

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO HIV-1 E VACINADOS CONTRA AS INFLUENZA
A(H1N1)pdm09, A/H3N2 E B**

ANDRESSA MARTTORELLI

Rio de Janeiro
JUNHO 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M387 Martorell, Andressa

Investigação da resposta imune humoral de indivíduos infectados pelo HIV-1 e vacinados contra os vírus influenza A (H1N1) pdm09, A/H3N2 e B / Andressa Martorell – Rio de Janeiro, 2014.

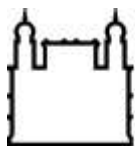
x, 83 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 69-83

1. TIV. 2. Influenza. 3. HIV. I. Título.

CDD 616.9792



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

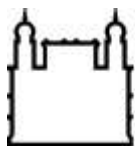
ANDRESSA MARTTORELLI

Investigação da resposta imune humoral de indivíduos infectados pelo HIV-1 e vacinados contra as Influenza A(H1N1)pdm09, A/H3N2 e B.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre ou Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador : Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza

RIO DE JANEIRO
JUNHO 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: ANDRESSA MARTTORELLI

Investigação da resposta imune humoral de indivíduos infectados pelo HIV-1 e vacinados contra as Influenza A(H1N1)pdm09, A/H3N2 e B.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza

Aprovada em: 11/ 06/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a Daniella Arêas Mendes da Cruz (FIOCRUZ)

Prof. Dr^a Mariza Morgado(FIOCRUZ)

Prof. Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro (UFRJ)

Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão (FIOCRUZ)

Prof. Dr^a Braulia Costa Caetano (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 11 de Junho de 2014

Dedico essa dissertação a minha família, meu maior tesouro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade concedida de realizar meu mestrado em uma instituição de excelente qualidade, sem Ele, não conseguiria chegar aqui.

Agradeço aos meus pais Regina Celi e Francisco, por serem esse alicerce tão forte, por serem minha base, minha inspiração de vida! Obrigada por todo amor!

Obrigada ao meu noivo Renato, a quem para sempre vou chamar de namorado!

Obrigada por estar comigo em todos os momentos em que mais precisei. Te amo!

Obrigada a minha família, que sem dúvidas é a melhor do mundo!

Não poderia deixar de agradecer ao meu orientador, Dr. Thiago Moreno, por tudo o que me ensinou, não só para o desenvolvimento do meu trabalho mas também pelos ensinamentos para vida. Obrigada por sempre nos dar força e apoiar nossos projetos.

Muito obrigada àquelas que me aturam dentro e fora do laboratório. Que me aguentam nos congressos, quando eu preciso de alguma ajuda para algum experimento, obrigada Carolina (Carol) e Natália (Nat)! Amo vocês.

Obrigada à todos do LVRS, à Dr^a Marilda, pelo carinho com que sempre me trataram.

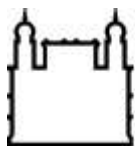
Gostaria de agradecer também ao IPEC e aos pesquisadores diretamente envolvidos no projeto, a Dr^a Beatriz Grinsztejn, Dr. Luiz Antonio Bastos Camacho e Dr. Marília Santini. Muito obrigada pela grande colaboração para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a disponibilidade da Dr^a Daniella Arêas, Dr^a Mariza Morgado e Dr. José Nelson de poderem de participarem da minha banca.

Meu muito obrigada ao Dr. Eduardo Volotão e a Dr^a Bráulia por também participarem deste dia tão importante.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a minha amiga-dinda-irmã Élide, que mesmo não acompanhando de perto meu trabalho, sempre torceu por mim! Obrigada amiga!

“Quando você acha que sabe todas as perguntas, vem a vida e muda todas as respostas.” (Bob Marley)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

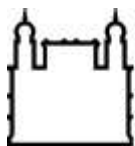
INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1 E VACINADOS CONTRA AS INFLUENZA A(H1N1)PDM09, A/H3N2 E B.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Andressa Marttorelli

Indivíduos infectados pelo HIV têm um risco mais elevado de serem afetados por doenças graves, tais como infecções por vírus respiratórios, incluindo o vírus da influenza. A imunossupressão desses indivíduos pode afetar a sua capacidade de resposta à imunização ativa. A vacinação contra o vírus influenza ainda representa a principal forma de reduzir o impacto deste vírus. Devido à circulação em 2009 do vírus influenza pandêmico A (H1N1) pdm09 e influenza sazonal A (H3N2) e vírus B, a composição atual vacina incluem antígenos destes três agentes em sua formulação. Assim, a análise do impacto da vacina trivalente inativada contra influenza (TIV) em indivíduos infectados pelo HIV merece mais estudos. Uma coorte de 131 indivíduos HIV- 1 positivos, com viremia controlada recebeu duas doses únicas de TIV com 21 dias de intervalo. Os títulos de anti- hemaglutinantes (HA) de seus soros foi avaliada em diferentes pontos de tempo (dias zero, 21 e 42, bem como seis meses pós- vacinação). No que diz respeito à resposta imune ao vírus A(H1N1) pdm09 , observou-se que um ano depois de ter recebido a vacina monovalente contra este antígeno , 62,6% dos indivíduos permaneceram soroprotetidos, uma queda de 20% em relação à 6 meses pós- vacinação monovalente no ano de 2010. Além disso, após a primeira dose de TIV, títulos soroprotetores foram encontrados em todos os indivíduos. A soroproteção de baseline para os antígenos H3N2 e influenza B foi de 67,9% e 27,5%, respectivamente. Em relação à soroconversão, observamos que 19,8% e 21% dos indivíduos apresentavam títulos anti- hemaglutinantes para o vírus A(H1N1)pdm09, 21 e 42 dias pós- vacinação com TIV, respectivamente. A soroconversão para o antígeno H3N2 foi 15,7% e 16% aos 21 e 42 dias respectivamente. Em relação à Influenza B, 35,7% e 38,6% dos indivíduos soroconverteram aos 21 e 42 dias após a vacinação. Aos seis meses pós- vacinação, os títulos de anti – hemaglutinantes dos soros caiu para abaixo 15,7% para o antígeno A(H1N1)pdm09, 14,4% para H3N2 e 29,1% para antígenos de influenza B. Observamos também que indivíduos com maiores contagem de células CD4 responderam melhor a vacinação frente ao vírus influenza B. Em conjunto, nossos resultados indicam que indivíduos HIV-1 positivos apresentam melhores repostas humorais para os antígenos A(H1N1)pdm09, quando comparado com os outros dois antígenos presentes na TIV.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INVESTIGATION OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN HIV-1 INFECTED INDIVIDUALS AND VACCINATED AGAINST INFLUENZA A(H1N1)pdm09, A/H3N2 AND B

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Andressa Marttorelli

HIV-infected individuals have a higher risk of being affected by serious illnesses, such as infections by respiratory viruses, including influenza virus. Immunosuppression of these individuals can affect their ability to respond to active immunization. Vaccination against influenza is still the main way to reduce the impact of this virus. Due to the movement in 2009 pandemic influenza A (H1N1)pdm09 and seasonal influenza A (H3N2) and B viruses, the current vaccine composition include antigens of these three agents in their formulation. Thus, analysis of the impact of trivalent inactivated influenza vaccine (TIV) in HIV-infected individuals deserves further study. A cohort of 131 HIV-1 positive individuals with controlled viremia received two single doses of TIV 21 days apart. The titers of anti-hemagglutinant (HA) of their sera was assessed at different time points (zero, 21, 42 days and six months post- vaccination). With regard to immune to the virus A (H1N1)pdm09 response, it was noted that a year after having received the monovalent vaccine against this antigen, 62.6 % of subjects remained seroprotection, a decrease of 20 % compared to 6 monovalent months post-vaccination in 2010. Moreover, after the first dose of TIV, seroprotective titers were found in all individuals. The seroprotection baseline for H3N2 and influenza B antigens was 67.9 % and 27.5 %, respectively. Regarding seroconversion, we found that 19.8 % and 21 % of subjects had anti -hemagglutinin titles for the A (H1N1)pdm09, 21 and 42 days post-vaccination with TIV, respectively. Seroconversion for H3N2 antigen was 15.7% and 16 % at 21 and 42 days respectively. Regarding Influenza B, 35.7 % and 38.6 % of subjects seroconverted after 21 and 42 days after vaccination. At six months post-vaccination, the titers of anti -hemagglutinin sera fell below 15.7 % for antigen A (H1N1)pdm09, 14.4% to 29.1 % for H3N2 and influenza B antigens. We also observed that indivíduos with higher CD4 cell counts resposram best vaccination against the influenza virus B. Together, our results indicate that HIV-1 positive individuals show better humoral responses to antigens A (H1N1) pdm09 compared with others two antigens present in the TIV.

ÍNDICE

Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	11
1.1 O vírus influenza	11
1.1.1 Histórico	11
1.1.2 Estrutura viral	12
1.1.3 Classificação e nomenclatura	15
1.1.4 Ciclo replicativo	16
1.1.5 Epidemiologia da infecção pelo influenza	19
1.1.6 Mecanismos evolutivos e o surgimento do vírus influenza A(H1N1)pdm09	20
1.2 A Vacina	23
1.2.1 Vacinas atualmente utilizadas	24
1.2.1.1 Vacinas inativadas (IVs)	24
1.2.1.2 Vacinas de vírus atenuado (LAIVs)	25
1.2.2 Vacinas recentemente aprovadas	25
1.2.2.1 Vacina quadrivalente (QIV)	25
1.2.2.2 Vacinas com adjuvantes	26
1.2.2.3 Vacinas intradérmicas (ID)	27
1.2.2.4 Vacinas “high-dose” de hemaglutinina	27
1.2.2.5 Vacinas “cell-culture”	28
1.2.2.6 Vacinas de hemaglutinina recombinante	28
1.2.3 Estratégias para o desenvolvimento de novas vacinas	29
1.3 Imunidade natural ou induzida ao influenza	30
1.3.1 Resposta imune natural	30
1.3.1.1 Resposta imune inata	30
1.3.1.2 Resposta imune adaptativa	31
1.3.1.2.1 Resposta imune mediada por células	32
1.3.1.2.2 Resposta imune humoral	35
1.3.1.3 Imunidade de mucosa	36
1.3.2 Resposta imune induzida pela vacinação	37
1.4 OHIV, sua imunopatogêneses e a imunodeficiência adquirida	39
1.5 Vacinação de indivíduos HIV positivos, inclusiva contra o influenza	41
2 Justificativa	43

3 Objetivo	44
3.1 Objetivos específicos	44
4 Materiais e métodos	45
4.1 Considerações éticas	45
4.2 Células	45
4.3 Vírus	45
4.4 Vacina Trivalente (TIV)	45
4.5 Sujeitos da pesquisa	45
4.6 Ensaio de inibição da hemaglutinação (HAI)	46
4.7 Soroprevalência e soroconversão	46
4.8 Análises estatísticas	46
5 Resultados	47
5.1 Aspectos clínico-demográficos dos indivíduos vacinados	47
5.2 Resposta sorológica à vacinação trivalente	49
5.2.1 Sustentabilidade da resposta à vacinação monovalente para o antígeno A(H1N1)pdm09	49
5.2.2 Estudo da resposta vacinal para o antígeno A(H1N1)pdm09 após vacinação com TIV	49
5.2.3 Análise da resposta vacinal ao antígeno de influenza A/H3N2	55
5.2.4 Análise da resposta vacinal ao antígeno influenza B linhagem Victoria	56
5.2.5 Análise da resposta vacinal ao antígeno influenza B linhagem yamagata	57
5.3 Carga viral, CD4, HAART, tempo de diagnóstico e resposta à vacina	58
6 Discussão	64
7 Conclusões	68
8 Referências Bibliográficas	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Pandemias humanas de influenza A ocorridas no século XX e XXI.....	11
Figura 2- Esquema representativo do vírus influenza A.....	13
Figura 3- Representação de uma ribonucleoproteína viral.....	14
Figura 4- Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus influenza A.....	17
Figura 5 – Distribuição de casos confirmados por Influenza, segundo o subtipo e região do mundo no período da semana epidemiológica 12 (16/Mar a 22/Mar de 2014).....	20
Figura 6– Geração da diversidade genética e <i>drift</i> antigênico.....	21
Figura 7 – Origem dos segmentos gênicos do A(H1N1)pdm09.....	23
Figura 8- Novas abordagens para o desenvolvimento de novas vacinas contra influenza.....	29
Figura 9- Resposta humoral e celular à infecção pelo vírus influenza.....	33
Figura 10- Uma vista geral simplificada dos processos imunológicos que ocorrem em conexão com a vacinação contra o influenza.....	38
Figura 11- Pessoas infectadas pelo HIV no mundo.....	40
Figura 12 - Proporção de soroproteção nos dias 21, 42 e meses pós-vacinação monovalente (2010).....	51
Figura 13- Taxa de soroconversão (IC 95%) em indivíduos que nunca fumaram, fumantes e ex-fumantes.....	52
Figura 14- Associação entre idade e soroconversão.....	53
Figura 15 – Associação entre sexo e soroconversão.....	53
Figura 16- Associação entre o índice de massa corporal (IMC) soroconversão.....	54
Figura 17- Gráfico da circulação do vírus influenza no Brasil que antecedeu a vacinação com TIV.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- proteínas codificadas pelos segmentos genômicos do vírus influenza a e suas respectivas funções.....	14
Tabela 2- Vacinas recentemente aprovadas pelo FDA.....	26
Tabela 3- Características demográficas da população em estudo.....	48
Tabela 4- Soroproteção de baseline (dia 0) para o antígeno A(H1N1)pdm09 pós-vacinação com TIV.....	49
Tabela 5- Soroproteção para H1N1pdm09 pós-vacinação com TIV.....	50
Tabela 6- Soroconversão para o antígeno A(H1N1)pdm09 pós-vacinação com TIV.....	52
Tabela 7- Soroproteção de baseline (dia 0) para o antígeno A/H3N2 pós-vacinação com TIV.....	55
Tabela 8- Soroproteção para o antígeno A/H3N2 nos dia 21, 42 e 6 meses pós-vacinação com TIV.....	55
Tabela 9- Percentagem de indivíduos que soroconverteram para A/H3N2 pós-vacinação com TIV.....	56
Tabela 10- Percentagem de indivíduos com títulos sorológicos $\geq 1:32$ para o antígeno influenza B linhagem Victoria.....	56
Tabela 11- Soroproteção para o antígeno influenza B-vic nos dia 21, 42 e 6 meses pós-vacinação com TIV.....	57
Tabela 12 - Percentagem de indivíduos que soroconverteram para B-vic pós-vacinação com TIV.....	57
Tabela 13- Percentagem de indivíduos com títulos sorológicos $\geq 1:32$ para o antígeno influenza B linhagem yamagata.....	58
Tabela 14 A, B e C- Relação entre o tempo de diagnóstico e soroproteção.....	59
Tabela 15- Relação entre o tempo de HARRT e soroproteção.....	60
Tabela 16- Relação entre a presença ou ausência de tratamento antiretroviral e soroproteção.....	61
Tabela 17- Relação entre a carga viral e soroproteção.....	62
Tabela 18- Relação entre o número de CD4 e soroproteção.....	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC - célula apresentadora de antígeno
BSA - albumina bovina sérica
CCIV- vacina “cell-culture”
CTLs - linfócitos T citotóxicos
DC – célula dendrítica
DMEM - meio Eagle modificado por Dulbecco
EDTA - ácido etilenodiamino tetraacético
EUA - Estados Unidos da América
FDA- Food and drug administration
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
FITC - isotiocianato de fluoresceína
H ou HA - hemaglutinina
HAI - inibição da hemaglutinação
HD- vacina “high-dose”
HIV - vírus da imunodeficiência humana
i.d- intradérmica
i.m. - intramuscular
IFN - Interferon
Ig - Imunoglobulina
IgAd - Imunoglobulina A dimérica
IIV- vacina inativada
IL - Interleucina
LAIV- vacina com vírus inativado
M1 - proteína de matriz 1
M2 - proteína de matriz 2
MDCK – rim de cachorro *Canis familiaris*
MHC - complexo principal de histocompatibilidade
MU - metilumbeliferil
NA - neuraminidase
NALT - tecido linfóide associado à nasofaringe
NK - do inglês, Natural Killer
NP - nucleoproteína

NS - proteína não-estrutural
OMS - Organização Mundial de Saúde
PB - proteína básica xiv
QIV- vacina quadrivalente
PBS - tampão fosfato salino
pH - potencial de hidrogênio iônico
RDE - receptor-destroying enzyme
RNA - ácido ribonucleico
RNA_v - ARN viral
RNP - ribonucleoproteína
RPM - rotações por minuto
S-IgA - IgA secretória
SD- vacina “standard”
TCR - receptores de células T
TIV- vacina trivalente inativada
Th - células T auxiliares
TLR - receptores do tipo Toll
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
UHA - Unidade hemaglutinante

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus influenza

1.1.1- Histórico

Os primeiros relatos de infecção pelo vírus influenza ocorreram por volta do século V a.c., quando Hipócrates, considerado o “pai da medicina”, relatou casos de uma doença respiratória com sintomatologia semelhante a ocasionada pelo influenza, que, em algumas semanas, matou muitas pessoas e depois desapareceu. Ainda, atribui-se ao vírus influenza a responsabilidade por variados surtos de doenças respiratórias ao longo da história [1].

No século XX ocorreram três notáveis pandemias nos anos de 1918, 1957 e 1968 e, uma de extensão menor em 1977 [2]. A Figura 1 resume as três pandemias do século XX e uma no século XXI, identificando o subtipo e a possível origem do vírus influenza A que causou cada uma delas, além do impacto gerado pelas pandemias [3].

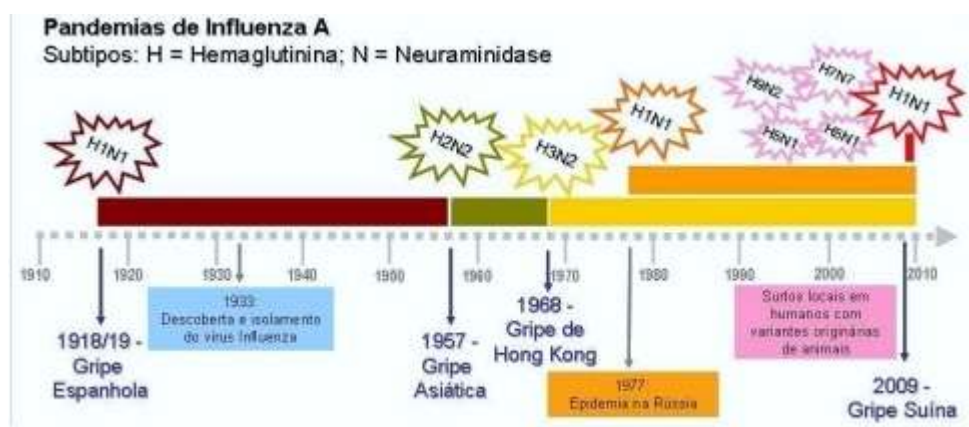


Figura 1 - Pandemias humanas de influenza A ocorridas no século XX e XXI.

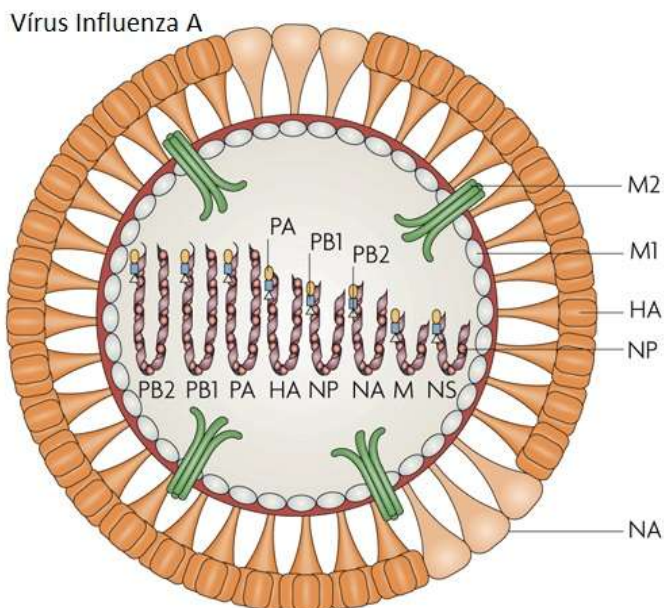
Em 1996, um novo vírus influenza aviário H5N1 altamente patogênico foi isolado de alguns gansos na província de Guangdong na China. Em 1997, foi detectado um surto deste mesmo subtipo em aves domésticas em Hong Kong e, neste mesmo ano, foram reportados 18 casos de infecção em seres humanos, sendo 6 casos fatais, confirmando o rompimento da barreira animal-humano. Embora ainda não tenha sido confirmada a transmissão sustentada entre humanos, a emergência de um vírus aviário de alta patogenicidade capaz de infectar seres humanos é de significativa importância para a saúde pública, sendo necessária a vigilância contínua deste subtipo já que em fevereiro de 2003 ainda foram confirmados 2 casos de infecção humana pelo H5N1 em Hong Kong, sendo 1 caso fatal [4].

No ano de 2009 ocorreu a emergência de nova linhagem de influenza A/H1N1, que provocou a primeira pandemia do século XXI, e foi causada pelo antígeno A(H1N1)pdm09. A circulação deste vírus teve início no México e Canadá e rapidamente se espalhou por todo o mundo [5]. Este novo vírus foi produto de um rearranjo gênico entre uma linhagem aviária norte-americana, uma linhagem sazonal de H3N2, a linhagem suína clássica norte-americana e uma linhagem suína euro-asiática [6]. Este vírus teve alta transmissibilidade entre humanos e, após a pandemia, o vírus A(H1N1)pdm09 passou a co-circular na população juntamente com o H3N2, tornam-se portanto, um influenza sazonal, que foi incluído nas vacinas de 2010, 2011, 2012 e 2013 [7-10].

Mais recentemente, em 2013, foi detectada pela primeira vez a infecção de seres humanos com o vírus influenza aviário A(H7N9). Foram confirmados 132 casos na China. A maioria dos casos foi considerada severa e 37 pessoas morreram. Embora seja um vírus aviário, o H7N9 não causa doença severa em aves domésticas, o que torna difícil a confirmação da procedência aviária dos casos confirmados. Pouco ainda é conhecido sobre o vírus H7N9, sobre seus reservatórios e sua capacidade de transmissão de aves para humanos e entre humanos, porém, por ser um vírus altamente patogênico, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que os países se mantenham em alerta para uma possível circulação maciça desse subtipo viral [11].

1.1.2- Estrutura viral

Os vírus influenza são vírus envelopados com tamanho de 80-120 nm de diâmetro e apresentam capsídeo proteico com simetria helicoidal de aproximadamente 100 nm de diâmetro [12].



Nature Reviews | Immunology

Figura 2- Esquema representativo do vírus influenza A. As glicoproteínas HA e NA encontram-se inseridas no envelope lipídico, assim como a proteína M2, que forma o canal iônico viral. Abaixo do envelope encontra-se a proteína de matriz M1 e, internamente a matriz estão os segmentos de RNAv fita simples.

Adaptado de Nature Reviews Immunology 7, 267-278 (April 2007)

Os vírus influenza A possuem 8 segmentos genômicos de RNA fita simples negativa (Figura 2). Cada segmento encontra-se associado a nucleoproteínas virais (NP), formando uma estrutura no qual o RNA viral (RNAv) enovela-se adquirindo uma forma helicoidal, e a um complexo polimerase, e este conjunto recebe o nome de ribonucleoproteína (RNP) (Figura 3) [13]. Dentro do vírion existem 8 RNPs, que se encontram ancoradas internamente ao envelope lipídico através das proteínas de matriz M1, que servem como proteínas adaptadoras. A proteína M1 é confere rigidez ao envelope viral, além de atuar como a força motriz do brotamento viral. [14].

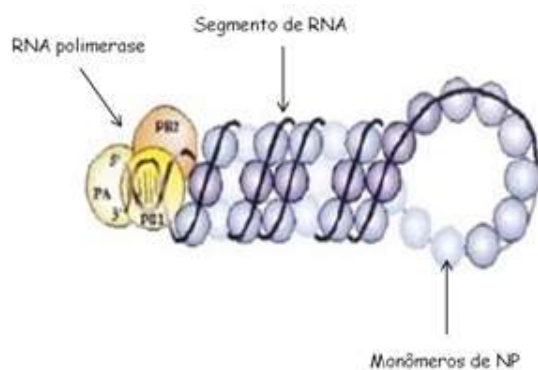


Figura 3 : Representação de uma ribonucleoproteína viral. Os monômeros de NP se associam a um segmento de RNAv e ao complexo polimerase formando uma estrutura com forma helicoidal conhecida como RNP.

Fonte: Portela, A. & Digard, P. JGV, 2002

O genoma do vírus influenza A apresenta cerca de 13 Kb. Dos 8 segmentos, 6 codificam uma proteína cada, enquanto os outros 2 (genes M e NS) codificam para mais de uma proteína. Os três maiores fragmentos genômicos codificam as três subunidades da RNA polimerase viral, PA, PB1 e PB2. O gene PB1 pode ainda gerar dois produtos gênicos menores: uma forma truncada da subunidade PB1 originada a partir de um códon de iniciação alternativo e um pequeno peptídeo, PB1-F2 [15]. As proteínas codificadas pelos segmentos genômicos do vírus influenza A e suas respectivas funções estão resumidas na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Proteínas codificadas pelos segmentos genômicos do vírus influenza A e suas respectivas funções. A tabela relaciona o segmento de RNAv à(s) proteína(s) por eles codificadas, com suas respectivas funções.

Fonte: Adaptado do NIAID

RNA	Proteína	Função
Segmento 1 (2341 nt)	PB2 (759aa)	RNA polimerase – reconhecimento do <i>cap</i>
Segmento 2 (2341 nt)	PB1 (757 aa)	RNA polimerase – alongamento da cadeia
Segmento 3 (2233 nt)	PA (716 aa)	RNA polimerase – atividade endonuclease
Segmento 4 (1778 nt)	HA (550 aa)	Adsorção e fusão
Segmento 5 (1565 nt)	NP (498 aa)	Ligação de RNA e forma o nucleocapsídeo
Segmento 6 (1413 nt)	NA (454 aa)	Atividade sialidásica
Segmento 7 (1027 nt)	M1(252aa)	Interação com RNP e importante para brotamento
	M2 (366aa)	Canal iônico
Segmento 8 (890 nt)	NS1 (890aa)	Proteína multifuncional
	NEP/NS2 (418 aa)	Exportação da RNP

Inseridas no envelope viral estão presentes duas glicoproteínas, a HA e a NA, e a proteína de membrana M2 (Figura 2) [16].

A HA é uma proteína trimérica formada por monômeros de hemaglutinina (HA0), que são compostos por subunidades HA1 e HA2. A HA1 participa da adsorção viral, já que contém o sítio de ligação que interage com os resíduos de ácido siálico presentes na membrana plasmática da célula hospedeira. A HA2 é importante para fusão do envelope viral com a membrana endossomal. Esta subunidade possui o peptídeo de fusão na sua extremidade N-terminal, que devido a mudança de pH no interior do endossoma, sofre uma mudança conformacional expondo o peptídeo e permitindo fusão de membranas [17].

A NA catalisa a clivagem de resíduos de ácido siálico presentes na membrana plasmática, permitindo a liberação das novas partículas virais formadas. Além disso, a NA também remove o ácido siálico presente nas próprias glicoproteínas impedindo a agregação das partículas virais. Este processo é importante para a mobilidade dos vírus no trato respiratório [18].

A proteína M2 atravessa o envelope viral formando o canal iônico do vírion [19]. Após a endocitose do vírus, este canal permite o influxo de prótons e a acidificação do interior do vírion, necessária para a exposição do peptídeo de fusão presente na HA e para a dissociação entre as RNPs e as proteínas M1. Após este processo, as RNPs são então liberadas para migrarem para o núcleo e darem início a transcrição e replicação viral [20].

1.1.3- Classificação e nomenclatura

Os vírus influenza estão classificados na família *Orthomyxoviridae*, gênero *Influenzavirus* [21]. Atualmente, existem 5 gêneros de vírus influenza: *Influenzavirus A*, *B* e *C*, considerados como vírus influenza propriamente ditos, além dos *Isavirus* e *Thogotovirus* [22]. Os *Thogotovirus* foram isolados de carrapatos e são agentes infecciosos capazes de causar meningite e meningoencefalite em seres humanos. Já os *Isavirus* estão relacionados a quadros clínicos de anemia infecciosa em salmões [22]. A característica geral dos 5 gêneros é apresentação do genoma na forma de RNA fita simples, segmentado com polaridade negativa [23].

Os três gêneros de vírus influenza propriamente ditos diferem na gama de hospedeiros e na patogenicidade. Os gêneros B e C são isolados quase exclusivamente de humanos enquanto o gênero A possui uma ampla variedade de hospedeiros [24]. As aves aquáticas representam o reservatório natural dos vírus influenza A, que podem ser então transmitidos para cavalos, gatos, cachorros, baleias, focas, aves silvestres migratórias, galinhas, porcos, humanos e, mais recentemente, este gênero também foi encontrado em morcegos, embora sua origem ainda seja desconhecida [25]. Enquanto os vírus influenza A são responsáveis por

causar de surtos epidêmicos à pandemias, os vírus influenza B causam epidemias periódicas, e o gênero C causa somente endemias e doenças respiratórias leves [26].

Os vírus influenza A são divididos em subtipos de acordo com a combinação das suas glicoproteínas de superfície, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) [27]. Até o presente momento, já foram descritos, 16 tipos de HA (H1 a H16) e 9 tipos de NA (N1 a N9), encontrados em diferentes espécies animais [28] [29].

De acordo com a OMS, a nomenclatura das amostras humanas é representada da seguinte maneira: indica-se o gênero do vírus ao qual pertence (A, B ou C), a origem geográfica de isolamento (cidade ou país), número da amostra do laboratório e ano de isolamento e, finalmente, coloca-se entre parênteses o subtipo de HA e NA. Por exemplo, uma amostra designada como influenza A/England/42/1972 (H3N2) pertence ao gênero A, subtipo H3N2, isolada na Inglaterra no ano de 1972 e recebeu o número 42.

Em contraste com o vírus influenza A, não existem subtipos de influenza B. Este gênero é constituído por duas linhagens principais (Yamagata e Victoria). Embora existam diferenças consideráveis entre as linhagens, seja em termos genéticos ou antigênicos, elas não são suficientes para a designação em diferentes subtipos [30]. Assim, a nomenclatura adotada para o vírus influenza B descreve apenas o gênero, local de detecção, número de origem e ano (exemplo: B/Florida/4/2006).

1.1.4- Ciclo replicativo

A replicação do vírus influenza A encontra-se esquematicamente apresentada na figura 4. O principal alvo da infecção pelos vírus influenza em humanos são as células epiteliais ciliadas do trato respiratório, por apresentarem maior abundância de resíduos de ácido siálico nas suas membranas. Os resíduos de ácido siálico ficam associados a resíduos de galactose por ligações α -2,3 ou α -2,6, que se encontram preferencialmente no trato respiratório superior e inferior, respectivamente [31]. Essas ligações são reconhecidas de maneira distinta por hemaglutininas de vírus humanos e animais e são críticos na determinação do hospedeiro e no tropismo tecidual.

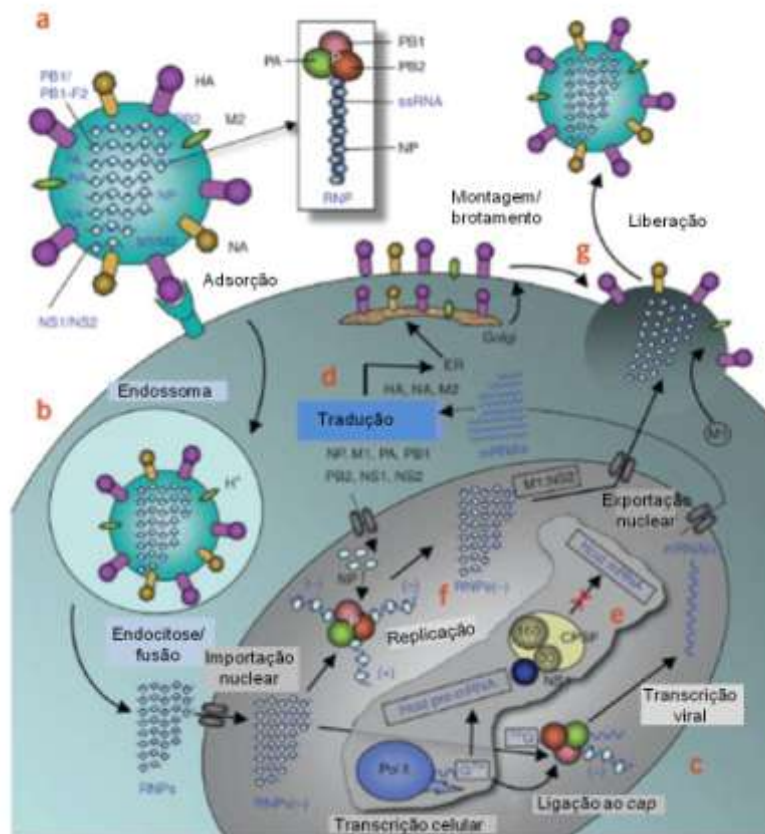


Figura 4: Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus influenza A. (a) O vírus influenza possui um envelope lipídico no qual estão inseridas as proteínas HA, NA e M2 e seu genoma possui 8 segmentos de RNA fita simples organizados em complexos proteicos chamados RNPs. As RNPs se encontram ancoradas no interior do envelope pelas proteínas de matriz M1. Durante a adsorção do vírus influenza à célula hospedeira, ocorre a ligação da HA aos resíduos de ácido siálico presentes na membrana citoplasmática. (b) O vírus é endocitado e o baixo pH do endossoma leva a acidificação no interior do vírion através da entrada de prótons pelo canal M2. Ocorre uma mudança conformacional na HA, que expõe o peptídeo responsável pela fusão do envelope viral com a membrana endossomal. A acidificação faz com que as RNPs se dissociem das proteínas M1 e sejam liberadas. As RNPs migram para o núcleo celular, onde ocorre a replicação e a transcrição viral. (c) No núcleo, ocorre a transcrição do RNAmv pela RNA polimerase dependente de RNA. As novas moléculas de RNAmv são exportadas para o citoplasma celular com auxílio da proteína NEP/NS2. (d) No citoplasma, os RNAmv são traduzidos nas proteínas virais. As proteínas de superfície HA, NA e M2 são processadas no RE, glicosiladas no complexo de Golgi e transportadas para a superfície celular. (e) A proteína NS1 tem um papel fundamental para a transcrição viral, já que impede a saída do RNAmc do núcleo. (f) A RNA polimerase viral também é responsável pela replicação do RNAv através da síntese de uma fita de RNA complementar que serve de molde para a geração de novas fitas de RNAv, com polaridade negativa. Neste momento as NP já se ligam aos novos RNAv formados gerando novas RNPs, que são transportadas para o citoplasma com ajuda das proteínas M1 e NEP/NS2. (g) As RNPs são direcionadas para a membrana plasmática celular, onde já estão ancoradas as proteínas de envelope viral, para formarem as novas partículas virais por brotamento. As novas partículas virais são liberadas para o meio extracelular pela ação da NA.

Fonte: Adaptado de *Das et al* Nature, 2010 [32].

Os resíduos de ácido siálico permitem a ligação da HA e a adsorção do vírus influenza a membrana plasmática da célula hospedeira (Figura 4). A ligação ocorre na subunidade HA1. Após a adsorção ocorre a endocitose da partícula viral (Figura 4). O endossoma celular já é um ambiente fisiologicamente ácido, permitindo então a entrada de prótons para o interior do vírion através do canal iônico M2 [33]. A acidificação (pH entre 5,0 e 6,0) do interior da partícula viral causa uma mudança conformacional na HA, que leva a exposição de seu domínio hidrofóbico contendo o peptídeo de fusão. Este se insere na membrana do endossoma possibilitando sua fusão com o envelope viral. A diminuição do pH dentro do vírion também possibilita que as RNPs se dissociem das proteínas M1 e sejam liberadas para o citoplasma celular [34].

Uma vez no citoplasma, as RNPs migram para o núcleo celular através da ligação a nucleoporinas (Figura 1.3). A penetração no núcleo é dependente de importinas α e β , que reconhecem sinais de localização nuclear presentes tanto na proteína viral NP [35] quanto na subunidade PB2 da RNA polimerase [35].

No núcleo ocorrem os processos de transcrição e replicação do genoma viral pelo complexo polimerase. A transcrição ocorre em momentos iniciais do ciclo replicativo e é um processo dependente de uma sequência iniciadora, que é obtida a partir do pré-RNA_{mc}. Os RNA_{mv} formados são transportados para o citoplasma celular com auxílio da proteína NEP/NS2 e de fatores celulares, onde serão traduzidos em proteínas virais utilizando-se da maquinaria celular. As proteínas virais de superfície, como a HA, NA e M2, são processadas no retículo endoplasmático (RE) da célula, glicosiladas no complexo de Golgi e são direcionadas para a membrana plasmática celular (Figura 1.3). A proteína M1 é sintetizada na fase inicial da replicação, a partir do RNA_{mv} codificado pelo segmento 7, que, em uma fase mais tardia, sofre o mecanismo de *splicing* originando a proteína M2. O mesmo acontece com as proteínas NS1 e NEP/NS2, sendo a segunda dependente do *splicing* [36].

A replicação do genoma viral se dá através da síntese de uma fita intermediária de RNA complementar (RNA_c) com polaridade positiva, para posterior geração das novas fitas de RNA_v polaridade negativa. Logo após a formação dos novos RNA_v, as NP se ligam e dão origem as novas RNPs, que se associam as proteínas M1 e NEP/NS2. Juntamente com a maquinaria de exportação nuclear da célula, o complexo RNP-M1-NEP/NS2 é exportado para o citoplasma celular até a região da membrana plasmática onde estão inseridas as proteínas de superfície virais. A proteína M1 é a responsável por recrutar todos os componentes virais para o sítio de brotamento, além de se associar a membrana plasmática celular [37].

A liberação das novas partículas virais ocorre por brotamento. Este processo requer uma curvatura da membrana plasmática, que é estimulada pelo acúmulo de proteínas M1 no

interior da mesma [38]. O brotamento termina quando ocorre a fissão da membrana plasmática celular. Nesse momento as novas partículas virais estão prontas para serem liberadas e a NA cliva os resíduos de ácido siálico presentes na membrana celular e remove o ácido siálico presente nas próprias glicoproteínas, impedindo a reinfeção da célula já infectada e a agregação das partículas virais [39].

1.1.5- Epidemiologia da infecção pelo influenza

A gripe ocorre mundialmente, sob a forma de surtos localizados ou regionais, em epidemias ou como pandemias associadas ao *shift* ou *drift* antigênico entre os subtipos de Influenza A. Globalmente, estas infecções ocasionam cerca de três a cinco milhões de casos severos, com 250 mil a 500 mil óbitos [40].

Em anos epidêmicos, a taxa de infecção atinge, aproximadamente, 15 % da população, podendo alcançar até 70 %, nas comunidades fechadas. Tanto a morbidade quanto a mortalidade por Influenza podem variar ano a ano, dependendo das cepas circulantes, do grau de imunidade da população geral e da população susceptível [41 e 42].

No ano pandêmico de 2009, no período de 19 de Abril a 21 de Novembro (semana epidemiológica 47), um total de 82 países notificaram à Rede Global de Vigilância da Influenza (FluNet), entre os quais o Brasil, 309.204 casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), das quais foram evidenciados: 71,4% (220.641) por Influenza Pandêmica A(H1N1)pdm09; 2,6% (8.130) por Influenza A (H1) sazonal; 7,6% (23.531) Influenza A (H3) sazonal; 16,5% (51.071) InfluenzaA não subtipada e 1,9% (5.831) Influenza B [41 e 42].

Com base no monitoramento periódico das infecções por influenza são gerados mapas que apontam a sua distribuição global. Um exemplo está mostrado na Figura 5, que ilustra a distribuição dos tipos de influenza na semana epidemiológica 16 a 22 de março de 2014 [43].

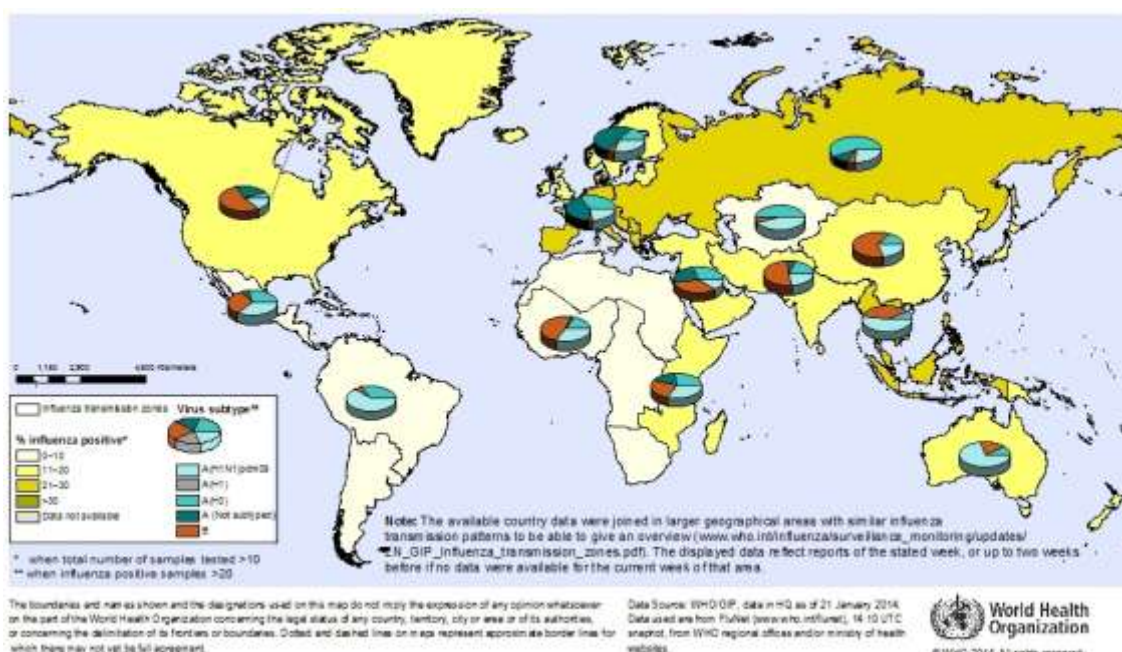


Figura 5 – Distribuição de casos confirmados por Influenza, segundo o subtipo e região do mundo no período da semana epidemiológica 12 (16/Mar a 22/Mar de 2014).

Fonte: WHO, 2014.

As infecções pelo vírus Influenza apresentam um padrão sazonal. Como estes vírus disseminam-se principalmente durante o período de inverno, os surtos epidêmicos nos hemisférios norte e sul ocorrem em períodos diferentes do ano.

O Brasil é um país com dimensões continentais. Desta forma, engloba uma grande disparidade climática, compreendendo regiões de clima equatorial (região Norte) a subtropical (região Sul). Consequentemente, são observados diferentes padrões de sazonalidade [44]. Observa-se um gradiente latitudinal no momento do pico da epidemia – no Norte do país, este costuma ocorrer cerca de três meses antes (março-abril) daquele observado na região Sul [44 e 45].

1.1.6- Mecanismos evolutivos e o surgimento do vírus influenza A(H1N1)pdm09

Seja sob a perspectiva da genética de populações ou da evolução de vírus RNA, as mudanças evolucionárias encontram-se relacionadas a diferentes processos: mutação, recombinação ou rearranjo gênico, seleção, deriva genética e migração. Estes processos são interativos e delimitam a estrutura das populações.

Algumas características dos vírus RNA são também importantes para o processo evolutivo. Frequentemente, estes vírus encontram-se sob a forma de grandes populações (o número de partículas virais pode chegar à ordem de 10^{12}). Isto ocorre em consequência do processo replicativo, no qual uma única partícula viral pode produzir até 100.000 novas

cópias em 10 horas. Ainda, a baixa fidelidade das polimerases faz com que os vírus RNA exibam grandes taxas de mutação (cerca de 1 mutação/genoma/replicação) [46 e 47].

O processo de *drift* antigênico se dá quando ocorrem mutações pontuais no genoma viral, o que constitui um importante mecanismo evolutivo para os vírus influenza. O acúmulo gradual de mutações nas glicoproteínas HA e NA ocasiona mudanças nas respectivas estruturas antigênicas, contribuindo para a evasão da resposta imune do hospedeiro [48] (Figura 6).

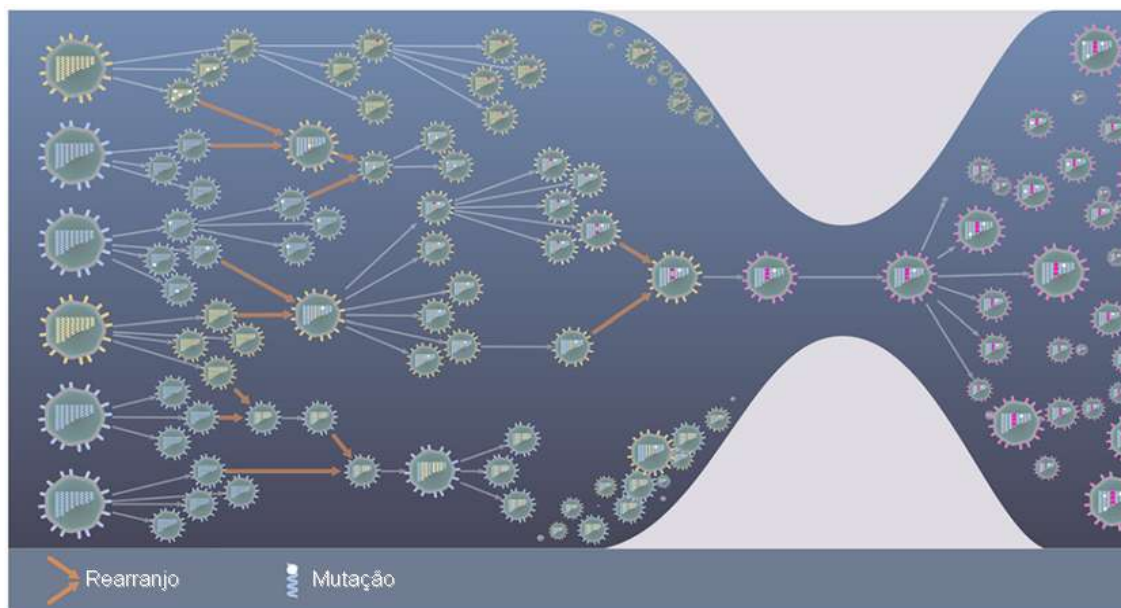


Figura 6– Geração da diversidade genética e *drift* antigênico. Os vírus amarelos e azuis representam duas linhagens antigênicamente distintas do vírus influenza A, circulando na mesma população humana. A diversidade genética da população viral circulante aumenta através dos processos de mutação e rearranjo. As setas brancas indicam as relações entre os vírus ancestrais e descendentes. As marcas brancas nos segmentos indicam as mutações neutras, e as vermelhas, indicam as mutações que afetam as regiões antigênicas nas proteínas de superfície. As setas laranja indicam a geração de vírus oriundos de rearranjo, contendo segmentos dos dois ancestrais. Conforme estes vírus permanecem circulando, a imunidade da população aumenta, sendo representada na figura pelo afunilamento em forma de gargalo. Paralelamente, os vírus contendo mudanças antigênicas favoráveis nas proteínas de superfície se acumulam na população viral. Em algum momento, ocorrerá a emergência da nova variante antigênica (*drift*), menos afetada pela imunidade populacional. Esta variante emergente será capaz de causar novas infecções e fundar um novo *cluster*, composto por variantes similares. Fonte: McHardy & Adams, 2009.

As mudanças antigênicas da HA parecem ser menos importantes para o processo evolutivo viral do que a aquisição de novos genes por rearranjo, o que configura um *shift* viral. Este processo ocorre quando dois vírus de diferentes subtipos infectam uma mesma célula hospedeira, e durante o processo de replicação viral ocorre troca de segmentos gênicos (rearranjo gênico), de tal forma a produzir um novo subtipo diferente dos dois iniciais (Figura 7). Este novo subtipo, por conter grandes variações antigênicas, é considerado potencialmente pandêmico [49].

As pandemias de gripe que ocorreram nos últimos dois séculos foram sabidamente ocasionadas pela emergência de um novo subtipo do vírus influenza A. Estes vírus, com o qual a população não havia tido contato prévio, foram capazes de provocar uma doença grave, tendo um alto índice de morbidade e de mortalidade. A ausência de imunidade prévia sugere que estes subtipos virais emergentes sejam produtos de rearranjo gênico entre as cepas humanas e as animais, o que é facilitado devido a segmentação genômica deste vírus [50].

No ano de 2009, ocorreu a emergência de nova linhagem de influenza A/H1N1, que provocou a primeira pandemia do século XXI, e ficou conhecida como A(H1N1)pdm09. O vírus, produto de rearranjo gênico, é composto por: dois genes (PA e PB2) da linhagem aviária norte-americana; um gene (PB1) derivado da linhagem sazonal H3N2; três genes (HA, NP e NS) da linhagem suína clássica norte-americana; e dois genes (NA e M) da linhagem suína euro-asiática (Figura 9). Este vírus parece haver sido introduzido em um único evento na população mexicana e norte-americana [51], teve alta transmissibilidade entre humanos, desafiando toda a preparação mundial para uma esperada pandemia de influenza aviária [52].

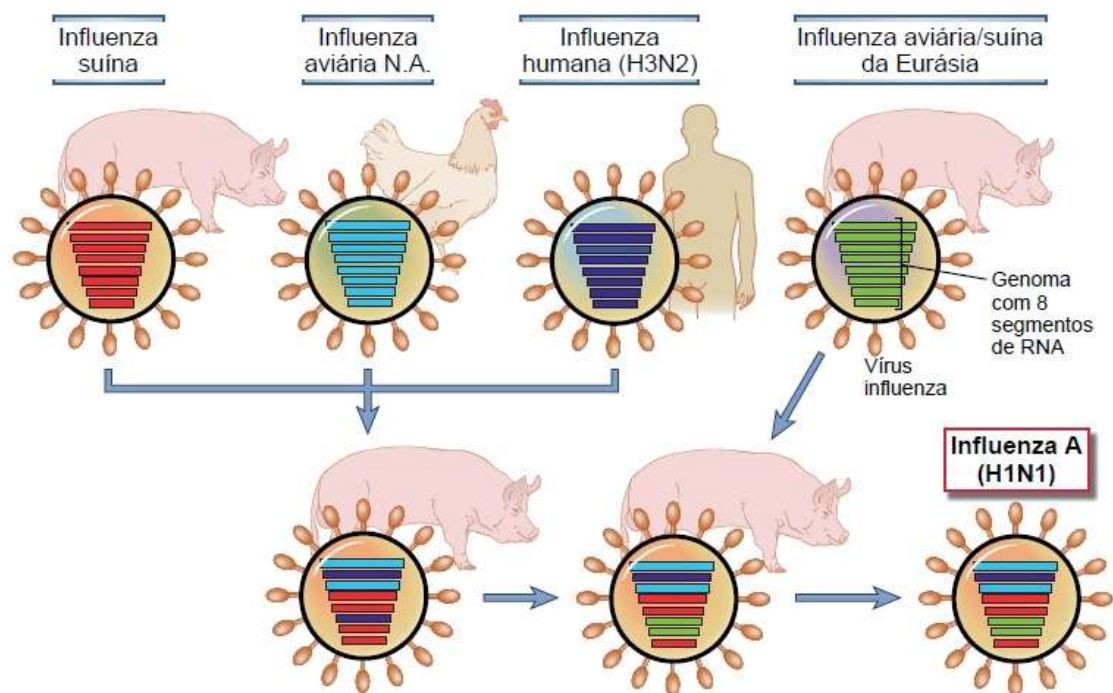


Figura 7 – Origem dos segmentos gênicos do A(H1N1)pdm09. Humanos, aves e suínos podem ser infectados simultaneamente por vírus influenza de diferentes cepas do gênero A. Este fato, combinado a segmentação do genoma, possibilita o rearranjo gênico e o surgimento de cepas pandêmicas, como o A(H1N1)pdm09. Os genes PA e PB2 são representados em azul claro; PB1 em azul marinho; HA, NP e NS em vermelho; NA e M em verde.

A distinção entre o vírus A(H1N1)pdm09 e o H1N1 sazonal (circulante na população desde 1977) está especialmente localizada na hemaglutinina (HA) viral e deve-se à rápida mudança antigênica ocorrida nesta molécula, responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira [53].

1.2- Vacina

Desde a descoberta do vírus Influenza A em 1933 [54] e do subtipo B em 1940 [55], os vírus da influenza têm sido considerados importantes patógenos causadores de doenças respiratórias agudas em seres humanos.

A variação antigênica é uma característica exclusiva dos vírus influenza A e B, e por isso infecções pelo influenza são consideradas problema de saúde pública em curso. Variações antigênicas ocorrem principalmente nos genes da hemaglutinina (HA) e

neuraminidase (NA). Devida à presença de grande variação antigênica dos vírus influenza e o escape viral da resposta imune do hospedeiro, a vacina precisa ser revisada anualmente, tendo como base as cepas predominantes que circularam nos hemisférios Norte e Sul na última temporada e que provavelmente continuarão circulando [56].

Estão disponíveis, contra influenza, as vacinas inativadas (IVs), para injeção intramuscular, e vacinas "vivas" atenuadas trivalentes (LAIVs), para aplicação intranasal e também vacinas quadrivalentes. Existem ainda modelos de vacinas promissores, como a vacina universal baseada na proteína M2 do vírus influenza.

1.2.1- Vacinas atualmente utilizadas

Em geral, vacinas sazonais contra influenza são trivalentes. As vacinas trivalentes (TIVs) tem sido utilizadas desde sua introdução em 1978 [57], mas no Brasil a primeira campanha de vacinação só deu no ano de 1999 com disponibilização da vacina TIV em todo território nacional, para grupos de indivíduos selecionados para a imunização. [58]. Em 2011, 620 milhões de doses da TIV foram produzidas no mundo inteiro [59]. A vacina trivalente contempla cerca de três vírus influenza: um influenza A(H1N1), um influenza A(H3N2) e um influenza B. A cada ano, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a composição da vacina contra influenza, baseada nos resultados globais de vigilância e predição das cepas de influenza de maior circulação para a próxima temporada. Atualmente as vacinas contra influenza licenciadas são: vacinas inativadas (IIV) e vacinas com vírus vivo inativado (LAIV).

1.2.1.1- Vacinas inativadas (IIVs)

As primeiras vacinas inativadas contra o vírus influenza foram aprovadas para uso nos Estados Unidos da América em 1945 [60]. Estas vacinas consistem em vírus purificados que são quimicamente inativados através da ação da formalina ou β -propiolactona [61].

Existem três tipos de IIVs: com vírus inteiro, "split" de vírus, e de subunidade viral. As IIVs mais utilizadas são as de "split" de vírus e de subunidade viral. A eficácia da vacina depende de vários fatores, primeiramente da idade e também a existência de comorbidades nos vacinados assim como o pareamento antigênico entre as cepas presentes na vacina e as circulantes [62]. Entre 66-86% dos indivíduos adultos vacinados com IIVs estão soroprotetidos contra infecções pelo influenza [63].

1.2.1.2- Vacinas de vírus atenuado (LAIVs)

A LAIV é administrada através da via intranasal, na qual as cepas do vírus influenza contidas na vacina se replicam nas células epiteliais da nasofaringe. Os vírus contidos nesta vacina apresentam duas propriedades. A primeira é que em temperaturas de até 25°C as cepas são capazes de se replicar, temperatura que restringe a replicação de outras cepas virais não vacinais. Já em temperaturas mais elevadas, entre 37°C e 39°C, ocorre uma restrição da replicação das cepas contidas na LAIV; as mesmas são atenuadas para evitarem uma possível infecção [64].

O “spray” intranasal da LAIV atua na indução de produção de IgG no soro quanto na produção de IgA na mucosa da nasofaringe [65]. Ao contrário das vacinas inativadas, LAIV gera resposta humoral e celular contra as glicoproteínas HA e NA, similar a que ocorre na infecção natural pelo vírus influenza. Essa resposta ocorre na mucosa onde houve a inoculação da vacina e também é uma resposta sistêmica [66]. A LAIV, primeiramente licenciada nos Estados Unidos da América [67], apresentou maior eficácia em crianças, quando comparada com a TIV sem adjuvante [68], entretanto se mostrou menos eficiente em adultos com faixa etária variando entre 17 e 49 anos de idade [69].

1.2.2- Vacinas recentemente aprovadas

Várias estratégias para o desenvolvimento de vacinas anti-influenza mais eficientes tem sido pensadas e algumas já foram implantadas recentemente. Os objetivos destas estratégias são elevar a imunogenicidade da vacina, ampliar a imunidade induzida pela vacina, estabelecer métodos alternativos para a produção de vacinas de maneira mais rápida, e melhorar a aceitabilidade das vacinas contra o influenza. Algumas das vacinas recentemente aprovadas estão descritas a seguir.

1.2.2.1- Vacina quadrivalente (QIV)

Duas linhagens distintas do vírus influenza B, linhagem Victoria e linhagem Yamagata, tem co-circulado desde o ano de 1980 [70]. Já foi visto que existe uma pequena proteção cruzada entre as duas linhagens. Atualmente as TIVs contém antígenos para um vírus influenza B, representando apenas uma linhagem. Isto leva a uma redução da efetividade da vacina especialmente quando o vírus influenza B que circula predominantemente não corresponde à linhagem vacinal. A linhagem de influenza B circulante predominante foi

diferente da linhagem vacinal em cinco de dez temporadas nos Estados Unidos entre os anos de 2001 e 2011 [71]. Na Europa entre os anos de 2003 e 2011, a linhagem circulante predominante diferiu da linhagem vacinal em metade das temporadas, e a taxa de incompatibilidade das amostras de influenza B foi de 58% [72].

A primeira vantagem da vacina quadrivalente para influenza (QIV) está relacionado com fato de a vacina fornecer cobertura para ambas possibilidades de circulação da linhagem de influenza B, seja linhagem Yamagata ou linhagem Victoria. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou a inclusão de uma segunda cepa de influenza B em QIVs para a temporada 2013-2014 [73]. Estudos tem demonstrado que a QIV oferece imunogenicidade para três antígenos que pode ser comprada à TIV [74, 75 e 76]. Além disso, a QIV também contribui com uma resposta imune adicional à cepa alternativa da linhagem de influenza B. A segurança e reatogenicidade da QIV demonstraram ser semelhantes às encontradas na TIV [77].

Abaixo encontra-se uma tabela (Tabela 2) com as QIVs recentemente aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos.

Nome	Fabricante	Composição	Via de administração	Dose do antígeno	Subtrato	Idade	Data da aprovação
Flumist® Quadrivalente	MedImmune	LAIV	Intranasal	10 ^{6,5} -10 ^{7,5} FFU/cepa	Ovos embrionados	2-49 anos	fev/14
Fluariz® Quadrivalente	GlaxoSmithKline	IIV	Intramuscular	15µg HA/ cepa	Ovos embrionados	≥3 anos	dez/12
Fluzone® Quadrivalente	Sanofi Pasteur	IIV	Intramuscular	15µg HA/ cepa	Ovos embrionados	≥ 6 meses	jun/12
Flulaval® Quadrivalente	ID Biomedical Corporation	IIV	Intramuscular	15µg HA/ cepa	Ovos embrionados	≥ 3 years	ago/12

Tabela 2- Vacinas quadrivalente anti-influenza aprovadas recentemente pelo FDA-EUA.

1.2.2.2- Vacinas com adjuvantes

O papel essencial dos adjuvantes é permitir uma resposta imune rápida e ampla, além da expansão da resposta de anticorpos [78]. O uso de adjuvantes é um dos melhores métodos para melhorar a performance da TIV, especialmente em idosos.

A primeira geração de vacinas anti-influenza com adjuvantes foi introduzida em 1950, e as formulações incluíam antígenos emulsificados com óleo mineral [79 e 80]. Estas vacinas induzem respostas de anticorpos maiores e mais sustentáveis [81]. Entretanto, as vacinas

contendo óleo mineral como adjuvante também induzem reações indesejadas como cistos e abscessos [82].

Sais de alumínio têm sido amplamente utilizados como adjuvantes [83]. Pensava-se que o modelo de ação dos sais de alumínio ocorresse através de um aumento da atração e captação de células apresentadoras de antígeno e ativação de inflamações com aumento da eficiência da imunidade inata [84]. Mas os sais de alumínio induzem uma forte resposta Th2. Entretanto, eles são menos efetivos para gerar imunidade mediada por células Th1 [85].

A TIV contém uma emulsão “oil-in-water” que foi licenciada primeiramente pela Europa no ano de 1997. O MF59 é um microfluido, uma emulsão “oil-in-water” contendo esqualeno [86]. Este adjuvante estimula o influxo de células inflamatórias e estabelece um ambiente imunoestimulatório [87] a proliferação de células apresentadoras de antígeno e células T helper melhoram a resposta das células B e levam a um aumento da produção de anticorpos [88].

1.2.2.3- Vacinas intradérmicas (ID)

A pele é um alvo atrativo para a entrega de uma vacina contra o influenza. A epiderme e a derme apresentam uma quantidade abundante de células apresentadoras de antígenos, células de Langerhans e células dendríticas [89]. Imunizações intradérmicas (ID) desencadeia a migração dos antígenos vacinais através dos ductos linfáticos e conseqüentemente leva a uma estimulação das células dendríticas residentes. A ativação e migração das células dendríticas residentes na derme leva a uma potente ativação de células T [90].

Os principais objetivos para a introdução de uma vacina ID é a possibilidade da utilização de pequenas doses e também de uma melhoria da resposta imune dos indivíduos vacinados. As vacinas contra influenza intradérmicas induzem uma resposta imune similar, com menores doses de antígeno, em adultos saudáveis com comorbidades [91]. Em indivíduos idosos, vacinas intradérmicas demonstraram uma melhor imunogenicidade quando comparadas às vacinas inativadas convencionais (IIVs) [92].

A primeira vacina intradérmica contra o influenza avaliada, Intaza® (Sanofi Pasteur), também conhecida como IDflu®, foi licenciada no ano de 2009 como uma vacina sazonal na Europa [93]. Fluzone® Intradermal (Sanofi Pasteur) contém 9µg de HA por cepa foi licenciada para uso nos Estados Unidos da América em 2011. Na Coreia do Sul, IDflu® 15 µg (Sanofi Pasteur) e IDflu® 9µg (Sanofi Pasteur) foram aprovadas em 2010 para uso em indivíduos com idades superiores a 60 anos e idades entre 18-59 anos, respectivamente [94].

1.2.2.4- Vacinas “high-dose” de hemaglutinina

A vacina contra influenza “high-dose” (HD) contém 60 µg de HA por cada cepa vacinal, enquanto que a “standard dose” (SD) apresenta apenas 15 µg de HA de cada cepa presente na vacina. Estudos recentes tem demonstrado que a vacina HD é mais imunogênica que a vacina SD em idosos [95]. Um ensaio de fase III, randomizado, controlado, duplo-cego demonstrou que a vacina HD anti-influenza aumenta de maneira significativa a resposta humoral quando comparada com a vacina SD [96]. Em indivíduos infectados pelo HIV com mais de 18 anos de idade, que foram vacinadas com a “high-dose” tiveram níveis mais elevados de soroproteção contra o antígeno H1N1 e influenza B quando comparados com os indivíduos que receberam a vacina “standard-dose” [97].

O “Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América aprovaram a Fluzone® High Dose (Sanofi Pasteur) em 2009 para a prevenção da infecção por influenza em pessoas com mais de 65 anos de idade [98].

1.2.2.5- Vacinas “cell-culture”

A tecnologia da cultura de células fornece um número maior de vantagens em relação a fabricação de vacinas contra o influenza a base de ovos embrionados. A vacina anti-influenza “cell-culture” (CCIV) supera a dependência dos ovos embrionados e o risco de contaminação que existe neste tipo de fabricação de vacinas. E ainda pessoas que apresentam algum tipo de alergia a proteínas do ovo seriam extremamente beneficiadas com a utilização da CCIV. A fabricação das CCIV é rápida e estas vacinas podem ser mais facilmente ampliadas do que aquelas baseadas em ovos embrionados. Além disso, a introdução da CCIV contribuiria substancialmente para o melhoramento do estoque de vacinas anti-influenza, de maneira global.

Diversas linhagens de cultura celular tem sido desenvolvidas especilmnte para a fabricação de vacinas contra o influenza [99]. Atualmente, “Madin Darvy Canine Kidney (MDCK) e células Vero foram licenciadas para a produção de vacinas. Em junho de 2007, Optaflu® (Novartis), uma vacina de subunidade, trivalente e produzida em MDCK, foi aprovada na Europa [100]. Nos Estados Unidos, a Flucelvax® (Novartis), outra vacina de subunidade e trivalente contendo vírus propagadas em células MDCK, foi aprovada no ano de 2012 [101]. A Preflucel® (Baxter) é uma vacina derivada de células Vero e inativada, quem está em ensaio de fase III [102].

1.2.2.6- Vacinas de hemaglutinina recombinante

A vacina anti-influenza de hemaglutinina recombinante e trivalente, Flu Block® (Protein Sciences) foi aprovada para indivíduos com idades entre 18 e 49 anos em 2013 [103]. Para vacinas recombinantes, o gene que codifica para a proteína hemaglutinina é clonado em um vetor de baculovírus. As proteínas de HA são expressas em linhagens celulares de insetos infectados por esses vetores [104]; não é necessária a utilização de ovos embrionados no processo de produção deste tipo de vacina.

A Flu Bock® contém cerca de 15µg de hemaglutinina de cada cepa, totalizando 135µg de HA [105]. Em um ensaio de fase III a Flu Block® se mostrou potente e eficaz [106].

1.2.3- Estratégias para o desenvolvimento de novas vacinas anti-influenza

Um número razoável de novas abordagens estão sendo estudadas para o desenvolvimento de novas vacinas anti-influenza mais eficientes. Na figura 8 podemos observar algumas das estratégias que estão sendo estudadas no momento.

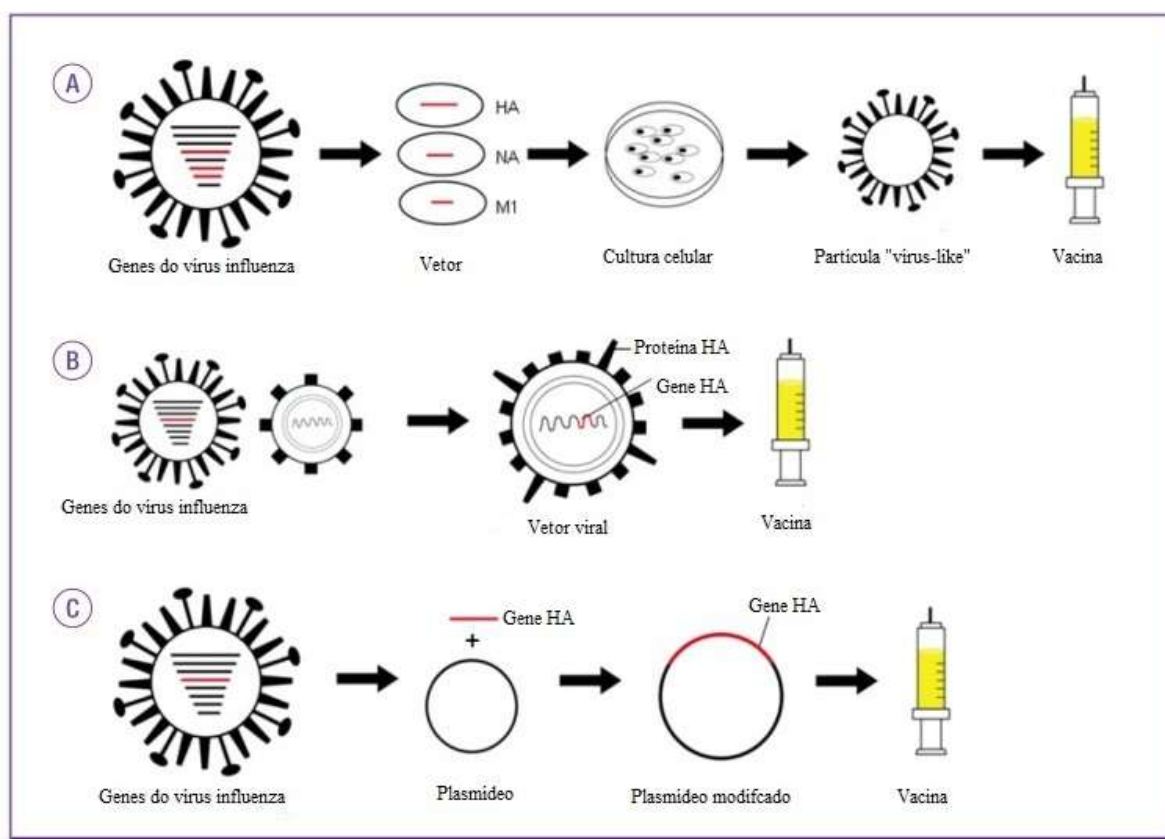


Figura 8- Novas abordagens para o desenvolvimento de novas vacinas contra influenza. Um breve diagrama representando o processo de produção de vacinas anti-

influenza com partículas “virus-like” (A), vacinas com vetor viral (B) e vacinas baseadas em DNA (C) são representadas. Adaptado de Young-Tae, 2014.

A vacina anti-influenza com partículas “virus-like” contém as proteínas da HA, NA, e da proteína de matriz 1 (M1). Neste processo, vetores virais recombinantes que expressam as proteínas HA, NA, e M1 são utilizados para infectarem células [107]. A expressão espontânea de proteínas do influenza forma partículas que apresentam estruturas similares as dos vírus selvagens. A replicação dos vetores virais recombinantes não dependem da expressão da HA ou NA [108].

Vacinas de vetores virais utilizam outros vírus para apresentar as proteínas do influenza para o sistema imune. Os genes da HA são clonados em um vetor, como o adenovírus, vaccinia vírus, vírus Newcastle ou baculovírus, para expressar a hemaglutinina [109]. Alguns sistemas de vacinas recombinantes podem permitir uma maior e mais rápida produção de vacinas do que os métodos convencionais [110]. Entretanto, preocupações de que a imunidade preexistente contra os vetores virais possa interferir na eficácia precisam ser superadas.

Vacinas baseadas em DNA são feitas através da inserção do gene da HA em um plasmídeo. A injeção intramuscular de vacinas baseadas em DNA induzem a transfecção das células do hospedeiro e consequente expressão do antígeno no hospedeiro. As vacinas baseadas em DNA são estáveis e podem ser produzidas de maneira rápida. Alguns relatos indicaram uma boa performance desta vacina em modelos animais [111], entretanto sua baixa imunogenicidade em humanos sugerem que são necessárias maiores investigações clínicas [112].

Uma vacina universal é ideal, pois promove imunidade de amplo espectro contra múltiplas cepas de influenza. Várias regiões do genoma viral são conservadas e tem sido investigadas como possíveis candidatas para a criação de uma vacina universal. Um domínio altamente conservado da proteína M2 do vírus influenza A e um domínio “stalk” da hemaglutinina tem sido explorados [113]. Vacinas baseadas em epítomos utilizando nucleoproteína e proteína M1 também tem sido testadas [114]. A vacina de células T contém múltiplos epítomos contra influenza, e também vem sendo estudada [115].

1.3- Imunidade natural ou induzida ao influenza

Os vírus influenza causam uma infecção aguda no hospedeiro e inicia uma cascata de reações, ativando o sistema imunológico, gerando uma resposta sistêmica e local de

anticorpos (imunidade humoral), bem como as respostas das células T citotóxicas (imunidade celular), ambas importantes na recuperação da infecção aguda e resistência à reinfecção.

Estes vírus são inicialmente detectados e eliminados de forma não específica por mecanismos da imunidade inata, mas se houver o escape viral dos mecanismos de defesa precoces, eles serão detectados e eliminados por mecanismos imunes adaptativos [116]

1.3.1- Resposta imune natural

1.3.1.1- Resposta imune inata

A linha inicial de defesa contra patógenos é fornecida pela imunidade inata (também conhecida como imunidade natural ou nativa). O sistema imune inato possui duas importantes funções: inicia a resposta a patógenos, que pode prevenir, controlar ou eliminar a infecção do hospedeiro, e estimula também a resposta imune adaptativa. A resposta imune inata não tem a capacidade de desenvolver memória imunológica [117].

A resposta inata inclui a liberação de citocinas (interferon α e β), influxo de granulócitos neutrófilos, macrófagos e de células *Natural Killer* (células NK) [118 e 119]. Dentro da imunidade inata, deve-se destacar a importância dos receptores do tipo Toll (TLR). Esses receptores presentes em vários tipos de células do sistema imune são capazes de ativar essas células, gerando uma potente resposta imune [120]. Existem sete tipos de TLR envolvidos na resposta contra vírus [121]. Esses TLRs têm como principal alvo de reconhecimento os ácidos nucleicos.

A partir da produção de interferon do tipo I e citocinas inflamatórias ocorre a ativação das células NK. Essas células têm grande importância na resposta imune inata contra vírus, pois são capazes de eliminar células infectadas por esse patógeno. A interação com a célula infectada somada ao sinal proveniente das citocinas inflamatórias induz a célula NK a liberar seu conteúdo citolítico de perforinas e granzimas que levarão à morte da célula infectada [122]. Outro mecanismo utilizado pelas células NK para inibir a infecção viral é a lise de células que não expressam MHC de classe I, uma vez que a expressão dessa molécula pode ser inibida pelo vírus infectante.

A imunidade inata é um pré-requisito essencial para a resposta imune adaptativa, em primeiro lugar, para limitar a replicação viral inicial, e, segundo, porque os linfócitos antígeno-específicos da resposta imune adaptativa são ativados por moléculas co-

estimulatórias que são induzidas em células do sistema imune inato durante sua interação com vírus [123].

1.3.1.2- Resposta imunidade adaptativa

Muitos vírus conseguem sobrepujar a resposta imune inata devido, principalmente, à sua alta taxa de replicação, por isso, paralelamente à resposta inata, também ocorre a ativação de uma resposta antígeno-específica. Normalmente, células dendríticas e macrófagos realizam esse papel [124].

A imunidade adaptativa é antígeno-específica e é capaz de reconhecer e dar uma resposta mais rápida e específica para exposições repetidas ao mesmo patógeno. Esta é dividida didaticamente em resposta humoral e celular. A primeira é mediada por anticorpos produzidos por células B, que é necessária para a neutralização do vírus e, portanto, para a prevenção da infecção [125]. A resposta celular é caracterizada pela ativação de células T. A recuperação da infecção é mediada por células T citotóxicas que induzem a lise de células infectadas pelo vírus da gripe. A conexão entre estes dois ramos da imunidade adaptativa é essencial para uma resposta imune eficaz [126].

1.3.1.2.1- Resposta imune mediada por células

A imunidade mediada por células consiste principalmente de dois componentes celulares: as células T CD4⁺ e T CD8⁺. As células T CD4⁺, também chamadas de células T auxiliares (Th), secretam diferentes citocinas que desempenham papel fundamental na regulação da resposta imune humoral e celular, enquanto as células T CD8⁺ são mediadoras da resposta citotóxica [127] (Figura 9).

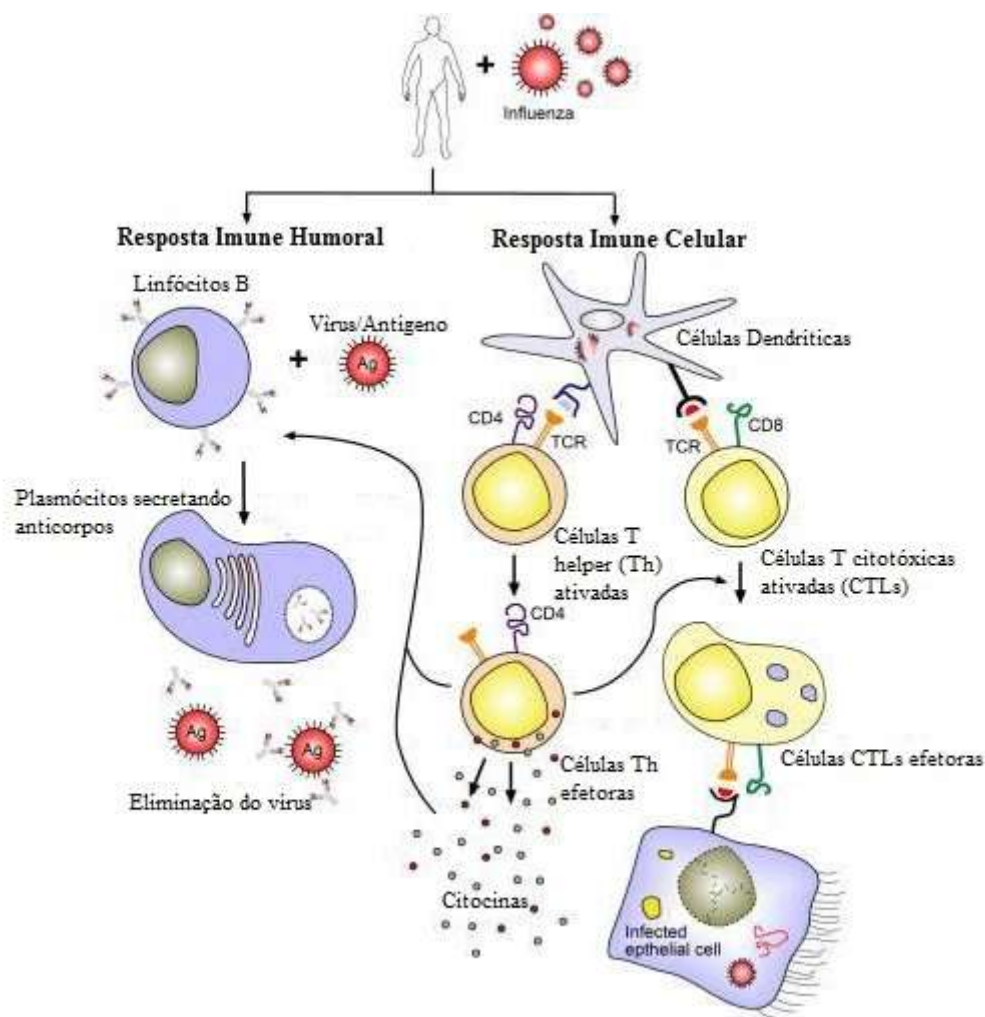


Figura 9- Resposta humoral e celular à infecção pelo vírus influenza. O sistema imune humoral é composto por linfócitos B (à esquerda), que após interação com vírus da gripe se diferenciam em células secretoras de anticorpos. A resposta celular (à direita) começa com a apresentação de antígenos via moléculas de MHC I (preto) e MHC II (azul) pelas células dendríticas, que então levam à proliferação, ativação e diferenciação de células T antígeno-específicas (CD4+ ou CD8+). Essas células ganham a função de células efetoras, que atuam diretamente, na liberação de citocinas, ou mediam a citotoxicidade no reconhecimento do antígeno seguinte. Não é mostrada a formação da resposta de memória imunológica celular e as várias formas da imunidade inata induzidas pela gripe. Adaptado de Flint, 2004.

Devido à natureza de infecção intracelular dos vírus, os antígenos são apresentados principalmente via MHC de classe I, desencadeando uma resposta de linfócitos T CD4+. A ativação desse tipo de linfócito pode seguir diferentes caminhos dependendo do ambiente da infecção. Esse ambiente é formado por todos os fatores imunológicos presentes no sítio da infecção, como citocinas, quimiocinas, hormônios, glicose e oxigenação local [128].

Células TCD4⁺

As células T CD4 + podem se diferenciar em subconjuntos de células efetoras Th1, Th2 e Th17. As características desses subconjuntos são baseadas em como eles são induzidos, que citocinas secretam e seus mecanismos efetores.

A indução de células Th exige apresentação de antígenos via complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHCII) por células dendríticas (DCs) ou macrófagos. Além disso, o tipo de citocina que é secretado pelas DCs determina a polarização da resposta imune Th para Th1 ou Th2. A diferenciação do precursor Th para os subconjuntos Th1 é promovida pela interleucina 12 (IL-12), enquanto que a interleucina 4 (IL-4) induz a diferenciação do precursor Th a uma resposta Th2 [129].

Citocinas que são secretadas por células Th1 (IFN- γ e IL-2) são necessárias para o desenvolvimento da imunidade mediada por células. Adicionalmente, o IFN- γ induz a troca de isotipo em células B para IgG2a e ambos são, portanto, utilizados como um marcador de uma resposta Th1. Por outro lado, a diferenciação e proliferação das células B e troca de isotipo de anticorpos para IgE, IgG1e IgA são estimuladas por citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10), que são importantes na resposta imune humoral [130].

As células Th17 são classificadas como o terceiro subconjunto diferenciado de células T CD4+ de camundongos. Estas secretam uma citocina pró-inflamatória, a IL-17, que está envolvida na maturação de células dendrítica e neutrófilos, que são importantes na contribuição da proteção contra bactérias e fungos. A diferenciação de células Th17 é inibida na presença de IFN- γ e IL-4 [131].

É sabido que a maioria das infecções virais induz a produção de interferons pelas células NK. Esse fato leva a uma preferência para ativação do padrão Th1. No entanto, podem ocorrer respostas mistas no desenrolar da infecção [132].

Células TCD8⁺

O mecanismo de defesa mais ativo contra a infecção viral é o mediado por linfócitos T CD8+ específicos. Esse tipo celular tem a capacidade de reconhecer as células infectadas, eliminando-as por indução de apoptose ou pela liberação de proteínas citolíticas como a perforina. Outra propriedade dessa célula, na infecção viral, é a produção de interferon- γ que reduz diretamente a replicação de alguns vírus [133].

A diferenciação de células T CD8+ *naïve* em linfócitos T citotóxicos (CTLs) requer o

reconhecimento do antígeno que é exibido por moléculas de MHC classe I na superfície da célula infectada e estimulação por citocinas Th1. O receptor de antígeno dos CTLs deve reconhecer o peptídeo-MHC classe I nas células infectadas antes que os CTLs matem a célula infectada por dois mecanismos principais. Em primeiro lugar, CTLs liberam complexos de perforina e granzimas na célula infectada. As granzimas penetram no citoplasma da célula infectada e induzem a apoptose. Em segundo lugar, o receptor FasL que é expresso em CTLs, interage com receptor Fas na superfície das células infectadas e também induzem a apoptose [134 e 135].

As células de memória de T CD4+ e CD8+ podem ser reativadas e dar uma resposta mais rápida quando o mesmo antígeno é reencontrado. Os CTLs fornecem ampla reatividade cruzada contra diversos subtipos, porque reconhecem as proteínas virais internas, que são altamente conservadas entre os vírus da influenza [136].

1.3.1.2.- Resposta imune humoral

Outro mecanismo da imunidade adaptativa contra vírus também muito eficiente é a produção de anticorpos. Os anticorpos são produzidos por células plasmáticas, que são o estágio final de desenvolvimento de células B.

O disparo da resposta imune humoral ocorre pelo reconhecimento de antígenos por células B. As imunoglobulinas de membrana M (IgM) e os receptores IgD em células B *naïve* se ligam aos antígenos. Quando isso ocorre, juntamente com os estímulos essenciais por células Th, às células B são ativadas, sofrem expansão clonal (proliferação do clone de linfócitos antígeno-específicos) e se diferenciam em células plasmáticas secretoras de anticorpos, células de memória e progênie de clones que produzem Ig de outros isotipos (por exemplo, IgG ou IgA) [135].

Algumas células plasmáticas migram para a medula óssea, onde ficam por muitos anos e continuam a produzir baixos níveis de anticorpos por longos períodos, que fornecem imunidade duradoura mediada por anticorpos. Células de memória desempenham um papel importante na resposta imunológica secundária por darem rápida resposta após reencontro com o mesmo antígeno [137]. Progênie de clones que irão produzir outros isotipos de imunoglobulinas são determinadas por citocinas, que são secretadas por células T auxiliares (Th) e este processo é essencial para o desenvolvimento da resposta humoral. Enquanto a IgA serve para neutralizar e eliminar a infecção por vírus que entram em contato através das mucosas respiratória e intestinal, IgGs possuem três diferentes funções: 1) opsonização de antígenos que irão ser fagocitados por neutrófilos e macrófagos; 2) citotoxicidade dependente

de anticorpos, mediada por células *natural killer*; 3) ativação da via clássica do complemento, que levará à lise viral [135].

Acredita-se que os anticorpos antivirais atuam principalmente como moléculas neutralizantes, isto é, os anticorpos evitam a ligação do vírus ao seu receptor específico, na célula hospedeira, impedindo a posterior entrada do vírus nessa célula [133].

A infecção por influenza resulta na produção sistêmica de anticorpos para glicoproteínas HA e NA, bem como para as proteínas M e NP. O anticorpo anti-HA é neutralizante e protege contra infecções com vírus homólogos. A indução de anticorpos neutralizantes é um dos principais objetivos da imunização com vacinas virais humanas e veterinárias [138].

1.3.1.3- Imunidade de mucosa

O sistema imune da mucosa serve como primeira linha de defesa contra o vírus influenza. Ela é mediada, principalmente, por imunoglobulinas A diméricas (IgAd).

A IgA aparece basicamente sob duas formas: a sérica e a secretória. É sintetizada em glândulas e mucosas por plasmócitos. A IgA sérica, seja ela intra ou extracelular, é um monômero e não se apresenta ligada à cadeia J. Já a IgA secretória é encontrada em mucosas e secreções, tem a forma de um dímero e a cadeia J une as duas porções Fc das moléculas de IgA.

Esse dímero combina-se com a porção secretória, sintetizada por células epiteliais que participam ativamente na secreção desse tipo de imunoglobulina. O componente secretório liga-se à porção Fc e necessita da presença da cadeia J, com a qual tem grande afinidade. A presença da porção secretória confere à IgA uma grande resistência à ação de enzimas proteolíticas presente em secreções.

A IgA secretora está presente em quantidades significativas em todo o trato aéreo-digestório e não é degradada pelos processos de digestão habituais. A forma monomérica da IgA não é encontrada em quantidades significativas nas secreções e, de modo semelhante, a IgA secretora não é absorvida sistemicamente [139].

Outra classe de anticorpos que contribui para essa neutralização é a IgG, que vai para o muco por difusão. Os anticorpos IgAs têm maior reatividade cruzada que IgG e, portanto, fornecem proteção contra mutações pontuais nos vírus (drifts). Nas células epiteliais infectadas, os anticorpos IgA que atravessam a célula podem se ligar às proteínas virais recém-sintetizadas e inibir o processo de montagem viral. O parênquima pulmonar não possui IgAs, portanto, a proteção contra a pneumonia por influenza é dependente principalmente de

IgG derivada no soro [140].

Estudos sugerem que a resistência à reinfecção é predominantemente mediada pela IgA produzida localmente, embora IgG também tenha papel relevante. Tanto os anticorpos da mucosa, quanto os sistêmicos podem ser protetores, e uma ótima proteção ocorre quando ambos estão presentes [141].

A resposta imune de mucosa no sistema respiratório superior é induzida no tecido linfóide associado à nasofaringe (NALT). O NALT nos murinos parece ser funcionalmente e anatomicamente diferente do anel linfático de Waldeyer, que compreende a amígdala nasofaríngea (adenóide), as amígdalas tubárias, as amígdalas palatinas e a amígdala lingual em seres humanos [142].

1.3.2- Resposta imune induzida pela vacinação

A hemaglutinina é o receptor viral que se liga aos receptores das células epiteliais do hospedeiro, permitindo que o vírus penetre na célula hospedeira. Portanto, os anticorpos contra a HA desempenham um papel importante na imunidade que protege da infecção pelo vírus influenza e são a base para o licenciamento de vacinas contra a influenza. [144].

A vacinação contra influenza resulta em resposta imune local e sistêmica. Entre 2 e 6 dias pós-vacinação, um aumento dos títulos de anticorpos em resposta a vacinação já podem ser detectados [144]. Após duas semanas de vacinação, 90% dos indivíduos vacinados apresentam títulos soroprotetores de anticorpos [145]. O pico da resposta de anticorpos se dá entre 2 e 3 semanas após a vacinação anti-influenza em indivíduos imunizados [146], e diminui ao longo do tempo e geralmente duas vezes menor 6 meses pós-vacinação [147]. A resposta sorológica é dominada por anticorpos IgG específicos para influenza (especificamente IgG1), e baixas concentrações anticorpos de IgM e IgA podem ser detectados [148]. Os anticorpos induzidos após a vacinação são do tipo específicos [149] mas podem apresentar um reatividade cruzada,oferecendo proteção cotra outras cepas virais [150]. A vacina de “split-virus” estimula uma robusta resposta imune direcionada para as glicoproteínas da superfície viral, a hemaglutinina e a neuraminidase; em alguns casos, essa resposta também pode ser direcionada para proteínas internas do vírus, como as proteínas M e a NP [151]. A resposta imune local é induzida após a vacinação nas tonsilas e na saliva/fluídos orais (Figura 10) [152].

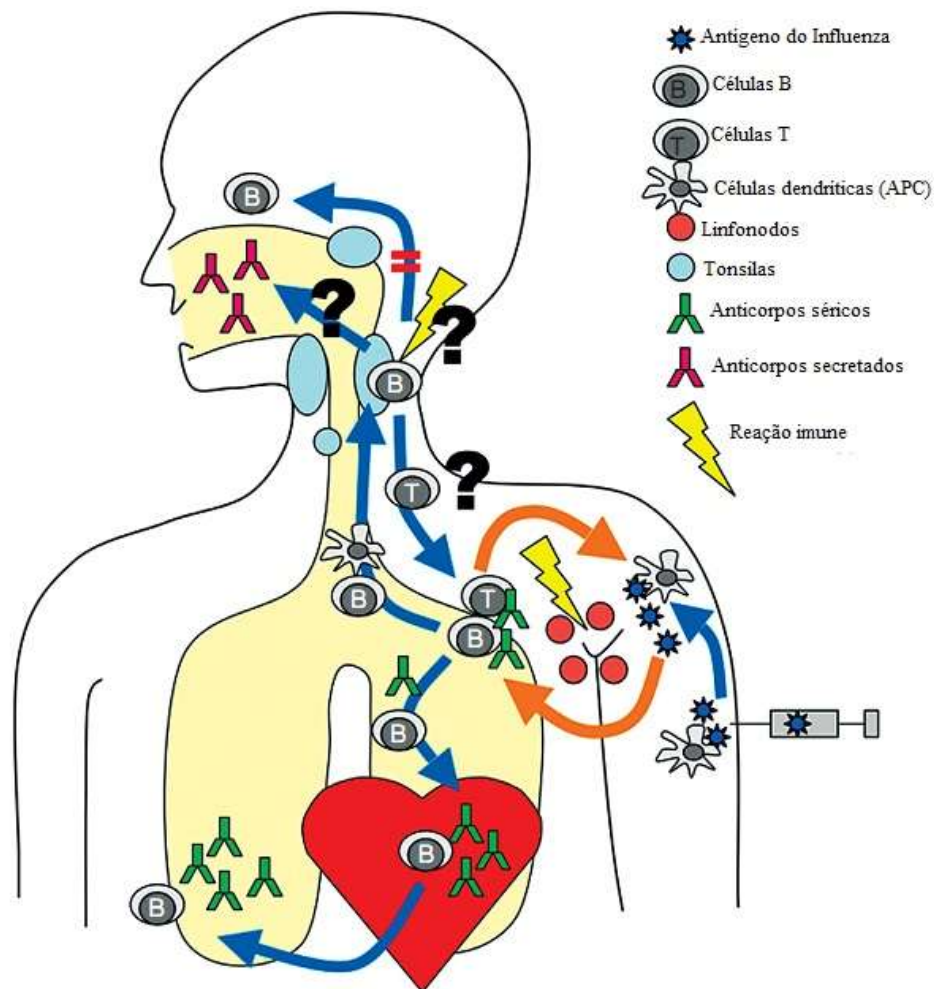


Figura 10- Uma vista geral simplificada dos processos imunológicos que ocorrem em conexão com a vacinação contra o influenza. Após a injeção, os componentes da vacina são transportados para linfonodos da axila, como antígenos livres, são opsonizados ou transportados através de células dendríticas (APCs). Aqui, eles induzem uma resposta imunológica. Níveis elevados de anticorpos específicos para o influenza e de linfócitos de sangue periférico são detectados sistematicamente após a vacinação e, provavelmente, originados dos gânglios linfáticos na axila. Plasmócitos específicos contra o influenza também podem migrar para os nódulos linfáticos locais, tal como as tonsilas, mas não para as mucosas de superfície. Os antígenos contidos na vacina também montam uma resposta de anticorpos na saliva, mas a origem destes anticorpos não é conhecida, a hipótese é que eles sejam oriundos das tonsilas ou de outro tecido linfoide local. Células TCD4⁺ auxiliares também podem migrar das tonsilas amígdalas para linfonodos na axila, participando da presente resposta imune.

Predominantemente, células secretoras de anticorpos IgA e IgG específicos para influenza são detectadas no sangue periférico e no tecido das tonsilas, com pico de detecção após 1 semana de vacinação [152]. Jovens diabéticos apresentam uma rápida e eficiente resposta imune após vacinação anti-influenza, sendo comparável a indivíduos saudáveis, entretanto mais estudos são necessários para confirmar este achado em outros grupos de risco

[153].

Recentemente foi verificado que há a existência natural de um nível basal de células que secretam anticorpos específicos para influenza na mucosa nasal [154], mas este nível não é influenciado pela vacinação [155]. Em adultos saudáveis, o tratamento com antivirais não altera a cinética da resposta imune após a vacinação contra o influenza [156], sugerindo que as drogas antivirais podem ser combinadas com a vacinação em um esforço para a proteção contra a infecção pelo influenza em períodos de grande circulação viral.

1.4- O HIV, sua imunopatogênese e a imunodeficiência adquirida

O vírus da imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) pertence à família *retroviridae* e é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), que é caracterizada por uma profunda imunossupressão associada a infecções oportunistas, tumores malignos e degeneração do sistema nervoso central [144].

O HIV-1 foi isolado pela primeira vez em 1983 [145] e sua distribuição é irrestrita pelo mundo. Nas mais de três décadas após o aparecimento dos primeiros casos de AIDS [146], o número de indivíduos acometidos pela infecção pelo HIV alcançou proporções pandêmicas. De acordo com dados do Programa das Nações Unidas para HIV e AIDS (Figura 11), estima-se que 35 milhões (32,2 – 38,8 milhões) de indivíduos estejam infectados pelo HIV em todo o globo terrestre [147]. No Brasil, o Ministério da Saúde informou que os novos números de AIDS, atualizados até junho de 2011, contabilizam 608.230 casos registrados desde 1980. Em relação a disseminação, a taxa de incidência oscila em torno de 17,9 casos de AIDS por 100 mil habitantes, e em 2009, foram notificados 34.218 casos da doença.

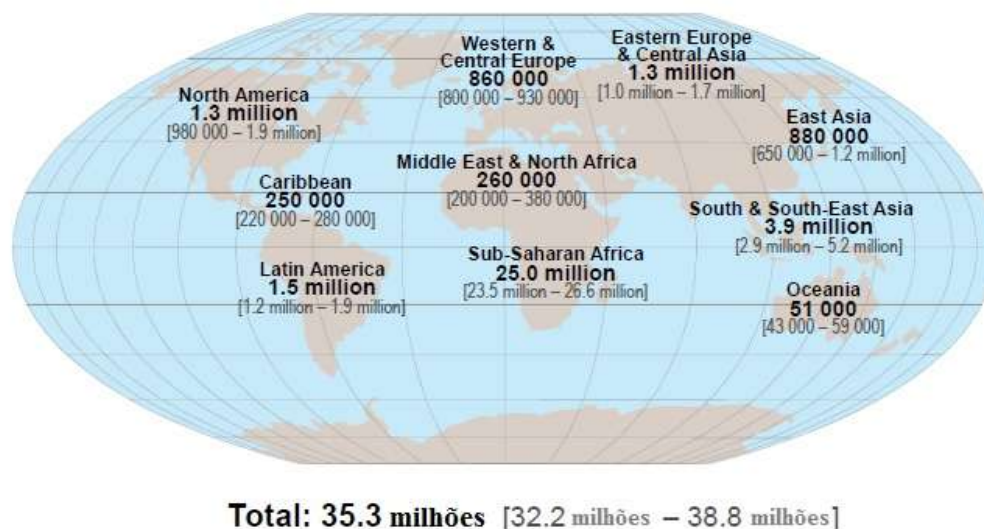


Figura 11- Pessoas infectadas pelo HIV no mundo. Modificada de <http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013>

Nos primeiros dias após a infecção, os vírus e células infectadas pelo HIV-1 atravessam a barreira da mucosa intestinal e promovem a infecção da célula-alvo mais abundante residente na *lamina própria* das células T CD4+ de memória efectoras em repouso [148].

Após o estabelecimento nos tecidos linfóides, um grande número de células CD4+ são infectadas. As condições se tornam, então, ideais para uma explosão na produção viral, que resulta em uma drástica redução do número de células T CD4+ no tecido linfóide associado ao intestino (GALT), a maior coleção de tecido linfóide no organismo [149]. Logo após este período, começa uma fase de controle da replicação viral pela resposta de células T citotóxicas e melhora na contagem de linfócitos T CD4+, que só torna a cair mais tardiamente no curso da infecção, com o estabelecimento da aids.

No entanto, acredita-se este primeiro momento da infecção seja decisivo na progressão da doença [150]. Em parte, essa teoria é sustentada pela ideia de que nesse curto período diversos vírus mutantes são produzidos. Alguns desses mutantes seriam resistentes a anticorpos neutralizantes, outros à ação de células T citotóxicas. Além disso, nessa fase se dá o estabelecimento de reservatórios virais e vírus infecciosos que se associam á células

foliculares dendríticas, sem falar na redução em massa do número de células T CD4+ e células T CD4+ de memória, particularmente no GALT [151]. No entanto, a depleção dramática de linfócitos T CD4+ que ocorre na mucosa, parece não ser o único fator responsável pela progressão para a síndrome da imunodeficiência adquirida, uma vez que macacos que são infectados pelo Simian Immunodeficiency Virus (SIV) também apresentam essa depleção sem apresentar quadro clínico semelhante à AIDS [152]. Alguns autores defendem que a ativação crônica e generalizada do sistema imune possa ser o fator principal causador da aceleração e progresso da infecção pelo HIV-1 até o quadro clínico de aids [153].

Vários autores sugerem que essa ativação generalizada se dê por uma recorrente estimulação antigênica associada à resposta inflamatória [154]. Essa ativação crônica levaria à regeneração insuficiente de células T de memória central, morte das células associadas à infecção e destruição da arquitetura dos linfonodos devido à inflamação crônica, perda de células T “naive” pela excessiva diferenciação em células de memória; perda da função tímica. Porém, ainda não se sabe o papel exato desses fatores individualmente ou em combinação, na patogênese da aids.

Nessa linha, Brenchley e colaboradores sugerem que uma aumentada translocação microbiana, provavelmente no trato gastrointestinal, pode contribuir para a ativação generalizada e crônica do sistema imune na infecção pelo HIV-1 [155]. Esta ativação crônica é apontada como causa principal da exaustão do sistema imune destes indivíduos, levando a imunossupressão que favorece o acometimento por infecções oportunistas.

1.5- Vacinação de indivíduos HIV positivos, inclusive contra o influenza

À medida que a disponibilidade de esquemas anti-retrovirais potentes aumentou a expectativa e a qualidade de vida dos pacientes infectados pelo HIV, a resposta às vacinas contra as infecções que podem ser prevenidas adquiriram maior significado. Respostas insuficientes após vacinação contra hepatite A e hepatite B foram observadas e documentadas em pacientes infectados pelo HIV [156].

Uma meta análise de oito estudos desenhados para avaliar a eficácia da vacinação contra a hepatite A entre pacientes infectados pelo HIV utilizando a série vacinal convencional revelou um baixo índice da resposta imunológica [156]. O índice geral de resposta para os pacientes infectados pelo HIV foi de 64%, observado em uma associação total de 458 participantes. Cada estudo revelou uma baixa proporção de pacientes obtendo títulos adequados de anticorpos contra o HAV. Em outro estudo, uma análise retrospectiva mostrou que o índice de resposta à vacina contra a hepatite A foi de apenas 48% em

comparação aos índices descritos de 100% entre pacientes HIV-negativos [157]. Comparado ao sucesso dos índices de soroconversão acima de 90% observados em hospedeiros imunocompetentes, os pacientes infectados pelo HIV respondem à vacina contra o HBV com índices de 17,5% a 56%. [158].

As estratégias para melhorar os índices de resposta à vacina compreendem o uso de doses maiores, a administração de maior número de doses e a administração de reforços vacinais [159]. Doses mais altas de vacina inativada contra o HBV têm demonstrado melhor resposta de anticorpos em jovens infectados pelo HIV [160].

Na população infectada pelo HIV existem indícios sugerindo que uma resposta adequada de anticorpos possa não se manter ao longo do tempo, como esperado. O uso de uma estratégia de seis doses promovendo títulos de anticorpos iniciais comparáveis aos da população imunocompetente observou que títulos adequados contra o HBV só se mantiveram em 59% dos participantes um ano após o término da série modificada [161]. Os

pesquisadores analisaram diversos parâmetros específicos do paciente associados a resposta à vacina contra a hepatite A e a hepatite B. A presença de baixos níveis de viremia do HIV foi sistematicamente associada à falha na resposta à vacinação contra hepatite. Em um modelo de regressão logística, Overton mostrou que apenas níveis de RNA do HIV abaixo de 400 cópias/mL no momento da vacinação contra a hepatite foram associados a resposta protetora, enquanto a contagem de CD4+ no momento da vacinação não foi considerada estatisticamente significativa [162]. O nadir da contagem de CD4+ não foi associado à previsão da produção de anticorpos protetores nos pacientes com HIV nem para a vacina contra a hepatite A, nem para a vacina contra a hepatite B em nenhum estudo até hoje.

Sendo assim, compreender o mecanismo da doença e da proteção conferida pelos diferentes esquemas vacinais, a investigação da resposta sérica (desenvolvimento de anticorpos específicos em níveis protetores), o tempo de duração da resposta humoral e o desenvolvimento de síndrome gripal causada pelo H1N1 após a vacinação desta população são de grande importância para o contexto atual.

2 JUSTIFICATIVA

Indivíduos infectados pelo HIV apresentam mais risco de desfechos graves do que a população em geral quando infectados pelo vírus influenza [163], e, portanto, devem receber doses anuais da vacinação contra a gripe [164]. Como existe circulação dos vírus influenza A(H1N1)pdm09, H3N2 e B estes vírus compõe a formulação vacinal. Entender o impacto dessa vacinação em indivíduos infectados pelo HIV poderá ajudar a formular estratégias específicas de vacinação para estes indivíduos, uma vez que o quadro imunossupressivo destes pode afetar a resposta vacinal.

3 OBJETIVO

Analisar a resposta imune humoral de indivíduos infectados pelo HIV-1 a vacinação trivalente contra influenza inativado.

3.1- Objetivos específicos

- Avaliar a sustentação da resposta imune dos indivíduos HIV-1 positivos um ano após vacinação monovalente contra o vírus influenza A/(H1N1)pdm09.
- Investigar a soroprevalência dos indivíduos infectados pelo HIV aos vírus influenza A/H3N2 e B.
- Avaliar a capacidade de soroconversão e sustentação da resposta imune de indivíduos HIV-1 positivos após vacinação contra os vírus influenza A/(H1N1)pdm09, A/H3N2 e B.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Considerações éticas

O estudo encontra-se aprovado no CEP-IPEC sob protocolo 10/2012.

4.2- Células

Células epiteliais de rim canino (MDCK) foram cultivadas, em meio de manutenção DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*- LGC Biotecnologia) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB- GIBCO). O meio foi também suplementado com antibiótico (penicilina; 100U/ml, e estreptomicina; 100µg/ml- GIBCO). A cultura foi mantida em garrafas de poliestireno de 75 cm², em atmosfera de 5% de gás carbônico (CO₂) à 37°C e acompanhadas diariamente ao microscópio óptico de campo claro. Durante o repique as células foram lavadas com PBS (tampão salina fosfato) 1x pH 7,2 e tratadas com tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético- GIBCO) 0,25 % (MDCK).

4.3- Vírus

Para propagação das cepas virais, as mesmas foram inoculadas em células MDCK cultivadas em meio de inoculação [meio DMEM contendo 4% de albumina (BSA) e 0,4 mg/ml de tripsina]. A cultura foi acompanhada até a observação do efeito citopático causado pelos vírus. O sobrenadante foi então coletado e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. O pellet contendo os restos celulares foi descartado e o sobrenadante contendo os vírus foi coletado e congelado à -70°C até sua utilização.

4.4- Vacina trivalente (TIV)

A vacina trivalente fragmentada e inativada é composta por 15 µg de hemaglutinina de cada um dos vírus A/California/7/2009, A/Perth/16/2009 e B/Brisbane/60/2008.

4.5- Sujeitos da pesquisa

IPEC/Fiocruz estabeleceu uma coorte de aproximadamente 200 indivíduos infectados pelo vírus HIV-1 que receberam a vacina anti-A(H1N1)pdm09 em março de 2010. Destes, 131 fizeram parte da fase de extensão do estudo, no qual receberam a vacina trivalente anti-influenza em maio de 2011. Os soros foram coletados antes da vacinação, 21 dias, 42 dias e 6 meses pós-vacinação. Dados como idade, sexo, NADIR, tempo de tratamento com

antirretroviral, índice de massa corporal (IMC) e tabagismo foram coletadas em cada uma destas datas.

4.6- Ensaio de inibição da hemaglutinação (HAI)

Realizamos este ensaio como descrito anteriormente [165 e 166]. Brevemente, os soros dos indivíduos foram tratados com inibidor de hemaglutinação inespecífica (Receptor-destroying enzyme; RDE, Denka-Seiken, Japão), diluídos em PBS e incubados com quatro unidades hemaglutinantes dos vírus A/California/07/2009, A(H1N1)pdm09; A/Perth/16/2009, (H3N2); ou B/Brisbane/60/2008, (influenza B); por 1 hora (Kit de identificação de isolados de influenza- WHO). Em seguida, 0.5% de hemácias de peru foi adicionada à mistura de antígeno e soro e, após uma hora, a HAI foi lida. Os resultados são expressos como o título recíproco da diluição mais elevada que inibiu hemaglutinação. HAI títulos <1:8 foram considerados como tendo um valor de 1:4 para efeitos de cálculo.

4.7- Soroprevalência e soroconversão

Para análises de títulos da HAI $\geq 1:32$ no soro pré-vacinação foram considerados como prévia exposição ao vírus [167]. A soroconversão é definida por um aumento de pelo menos quatro vezes nos títulos de HAI após a vacinação. Alternativamente, serão considerados soroconvertidos aqueles indivíduos que apresentarem sorologia de baseline < 1:8 e depois de vacinados apresentarem títulos $\geq 1:32$ [168].

4.8- Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com SAS 9.1.3 (Cary, NC, EUA: SAS Institute Inc., 2004) e SPSS Statistics 19 (Lançamento Versão 19.0.0, SPSS, Inc., 2010). Significância estatística das diferenças entre as proporções foi avaliada pelo teste do qui-quadrado. A regressão logística foi utilizada para ajustar o grau de associação dos regimes de vacinação para a soroconversão menos 42 dias após a primeira dose da vacina para fatores demográficos e clínicos. Da mesma forma, a associação de títulos de anticorpos para covariáveis relevantes foi explorado em modelos de regressão múltipla.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos clínico-demográficos dos indivíduos vacinados

A população em estudo consistiu em 131 indivíduos HIV-1 positivos que receberam no ano de 2011 duas doses simples da TIV (Trivalent inactivated Influenza vaccine) com 21 dias de intervalo cada. A TIV contemplava três subtipos virais: A/California/07/2009, A(H1N1)pdm09; A/Perth/16/2009, A(H3N2); e B/Brisbane/60/2008, influenza B linhagem Victoria. As características da população no momento da inclusão estão descritas na tabela 1. A população em estudo era formada predominantemente por homens (67,2%) de meia idade. Em geral os indivíduos já tinham aproximadamente 10 anos de diagnóstico de HIV, 87% dos indivíduos estavam sob tratamento com HAART, por um tempo médio de 6,5 anos, a contagem de CD4 estava em torno de 400 cell/mm³ e cerca de 65,6% apresentava carga viral indetectável (Tabela 3). Apesar dos parâmetros virais e celulares apontarem para um bom prognóstico destes indivíduos, valores de NADIR relativamente baixos, 174 células/mm³, já foram observados assim como outras condições definidoras da AIDS em 40,5% da coorte.

Foram administradas vacinações de TIV em 131 pacientes com 21 dias de intervalo. Seus soros foram avaliados para os três subtipos virais presentes nesta vacina em diferentes momentos: pré-vacinação (dia 0), 21 e 42 dias e 6 meses pós-vacinação.

Vale destacar que estes 131 indivíduos fizeram parte de uma coorte maior que recebeu a vacinação monovalente para influenza A(H1N1)pdm09 em 2010 em dois regimes diferentes: duas doses simples ou duas doses duplas. Assim, dos 131 indivíduos vacinados com TIV, 69 e 62 pacientes haviam recebido em 2010 duas doses simples ou duplas da vacina monovalente contra A(H1N1)pdm09, respectivamente.

Tabela 3- Características demográficas da população em estudo.

Características	
Número de participantes	131
Idade	
Mediana (IQR)	46.4 (10.8)
Média (SD)	46.5 (7.8)
≤ 40 anos, N (%)	26 (19.8)
> 40 anos, N (%)	105 (80.2)
Sexo	
Masculino, N (%)	88 (67.2)
Anos de diagnóstico do HIV	
Mediana (IQR)	8.4 (10.1)
Média (SD)	9.6 (6.2)
Previous AIDS-defining illness	
Sim, N (%)	53 (40.5)
Contagem de CD4 (células/mm ³)	
Mediana (IQR)	592.5 (398.8)
Média (SD)	644.0 (331.7)
Contagem Nadir CD4 (células/mm ³)	
Mediana (IQR)	174.0 (234.0)
Média (SD)	211.9 (183.2)
Carga Viral	
< 50 cópias/ml, N (%)	86 (65.6)
Faltante, N (%)	8 (6.1)
HAART	?
Em tratamento, N (%)	114 (87.0)
Nunca receberam HAART, N (%)	14 (10.7)
Sem tratamento atualmente com HAART, N (%)	3 (2.3)
Faltante, N (%)	0 (0.0)
Anos em tratamento com HAART	
Mediana (IQR)	4.6 (8.3)
Média (SD)	6.5 (5.5)

IQR: interquartile range

5.2 Resposta sorológica à vacinação trivalente

5.2.1 Sustentabilidade da resposta à vacinação monovalente para o antígeno A(H1N1)pdm09

Os soros de dia zero (baseline) foram colhidos um ano após a administração da vacina monovalente com o antígeno de influenza A(H1N1)pdm09 em 2010. Assim, observamos que 62,6% dos indivíduos ainda apresentavam títulos soroprotetores para este antígeno (Tabela 4). De fato títulos de resposta $\geq 1:32$ UHA/25 μ L são considerados soroprotetores e observamos GMT de 37,1 UHA/25 μ L. Chamamos a atenção para o fato de que indivíduos com idade ≤ 40 anos parecem ter mantido a melhor soroproteção em relação aos mais velhos (Tabela 4). Independentemente do esquema vacinal utilizado em 2010, não houve diferença significativa na queda da sustentação da resposta imune um ano depois da primeira vacinação, embora exista uma pequena tendência de menor queda na sustentação da resposta imune entre aqueles que receberam duas doses duplas em 2010 (Figura 12).

Tabela 4- Soroproteção de baseline (dia 0) para o antígeno A(H1N1)pdm09 pós-vacinação com TIV.

Baseline (Dia 0)	H1N1pdm09	
	N	Estimates
Soroproteção*, N (%)	131	82 (62.6)
Idade ≤ 40 anos	26	19 (73.1)
Idade > 40 anos	105	63 (60.0)
GMT (95% CI)	131	37.1 (34.9 ; 39.3)
Idade ≤ 40 anos	26	46.5 (44.0 ; 49.0)
Idade > 40 anos	105	35.1 (32.6 ; 37.6)

5.2.2 Estudo da resposta para o antígeno A(H1N1)pdm09 após vacinação com TIV.

Quando os 131 indivíduos foram vacinados com a TIV, a percentagem de soroprotetidos subiu de 60% (dia 0) para 80,2 % e 83,2% em 21 e 42 dias pós-vacinação, respectivamente (Tabela 5). Foi visto um modesto aumento na percentagem de indivíduos soroprotetidos entre os dias 21 e 42 pós-vacinação, em função de uma nova dose de TIV ter sido administrada. Outro dado relevante, em seis meses pós-vacinação a percentagem de soroprotetidos diminuiu para 49,6% (Tabela 5). Novamente a idade foi um fator importante

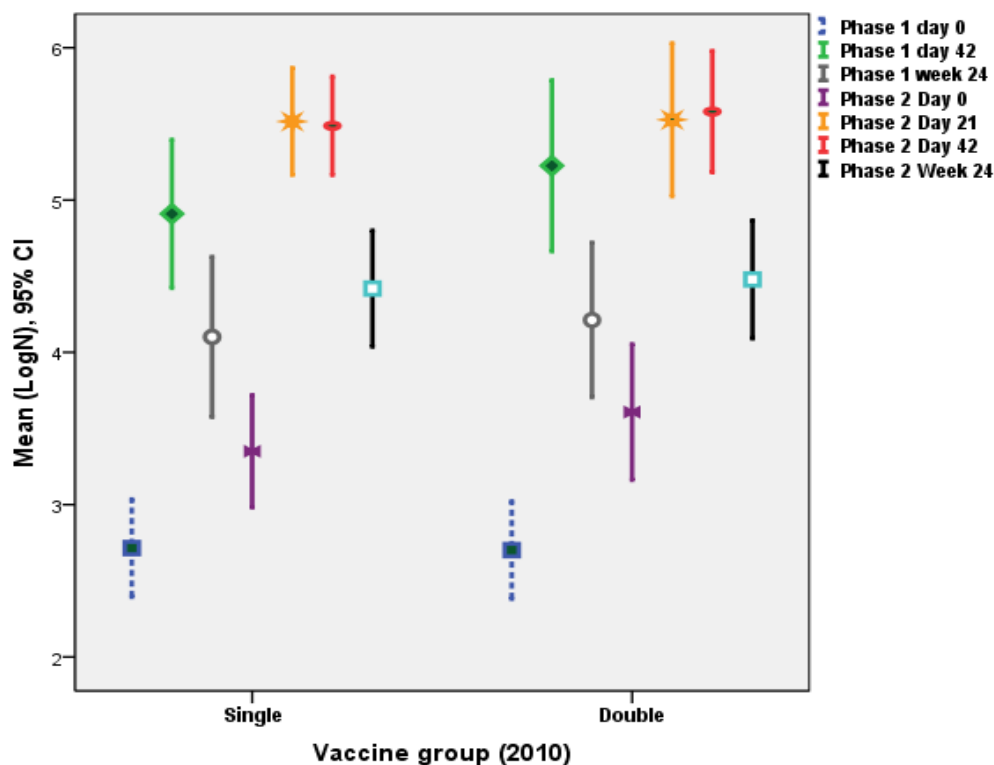
para preservação da soroproteção. As melhores respostas sorológicas foram observadas em indivíduos com idade ≤ 40 anos (Tabela 5).

Tabela 5- Soroproteção para H1N1pdm09 pós-vacinação com TIV.

	Dia 21 pós-vacinação		Dia 42 pós-vacinação			6 meses pós-vacinação
		Estimates		Estimates		Estimates
Soroproteção (N. %)	31	105 (80.2)	31	109 (83.2)	31	65 (49.6)
Idade ≤ 40 anos	6	21 (80.8)	6	22 (84.6)	6	16 (61.5)
Idade > 40 anos	05	84 (80.0)	05	87 (82.9)	05	49 (46.7)

Ao estratificarmos os dados de soroproteção em função das doses simples ou duplas recebidas em 2010, podemos observar toda magnitude de variações de resposta a dois anos seguidos de vacinação (Figura 12). O ponto inicial deste gráfico é o baseline (dia 0), antes da vacinação monovalente de 2010. Após 6 e 12 meses da vacinação monovalente, houve uma queda na sustentabilidade da resposta imune (Figura 12; barras cinza e roxas). Em 2011, ao receber a vacina TIV, houve uma resposta vacinal que elevou a soroproteção de virtualmente todos os indivíduos (Figura 12; barras verdes e vermelhas).

Figura 12 - Proporção de soroproteção nos dias 21, 42 e meses pós-vacinação monovalente (2010).



No que tange a soroconversão, observamos que cerca de 19,8 % e 21% dos indivíduos presentes no estudo soroconverteram para o antígeno de A(H1N1)pdm09 após 21 e 42 dias pós-vacinação com TIV, respectivamente (Tabela 6). Embora estes valores de soroconversão possam parecer baixos, refletem um grande número de indivíduos soroprotegidos. De fato, os valores de GMT superam 37,1 UHA/25 μ L no dia zero para aproximadamente 230 UHA/25 μ L em 21/42 dias pós-vacinação. Vale notar que embora o fator idade (\leq 40 anos) não tenham influenciado positivamente a percentagem de soroconvertidos, estes indivíduos atingiram maiores títulos sorológicos – GMT de 263 e 367 UHA/25 μ L em 21 e 42 dias respectivamente (Tabela 6). Consistentemente com uma queda na sustentabilidade da resposta imune em 6 meses, a percentagem de soroconvertidos remanescentes neste período seria de 15% (Tabela 6). Vale ressaltar também que não foram observadas diferenças significativas nos títulos anti-hemaglutinante dos soros em relação a diversos fatores: tabagismo, (Figura 13), em relação à idade (Figura 14), ao gênero (Figura 15) ou ao índice de massa corporal (IMC) (Figura 16).

Tabela 6- Soroconversão para o antígeno A(H1N1)pdm09 pós-vacinação com TIV.

Soroconversão (N. %)	Dia 21 pós-vacinação		Dia 42 pós-vacinação		6 meses pós-vacinação	
	Estimates	Estimates	Estimates	Estimates	Estimates	Estimates
	21	24 (19.8)	19	25 (21.0)	9	14 (15.7)
Idade ≤ 40 anos	3	5 (21.7)	3	5 (21.7)	9	3 (15.8)
Idade > 40 anos	8	19 (19.4)	6	20 (20.8)	0	11 (15.7)
GMT(95% CI)	21	239 (236.8 ; 241.2)	19	233.2 (231.0 ; 235.4)	9	86 (83.8 ; 88.2)
Idade ≤ 40 anos	3	263.8 (261.3 ; 266.3)	3	367.5 (365.0 ; 370.0)	9	102.8 (100.3 ; 105.3)
Idade > 40 anos	8	233.5 (230.8 ; 236.2)	6	209.1 (206.6 ; 211.6)	0	82 (79.3 ; 84.7)

Figura 13- Taxa de soroconversão (IC 95%) em indivíduos que nunca fumaram, fumantes e ex-fumantes.

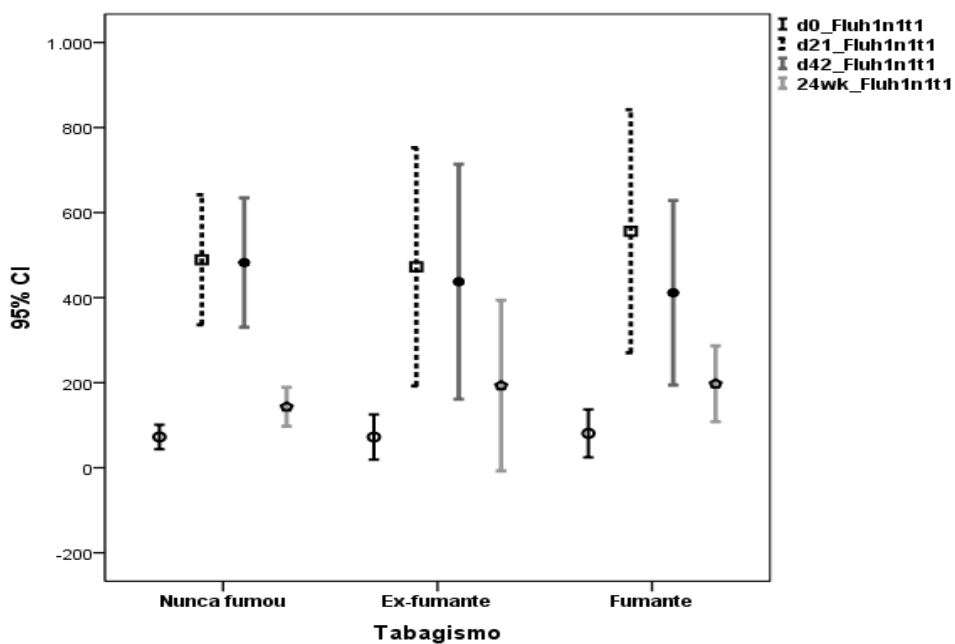


Figura 14- Associação entre idade e soroconversão.

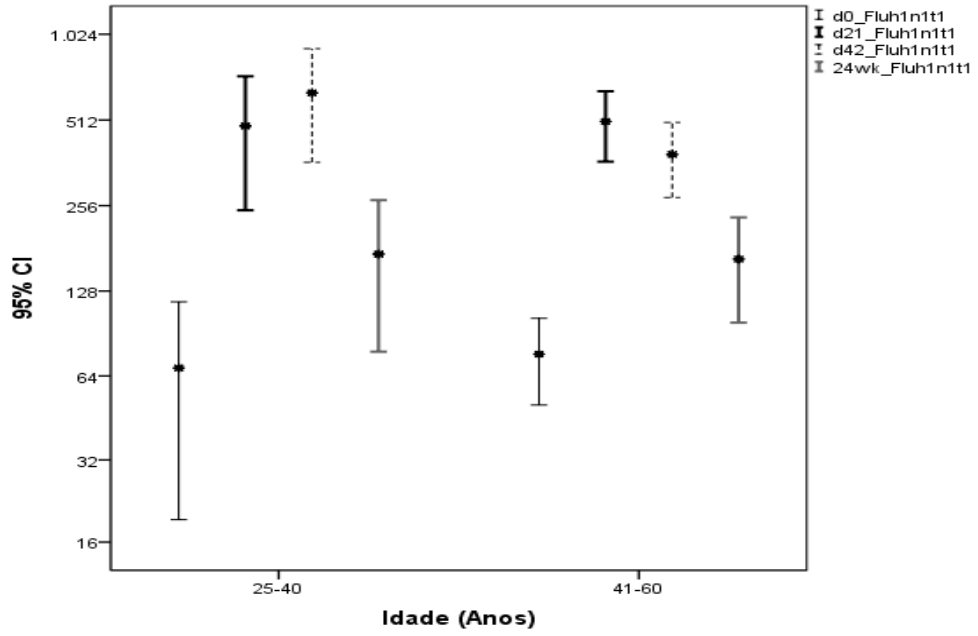


Figura 15 – Associação entre sexo e soroconversão.

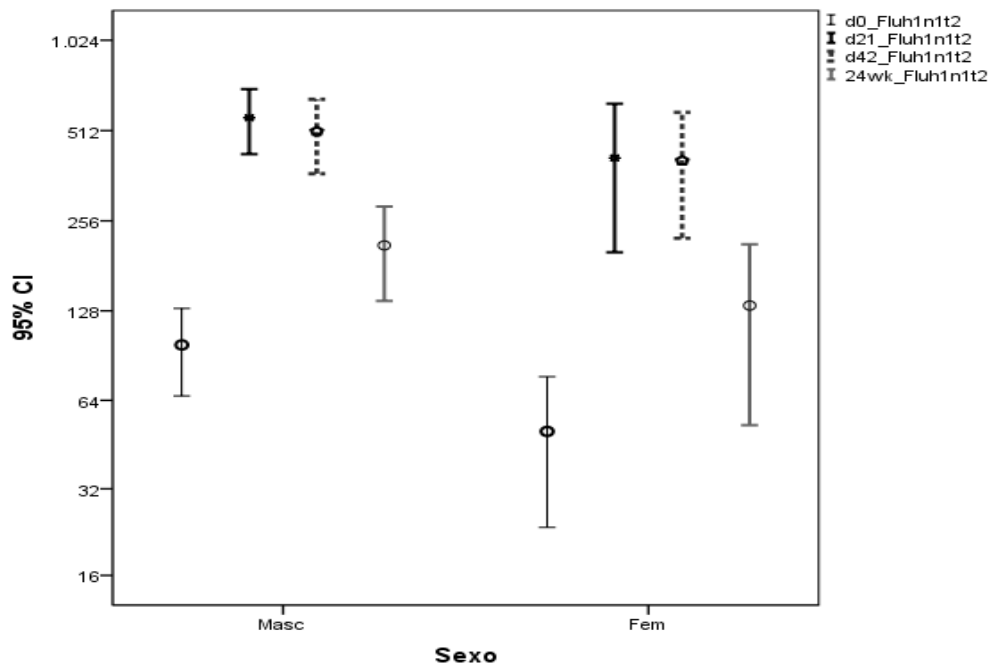
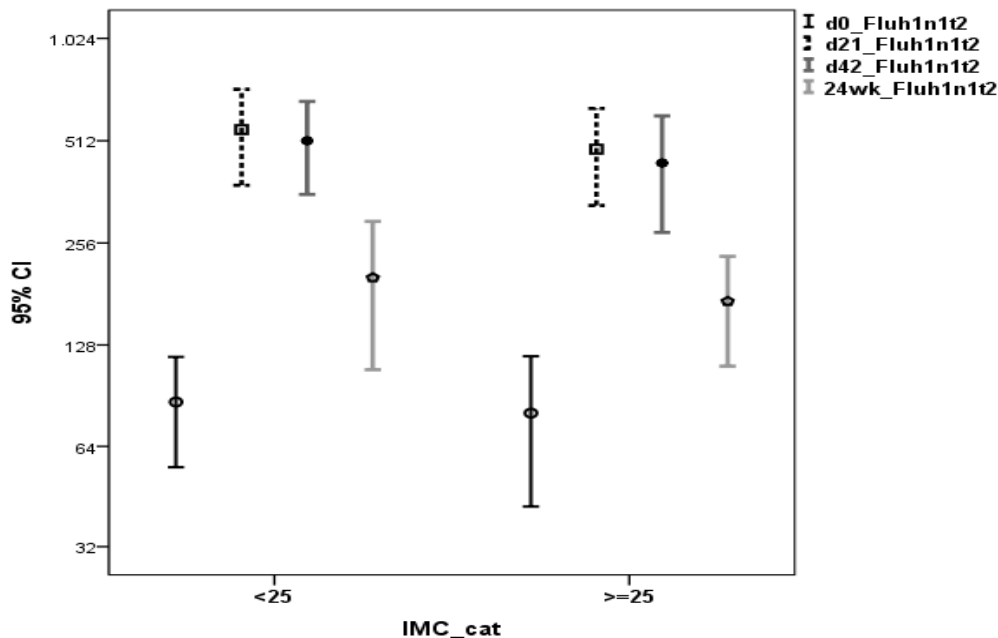


Figura 16- Associação entre o índice de massa corporal (IMC) e soroconversão.



5.2.3- Análise da resposta vacinal ao antígeno de influenza A/H3N2.

Em seguida, avaliamos os títulos sorológicos para o antígeno vacinal de influenza A/H3N2. Analisando os títulos dos soros pré-imune, observamos que 67,9 % dos indivíduos apresentavam sorologia $\geq 1:32$, sugerindo que a maior parte dos indivíduos apresentavam uma previa exposição a este subtipo viral (Tabela 7). Ao serem vacinados com TIV, 69,5 % e 73,3% dos indivíduos HIV positivos apresentavam títulos soroprotetores após 21 e 42 dias, respectivamente (Tabela 8). Em seis meses pós-vacinação, a porcentagem de indivíduos soroprotetidos caiu para 34,4%, indicando uma queda na sustentabilidade da resposta imune destes indivíduos. Em relação a idade não observamos diferença significativa em relação a soroproteção.

Tabela 7- Soroproteção de baseline (dia 0) para o antígeno A/H3N2 pós-vacinação com TIV.

	H3N2	
	N	Estimates
Baseline (Dia 0)		
Soroproteção*, N (%)	131	89 (67.9)
Idade ≤ 40 anos	26	17 (65.4)
Idade > 40 anos	105	72 (68.6)
GMT (95% CI)	131	40.6 (38.1 ; 43.1)
Idade ≤ 40 anos	26	38.5 (36.0 ; 41.0)
Idade > 40 anos	105	41.1 (38.9 ; 43.3)

Tabela 8- Soroproteção para o antígeno A/H3N2 nos dia 21, 42 e 6 meses pós-vacinação com TIV.

	Dia 21pós-vacinação		Dia42 pós-vacinação		6 meses pós-vacinação	
	N	Estimates	N	Estimates	N	Estimates
Soroproteção (N. %)	131	91 (69.5)	131	96 (73.3)	131	45 (34.4)
Idade ≤ 40 anos	26	18 (69.2)	26	20 (76.9)	26	9 (34.6)
Idade > 40 anos	105	73 (69.5)	105	76 (72.4)	105	36 (34.3)

Nosso estudo demonstrou que a soroconversão para os antígenos do vírus H3N2 foi de 15,7% e 16% após 21 e 42 dias de vacinação, respectivamente (Tabela 9). Novamente a baixa soroconversão pode ser atribuída à imunidade previa da população presente no estudo. Após 6 meses da administração da TIV, a percentagem de indivíduos que ainda estavam soroconvertidos foi de 14,4%.

Tabela 9- Percentagem de indivíduos que soroconverteram para A/H3N2 pós-vacinação com TIV.

	Dia 21pós-vacinação		Dia42 pós-vacinação		6 meses pós-vacinação	
	N	Estimates	N	Estimates	N	Estimates
Soroconversão (N. %)	121	19 (15.7)	119	19 (16.0)	90	13 (14.4)
Idade ≤ 40 anos	23	3 (13.0)	23	3 (13.0)	19	2 (10.5)
Idade > 40 anos	98	16 (16.3)	96	16 (16.7)	71	11 (15.5)
GMT (95% CI)	121	238.9 (236.4 ; 241.4)	119	233.1 (230.6 ; 235.6)	89	86 (83.3 ; 88.7)
Idade ≤ 40 anos	23	263.7 (261.2 ; 266.2)	23	367.4 (364.9 ; 369.9)	19	102.8 (100.3 ; 105.3)
Idade > 40 anos	98	233.4 (231.2 ; 235.6)	96	209.1 (206.9 ; 211.3)	70	81.9 (79.5 ; 84.3)

5.2.4- Análise da resposta vacinal para o antígeno Influenza B linhagem Victoria

Em relação ao antígeno de influenza B, linhagem victoria (B-vic), foi observado que 27,5 % dos indivíduos HIV positivos apresentavam sorologia $\geq 1:32$ no soro pré-imune, indicando uma baixa exposição previa a este antígeno (Tabela 10). A percentagem de indivíduos soroprotetidos após 21 e 42 dias de vacinação com TIV foi de 62,6% e 51,1%, respectivamente (Tabela 10). Também observamos que seis meses pós-vacinação essa percentagem cai para 27,5% (Tabela 11).

Tabela 10- Percentagem de indivíduos com títulos sorológicos $\geq 1:32$ para o antígeno influenza B linhagem victoria.

	Flu B Victoria	
	N	Estimates
Baseline		
Soroproteção*, N (%)	131	36 (27.5)
Idade ≤ 40 anos	26	5 (19.2)
Idade > 40 anos	105	31 (29.5)
GMT (95% CI)	125	15.2 (13.0 ; 17.4)
Idade ≤ 40 anos	25	13.2 (9.9 ; 16.5)
Idade > 40 anos	100	15.8 (13.6 ; 18.0)

Tabela 11- Soroproteção para o antígeno influenza B-vic nos dia 21, 42 e 6 meses pós-vacinação com TIV.

	Dia 21pós-vacinação		Dia 42 pós-vacinação		6 meses pós-vacinação	
	N	Estimates	N	Estimates	N	Estimates
Soroproteção (N. %)	131	82 (62.6)	131	67 (51.1)	131	36 (27.5)
Idade ≤ 40 anos	26	14 (53.8)	26	11 (42.3)	26	5 (19.2)
Idade > 40 anos	105	68 (64.8)	105	56 (53.3)	105	31 (29.5)

Em seguida, observamos que cerca de 35,7% e 38,6% dos indivíduos presentes no estudo soroconverteram após 21 e 42 dias de vacinação, respectivamente, para o antígeno influenza B (Tabela 12). Em seis meses, observamos que cerca de 29,1% dos indivíduos permaneceram soroconvertidos para este antígeno (Tabela 12).

Tabela 12 - Percentagem de indivíduos que soroconverteram para B-vic pós-vacinação com TIV.

	Dia 21pós-vacinação		Dia 42 pós-vacinação		6 meses pós-vacinação	
	N	Estimates	N	Estimates	N	Estimates
Soroconversão (N. %)	115	41 (35.7)	114	44 (38.6)	86	25 (29.1)
Idade ≤ 40 anos	22	10 (45.5)	22	9 (40.9)	18	6 (33.3)
Idade > 40 anos	93	31 (33.3)	92	35 (38.0)	68	19 (27.9)
GMT (95% CI)	121	75.6 (73.4 ; 77.8)	119	64 (61.8 ; 66.2)	89	37.4 (35.2 ; 39.6)
Idade ≤ 40 anos	23	66 (62.7 ; 69.3)	23	53.4 (49.9 ; 56.9)	19	26.7 (23.4 ; 30.0)
Idade > 40 anos	98	78 (75.8 ; 80.2)	96	66.8 (64.6 ; 69.0)	70	41 (38.6 ; 43.4)

5.2.5- Análise da resposta vacinal para o antígeno Influenza B linhagem Yamagata

Apesar de não fazer parte das linhagens de influenza contempladas na TIV, nosso estudo analisou a resposta sorológica frente ao antígeno de influenza B linhagem yamagata. Sendo assim, observamos que 93,1% da população apresentava sorologia prévia ao antígeno, indicando que a população de HIV positivos do Rio de Janeiro foi recentemente exposta ao vírus B-yamagata (Tabela 13).

Tabela 13- Percentagem de indivíduos com títulos sorológicos $\geq 1:32$ para o antígeno influenza B linhagem yamagata.

Baseline	Flu B Yamagata	
	N	Estimates
Soroproteção, N (%)	131	122 (93.1)
Idade \leq 40 anos	26	25 (96.2)
Idade $>$ 40 anos	105	97 (92.4)
GMT (95% CI)	131	113.3 (111.1 ; 115.5)
Idade \leq 40 anos	26	138.6 (136.2 ; 141)
Idade $>$ 40 anos	105	107.8 (105.6 ; 110.0)

5.3- Carga viral, CD4, HARRT, tempo de diagnóstico e resposta à vacina

Nosso trabalho também analisou alguns parâmetros que podem ser relevantes para a resposta imunológica dos indivíduos infectados pelo HIV. A fim de sabermos quais poderiam estar relacionados com a soroproteção pós-vacinação com TIV, foram analisados os seguintes parâmetros: tempo de diagnóstico de HIV (Tabela 14 A, B e C), tempo de tratamento com HARRT (Tabela 15 A, B e C), presença ou ausência de tratamento antiretroviral (Tabela 16 A, B e C) e análise da carga viral (Tabela 17 A, B e C). Dentre estes parâmetros não observamos diferença significativa em relação à soroproteção.

Em outro parâmetro analisado, nós observamos que houve uma relação significativa entre o número de CD4 e a soroproteção para o antígeno influenza B victoria presente na TIV, na qual houve um menor número de soroprotegidos com contagem de CD4 inferior a 350 células/mm³. Estes dados são apresentados na Tabela 18 A, B e C.

Tabela 14- Relação entre o tempo de diagnóstico e soroproteção.

A)

	Anos de diagnóstico- A(H1N1)pdm09				p-value
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	
≥ 10 anos	28	74	73	49	0,9937
< 10 anos	18	43	43	29	

B)

	Anos de diagnóstico- A/H3N2				p-value
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	
≥10 anos	53	71	72	55	0,8061
<10 anos	36	42	39	28	

C)

	Anos de diagnóstico- Flu B victoria				p-value
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	
≥10 anos	25	64	62	48	0,8563
<10 anos	11	36	33	21	

Tabela 15- Relação entre o tempo de HARRT e soroproteção.

A)

Anos de HAART- A(H1N1)pdm09					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
≥6,5 anos	17	45	44	28	0,9821
<6,5 anos	24	61	61	43	

B)

Anos de HAART- A/H3N2					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
≥6,5 anos	31	43	44	30	0,8565
<6,5 anos	51	60	56	45	

C)

Anos de HAART- Flu B victoria					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
≥ 6,5 anos	16	40	39	29	0,9835
< 6,5 anos	18	51	47	33	

Tabela 16- Relação entre a presença ou ausência de tratamento antiretroviral e soroproteção.

A)

Tratamento com HAART- A(H1N1)pdm09					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
Sim	41	106	105	71	0,9885
Não	5	11	11	7	

B)

Tratamento com HAART- A/H3N2					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
Sim	82	103	100	75	0,9616
Não	7	10	11	8	

C)

Tratamento com HAART- Flu B victoria					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
Sim	34	91	86	62	0,883
Não	2	9	9	7	

Tabela 17- Relação entre a carga viral e soroproteção.

A)

Carga Viral- A(H1N1)pdm09					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
Carga viral detectável	13	27	30	20	0,7414
Carga viral indetectável	28	90	83	55	

B)

Carga Viral- A/H3N2					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
Carga viral detectável	26	27	30	21	0,7122
Carga viral indetectável	57	86	78	58	

C)

Carga Viral- Flu B victoria					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
Carga viral detectável	8	24	26	16	0,9903
Carga viral indetectável	26	76	69	49	

Tabela 18- Relação entre o número de CD4 e soroproteção.

A)

CD4 - A(H1N1)pdm09					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
≥ 350 cells/mm³	66	91	90	69	0,1847
< 350 cells/mm³	16	26	24	8	

B)

CD4 - A/H3N2					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
≥ 350 cells/mm³	67	88	85	70	0,2273
< 350 cells/mm³	22	25	23	10	

C)

CD4 - Flu B victoria					
	Soroprotegidos dia 0 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 21 p.v. (n)	Soroprotegidos dia 42 p.v. (n)	Soroprotegidos 6 meses p.v. (n)	p-value
≥ 350 cells/mm³	22	77	74	59	0,01003
< 350 cells/mm³	14	23	19	7	

6 DISCUSSÃO

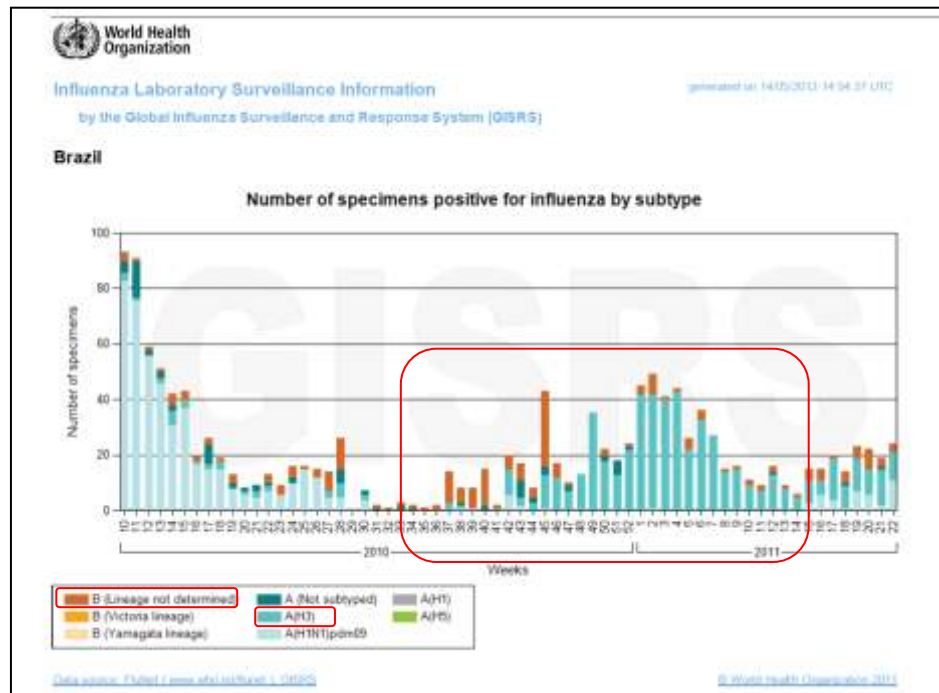
Indivíduos infectados pelo HIV apresentam risco mais elevado de desenvolverem complicações associadas à infecção pelo vírus influenza, para os quais a vacinação é a melhor maneira de prevenção. A vacinação contra o influenza é recomendada para indivíduos HIV positivos [169], embora os efeitos da vacinação possam ser menos evidentes do que em indivíduos imunocompetentes [170]. Nosso grupo estabeleceu em 2010, no primeiro ciclo de vacinação para o hemisfério sul, pós-pandemia de 2009, uma coorte de indivíduos infectados pelo HIV-1, e controles, que receberam a vacinação monovalente para A(H1N1)pdm09 através do ensaio clínico registrado sob número NCT01155037 [171]. Em 2010, a vacina recomendada foi a monovalente contendo como antígeno o vírus A/California/07/2009. Baseado no pressuposto, já verificado para outros antígenos vacinais [172], que indivíduos infectados pelo HIV-1 necessitavam de doses mais altas de antígenos para atingir níveis de soroproteção e soroconversão comparáveis a controles, foram randomizados 129 indivíduos para receber doses simples, 127 para receber doses duplas e 71 controles HIV-negativos. Observou-se uma resposta ligeiramente melhor dos indivíduos que receberam duas doses duplas, em termos de soroproteção e soroconversão, em relação aos que receberam duas doses simples. Apesar disso, em comparação à resposta sorológica de indivíduos controle, ambos os grupos de HIV-positivos apresentaram uma menor sustentabilidade da resposta imune após 6 meses da vacinação monovalente. O presente estudo representa a extensão do acompanhamento desta coorte. Naturalmente, o número de indivíduos que se mantêm ativos durante o follow-up de uma coorte tende a diminuir com relação ao tempo. Sendo assim, ao contrário do ano de 2010, quando havia 256 HIV-1 positivos incluídos, em 2011 tivemos inicialmente 131 pacientes. Apesar de nesta fase de extensão do estudo não terem sido incluídos indivíduos controle, comparações populacionais dos indivíduos infectados pelo HIV-1 e vacinados ainda pode ser realizada, como feito anteriormente [173]. Diferentemente de 2010, em 2011 a vacina recomendada incluía três antígenos diferentes de influenza, a mesma cepa de A(H1N1)pdm09 presente em 2010, bem como os principais representantes dos vírus influenza A/H3N2 e B que teriam circulado em 2010 no hemisfério sul. A vacinação de 2011, com TIV, foi aplicada em duas doses simples com intervalo de 21 dias como recomendado pelo MS brasileiro [174]. Para efeito das análises da resposta anti-A(H1N1)pdm09 após vacinação com TIV, os indivíduos foram estratificados em dois grupos, com base na vacinação de 2010, com duas doses duplas ou duas doses simples. Considerando que existe pouca ou nenhuma reatividade cruzada entre os antígenos da TIV, as demais análises para H3N2 e influenza B linhagem victoria foram realizadas independentemente do

esquema vacinal de 2010. Diferentemente dos trabalhos na literatura, que fazem análises da resposta sorológica anti-influenza em geral até 42 dias pós-vacinação, [175, 176] nosso estudo representa o segmento mais longo de indivíduos HIV positivos vacinados contra influenza após a pandemia de 2009. Além disso, o número de indivíduos incluídos no nosso estudo permitirá inferências estatísticas mais robustas.

Os dados dos soros de baseline (dia 0) encontrados em nosso estudo demonstraram que 62,6%, 67,9% e 27,5%, dos indivíduos HIV positivos apresentavam títulos de anticorpos \geq 1:32 para os antígenos A(H1N1)pdm09, A/H3N2 e B, respectivamente. Para o antígeno A(H1N1)pdm09 foi observada uma queda de \sim 20% de soroprotetidos após um ano da vacinação monovalente. Bieckel e colaboradores, em um estudo semelhante ao realizado por nosso grupo, analisaram a resposta imune em pacientes HIV positivos frente à vacina TIV, após vacinação monovalente no ano 2010. Eles observaram que apenas 40% dos indivíduos ainda permaneciam com títulos soroprotetores após 1 ano da vacinação monovalente [177]. Tanto nosso estudo quanto o de Bieckel e colaboradores não observaram uma manutenção adequada da resposta imune em indivíduos HIV positivos para o antígeno em questão. Segundo Motti e colaboradores, indivíduos portadores do vírus HIV parecem gerar níveis reduzidos de anticorpos após vacinação contra influenza, em comparação com indivíduos saudáveis, a duração da resposta imune também pode ser limitada [178]. Um estudo realizado por Kroon e colaboradores, de 3 anos consecutivos, para avaliar a resposta humoral após a vacinação anti-influenza em indivíduos infectados pelo HIV-1 demonstrou que a resposta humoral ao vírus influenza não foi melhorada por vacinações anuais repetidas [179].

Nosso trabalho observou que cerca de 27,5% da população em estudo havia sido previamente exposta ao vírus influenza B. Ross e colaboradores, em um estudo realizado em Pittsburgh, nos EUA, também observaram que entre os anos 2010-2011, 20% dos indivíduos presentes em seu trabalho apresentavam títulos soroprotetores para este mesmo antígeno [180]. A soroprevalência encontrada por Ross et al., para o vírus influenza A H3N2 foi de cerca de 37,5%, diferentemente dos 67,9 % encontrados por nosso grupo [180]. Esta disparidade entre os estudos pode ser explicada pelas diferentes circulações dos vírus influenza no hemisfério norte e sul. Dados da OMS sobre a circulação do vírus influenza que antecedeu a vacinação de 2011, demonstraram sobretudo a circulação do vírus influenza A H3N2 no Brasil (Figura 17), corroborando com a alta soroprevalência encontrada para este vírus na população em estudo. Já o vírus influenza B teve uma menor circulação em nosso hemisfério, refletindo em uma baixa soroprevalência na população estudada.

Figura 17- Gráfico da circulação do vírus influenza no Brasil que antecedeu a vacinação com TIV.



Assim como na primeira fase do estudo realizado por Santini-Oliveira [181] nós observamos um aumento na porcentagem de indivíduos soroprotetidos após a segunda dose da TIV, válido para os antígenos A(H1N1)pdm09 e A/H3N2. Nossos dados corroboram com um estudo realizado em 2012 por Siegrist e colaboradores em indivíduos HIV positivos, demonstrou um aumento nas porcentagens de soroconversão após uma segunda dose da TIV [182]. Mas para o antígeno de influenza B o desfecho observado não foi o mesmo. Houve uma queda de ~ 11,1% de soroprotetidos entre os dias 21 e 42 pós-vacinação trivalente. Trabalhos de Englund et al., Levin et al., e Tanzi et al., demonstraram que uma baixa resposta de anticorpos para influenza B tem sido documentada em muitas populações, desde crianças, adultos e idosos, que são consistentes com nosso estudo [183,184 e 185]. Segundo Monto et al., e Frank et al., os baixos níveis de anticorpos para influenza B podem ser devido à insensibilidade relativa do teste HAI para anticorpos específicos para este antígeno [186 e 187]. Estudos realizados por Harmon e colaboradores indicam que ensaios alternativos, tais como o de Microneutralização pode fornecer medidas mais sensíveis para a detecção de anticorpos para o influenza B [188], mas este teste não foi realizado em nosso estudo.

Em relação à sustentação da resposta imune, observamos que para os três antígenos testados houve queda na porcentagem de soroprotetidos em 6 meses pós vacinação com a TIV. Os dados sobre a durabilidade da resposta para influenza após a vacinação na população em geral sugerem que proteção persiste por pelo menos um ano, segundo dados do

CDC em 2011 [189]. Contudo, para a população HIV positiva, Fiori e colaboradores observaram que os anticorpos anti-influenza são mantidos por apenas 30 dias [190]. Outra potencial razão para essa queda na percentagem de soroprotetidos pode ser devido ao comprometimento das células TCD4⁺ em indivíduos HIV positivos. Esse comprometimento pode levar à uma imunosenescência e/ou alterações na expressão de moléculas que podem prejudicar as respostas das células B dependentes de células T [191]. Agregando os dados observados na literatura aos encontrados em nosso estudo, sugerimos que devido a queda na sustentabilidade da resposta imune contra Influenza A, uma mudança na estratégia de vacinação de indivíduos infectados pelo HIV possa ser oportuna.

Alguns outros parâmetros que podem ter relação com uma resposta imune adequada também foram analisadas em nosso estudo. Através de teste estatístico nós não observamos uma relação entre o tempo de diagnóstico, tempo de tratamento com HARRT, ausência ou presença de tratamento com HARRT e carga viral à percentagem de indivíduos soroprotetidos.

Quando nosso grupo de trabalho foi estratificado de acordo com sua contagem de células CD4⁺ (< 350 células/mm³ ou ≥ 350 células/mm³) nós encontramos uma relação entre o estado imune do indivíduo e a resposta sorológica ao antígeno de influenza B. Nosso estudo observou que para o este antígeno, o grupo que apresentava contagem maiores de células CD4⁺ (≥ 350 células/mm³) apresentou uma maior percentagem de indivíduos soroprotetidos. Um estudo realizado por Wood e colaboradores onde crianças infectadas pelo HIV receberam duas doses simples da vacina TIV foi observada uma melhor resposta de anticorpos em indivíduos com maiores contagens de células CD4⁺ [192]. Diferentemente do nosso estudo, eles observaram essa melhor resposta de anticorpos para os três antígenos contido na TIV, nós observamos esta melhora apenas para o antígeno de influenza B.

7 CONCLUSÕES

Através do nosso estudo nós observamos que:

- Uma melhor soroproteção foi conseguida para o antígeno A(H1N1)pdm09;
- A segunda dose da vacina aumentou a percentagem de indivíduos soroprottegidos para os antígenos A(H1N1)pdm09 e A/H3N2;
- Para o antígeno de influenza B a percentagem de soroprottegidos foi menor, quando comparado aos outros antígenos presentes na TIV;
- Em seis meses após a vacinação a percentagem de indivíduos soroprottegidos diminui para todos antígenos da TIV;
- A carga viral, presença ou ausência do tratamento com HARRT, tempo de tratamento com HARRT e tempo de diagnóstico não influenciaram na resposta imune à TIV;
- Indivíduos com maiores contagens de células CD4⁺ (≥ 350 células/mm³) apresentaram uma melhor resposta imune frente ao antígeno influenza B.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nicholson, K.G., *Human influenza*. . Textbook of Influenza., ed. R.W.a.A.H. KG Nicholson. 1998, London: Blackwell Science.
2. WHO, *Influenza Pandemic Plan. The Role of WHO and Guidelines for National and Regional Planning Geneva, Switzerland*. 1999.
3. Jonhson, N.P. and J. Mueller, *Updatinh the acconts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic*. Bull Hist Med, 2002. 76(1): p. 105-15
4. WHO, *H5N1 avian influenza:Timeline of mejor events 2012*.
5. CDC, *The 2009 H1N1 Pandemic: Summary Highlights, April 2009-April 2010*. 2010.
6. Ha, J.W., Schwahn, A.B., and Downard, K.M. Proteotyping to estabilish gene origin within reassortant influenza viruses. PLoS One, 2011. 6(1) : p. e15771.
7. WHO, Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2010 influenza season (southern hemisphere winter). Wkly Epidemiol Rec., 2009a. 84: p. 421-31.
8. WHO, Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2011 southern hemisphere influenza season.2010.
9. WHO, Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012 southern hemisphere influenza season. 2011.
10. WHO, Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013 southern hemisphere influenza season. 2012a
11. WHO, WHO Risk Assesemnt: Human infections with avian influenza A(H7N9)virus. 2013.
12. Murphy, B.R. and R.G. Webster, *Orthomyxoviruses*. 3rd ed Virology. 1996, Philadelphia:Lappincott-Raven Publishers
13. Mikulášová, A., Verecková, E., and Fondor, E. Transcription and replication os the influenza A viruses genome. Acta. Virologica, 2000. 44: p. 273-282.
14. Gomez-Puertas, P., et al., Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. J Virol, 2000. 74(24): p. 11538-47
15. McAuley, J.L., Zhang k., and McCullers J. A. The effects of influenza A virus PB1-F2 protein on polymerase activity are strain specific and do not impact pathogenesis. J Virol, 2010. 84(1): p. 558-64.

16. Murphy, B.R. and R.G. Webster, *Orthomyxoviruses*. 3rd ed. Virology, ed. B.N. Fields, Knipe D. M., Howley P. M., Chanock R. M., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E. 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
17. Nakada, S., et al., *Influenza C virus hemagglutinin: comparison with influenza A and B virus hemagglutinins*. J Virol, 1984. **50**(1): p. 118-24.
18. von Itzstein, M., *The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors*. Nat. Rev. Drug. Discov., 2007. **6**(12): p. 967-74.
19. Lamb, R.A. and R.M. Krug, *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. 3rd Vol.1 ed. Fields Virology, ed. K.D.M. Fields B. M., Howley P. M. 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven.
20. Nayak, D.P., E.K. Hui, and S. Barman, *Assembly and budding of influenza virus*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 147-65.
21. Murphy, B.R. and R.G. Webster, *Orthomyxoviruses*. 3rd ed. Virology, ed. B.N. Fields, Knipe D. M., Howley P. M., Chanock R. M., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E. 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
22. Fauquet, C.M. and D. Fargette, *International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species*. Virol J, 2005. **2**: p. 64.
23. Palese, P. and M.L. Shaw, *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. Fields Virology., ed. D.M.H. Knipe, P.M., editors. Vol. 5th. 2007, Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.
24. Webster, R.G., et al., *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Microbiol. Rev., 1992. **56**: p. 152-79.
25. Manz, B., M. Schwemmle, and L. Brunotte, *Adaptation of avian influenza a virus polymerase in mammals to overcome the host species barrier*. J Virol, 2013. **87**(13): p. 7200-9.
26. Taubenberger, J.K. and D.M. Morens, *The Pathology of Influenza*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 499-522.
27. Murphy, B.R. and R.G. Webster, *Orthomyxoviruses*. 3rd ed. Virology, ed. B.N. Fields, Knipe D. M., Howley P. M., Chanock R. M., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E. 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
28. Kim, J.I. and M.S. Park, *N-linked glycosylation in the hemagglutinin of influenza A viruses*. Yonsei Med J, 2012. **53**(5): p. 886-93.

29. Nguyen, H.T., A.M. Fry, and L.V. Gubareva, *Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods*. Antivir Ther, 2012. **17**(1 Pt B): p. 159-73.
30. ICTVdB, *Influenzavirus B*, in *ICTVdB - The Universal Virus Database*, C. Büchen-Osmond, Editor. 2006, Columbia University: New York, USA.
31. Liu, Y., et al., *Altered receptor specificity and cell tropism of D222G hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A(H1N1) 2009 influenza virus*. J Virol, 2010. **84**(22): p. 12069-74.
32. Das, K., et al., *Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(5): p. 530-8.
33. Kollerova, E. and T. Betakova, *Influenza viruses and their ion channels*. Acta Virol, 2006. **50**(1): p. 7-16.
34. Nayak, D.P., E.K. Hui, and S. Barman, *Assembly and budding of influenza virus*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 147-65.
35. Das, K., et al., *Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(5): p. 530-8.
36. Boivin, S., et al., *Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms*. J Biol Chem, 2010. **285**(37): p. 28411-7.
37. Lamb, R.A. and R.M. Krug, *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. 3rd Vol.1 ed. Fields Virology, ed. K.D.M. Fields B. M., Howley P. M. 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven.
38. Gomez-Puertas, P., et al., *Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding*. J Virol, 2000. **74**(24): p. 11538-47.
39. von Itzstein, M., *The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors*. Nat. Rev. Drug. Discov., 2007. **6**(12): p. 967-74.
40. World Health Organization. Influenza (Seasonal). 2009c. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>
41. Ministério da Saúde. Informe epidemiológico: Influenza pandêmica (H1N1) 2009. December 2009. Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza_se_47.pdf. Accessed January 17, 2013.
42. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2009-2010 influenza season (northern hemisphere winter). Wkly

43. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014 influenza season (north hemisphere) http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2013_14_north/en/index.html
44. de Mello, WA, de Paiva, TM, Ishida, MA, Benega, MA, Dos Santos, MC and Viboud, C. The dilemma of influenza vaccine recommendations when applied to the tropics: the Brazilian case examined under alternative scenarios. *PLoS One*. 2009; 4, e5095.
45. Alonso, WJ, Viboud, C, Simonsen, L, Hirano, EW, Daufenbach, LZ and Miller, MA. Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics. *Am J Epidemiol*. 2007; 165, 1434-42.
46. Moya, A, Holmes, EC and Gonzalez-Candelas, F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2, 279-88.
47. Suzuki, Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull*. 2005; 28, 399-408.
48. McHardy, AC and Adams, B. The Role of Genomics in Tracking the Evolution of Influenza A Virus. *PLoS Pathog.*, 2009, Oct;5(10). Review.
49. Holmes, EC. RNA virus genomics: a world of possibilities. *J Clin Invest*. 2009; 119, 2488-95.
50. Okazaki, K, Takada, A, Ito, T, Imai, M, Takakuwa, H and Hatta, M. Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. *Arch Virol*. 2000; 145, 885-93.
51. Dawood, FS, Jain, S, Finelli, L, Shaw, MW, Lindstrom, S and Garten, RJ. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*. 2009; 360, 2605-15.
52. Belshe, RB. Implications of the emergence of a novel H1 influenza virus. *N Engl J Med.*, 2009, 360, 2667-8.
53. Settembre, EC, Dormitzer, PR and Rappuoli, R. H1N1: can a pandemic cycle be broken? *Sci Transl Med.*, 2010; 2, 24ps14.
54. Lee, Y., Kim, K., Ko, E., Lee, Y. New vaccines against influenza virus. *Clin Exp Vaccine Res*. Jan 2014; 3(1):12-18.
55. Ji, Y.N., Kim, W.J. Influenza Vaccines: Unmet Needs and Recent Developments. *Infect Chemother*. Dec 2013; 45(4): 375–386.

56. WHO, W. H. O. 2012. Vaccines against influenza - WHO position paper. Weekly epidemiological record 87: 461-476.
57. Murphy BR, Coelingh K. Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines. Rev Infect Dis. 1983;5:748-757.
58. Siqueira, M. M., Aguiar, M. d. L., Motta, F. C. & Barreto, P. F. (2013) Influenza. In: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Vol. 2 (Coura, J. R., ed.). pp. 1855-1872 Doenças produzidas por vírus. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
59. Treanor J, Keitel W, Belsher R, et al. Evaluation of a single dose of half strength inactivated influenza vaccine in healthy adults. Vaccine. 2002;20:1099-1105.
60. Belshe RB, Newman FK, Wilkins K, et al. Comparative immunogenicity of trivalent influenza vaccine administered by intradermal or intramuscular route in healthy adults. Vaccine. 2007;25:6755-6763.
61. Meadows M. Nasal flu vaccine approved. FDA Consum. 2003;37:27.
62. Ambrose CS, Levin MJ, Belshe RB. The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults. Influenza Other Respir Viruses. 2011;5:67-75.
64. Longini IM, Halperin ME, Nizam A, Wolff M, Mendelman PM, Fast PE, Belshe RB. Estimation of the efficacy of live, attenuated influenza vaccine from a two-year, multi-center vaccine trial: implications for influenza epidemic control. Vaccine. 2000;18:1902-1909. [PubMed]
65. Belshe RB. The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza. Vaccine. 2010;28(Suppl 4):D45-D53.
66. Ambrose CS, Levin MJ. The rationale for quadrivalent influenza vaccines. Hum Vaccin Immunother. 2012;8:81-88.
67. Ambrose CS, Levin MJ. The rationale for quadrivalent influenza vaccines. Hum Vaccin Immunother. 2012;8:81-88.
68. WHO. WHO recommendations on the composition of influenza virus vaccines. [Accessed 19 November 2013]. Available at: <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/>
69. Kieninger D, Sheldon E, Lin WY, Yu CJ, Bayas JM, Gabor JJ, Esen M, Fernandez Roure JL, Narejos Perez S, Alvarez Sanchez C, Feng Y, Claeys C, Peeters M, Innis BL, Jain V. Immunogenicity, reactogenicity and safety of an inactivated quadrivalent

- t influenza vaccine can didate versus inactivated trivalentinfluenza vaccine: a phase III, randomized trial in adults aged ≥ 18 y ears. *BMC Infect Dis*. 2013;13:343. [[PMC free arti cl e](#)] [[Pu bMed](#)]
70. McKeage K. Inactivated quadrivalent split-virus seasonal influenza vaccine (Fluarix® quadri valent): a reviw of its use in the prevention of disease caused by influenza A and B. *Drugs*. 2013;73:1587–1594. [[Pu bMed](#)]
 71. Pépi n S, Donazzolo Y , Jambreci na A , Salamand C, Saville M. Safety and immunogen icity of a qu adri valent inactivated influenza vaccine in adults. *Vaccine*. 2013;31:5572–5578. [[Pu bMed](#)]
 72. McKeage K. Inactivated quadrivalent split-virus season al influenza vaccin e (Fluari x® quadri val en t): a reviw of i ts u se i n th e preven ti on of di sease cau sed by i n fl u en za A an d B. *Dru gs*. 2013;73:1587–1594.
 73. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key rol es of adju van ts i n m odern vacci n es. *Nat Med*. 2013;19:1597–1608.
 74. Salk JE, Laurent A M, Bailey ML. Direction of research on vaccination against influenza; new studies with immunologic adjuvants. *Am J Public Health Nations Health* . 1951;41:669–677. [[PMC free arti cl e](#)] [[Pu bMed](#)]
 75. Salk JE, Laurent A M. The use of adjuvants in studies on influenza immunization. Measurements in monkeys of the dimensions of antigenicity of virus-mineral oil emulsions. *J Exp Med*. 1952;95:429–447. [[PMC free arti cl e](#)][[Pu bMed](#)]
 76. Herbert WJ, Selwyn S, Philp JR. Field trials of adjuvant and saline influenza vaccines. *Br J Prev Soc Med*. 1965;19:97–100.
 77. Davis DJ, Philip RN , Bell JA , Vogel JE, Jensen DV . Epidemiologic studies on influenza infamilial and general population observations. *Am J Hyg*. 1961;73:138–147.
 78. Tetsutani K, Ishii KJ. Adjuvants ininfluenza vaccines. *Vaccin e*. 2012;30:7658–7661.
 79. Principi N, Esposito S. Adjuvanted influenza vaccines. *Hum Vaccin Immun other*. 2012;8:59–66.
 80. Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol* . 2004;82:497-505.
 81. Marti n JT. Development of an adjuvant to enhance the immune response to influenza vaccine in the elderly . *Biologicals*. 1997;25:209–213. [[Pu bMed](#)]
 82. Tsai TF. Flu ad®-MF59®-adjuvanted influenza vaccine in older adults. *Infect Ch em other*. 2013;45:159–174.

83. Koutsonanos DG, Compans RW, Skountzou I. Targeting the skin for micro need ledeli very of influenza vaccine. *Adv Exp Med Biol* . 2013;785:121–132. [[Pu bMed](#)]
84. Nicolas JF, Guy B. Intradermal , epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7:1201–1214.
86. Arnou R, Icardi G, De Decker M, Ambrozaitis A , Kazek MP, Weber F, V an Damme P. Intradermal influenza vaccinne for older adults: a randomized controlled multicenter phase III study . *Vaccine*. 2009;27:7304–7312.
87. Duggan ST, Plosker GL. Intanza 15 mu intradermal season al influenza vaccine in older adults (aged ≥ 60 y ears): profile report. *Bio Dru gs*. 2010;24:407–409. [[Pu bMed](#)]
88. Moro PL, Harrington T, Shimabukuro T, Cano M, Museru OI, Menschik D, Broder K. Adverse events after Fluzone® Intradermal vaccine reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (V A ERS), 2011-2013. *Vaccine*. 2013;31:4984–4987.
89. Falsey A R, Treanor JJ, Tornieport N , Capellan J, Gorse GJ. Randomized, double-blind controlled phase 3 trial comparing the immunogenicity of high-dose and standard-dose influenza vaccine in adults 65 years of age an d older. *J Infect Dis*. 2009;200:172–180.
90. Tsang P, Gorse GJ, Strout CB, Sperling M, Greenberg DP, Ozol-Godfrey A, Diazgranados C, Landolfi V .Immunogenicity and safety of Fluzone® intradermal and high-dose influenza vaccines in older adults ≥ 65 years of age: A randomized, controlled, phase II trial . *Vaccine*. 2013;pi i S0264-410X.
91. McKi ttri ck N , Fran k I, Jacobson JM, White CJ, Kim D, Kappes R, Di Giorgio C, Kenney T, Boyer J, Tebas P. Improved immunogenicity with high-dose season al influenza vaccine in HIV-1 infected persons: a single-center, parallel ,randomized trial. *Ann In tern Med*. 2013;158:19–26.
92. Sullivan SJ, Jacobson R, Poland GA . Advances in the vaccination of the elderly against influenza: role of a high-dose vaccine . *Expert Rev Vaccines*. 2010;9:1127–1133.
93. Hess RD, Weber F, Watson K, Schmitt S. Regulatory , biosafety and safety challenges for novel cells as substrates for human vaccines. *Vaccine*. 2012;30:2715–2727. [[Pu bMed](#)]
94. Doroshenko A , Halperin SA . Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu® (Novartis Vaccines) *Expert Rev Vaccines*. 2009;8:679–688.
95. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Prevention and control of season al influenza with vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices--United States, 2013-2014. *MMWR Recomm Rep*. 2013;62:1–43.
96. Chan CY , Tambyah PA . Preflucel®: a Vero-cell culture-derived trivalent influenza vaccine. *Expert Rev Vaccines*.2012;11:759–773.

97. Goldenberg MM. Pharmaceutical approval update. *PT*. 2013;38:150–152. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
98. Lambert LC, Fauci A S. Influenza vaccines for the future. *N Engl J Med*. 2010;363:2036–2044. [[PubMed](#)]
99. Yang LP. Recombinant trivalent influenza vaccine (Flublok®): a review of its use in the prevention of seasonal influenza in adults. *Drugs*. 2013;73:1357–1366. [[PubMed](#)]
100. Treanor JJ, El Sahly H, King J, Graham I, Izikson R, Kohberger R, Patriarca P, Cox M. Protective efficacy of a trivalent recombinant hemagglutinin protein vaccine (Flu-Blok®) against influenza in healthy adults: a randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine*. 2011;29:7733–7739.
101. Lambert LC, Fauci A S. Influenza vaccines for the future. *N Engl J Med*. 2010;363:2036–2044.
102. Dormitzer PR, Tsai TF, Del Giudice G. New technologies for influenza vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2012;8:45–58.
103. Lambert LC, Fauci A S. Influenza vaccines for the future. *N Engl J Med*. 2010;363:2036–2044.
104. Dormitzer PR, Tsai TF, Del Giudice G. New technologies for influenza vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2012;8:45–58.
105. Li J, Jiang Y, Zhao S, Chang X, Liu J, Zeng X, Li Y, Chen H. Protective efficacy of an H5N1 DNA vaccine against challenge with a lethal H5N1 virus in quail. *Avian Dis*. 2012;56(4 Suppl):937–939. [[PubMed](#)]
106. Ellebedy A H, Webby RJ. Influenza vaccines. *Vaccine*. 2009;27(Suppl 4):D65–D68.
107. Shaw A. New technologies for new influenza vaccines. *Vaccine*. 2012;30:4927–4933. [[PubMed](#)]
108. Pica N, Palese P. Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges. *Annu Rev Med*. 2013;64:189–202. [[PubMed](#)]
109. Goodman A G, Heinen PP, Guerra S, Vijayan A, Sorzano CO, Gomez CE, Esteban M. A human multi-epitope recombinant vaccinia virus as a universal T cell vaccine candidate against influenza virus. *PLoS One*. 2011;6:e25938.
110. Dybulek, M and Fauci, AS. Immunology of HIV infection in: *Fundamental Immunology*, 5th edition, William E. Paul. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2003, 1285-1318.
111. Barre-Sinoussi, F, Chermann, JC, Rey, F, Nugeyre, MT, Chamaret, S, Gruest, J, Dautet, C, Axler-Blin, C, Vezinet-Brun, F, Rouzioux, C, Rozenbaum, W,

- Montagnier, L. Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 1983, 220:868-871
112. Gottlieb, MS, Schroff, R, Schanker, HM, Weisman, JD, Fan, PT, Wolf, RA, Saxon, A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. *N.Engl.J.Med.*, 1981, 305:1425-1431.
 113. UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012. Geneva: World Health Organization (WHO), 2012 Contract No.: ISBN 978-92-9173-996-7.
 114. Pica N, Palese P. Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges. *Annu Rev Med.* 2013;64:189–202.
 115. Goodman A G, Heinen PP, Guerra S, Vijayan A , Sorzano CO, Gomez CE, Esteban M. A human multi-epitope recombinant vaccinia virus as a universal T cell vaccine candidate against influenza virus. *PLoS On e.* 2011;6:e25938.
 116. Tamura, S.; Karuta, T. Defense Mechanisms Against Influenza Virus Infection in The Respiratory Tract Mucosa. *Jpn J Infect Dis.* v.57 p. 236-247, 2004.
 117. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.. *Cellular and Molecular Immunology.* 5th edition Londres: Elsevier, 2007.
 118. Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature.*v. 409p.1055-1060, 2001.
 119. Achdount, K. The immune response to influenza. *J Infect Dis* 2003; 180: 1763-70
 120. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.. *Cellular and Molecular Immunology.* 6th edition Londres: Elsevier, 2008.
 121. Finberg, R. W.; Wang, J. P.; Kurt-Jones, E. A.. Toll like receptors and viruses.*Rev*
 122. Van-Dommelen, S. L.; Sumaria, N.; Schreiber, R. D.; Scalzo, A. A.; Smyth, M. J.; DEGLIESPOSTI, M. A.. Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. *Immunity*, v.25, n.5, p.835-848, 2006. *Med Virol*, v.17, n.1, p.35-43, 2007.
 123. Garcia-sastre, A. Antiviral response in pandemic influenza viruses. *Emerg Infect Dis.* 2006.

124. Longhi, M. P.; Wright, K.; Lauder, S.N.; Nowell, M. A.; Jones, G. W.; Godkin, A.J.; Jones, S. A.; Gallimore Awen M.. Interleukin-6 Is Crucial for Recall of Influenza-Specific Memory CD4+ T Cells. v. 4 , 2008.
125. Hasegawa, H., Ichinohe, T., Ainai, A., Tamura, S., Kurata, T., Development of mucosal adjuvant for intranasal vaccine for H5N1 influenza viruses. Therapeutics and Clinical Risk Management. v. 5. p. 125-132, 2009.
126. Tamura, S.; Karuta, T., Defense Mechanisms Against Influenza Virus Infection in The Respiratory Tract Mucosa. Jpn J Infect Dis. v.57 p. 236-247, 2004.
127. Kidd, P., Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitation, and implication for health and disease. Altern Med Ver. v.8.p. 223-246, 2003.
128. Longhi, M. P.; Wright, K.; Lauder, S.N.; Nowell, M. A.; Jones, G. W.; Godkin, A. J.; Jones, S. A.; Gallimore Awen M.. Interleukin-6 Is Crucial for Recall of Influenza-Specific Memory CD4+ T Cells. v. 4 , 2008.
129. Kapsenberg, M.L., Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nature Reviews Immunology. v.16.p. 111-135, 1998.
130. Huber, V. C.; Mckeeon, R. M.; Brackin, M. N.; Miller, L. A.; Keating, R.; Brown, S. A.; Makarova, N.; Perez, D. R.; Macdonald, G. H.; Mccullers, J.A.; Distinct Contributions of Vaccine-Induced Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a Antibodies to Protective Immunity against Influenza. Clinical and vaccine immunology. p. 981–990, 2006.
131. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.. Cellular and Molecular Immunology. 5th edition Londres: Elsevier, 2007.
132. Karp, C. L.; Wysocka, M.; Wahl, L. M.; Ahearn, J. M.; Cuomo, P. J.; Sherry, B.; Trinchieri, G.; Griffin, D. E.. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. Science, i.273, v.5272, p.228-231, 1996.
133. Longhi, M. P.; Wright, K.; Lauder, S.N.; Nowell, M. A.; Jones, G. W.; Godkin, A. J.; Jones, S. A.; Gallimore Awen M.. Interleukin-6 Is Crucial for Recall of Influenza-Specific Memory CD4+ T Cells. v. 4 , 2008.
134. Raja, S.M., Metkar, S.S., Froelich, C.J., Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. Current opinion in Immunology. v.15. p. 528-532, 2003.
135. Litchman procurer

136. Moran, T.M.; Park, H.; Fernandez-Sesma, A.; Schulman, J.L. Th2 responses to inactivated influenza virus can be converted to Th1 responses and facilitate recovery from heterosubtypic virus infection. *J Infect Dis*, v.180, p.579–85, 1999.
137. Cox, J.C. e Coulter, A.L. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine*.v.15, p. 248-256, 1997.
138. Treanor, J.J. Influenza virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed.: 2060-2085. Churchill Livingstone, 2005.
139. Johansen , F.E., Braathen, Brandtzaeg, R., P., The J chain is Essential for Polymeric Ig Receptor-Mediated Epithelial Transport of IgA. *J Immunol*, v.167. p. 5185-93, 2001.
140. Tamura, S., Kurata,T. Mucosal immune response against influenza virus. *Kurata*.v.55, p. 725-731, 1995.
141. Treanor, J.J. Influenza virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed.: 2060-2085. Churchill Livingstone, 2005.
142. Kuper, C. F. et al. The role of naso-pharyngeal lymphoid tissue. *Immunol.Today*, v.13, p. 219-224, 1992.
144. Cox RJ, Brokstad KA, Zuckerman MA, Wood JM, Haaheim LR, Oxford JS. An early humoral immune response in peripheral blood following parenteral inactivated influenza vaccination. *Vaccine* 1994;12:993–9.
145. Nichol KL. Efficacy/clinical effectiveness of inactivated influenza vaccines in adults. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, eds. *Textbook of Influenza*. Oxford, UK: Blackwell Science, 1998a, 358–72.
146. Brokstad KA, Cox RJ, Olofsson J, Jonsson R, Haaheim LR. Parenteral influenza vaccination induces a rapid systemic and local immune response. *J Infect Dis* 1995;171:198–203.
147. Powers DC, Smith GE, Anderson EL et al. Influenza A virus vaccines containing purified recombinant H3 hemagglutinin are well tolerated and induce protective immune responses in healthy adults. *J Infect Dis* 1995;171:1595–9.
148. El-Madhun AS, Cox RJ, Haaheim LR. The effect of age and natural priming on the IgG and IgA subclass responses after parenteral influenza vaccination. *J Infect Dis* 1999;180:1356–60.
149. Nichol KL. Efficacy/clinical effectiveness of inactivated influenza vaccines in adults. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, eds. *Textbook of Influenza*. Oxford, UK: Blackwell Science, 1998a, 358–72.

150. Brokstad KA, Cox RJ, Major D, Wood JM, Haaheim LR. Cross- reaction but no avidity change of the serum antibody response after influenza vaccination. *Vaccine* 1995;13:1522–8.
151. Cox RJ, Brokstad KA. The postvaccination antibody response to influenza virus proteins. *APMIS* 1999;107:289–96.
152. Brokstad KA, Cox RJ, Major D, Wood JM, Haaheim LR. Cross- reaction but no avidity change of the serum antibody response after influenza vaccination. *Vaccine* 1995;13:1522–8.
153. El-Madhun AS, Cox RJ, Seime A, Sovik O, Haaheim LR. Systemic and local immune responses after parenteral influenza vaccination in juvenile diabetic patients and healthy controls: results from a pilot study. *Vaccine* 1998;16:156–60.
154. BrokstadKA,CoxRJ, Eriksson JC, OlofssonJ,Jonsson R, DavidssonA. High prevalence of influenza specific antibody secreting cells in nasal mucosa. *Scand J Immunol* 2001;54:243–7.
155. Brokstad KA, Eriksson JC, Cox RJ et al. Parenteral vaccination against influenza does not induce a local antigen-specific immune response in the nasal mucosa. *J Infect Dis* 2002;185:878–84.
156. Cox RJ, Mykkeltvedt E, Sjursen H, Haaheim LR. The effect of zanamivir treatment on the early immune response to influenza vaccination. *Vaccine* 2001;19:4743–9.
157. Shire NJ, Welge JA, Sherman KE. Efficacy of inactivated hepatitis A vaccine in HIV-infected patients: a hierarchical bayesian meta-analysis. *Vaccine* 2006;24(3):2729
158. Weissman S, Feucht C, Moore BA. Response to hepatitis A vaccine in HIV-positive patients. *J Viral Hepat* 2006;13(2):81-6
159. Overton Et, Sungkanuparph S, Powderly WG, Seyfried W, Groger RK, Aberg JA. Undetectable plasma HIV RNA load predicts success after hepatitis B vaccination in HIV-infected persons. *Clin Infect Dis* 2005;41(7):1045-8
160. Bruguera M, Cremades M, Salinas R, Costa J, Grau M. Impaired response to recombinant hepatitis B vaccine in HIV-infected persons. *J Clin Gastroenterol* 1992;14(1):27-30
161. Flynn Pm, Wilson RB, Kapogiannis BG et al. Improving Seroresponse to Hepatitis B Vaccination in HIV-Infected Adolescents: ATN 024. International AIDS Society,

Capetown, SA, July 19-22, 2009 and 1st International Workshop on HIV in Pediatrics, Capetown, SA, July 17-18, 2009

162. Rey D, Krantz V, Partisani M, et al. Increasing the number of hepatitis B vaccine injections augments anti-HBs response rate in HIV-infected patients. Effects on HIV-1 viral load. *Vaccine* 2000;18(13):1161-5.
163. Overton ET, Sungkanuparph S, Powderly WG, Seyfried W, Groger RK, Aberg JA. Undetectable plasma HIV RNA load predicts success after hepatitis B vaccination in HIV-infected persons. *Clin Infect Dis* 2005;41(7):1045-8.
164. Cohen C, Simonsen L, Sample J, Kang JW, Miller M et al. (2012) Influenza-related mortality among adults aged 25-54 years with AIDS in South Africa and the United States of America. *Clin Infect Dis* 55: 996-1003. doi:10.1093/cid/cis549. PubMed: 22715173.
165. Succi RC, Farhat CK. Vaccination in special situations. *J Pediatr (Rio J)*. 2006; 82 (3Suppl):S91-100.
166. Cohen C, Simonsen L, Sample J, Kang JW, Miller M et al. (2012) Influenza-related mortality among adults aged 25-54 years with AIDS in South Africa and the United States of America. *Clin Infect Dis* 55: 996-1003. doi:10.1093/cid/cis549. PubMed: 22715173
167. Siegrist CA, Schappi MG, Meier S, Bel M, Posfay-Barbe KM. Protective antibody responses to influenza A/H1N1/09 vaccination in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012 Jun;54(6):817-9.
168. European Medicines Agency, 1997
169. Miller E, Hoschler K, Hardelid P, Stanford E, Andrews N, Zambon M. *Lancet*. 2010Mar 27;375(9720):1100-8. Epub 2010 Jan 21.
170. Bridges CB, Fukuda K, Cox NJ, Singleton JA. Recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2001, 50 (RR-4):1
171. Bickel M, von Hentig N, Wieters I, Khaykin P, Nisius G, et al. (2011) Immune response after two doses of the novel split virion, adjuvanted pandemic H1N1 influenza A vaccine in HIV-1-infected patients. *Clin Infect Dis* 52: 122–127.
172. Santini-Oliveira M, Camacho LAB, Souza TML, Luz PM, Vasconcellos MTL, et al. (2012) H1N1pdm09 Adjuvanted Vaccination in HIV-Infected Adults: A Randomized

- Trial of Two Single versus Two Double Doses. PLoS ONE 7(6): e39310. doi:10.1371/journal.pone.0039310
173. Overton Et, Sungkanuparph S, Powderly WG, Seyfried W, Groger RK, Aberg JA. Undetectable plasma HIV RNA load predicts success after hepatitis B vaccination in HIV-infected persons. *Clin Infect Dis* 2005;41(7):1045-8
 174. Tebas P., Frank I., Lewis M, Quinn J., Zifchak L., Thomas A, Kenney T, Kappes R, Wagner W, Maffei K., Sullivan K. Poor Immunogenicity of the H1N1 2009 vaccine in well controlled HIV-infected individuals. *Aids* 2010 Sep 10;24(14): 2187-92.175. Ministério da saúde (MS), 2010.
 176. Oka T, Honda T, Ohkuma K, Sakoh M, Nonaka S. Influenza vaccine: Enhancement of immune response by application of carboxy-vinylpolymer. *Vaccine*. 1990 Dec;8(6):573-6.
 177. Okuno Y, Yanagisawa N, Maeda K, Ajisawa A, Imamura A, Sukanuma A, Ando M, Takayama N. Reduced immune response to influenza A (H1N1) 2009 monovalent vaccine in HIV-infected Japanese subjects. *Vaccine*. 2011 Aug 5;29(34):5694-8.
 178. Bickel M, von Hentig N, Wieters I, Khaykin P, Nisius G, et al. (2011) Immune response after two doses of the novel split virion, adjuvanted pandemic H1N1 influenza A vaccine in HIV-1-infected patients. *Clin Infect Dis* 52: 122–127.
 179. Miotti PG, Nelson KE, Dallabetta GA, Farzadegan H, Margolick J, Clements ML. The influence of HIV infection on antibody responses to a two-dose regimen of influenza vaccine. *JAMA*. 1989; 262:779–783. [PubMed: 2787416]
 180. Kroon FP, van Diesel JT, de Jong JC, van Furth R. Immune response after influenza vaccination in HIV infected individuals: a 3-year consecutive study. *Vaccine*, 2000. Jul 1; 18 (26):3040-9.
 181. Santini-Oliveira M, Camacho LAB, Souza TML, Luz PM, Vasconcellos MTL, et al. (2012) H1N1pdm09 Adjuvanted Vaccination in HIV-Infected Adults: A Randomized Trial of Two Single versus Two Double Doses. PLoS ONE 7(6): e39310. doi:10.1371/journal.pone.0039310
 182. Siegrist CA, Schappi MG, Meier S, Bel M, Posfay-Barbe KM. Protective antibody responses to influenza A/H1N1/09 vaccination in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012 Jun;54(6):817-9.

184. Englund JA, Walter EB, Gbadebo A, Monto AS, Zhu Y, Neuzil KM. Immunization with trivalent inactivated influenza vaccine in partially immunized toddlers. *Pediatrics* 2006;118(3):e579–85.
185. Levin MJ, Song LY, Fenton T, Nachman S, Patterson J, Walker R, et al. Shedding of live vaccine virus, comparative safety, and influenza-specific antibody responses after administration of live attenuated and inactivated trivalent influenza vaccines to HIV-infected children. *Vaccine* 2008;26(33): 4210–7.
186. Tanzi E, Esposito S, Bojanin J, Amendola A, Trabattini D, Pariani E, ET al. Immunogenicity and effect of a virosomal influenza vaccine on viral replication and T-cell activation in HIV-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2006;78(4):440–5.
187. Monto AS, Sullivan KM. Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved. *Epidemiol Infect* 1993;110(1):145–60.
188. Frank AL, Taber LH, Glezen WP, Geyer EA, McIlwain S, Paredes A. Influenza B virus infections in the community and the family. The epidemics of 1976–1977 and 1979–1980 in Houston, Texas. *Am J Epidemiol* 1983;118(3): 313–25.
189. Center of Diseases Control, 2011.
190. Fiore AE, Epperson S, Perrotta D, Bernstein H, Neuzil K. Expanding the recommendations for annual influenza vaccination to school-age children in the United States. *Pediatrics*. 2012 Mar;129 Suppl 2:S54-62. doi: 10.1542/peds.2011-0737C.
191. Fabbiani M., Sidella, L., Corbi, M., Martucci, R., Sali, M., Colafilgi, M., Cauda, R., Delogu, G., Sgambato, A., Giambenedetto, S. HIV-infected patients show impaired cellular immune response to influenza vaccination compared to healthy subjects, *Vaccine*, JVAC-14169; No. of Pages 5.
192. John M. Woodb, Pope Kosalaraksaa,* , Ussanee Srirompotonga, Robert W. Newmanb, Pagakrong Lumbiganona, Serological response to trivalent inactivated influenza vaccine in HIV-infected children with different immunologic status. *Vaccine* 29 (2011) 3055–3060