disso, o aumento da expressão da molécula CD69 em linfócito B aconteceu de maneira coincidente, no terceiro dia após a imunização, com o aumento de monócitos pró-inflamatórios e com o aumento da expressão da molécula de adesão CD54 em linfócitos T CD4⁺, sugerindo uma coordenação dessas respostas neste grupo. A nossa primeira hipótese é de que a baixa indução da imunidade inata por esta vacina parece ativar um mecanismo de compensação através de uma maior ativação de linfócitos B que poderiam, então, atuar cooperativamente na apresentação de antígenos para as células T CD4⁺. E a análise de correlações evidencia um eixo entre linfócitos T CD4⁺ e citocinas de linfócitos B, demonstrando também uma conexão destas respostas. A segunda hipótese é de que uma deficiência na apresentação de antígeno e na ativação de linfócitos T auxiliares estaria forçando a ativação direta dos linfócitos B e aumentando, assim, a resposta dessas células ao antígeno para a produção de anticorpos. Em ambos os casos a regulação negativa de CD32 parece estar acontecendo para permitir essa maior ativação e produção de anticorpos pelos linfócitos B.

Ao avaliar a atividade funcional das células, através da cinética de citocinas intracitoplasmáticas, observamos que a vacina com adjuvante foi capaz de induzir um amplo repertório de citocinas, com um balanço entre citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, revelando um perfil misto induzido por esta vacina. A vacina sem adjuvante, por sua vez, apresentou uma baixa indução de citocinas no primeiro e terceiro dias pós-imunização, porém no sétimo dia a produção de citocinas aumentou consideravelmente e foi possível observar um perfil um pouco mais regulador neste tempo. A maior participação destes mediadores no sétimo dia

pós-vacinação coincidiu com os achados da análise *ex vivo*, em que alterações mais nítidas na cinética celular foram observadas neste tempo, reforçando que a vacina sem adjuvante promove uma resposta vacinal mais discreta e tardia. A maior produção de citocinas reguladoras talvez possa explicar a diminuição da expressão de marcadores relacionados à ativação e migração celular observada no sétimo dia pós-imunização com esta vacina.

Nossos dados evidenciam ainda que a vacina com AS03 é capaz de promover um balanço entre citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-12) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-10), que se alternaram levemente quanto à fonte produtora e os diferentes tempos avaliados. Estes resultados corroboram com os achados de Morel *et al.*, (2011) que relataram a capacidade desta vacina em aumentar as respostas Th1/ Th2, demonstrando uma maior elevação das citocinas IFN- γ (20 vezes), IL-5 (10 vezes) e IL-13 (10 vezes), quando comparada à vacina sem adjuvante. Neste sentido, a eficácia da resposta imune induzida pela vacina com adjuvante AS03 parece ser determinada pelo equilíbrio entre a ativação das células Th1 e Th2 sob o estímulo do antígeno vacinal. Diferentes adjuvantes são capazes de polarizar a resposta também de maneiras distintas. Magnusson *et al.*, (2013) demonstraram que o uso do adjuvante Matrix-M em vacinas de influenza promove uma resposta mista assim como o AS03, com um equilíbrio entre Th1 e Th2, porém essas respostas foram mais exacerbadas com o uso do Matrix-M. Os autores observaram que esta vacina é capaz de induzir uma alta produção de citocinas 48 horas após a vacinação, tais como IL-2, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-10. Outro estudo com o adjuvante Matrix-M relatou também este perfil duplo Th1/ Th2 que, segundo os autores, se tornou mais evidente após a administração da segunda dose. Além disso, o trabalho ressaltou a alta frequência de células Th1 multifuncionais induzidas por esta vacina (Madhun *et al.*, 2009). Neste contexto, foi demonstrado que o adjuvante completo de Freund (FCA) também induz uma resposta mista Th1/ Th2, enquanto que o adjuvante Alum promove uma polarização Th2, mesmo em camundongos *knockouts* para IL-4^{-/-} (Brewer *et al.*, 1996). Quanto ao adjuvante MF59, muito usado nas vacinas de influenza, a literatura é bastante divergente. Há trabalhos que evidenciam um perfil predominantemente Th2, enquanto outros relatam a observância de um perfil misto Th1/ Th2 (Valensi *et al.*, 1994; Vono *et al.*, 2013). Sabe-se que um adjuvante ideal não deve apenas aumentar a resposta imune, mas direcionar a resposta para alcançar um tipo adequado de imunidade protetora em cada situação. E ainda, sabe-se que a resposta biológica desencadeada

por um adjuvante depende da sua capacidade de ativar as respostas Th1, Th2 ou ambas, que controlam as principais características da resposta imune específica a determinado antígeno (Edelman & Tacket, 1990; Audibert & Lise, 1993; Schijns, 2003). Neste sentido, também acreditamos que a escolha do adjuvante deve ser feita de maneira criteriosa de acordo com o tipo de antígeno utilizado (*e.g.* se proveniente de bactéria, vírus, ou outro patógeno, se é um antígeno de microorganismo inteiro, fragmentado ou subunidade), o que determina qual o melhor tipo de resposta para cada condição. Outra hipótese é de que respostas mistas induzam maior eficácia vacinal paralelo a um bom perfil de segurança, o que está diretamente relacionado com a indução da inflamação contra o antígeno concomitante a uma regulação pelo organismo.

Nossos resultados mostraram ainda uma produção continuada de IL-10 no grupo que recebeu a vacina com adjuvante em todos os tempos avaliados e que esta citocina foi proveniente de diferentes fontes celulares, tais como CD4⁺IL-10⁺ (T1 e T30), CD8⁺IL-10⁺ (T3) CD19⁺IL-10⁺ (T1, T3, T7). As funções biológicas da IL-10 sobre os macrófagos/monócitos e células T já estão bem caracterizadas na literatura. Sabe-se que esta citocina é capaz de modular a apresentação de antígeno e fagocitose, por exemplo, diminuindo a expressão de MHC de classe II nas células, além de inibir a ação de células da imunidade inata, favorecendo as respostas Th2 através da supressão de citocinas pró-inflamatórias. Esta citocina, portanto, é capaz de regular as respostas de células T, além de exercer o controle da resposta inflamatória aguda (Fiorentino *et al.*, 1991; de Waal Malefyt *et al.*, 1991). Por outro lado, a IL-10 é um potente fator na proliferação e maturação de células B, bem como um componente crucial na produção de IgG1 e IgG3 por estas células, quando ativadas por CD40 (Rousset *et al.*, 1992; Malisan *et al.*, 1996). Levy & Brouet, (1994) ressaltam ainda que a citocina IL-10 exerce um importante papel na sobrevivência de células B maduras por induzir uma forte expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nestas células que, quando ativadas, também podem produzir sua própria IL-10. Neste contexto, os achados de Wang *et al.*, (2012) reforçam estas prerrogativas, demonstrando haver uma correlação positiva entre os níveis de IL-10 antes da vacinação com grau de aumento de anticorpos anti-H1N1, anti-H3N2, anti-B/Yamagata e anti-B/Victoria. Além disso, foi possível observar também uma elevada produção de IL-4 em todos os tempos nesta vacina, que se originou tanto de células da imunidade inata quanto da imunidade adquirida: CD56⁺IL-4⁺ (T1 e T30), CD16⁺IL-4⁺ (T1, T7, T30), CD4⁺IL-4⁺ (T1, T3, T7, T30), CD8⁺IL-4⁺ (T1, T3, T30), CD19⁺IL-4⁺ (T1, T7, T30).

Rousset *et al.*, (1991) demonstraram que IL-4 e IL-10 exercem efeitos aditivos, promovendo um aumento de 10 vezes do número de células B viáveis.

No grupo com adjuvante observamos também uma sustentada produção de IFN- γ ao lado de outras citocinas inflamatórias tais como IL-6, IL8, TNF- α e IL-12. O IFN- γ atua regulando a expressão de uma vasta gama de genes, os quais compreendem mediadores pró-inflamatórios, moléculas sinalizadoras, ativadores transcricionais, dentre outros, sendo uma das citocinas responsáveis pela caracterização de uma resposta do tipo Th1 (de Veer *et al.*, 2001; Saha *et al.*, 2010). Assim, o IFN- γ exerce inúmeras funções na resposta imunológica. Além de possuir atividade antiviral, embora menor que interferons do tipo I, esta citocina é um potente ativador de macrófagos, neutrófilos e células NK, bem como linfócitos T e B, atuando também na diferenciação destas células. Esta citocina é ainda capaz de induzir maior expressão de MHCs de classe I e II e atuar em sinergia com TNF- α , amplificando as respostas de ambas as citocinas e intensificando a resposta Th1, embora também possa atuar na imunorregulação da resposta imune (Billiau & Matthys, 2009). Desta forma, o IFN- γ funciona ativamente no controle de diferentes patógenos, sobretudo aqueles cuja eliminação depende de fagocitose e lise celular, tais como bactérias, protozoários, fungos e vírus (Kiderlen *et al.*, 1984; Flynn *et al.*, 1993; Armstrong-James & Harrison, 2012). Neste contexto, considerando a importância desta citocina na resposta antiviral e suas propriedades inflamatórias, ao comparar as duas vacinas observamos que a produção de IFN- γ foi expressivamente maior no grupo com adjuvante AS03. Este resultado corrobora com achados de Moris *et al.*, (2011), porém utilizando o antígeno vacinal H5N1. Além disso, Long *et al.*, (2008) destacam a importância das células NK, juntamente com linfócitos T, na produção de IFN- γ após a imunização contra influenza, o que também foi observado em nosso estudo.

A citocina IL-17, por sua vez, esteve elevada no primeiro e no terceiro dia pós-imunização no grupo que recebeu a vacina sem adjuvante e no sétimo dia no grupo imunizado com adjuvante. Esta citocina pode desempenhar um papel importante na resposta imunológica direcionada à eliminação de patógenos, mas também está envolvida na inflamação do tecido em diversas doenças autoimunes, alergias e asma (Korn *et al.*, 2009; Louten *et al.*, 2009). Na infecção por H1N1, o papel que esta citocina pode desempenhar ainda é bastante controverso. O aumento de IL-17 foi observado em pacientes com formas graves da doença exercendo um papel

protetor nestes indivíduos (Barmejo-Martin *et al.*, 2009). Adicionalmente, outros trabalhos também demonstraram essa atividade benéfica da IL-17 na influenza letal (Hamada *et al.*, 2009; To *et al.*, 2010; Alamansa *et al.*, 2011). Em contrapartida, há estudos que associam a produção aumentada desta citocina com elevada inflamação e dano tecidual pulmonar (Crowe *et al.*, 2009; Ryzhakov *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012).

Com relação às citocinas presentes no plasma também foi observado um perfil de resposta mais inflamatório induzido pela vacina com adjuvante, em que pelo menos duas citocinas inflamatórias estiveram acima da mediana global dos grupos em cada tempo avaliado. A vacina sem adjuvante, por sua vez, apresentou apenas uma citocina inflamatória acima da mediana global em cada tempo. Além disso, os níveis gerais das citocinas produzidas foram claramente menores neste grupo em relação àquele que recebeu vacina com AS03.

A vacina com adjuvante promoveu um aumento das seguintes citocinas plasmáticas nos diferentes tempos: IL-8, IL-6, IL-12 e IL-10 (T1), IL-1 β , IL-12 e IL-10 (T3), IL-1 β , TNF, IL-12 (T7) e IL-1 β , IL-12 (T30). Enquanto que na vacina sem adjuvante foi observado o aumento de IL-8 (T1), TNF, IL-10 (T3), TNF (T7) e TNF e IL-10 (T30).

O aumento de IL-8 no primeiro dia após a vacinação foi observado em ambos os grupos. Sabe-se que o acúmulo de neutrófilos no tecido é uma marca característica da inflamação e para que isto ocorra, estas células precisam ser recrutadas dos vasos sanguíneos até o local da lesão ou infecção por um estímulo quimioatraente, sendo a IL-8 um componente crucial nesse processo. Esta citocina induz a expressão de um padrão completo de características em neutrófilos ativados, tais como: mudança de forma, acionamento do aparelho de motilidade e migração direcional, a expressão de moléculas de adesão de superfície e a liberação de grânulos enzimáticos armazenados da produção de metabólitos reativos de oxigênio (Baggiolini *et al.*, 1989; Baggiolini & Clark-Lewis, 1992). Neste sentido, nossos dados demonstram que a vacinação parece induzir uma inflamação local, com elevada e precoce infiltração de granulócitos, principalmente neutrófilos, juntamente com outras células da imunidade inata. Esta observação é consistente com os resultados do hemograma, em que foi evidenciado um aumento expressivo de granulócitos circulantes um dia após a imunização. Além disso, Ramakrishnan *et al.*, (2012) correlacionam os níveis de IL-8 basais com o desenvolvimento de uma resposta adaptativa eficaz em indivíduos imunizados com a vacina trivalente.

Nossos resultados evidenciaram também um aumento plasmático de IL-12 no grupo vacinado com adjuvante, em todos os tempos avaliados. Esta citocina é considerada um regulador essencial das imunidades inata e adaptativa e sua atividade é substancialmente pró-inflamatória. Sabe-se que, dentre outras funções, a IL-12 induz a polarização de uma resposta Th1 e estimula células NK a produzirem IFN- γ (Vignali & Kuchroo, 2012; Lasek *et al.*, 2014). Neste contexto, acreditamos que este aumento de IL-12 está em concordância com nossos resultados de citocinas intracitoplasmáticas, que mostraram uma importante produção de IFN- γ pelas células NK no grupo vacinado com adjuvante.

Notamos ainda uma continuada produção de IL-1 β , que se encontrou aumentada no plasma no terceiro, no sétimo dia e no trigésimo dia após a vacinação na presença de adjuvante. Ao passo que, a vacinação sem adjuvante estimulou a produção de TNF nestes mesmos tempos. TNF e IL-1 β possuem atividades similares e exercem efeitos importantes nas respostas inflamatórias, além disso, possuem a capacidade de modular a diferenciação e proliferação de células B. Estas citocinas são bem conhecidas por seus efeitos estimulantes sobre as funções de neutrófilos e macrófagos, sinalizando para que ocorra a migração direcionada destas células para o tecido. Sabe-se ainda que durante a resposta imunológica é comum ocorrer sobreposição e/ ou sinergismo das atividades de citocinas, que podem induzir a sua própria produção ou a produção de outras citocinas. Neste sentido, TNF- α e IL-1 β , por exemplo, estimulam a liberação de IL-6 atuando em sinergismo com esta citocina (Semenzato, 1990; Jelinek & Lipsky *et al.*, 1987; Van Reeth, 2000). Tanaka & Kishimoto, (2014) reuniram achados de diversos estudos, destacando as principais atividades da IL-6, dentre as quais, sua importância na ativação de células T CD4⁺ *naïve* na produção de proteínas de fase aguda, bem como na ativação e diferenciação de células B e produção de anticorpos. Considerando o exposto, Le & Vilck, (1987) reforçam ainda o importante papel de IFN- α , TNF- α , IL-1 β e IL-6 na resposta imune específica e não específica contra os vírus. Além disso, Morel *et al.*, (2011) observaram a presença precoce de mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β , IL-1 α , TNF- α no músculo de indivíduos vacinados contra influenza na presença AS03 e de IFN- γ 24 horas após a imunização. Os autores enfatizam ainda que o α -tocoferol, presente no AS03, é capaz de afetar intensamente a produção de citocinas, funcionando assim como um imunomodulador, atuando em conjunto com o esqualeno na amplificação da resposta vacinal.

7 CONCLUSÕES E EVIDÊNCIAS

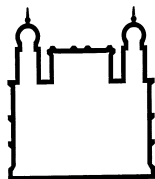
Em uma visão global dos resultados obtidos neste estudo, ficou evidente que as vacinas com adjuvante AS03 (*GlaxoSmithKline*) e sem adjuvante (*Sanofi Pasteur/ Butantan*) desencadearam perfis imunológicos bastante distintos pós-imunização. As respostas entre as vacinas não se distinguiram apenas na intensidade em que foram geradas, mas nas diferentes vias de ativação das respostas imune inata e adaptativa, bem como na cinética de citocinas e nas redes de interações celulares observadas no desenvolvimento da imunidade contra o antígeno. Neste contexto, o trabalho como um todo, demonstra a capacidade do adjuvante em alterar de maneira intensa a resposta vacinal, induzindo um perfil diferente e mais exacerbado de imunidade, sob o estímulo de um mesmo antígeno.

Segue abaixo uma síntese das principais alterações imunológicas observadas nos indivíduos imunizados na presença e ausência do adjuvante:

- ❖ A vacina sem adjuvante induziu uma resposta vacinal menos proeminente em todas as análises realizadas;
- ❖ A vacina com adjuvante provocou mais efeitos adversos nos voluntários vacinados, embora tais reações tenham sido de intensidade leve a moderada, e nenhum evento adverso grave tenha sido observado;
- ❖ Apenas a vacina com adjuvante induziu alterações acentuadas capazes de serem detectadas pelo exame de hemograma, com elevação da frequência de leucócitos totais e aumento expressivo de células da imunidade inata nos primeiros dias pós-imunização;
- ❖ Todos os indivíduos avaliados soroconverteram com a vacinação, apresentando um título de anticorpos $\geq 1:40$ no HAI após 30 dias;
- ❖ Ambas as vacinas induzem níveis semelhantes de anticorpos e sua persistência 6 meses após a imunização;
- ❖ A vacina com adjuvante desencadeou maior proliferação, ativação e migração de células da imunidade inata, bem como uma resposta mais expressiva de linfócitos T auxiliares e citotóxicos, porém com ativação mais proeminente de linfócitos T CD4⁺;

- ❖ Embora tenha sido observado maior aumento na frequência de células B e de suas subpopulações no grupo que recebeu a vacina com adjuvante, a vacina sem adjuvante induziu maior ativação destas células;
- ❖ A vacina com AS03 promoveu um perfil misto de ativação, induzindo um balanço entre as respostas de Th1 e Th2;
- ❖ A presença do adjuvante provocou maior expressão de citocinas inflamatórias no plasma dos indivíduos imunizados;
- ❖ A vacina com adjuvante apresentou redes de correlações celulares mais robustas e complexas entre os diferentes compartimentos da imunidade.

APÊNDICE A



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ

Centro de Pesquisas René Rachou

Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Caracterização fenotípica e funcional da resposta imune de voluntários vacinados contra o vírus da influenza A (H1N1)pdm09”. Você foi convidado a participar do estudo e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador, com o Centro de Pesquisas René Rachou ou com o Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração. O objetivo deste estudo é fazer uma avaliação imunológica de pessoas que foram submetidas à vacinação contra o vírus da Influenza A (H1N1)pdm09. Sua participação nesta pesquisa consistirá em doar amostras de sangue em cinco momentos do processo vacinal: anterior a vacinação (T0), 1º dia após a vacinação (T1), 3º dia após a vacinação (T3), 7º dia após a vacinação (T7) e 30º dia após a vacinação (T30). Neste projeto você não estará exposto a nenhum a risco. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação, pois as amostras serão codificadas através de números e isto assegurará a total privacidade dos voluntários. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do Comitê de Ética do CPqRR. Prontificamo-nos a esclarecer quaisquer dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Dr. Olindo Assis Martins Filho

Endereço e telefone institucional do Pesquisador Principal:

- Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002). Secretária: Jucélia Amorim – TeleFax: (31) 3349 7764

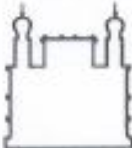
Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética - CPqRR:

- Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002). Secretária: Jéssica Camêlo – TeleFax: (31) 3349 7825

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Sujeito da pesquisa

APÊNDICE B

	Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisa René Rachou Comitê de Ética	
---	---	---

CARTA DE APROVAÇÃO Nº 11/2010 – CEP / CPqRR / FIOCRUZ / MS

Protocolo CEP - CPqRR nº: 13/2010

Projeto de Pesquisa: "Aspectos Fenotípicos e Funcionais da Imunidade Celular e Humoral contra o Vírus da Influenza A (H1N1)". Gill.

Pesquisador Responsável: Olindo Assis Martins-Filho

Instituição Realizadora: Centro de Pesquisa René Rachou

CAAE: 0011.0.245.000-10

Após submissão e análise criteriosa do protocolo em questão, no Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou, constatamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 196/96 CNS, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR / FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições à ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela homologação do projeto de pesquisa proposto.

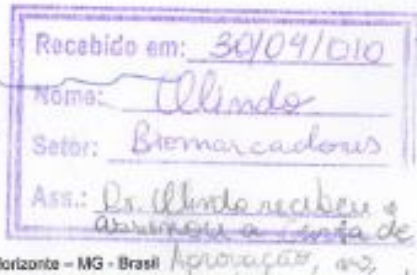
Situação: PROJETO APROVADO.

Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios:

- Parcial 01: Maio 2011;
- Final: Maio 2012.

Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Belo Horizonte, 26 de Abril de 2010.

	 João Carlos Pinto Dias Coordenador do CEP/SH-CPqRR Dr. João Carlos Pinto Dias COORDENADOR COMITÊ DE ÉTICA	
---	--	--

Av. Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto 30190-002, Belo Horizonte - MG - Brasil

Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

IDENTIFICAÇÃO: _____

Data: / /

Nome: _____

Endereço: _____

Bairro: _____

Cidade (UF): _____) CEP: _____

Telefones:

Endereço de contato: _____

1. Encaminhado por: 1 () Posto de Saúde 2 () Outros locais 9 () SI

2. Data de Nascimento: ____/____/____

3. Idade (anos): _____

4. Sexo: 1 () Masculino 2 () Feminino

5. Ocupação atual: _____

6. Patologia prévia: 1 () Sim 2 () Não

Quais? _____

Faz uso de algum medicamento? _____

7. Já doou sangue? 1 () Nunca 2 () 1 vez
 3 () 2 a 5 vezes 4 () mais de 5 vezes 9 () SI

1.06

Especificar: _____

9. Bebida alcoólica 1 () Atual 2 () Nunca Frequência no uso: _____

10. Vacinação do programa básico? 1 () Sim 2 () Não

11. Data da última vacinação: _____

Anamnese

12. Queixas atuais (SIC): 1 () Sim 2 () Não 9 () SI

Quais? _____

13. Doenças atuais: 1 () Sim 2 () Não 9 () SI

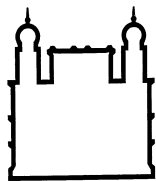
Quais? _____

14. Gestante, aleitamento ou possibilidade de gravidez? _____

Exames Complementares

Exames/ Data	T0 (_/_/_)	T1 (_/_/_)	T3 (_/_/_)	T7 (_/_/_)	T30 (_/_/_)
Hm					
Hb					
Htc					
Leucócitos totais					
Segmentados (%)					
Segmentados (uL)					
Linfócitos (%)					
Linfócitos (/uL)					
Monócitos (%)					
Monócitos (/uL)					
Eosinófilos (%)					
Eosinófilos (/uL)					
Basófilos (%)					
Basófilos (/uL)					
Plaquetas					
Bilirrubina Direta					
Bilirrubina indireta					
Bilirrubina total					
ALT					
AST					
Fosfatase alcalina					
CK					

APÊNDICE D



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ

Centro de Pesquisas René Rachou

Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

FICHA PÓS-VACINAÇÃO CONTRA O VIRUS INFLUENZA A (H1N1)pdm09

Nome : _____

Identificação : _____ Data da vacina: ____/____/____

Reações adversas	SIM	NÃO	Início	Término
Febre				
Dor local				
Eritema local				
Dor muscular				
Icterícia				
Mal estar				
Cefaléia				
Dor articular				
Fadiga				
Náusea				
Diarréia				
Sudorese				
Hiperemia				
Tremores				
Linfadenopatia				
Insônia				
Dispepsia				
Desconforto gástrico				
Prurido				
Erupção				
Lombalgia				
Rigidez muscular				
Espasmos musculares				
Astenia				
Precordialgia				
Outros:				

Em caso de dúvidas entrar em contato: Dra. Silvana Eloi - LBDM- Celular: 8736-1686

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, AK; Lichtman, AH; Pillai, S. *Imunologia celular e molecular*. 7a ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier, 2011. xi, 545 p.

Aguilar JC, Rodriguez EG. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 2007 May 10;25(19):3752-62.

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

Almansa R, Bermejo-Martin JF, de Lejarazu Leonardo RO. Immunopathogenesis of 2009 pandemic influenza. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012 Oct;30 Suppl 4:18-24.

Altfeld M, Fadda L, Frleta D, Bhardwaj N. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat Rev Immunol*. 2011 Mar;11(3):176-86.

Alving CR. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine*. 2002 May 31;20 Suppl 3:S56-64.

Armstrong-James D, Harrison TS. Immunotherapy for fungal infections. *Curr Opin Microbiol*. 2012 Aug;15(4):434-9.

Audibert F. Adjuvants for vaccines, a quest. *Int Immunopharmacol*. 2003 Aug;3(8):1187-93.

Audibert FM, Lise LD. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today*. 1993 Jun;14(6):281-4.

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*. 1992 Jul 27;307(1):97-101.

Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*. 1989 Oct;84(4):1045-9.

Bean B, Moore BM, Sterner B, Peterson LR, Gerding DN, Balfour HH, Jr. Survival of influenza viruses on environmental surfaces. *J Infect Dis*. 1982 Jul;146(1):47-51.

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

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

Billiau A, Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Apr;20(2):97-113.

Bode AP, Hickerson DH. Characterization and quantitation by flow cytometry of membranous microparticles formed during activation of platelet suspensions with ionophore or thrombin. *Platelets.* 2000 Aug;11(5):259-71.

Bonduelle O, Carrat F, Luyt CE, Leport C, Mosnier A, Benhabiles N, et al. Characterization of pandemic influenza immune memory signature after vaccination or infection. *J Clin Invest.* 2014 Jul 1;124(7):3129-36.

Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008 Sep 12;26 Suppl 4:D49-53.

Bradley-Stewart A, Jolly L, Adamson W, Gunson R, Frew-Gillespie C, Templeton K, et al. Cytokine responses in patients with mild or severe influenza A(H1N1)pdm09. *J Clin Virol.* 2013 Sep;58(1):100-7.

Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur J Immunol.* 1996 Sep;26(9):2062-6.

Broadbent AJ, Subbarao K. Influenza virus vaccines: lessons from the 2009 H1N1 pandemic. *Curr Opin Virol.* 2011 Oct;1(4):254-62.

Brodin P, Jojic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJ, Furman D, et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell.* 2015 Jan 15;160(1-2):37-47.

Brown EG. Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother.* 2000 May;54(4):196-209.

Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine.* 2011 Feb 17;29(9):1812-23.

Calabro S, Tritto E, Pezzotti A, Taccone M, Muzzi A, Bertholet S, et al. The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine.* 2013 Jul 18;31(33):3363-9.

Carmona A, Omenaca F, Tejedor JC, Merino JM, Vaman T, Dieussaert I, et al. Immunogenicity and safety of AS03-adjuvanted 2009 influenza A H1N1 vaccine in children 6-35 months. *Vaccine.* 2010 Aug 16;28(36):5837-44.

CD Antigens – Abcam; 2009 [acesso em 2015 Jan 18]. Disponível em: http://docs.abcam.com/pdf/immunology/cdantigen_poster.pdf.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Estimates of 2009 H1N1 Influenza Cases, Hospitalizations and Deaths in the United States, April 2009 – February 13, 2010. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2010 Mar 12 [acesso em 2015 Jan 15]. Disponível em: www.cdc.gov/h1n1flu/estimates/april_february_13.htm.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Swine influenza A (H1N1) infection in two children--Southern California, March-April 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009 Apr 24;58(15):400-2. (a)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update on influenza A (H1N1) 2009 monovalent vaccines. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009 Oct 9;58(39):1100-1. (e)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: infections with a swine-origin influenza A (H1N1) virus--United States and other countries, April 28, 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009 May 1;58(16):431-3. (c)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: novel influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-May, 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009 Jun 5;58(21):585-9. (b)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: novel influenza A (H1N1) virus infections - worldwide, May 6, 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009 May 8;58(17):453-8. (d)

Chen GL, Lau YF, Lamirande EW, McCall AW, Subbarao K. Seasonal influenza infection and live vaccine prime for a response to the 2009 pandemic H1N1 vaccine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jan 18;108(3):1140-5.

Chiu C, Wrammert J, Li GM, McCausland M, Wilson PC, Ahmed R. Cross-reactive humoral responses to influenza and their implications for a universal vaccine. Ann N Y Acad Sci. 2013 Apr;1283:13-21.

Clark TW, Pareek M, Hoschler K, Dillon H, Nicholson KG, Groth N, et al. Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine. N Engl J Med. 2009 Dec 17;361(25):2424-35.

Cohen J, Enserink M. Infectious diseases. As swine flu circles globe, scientists grapple with basic questions. Science. 2009 May 1;324(5927):572-3.

Cohen J, Enserink M. Swine flu. After delays, WHO agrees: the 2009 pandemic has begun. Science. 2009 Jun 19;324(5934):1496-7.

Cohen J. Pandemic influenza. Straight from the pig's mouth: swine research with swine influenzas. Science. 2009 Jul 10;325(5937):140-1.

- Corti D, Suguitan AL Jr, Pinna D, Silacci C, Fernandez-Rodriguez BM, Vanzetta F, et al. Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *J Clin Invest*. 2010 May;120(5):1663-73.
- Cox JC, Coulter AR. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. 1997 Feb;15(3):248-56.
- Crowe CR, Chen K, Pociask DA, Alcorn JF, Krivich C, Enelow RI, et al. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J Immunol*. 2009 Oct 15;183(8):5301-10.
- Culley FJ. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology*. 2009 Oct;128(2):151-63.
- Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2012 Sep;12(9):687-95.
- 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. *N Engl J Med*. 2009 Jun 18;360(25):2605-15.
- Dawson TC, Beck MA, Kuziel WA, Henderson F, Maeda N. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am J Pathol*. 2000 Jun;156(6):1951-9.
- de Castro IF, Guzmán-Fulgencio M, García-Alvarez M, Resino S. First evidence of a pro-inflammatory response to severe infection with influenza virus H1N1. *Crit Care*. 2010;14(1):115.
- de la Fuente H, Cibrian D, Sanchez-Madrid F. Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the immune response. *FEBS Lett*. 2012 Aug 31;586(18):2897-905.
- De Serres G, Rouleau I, Hamelin ME, Quach C, Skowronski D, Flamand L, et al. Contagious period for pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis*. 2010 May;16(5):783-8.
- de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol*. 2001 Jun;69(6):912-20.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1209-20.
- Degen WG, Jansen T, Schijns VE. Vaccine adjuvant technology: from mechanistic concepts to practical applications. *Expert Rev Vaccines*. 2003 Apr;2(2):327-35.

Del Giudice G, Stittelaar KJ, van Amerongen G, Simon J, Osterhaus AD, Stöhr K, Rappuoli R. Seasonal influenza vaccine provides priming for A/H1N1 immunization. *Sci Transl Med*. 2009 Dec 23;1(12):12re1.

Dessing MC, van der Sluijs KF, Florquin S, van der Poll T. Monocyte chemoattractant protein 1 contributes to an adequate immune response in influenza pneumonia. *Clin Immunol*. 2007 Dec;125(3):328-36.

Domingues CM, de Oliveira WK. Uptake of pandemic influenza (H1N1)-2009 vaccines in Brazil, 2010. *Vaccine*. 2012 Jul 6;30(32):4744-51.

Dupuis M, Denis-Mize K, LaBarbara A, Peters W, Charo IF, McDonald DM, et al. Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis. *Eur J Immunol*. 2001 Oct;31(10):2910-8.

Edelman R, Tacket CO. Adjuvants. *Int Rev Immunol*. 1990;7(1):51-66.

Edelman R. The development and use of vaccine adjuvants. *Mol Biotechnol*. 2002 Jun;21(2):129-48.

Egli A, Santer D, Barakat K, Zand M, Levin A, Vollmer M, et al. Vaccine adjuvants--understanding molecular mechanisms to improve vaccines. *Swiss Med Wkly*. 2014;144:w13940.

Enserink M, Cohen J. Virus of the year. The novel H1N1 influenza. *Science*. 2009 Dec 18;326(5960):1607.

Ferguson M, Risi G, Davis M, Sheldon E, Baron M, Li P, et al. Safety and long-term humoral immune response in adults after vaccination with an H1N1 2009 pandemic influenza vaccine with or without AS03 adjuvant. *J Infect Dis*. 2012 Mar 1;205(5):733-44.

Fineberg HV. Pandemic preparedness and response--lessons from the H1N1 influenza of 2009. *N Engl J Med*. 2014 Apr 3;370(14):1335-42.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991 Dec 1;147(11):3815-22.

Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 1993 Dec 1;178(6):2249-54.

Fox CB, Haensler J. An update on safety and immunogenicity of vaccines containing emulsion-based adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2013 Jul;12(7):747-58.

- Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol.* 2008 Jul;86(5):398-408.
- Girard MP, Tam JS, Assossou OM, Kieny MP. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine.* 2010 Jul 12;28(31):4895-902.
- Gonzalez-Amaro R, Cortes JR, Sanchez-Madrid F, Martin P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med.* 2013 Oct;19(10):625-32.
- Grailer JJ, Kodera M, Steeber DA. L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *J Dermatol Sci.* 2009 Dec;56(3):141-7.
- Greenberg ME, Lai MH, Hartel GF, Wichems CH, Gittleson C, Bennet J, et al. Response to a monovalent 2009 influenza A (H1N1) vaccine. *N Engl J Med.* 2009 Dec 17;361(25):2405-13.
- Gulati U, Kumari K, Wu W, Keitel WA, Air GM. Amount and avidity of serum antibodies against native glycoproteins and denatured virus after repeated influenza whole-virus vaccination. *Vaccine.* 2005;23(11):1414–1425.
- Hamada H, Garcia-Hernandez Mde L, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinsty KK, et al. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol.* 2009 Mar 15;182(6):3469-81.
- Heier MS, Gautvik KM, Wannag E, Bronder KH, Midtlyng E, Kamaleri Y, et al. Incidence of narcolepsy in Norwegian children and adolescents after vaccination against H1N1 influenza A. *Sleep Med.* 2013 Sep;14(9):867-71.
- Herrera MT, Gonzalez Y, Juarez E, Hernandez-Sanchez F, Carranza C, Sarabia C, et al. Humoral and cellular responses to a non-adjuvanted monovalent H1N1 pandemic influenza vaccine in hospital employees. *BMC Infect Dis.* 2013;13:544.
- Hikono H, Kohlmeier JE, Ely KH, Scott I, Roberts AD, Blackman MA, et al. T-cell memory and recall responses to respiratory virus infections. *Immunol Rev.* 2006 Jun;211:119-32.
- Hillaire ML, van Trierum SE, Bodewes R, van Baalen CA, van Binnendijk RS, Koopmans MP, et al. Characterization of the human CD8(+) T cell response following infection with 2009 pandemic influenza H1N1 virus. *J Virol.* 2011 Nov;85(22):12057-61.
- Hsu JP, Phoon MC, Koh GC, Chen MI, Lee VJ, Wu Y, et al. Comparison of neutralizing antibody and cell-mediated immune responses to pandemic H1N1 2009 influenza virus before and after H1N1 2009 influenza vaccination of elderly subjects and healthcare workers. *Int J Infect Dis.* 2012 Aug;16(8):e621-7.

- Hussell T, Wissinger E, Goulding J. Bacterial complications during pandemic influenza infection. *Future Microbiol.* 2009 Apr;4(3):269-72.
- Janeway CA, Traves P, Walport M, Schlomik M. *Imunobiologia. - O Sistema Imunológico na Saúde e na Doença.* 7a ed. Porto Alegre (RS): Artmed, 2010.
- Jelinek DF, Lipsky PE. Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J Immunol.* 1987 Nov 1;139(9):2970-6.
- Johansen K, Nicoll A, Ciancio BC, Kramarz P. Pandemic influenza A(H1N1) 2009 vaccines in the European Union. *Euro Surveill.* 2009;14(41):19361.
- Johnson NP, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med.* 2002 Spring;76(1):105-15.
- Kaiser J. A one-size-fits-all flu vaccine? *Science.* 2006 Apr 21;312(5772):380-2.
- Kaiser L. Influenza will not miss opportunities. *Clin Infect Dis.* 2006 Dec 15;43(12):1562-4.
- Kenney RT, Edelman R. Survey of human-use adjuvants. *Expert Rev Vaccines.* 2003 Apr;2(2):167-88.
- Kiderlen AF, Kaufmann SH, Lohmann-Matthes ML. Protection of mice against the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* by recombinant immune interferon. *Eur J Immunol.* 1984 Oct;14(10):964-7.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
- Kuiken, T., B. Riteau, R. A. Fouchier, and G. F. Rimmelzwaan. 2012. Pathogenesis of influenza virus infections: the good, the bad and the ugly. *Current opinion in virology* 2:276-286.
- Kumru OS, Joshi SB, Smith DE, Middaugh CR, Prusik T, Volkin DB. Vaccine instability in the cold chain: mechanisms, analysis and formulation strategies. *Biologicals.* 2014 Sep;42(5):237-59.
- Lambert LC, Fauci AS. Influenza vaccines for the future. *N Engl J Med.* 2010 Nov 18;363(21):2036-44.
- Lasek W, Zagozdzon R, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother.* 2014 May;63(5):419-35.
- Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep.* 2009 Jan-Feb;61(1):22-32.
- Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest.* 1987 Mar;56(3):234-48.

Leung GM, Nicoll A. Reflections on pandemic (H1N1) 2009 and the international response. *PLoS Med*. 2010 Oct;7(10).

Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest*. 1994 Jan;93(1):424-8.

Li C, Yang P, Sun Y, Li T, Wang C, Wang Z, et al. IL-17 response mediates acute lung injury induced by the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Cell Res*. 2012 Mar;22(3):528-38.

Li J, Arevalo MT, Chen Y, Chen S, Zeng M. T-cell-mediated cross-strain protective immunity elicited by prime-boost vaccination with a live attenuated influenza vaccine. *Int J Infect Dis*. 2014 Oct;27:37-43.

Liang XF, Wang HQ, Wang JZ, Fang HH, Wu J, Zhu FC, et al. Safety and immunogenicity of 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccines in China: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010 Jan 2;375(9708):56-66.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Long BR, Michaelsson J, Loo CP, Ballan WM, Vu BA, Hecht FM, et al. Elevated frequency of gamma interferon-producing NK cells in healthy adults vaccinated against influenza virus. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Jan;15(1):120-30.

Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1004-11.

Madhun AS, Haaheim LR, Nilsen MV, Cox RJ. Intramuscular Matrix-M-adjuvanted virosomal H5N1 vaccine induces high frequencies of multifunctional Th1 CD4⁺ cells and strong antibody responses in mice. *Vaccine*. 2009 Dec 9;27(52):7367-76.

Magnusson SE, Reimer JM, Karlsson KH, Lilja L, Bengtsson KL, Stertman L. Immune enhancing properties of the novel Matrix-M adjuvant leads to potentiated immune responses to an influenza vaccine in mice. *Vaccine*. 2013 Mar 25;31(13):1725-33.

Mahallawi WH, Kasbekar AV, McCormick MS, Hoschler K, Temperton N, Leong SC, et al. Infection with 2009 H1N1 influenza virus primes for immunological memory in human nose-associated lymphoid tissue, offering cross-reactive immunity to H1N1 and avian H5N1 viruses. *J Virol*. 2013 May;87(10):5331-9.

Malisan F, Briere F, Bridon JM, Harindranath N, Mills FC, Max EE, et al. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3):937-47.

Marks G, Beatty WK. *Epidemics*. New York: Scribners, 1976.

Martins MA, Silva ML, Eloi-Santos SM, Ribeiro JG, Peruhype-Magalhaes V, Marciano AP, et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine*. 2008 Feb 26;26(9):1173-84.

Marzio R, Mauel J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1999 Aug;21(3):565-82.

Marzocchi-Machado, CM.; Lucisano-Valim, YM.. Receptores para imunoglobulina G (FcγR). *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*. 2005 Mar;38(1): 82-95.

Merekoulis G, Alexopoulos EC, Belezos T, Panagiotopoulou E, Jelastopulu DM. Lymphocyte to monocyte ratio as a screening tool for influenza. *PLoS Curr*. 2010 Mar 29;2:RRN1154.

Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J, Jr. An influenza A H1N1 virus revival - pandemic H1N1/09 virus. *Infection*. 2009 Oct;37(5):381-9.

Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, Delhay S, Baras B, Jacob V, et al. Adjuvant System AS03 containing alpha-tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine*. 2011 Mar 16;29(13):2461-73.

Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis*. 2008 Oct 1;198(7):962-70.

Moris P, van der Most R, Leroux-Roels I, Clement F, Drame M, Hanon E, et al. H5N1 influenza vaccine formulated with AS03 A induces strong cross-reactive and polyfunctional CD4 T-cell responses. *J Clin Immunol*. 2011 Jun;31(3):443-54.

Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29;105(30):10501-6.

Nayak JL, Fitzgerald TF, Richards KA, Yang H, Treanor JJ, Sant AJ. CD4+ T-cell expansion predicts neutralizing antibody responses to monovalent, inactivated 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus subtype H1N1 vaccine. *J Infect Dis*. 2013 Jan 15;207(2):297-305.

Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 2009 Jun 18;459(7249):931-9.

Neumann G, Kawaoka Y. The first influenza pandemic of the new millennium. *Influenza Other Respir Viruses*. 2011 May;5(3):157-66.

Nolan T, Roy-Ghanta S, Montellano M, Weckx L, Ulloa-Gutierrez R, Lazcano-Ponce E, et al. Relative efficacy of AS03-adjuvanted pandemic influenza A(H1N1) vaccine in children: results of a controlled, randomized efficacy trial. *J Infect Dis*. 2014 Aug 15;210(4):545-57.

O'Hagan DT, Ott GS, De Gregorio E, Seubert A. The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine*. 2012 Jun 19;30(29):4341-8.

Pada S, Tambyah PA. Overview/reflections on the 2009 H1N1 pandemic. *Microbes Infect*. 2011 May;13(5):470-8.

Palese, P.; Shaw, ML. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, DM.;Howley, PM.; Griffin, DE.; Lamb, RA.; Martin, MA.; Roizman, B., et al., editors. *Fields Virology*. Fifth Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1647-1689.

Partinen M, Saarenpaa-Heikkila O, Ilveskoski I, Hublin C, Linna M, Olsen P, et al. Increased incidence and clinical picture of childhood narcolepsy following the 2009 H1N1 pandemic vaccination campaign in Finland. *PLoS One*. 2012;7(3):e33723.

Patterson KD, Pyle GF. The geography and mortality of the 1918 influenza pandemic. *Bull Hist Med*. 1991 Spring;65(1):4-21.

Peiris JS, Poon LL, Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J Clin Virol*. 2009 Jul;45(3):169-73.

Pellegrini M, Nicolay U, Lindert K, Groth N, Della Cioppa G. MF59-adjuvanted versus non-adjuvanted influenza vaccines: integrated analysis from a large safety database. *Vaccine*. 2009 Nov 16;27(49):6959-65.

Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol*. 2006 Oct;146(1):124-32.

Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol*. 2004 Oct;82(5):488-96.

Plennevaux E, Blatter M, Cornish MJ, Go K, Kirby D, Wali M, et al. Influenza A (H1N1) 2009 two-dose immunization of US children: an observer-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine*. 2011 Feb 11;29(8):1569-75.

Plennevaux E, Sheldon E, Blatter M, Reeves-Hoche MK, Denis M. Immune response after a single vaccination against 2009 influenza A H1N1 in USA: a preliminary report of two randomised controlled phase 2 trials. *Lancet*. 2010 Jan 2;375(9708):41-8.

Poder A, Simurka P, Li P, Roy-Ghanta S, Vaughn D. An observer-blind, randomized, multi-center trial assessing long-term safety and immunogenicity of AS03-adjuvanted or unadjuvanted

H1N1/2009 influenza vaccines in children 10-17 years of age. *Vaccine*. 2014 Feb 19;32(9):1121-9.

Rahier JF, Papay P, Salleron J, Sebastian S, Marzo M, Peyrin-Biroulet L, et al. H1N1 vaccines in a large observational cohort of patients with inflammatory bowel disease treated with immunomodulators and biological therapy. *Gut*. 2011 Apr;60(4):456-62.

Ramakrishnan A, Althoff KN, Lopez JA, Coles CL, Bream JH. Differential serum cytokine responses to inactivated and live attenuated seasonal influenza vaccines. *Cytokine*. 2012 Dec;60(3):661-6.

Rappuoli R, Dormitzer PR. Influenza: options to improve pandemic preparation. *Science*. 2012 Jun 22;336(6088):1531-3.

Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol*. 1999 Dec;66(6):876-88.

Roman F, Clement F, Dewe W, Walravens K, Maes C, Willekens J, et al. Effect on cellular and humoral immune responses of the AS03 adjuvant system in an A/H1N1/2009 influenza virus vaccine administered to adults during two randomized controlled trials. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 May;18(5):835-43.

Roman F, Vaman T, Gerlach B, Markendorf A, Gillard P, Devaster JM. Immunogenicity and safety in adults of one dose of influenza A H1N1v 2009 vaccine formulated with and without AS03A-adjuvant: preliminary report of an observer-blind, randomised trial. *Vaccine*. 2010 Feb 17;28(7):1740-5.

Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;89(5):1890-3.

Roy-Ghanta S, Van der Most R, Li P, Vaughn DW. Responses to A(H1N1)pdm09 influenza vaccines in participants previously vaccinated with seasonal influenza vaccine: a randomized, observer-blind, controlled study. *J Infect Dis*. 2014 Nov 1;210(9):1419-30.

Ryzhakov G, Lai CC, Blazek K, To KW, Hussell T, Udalova I. IL-17 boosts proinflammatory outcome of antiviral response in human cells. *J Immunol*. 2011 Nov 15;187(10):5357-62.

Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*. 2010 Apr;50(1):1-14.

Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*. 2005 Mar;26(3):136-40.

- Scheifele DW, Dionne M, Ward BJ, Cooper C, Vanderkooi OG, Li Y, et al. Safety and immunogenicity of 2010-2011 A/H1N1pdm09-containing trivalent inactivated influenza vaccine in adults previously given AS03-adjuvanted H1N1 2009 pandemic vaccine: results of a randomized trial. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 Jan;9(1):136-43.
- Schijns VE. Antigen delivery systems and immunostimulation. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002 Sep 10;87(3-4):195-8.
- Schijns VE. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol*. 2000 Aug;12(4):456-63.
- Schijns VE. Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. *Vaccine*. 2003 Feb 14;21(9-10):829-31.
- Schmidt T, Dirks J, Enders M, Gartner BC, Uhlmann-Schiffler H, Sester U, et al. CD4⁺ T-cell immunity after pandemic influenza vaccination cross-reacts with seasonal antigens and functionally differs from active influenza infection. *Eur J Immunol*. 2012 Jul;42(7):1755-66.
- Schultz-Cherry S. Role of NK cells in influenza infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;386:109-20.
- Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):247–258.
- Semenzato G. Tumour necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br J Cancer*. 1990 Mar;61(3):354-61.
- Short, K. R., E. J. Kroeze, R. A. Fouchier, and T. Kuiken. 2014. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *The Lancet infectious diseases* 14:57-69.
- Sigal LH. Basic science for the clinician 33: interleukins of current clinical relevance (part I). *J Clin Rheumatol*. 2004 Dec;10(6):353-9.
- Sigal LH. Basic science for the clinician 34: Interleukins of current clinical relevance (part II). *J Clin Rheumatol*. 2005 Feb;11(1):34-9.
- Simonsen L, Spreeuwenberg P, Lustig R, Taylor RJ, Fleming DM, Kroneman M, et al. Global mortality estimates for the 2009 Influenza Pandemic from the GLaMOR project: a modeling study. *PLoS Med*. 2013 Nov;10(11):e1001558.
- Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol*. 2003 May;33(5-6):469-78.

Sridhar S, Begom S, Hoschler K, Bermingham A, Adamson W, Carman W, et al. Longevity and determinants of protective humoral immunity after pandemic influenza infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Feb 1;191(3):325-32.

Steeber DA, Engel P, Miller AS, Sheetz MP, Tedder TF. Ligation of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes. *J Immunol*. 1997 Jul 15;159(2):952-63.

Steeber DA, Tang ML, Green NE, Zhang XQ, Sloane JE, Tedder TF. Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways. *J Immunol*. 1999 Aug 15;163(4):2176-86.

Steinhauer DA, Skehel JJ. Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet*. 2002;36:305-32.

Subbarao K, Murphy BR, Fauci AS. Development of effective vaccines against pandemic influenza. *Immunity*. 2006 Jan;24(1):5-9.

Szakacs A, Darin N, Hallbook T. Increased childhood incidence of narcolepsy in western Sweden after H1N1 influenza vaccination. *Neurology*. 2013 Apr 2;80(14):1315-21.

Tanaka T, Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res*. 2014 Apr;2(4):288-94.

Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jan;12(1):15-22.

Tetsutani K, Ishii KJ. Adjuvants in influenza vaccines. *Vaccine*. 2012 Dec 14;30(52):7658-61.

To KK, Hung IF, Li IW, Lee KL, Koo CK, Yan WW, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. *Clin Infect Dis*. 2010 Mar 15;50(6):850-9.

Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003657.

Vajdy M, Baudner B, Del Giudice G, O'Hagan D. A vaccination strategy to enhance mucosal and systemic antibody and T cell responses against influenza. *Clin Immunol*. 2007 May;123(2):166-75.

Valensi JP, Carlson JR, Van Nest GA. Systemic cytokine profiles in BALB/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants. *J Immunol*. 1994 Nov 1;153(9):4029-39.

Van Damme P, Kafaja F, Bambure V, Hanon E, Moris P, Roman F, et al. Long-term persistence of humoral and cellular immune responses induced by an AS03A-adjuvanted H1N1 2009

influenza vaccine: an open-label, randomized study in adults aged 18-60 years and older. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 Jul;9(7):1512-22.

van de Winkel JG, Anderson CL. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol*. 1991 May;49(5):511-24.

van Puijenbroek EP, Broos N, van Grootheest K. Monitoring adverse events of the vaccination campaign against influenza A (H1N1) in the Netherlands. *Drug Saf*. 2010 Dec 1;33(12):1097-108.

Van Reeth K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet Microbiol*. 2000 May 22;74(1-2):109-16.

Venturi GM, Conway RM, Steeber DA, Tedder TF. CD25+CD4+ regulatory T cell migration requires L-selectin expression: L-selectin transcriptional regulation balances constitutive receptor turnover. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):291-300.

Viboud C, Miller M, Olson D, Osterholm M, Simonsen L. Preliminary Estimates of Mortality and Years of Life Lost Associated with the 2009 A/H1N1 Pandemic in the US and Comparison with Past Influenza Seasons. *PLoS Curr*. 2010;2:RRN1153.

Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol*. 2012 Aug;13(8):722-8.

Vono M, Taccone M, Caccin P, Gallotta M, Donvito G, Falzoni S, et al. The adjuvant MF59 induces ATP release from muscle that potentiates response to vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 24;110(52):21095-100.

Waddington CS, Walker WT, Oeser C, Reiner A, John T, Wilkins S, et al. Safety and immunogenicity of AS03B adjuvanted split virion versus non-adjuvanted whole virion H1N1 influenza vaccine in UK children aged 6 months-12 years: open label, randomised, parallel group, multicentre study. *BMJ*. 2010;340:c2649.

Walker WT, Faust SN. Monovalent inactivated split-virion AS03-adjuvanted pandemic influenza A (H1N1) vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2010 Dec;9(12):1385-98.

Wang HB, Weller PF. Pivotal advance: eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production. *J Leukoc Biol*. 2008 Apr;83(4):817-21.

Wang SM, Tsai MH, Lei HY, Wang JR, Liu CC. The regulatory T cells in anti-influenza antibody response post influenza vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2012 Sep;8(9):1243-9.

Woodland DL, Hogan RJ, Zhong W. Cellular immunity and memory to respiratory virus infections. *Immunol Res*. 2001;24(1):53-67.

World Health Organization (WHO). H1N1 in post-pandemic period. Geneva: World Health Organization; 2010 [acesso em 2015 Jan 23]. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/.

World Health Organization (WHO). Human infection with new influenza A (H1N1) virus: clinical observations from Mexico and other affected countries, May 2009. Wkly Epidemiol Rec. 2009 May 22;84(21):185-9. (b)

World Health Organization (WHO). Human infection with pandemic A (H1N1) 2009 influenza virus: clinical observations in hospitalized patients, Americas, July 2009 - update. Wkly Epidemiol Rec. 2009 Jul 24;84(30):305-8. (a)

World Health Organization (WHO). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: World Health Organization; 2011 [acesso em 2015 Jan 25]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/.

World Health Organization (WHO). Pandemic influenza vaccine manufacturing process and timeline. Geneva: World Health Organization; 2009 [acesso em 2015 Jan 18]. Disponível em: http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_vaccine_20090806/en/. (e)

World Health Organization (WHO). Situation updates - Pandemic (H1N1) 2009. Geneva: World Health Organization; 2009-2010 [acesso em 2015 Jan 16]. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/updates/en/>. (c)

World Health Organization (WHO). Timeline – Pandemic (H1N1) 2009 laboratory confirmed cases and number of deaths as reported to WHO. Geneva: World Health Organization; 2009-2010 [acesso em 2015 Jan 16]. Disponível em: http://gamapserver.who.int/h1n1/cases-deaths/h1n1_casesdeaths.html. (d)

Wright, PF.; Neumann, G.; Kawaoka, Y. Orthomyxoviruses. In: Knipe, DM.; Howley, PM.; Griffin, DE.; Lamb, RA.; Martin, MA.; Roizman, B., et al., editors. Fields Virology. Fifth Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1727-1740.

Zhu FC, Wang H, Fang HH, Yang JG, Lin XJ, Liang XF, et al. A novel influenza A (H1N1) vaccine in various age groups. N Engl J Med. 2009 Dec 17;361(25):2414-23.