

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
DOUTORADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Vacinas em forma inativada e atenuada contra vírus influenza induzem  
diferente resposta celular imune e perfil de expressão gênica em crianças.**

**RAQUEL GIACOMELLI CAO**

**Porto Alegre**

**2013**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**DOUTORADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Vacinas em forma inativada e atenuada contra vírus influenza induzem  
diferente resposta celular imune e perfil de expressão gênica em crianças.**

**RAQUEL GIACOMELLI CAO**

Tese de Doutorado apresentada à  
Faculdade de Medicina da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do  
Sul para obtenção do título de Doutor  
em Medicina e Ciências da Saúde

**Orientador: Prof. Dr. Renato Tetelbom Stein**

**Co-orientador: Prof. Dr. Octavio Ramilo**

**Porto Alegre**

**2013**



**Raquel Giacomelli Cao**

Endereço: Rua Garibaldi, 1317/203

Porto Alegre/RS – CEP 90035-052

Email: [raque.cao@gmail.com](mailto:raque.cao@gmail.com)

[raque\\_cao@yahoo.com.br](mailto:raque_cao@yahoo.com.br)

Telefone: (51) 98525858

**ÓRGÃOS FINANCIADORES:**

**Bolsa de Doutorado: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**

**Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**

Conflito de interesses: Não

# AGRADECIMENTOS

---

Ao Prof. Dr. Renato, pela atenção e apoio durante o processo de definição do projeto e orientação, e pela confiança ao me selecionar como orientanda.

Ao Prof. Dr. Paulo Márcio, com quem tive o primeiro contato na iniciação científica, e que muito contribuiu para meu crescimento científico e intelectual.

Aos Drs. Octavio Ramilo e Asuncion Mejias, que me proporcionaram a experiência de trabalhar em um instituto de pesquisa de excelência nos Estados Unidos.

À PUCRS, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

Aos colegas do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS e do Center for Vaccines & Immunity do Nationwide Children's Hospital, pela colaboração e momentos de descontração.

Aos amigos que estiveram presentes nesse processo, pelo apoio e cumplicidade.

À minha família, que sempre me apoiou em minhas decisões e esteve presente em todos os momentos desses quatro anos, confortando nas dificuldades e vibrando nas conquistas, principalmente meus pais e irmãos, sempre juntos.

“Quando vejo uma criança, ela inspira-me dois sentimentos: ternura, pelo que é, e respeito pelo que pode vir a ser.”

Louis Pasteur

# SUMÁRIO

---

SUMÁRIO.....	7
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
<i>Capítulo I</i> .....	14
1. REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
1.1. Introdução.....	15
1.2. Epidemias e pandemias causadas pelos vírus influenza .....	16
1.3. Variações antigênicas dos vírus influenza.....	19
1.4. Transmissão e Quadro Clínico.....	23
1.5. Monitoramento Epidemiológico.....	24
1.6. Prevenção da infecção pelos vírus influenza .....	27
1.6.1. Prevenção não vacinal .....	27
1.6.2. Prevenção vacinal .....	29
1.6.2.1. Vacinas Inativadas.....	30
1.6.2.2. Vacina Atenuada .....	32
1.6.2.3. Considerações gerais sobre vacinação.....	33
1.7. Mecanismos imunológicos da vacinação.....	34
2. JUSTIFICATIVA .....	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivo Geral:.....	41
3.2. Objetivos Específicos: .....	41
4. REFERÊNCIAS.....	42
<i>Capítulo II</i> .....	46
1. MÉTODOS.....	
1.1. Sujeitos recrutados, protocolos de vacinação e coleta de amostras.....	47
1.2. Citometria de Fluxo.....	49
1.3. Ensaio de Inibição da Hemaglutinação e Ensaio de Neutralização Viral .....	51
1.4. Análise pela Técnica de Microarranjos .....	53

1.5. Mensuração de Interferon alfa em amostras séricas .....	56
1.6. Análise Estatística .....	57
2. REFERÊNCIAS.....	58
<i>Capítulo III</i> .....	59
1. ARTIGO ORIGINAL .....	60
<i>Capítulo IV</i> .....	96
1. CONCLUSÃO .....	97



## LISTA DE FIGURAS

---

### *Capítulo I*

<b>Figura 1:</b> Variação Antigênica Menor ou Antigenic Drift.....	21
<b>Figura 2:</b> Variação Antigênica Maior ou Antigenic Shift.....	22
<b>Figura 3:</b> Centros participantes da GIRS.....	25
<b>Figura 4:</b> Pesquisa Laboratorial de Influenza no Brasil.....	27
<b>Figura 5:</b> Ilustração de um Centro Germinativo.....	35

### *Capítulo II*

<b>Figura 6:</b> Esquema de recrutamento dos sujeitos do estudo.....	49
<b>Figura 7:</b> Estratégia de análise de células B naïve, de memória e transicionais.....	50
<b>Figura 8:</b> Estratégia de análise de plasmoblastos e plasmócitos.....	51
<b>Figura 9:</b> Representação de um heat map.....	55
<b>Figura 10:</b> Representação do mapa modular.....	56

### *Capítulo III - Artigo Original*

<b>Figure 1:</b> B cell immune responses after immunization with LAIV or TIV.....	65
<b>Figure 2:</b> Fold increase of Hemagglutination Inhibition and Viral Neutralization titers pre and post-vaccination in LAIV and TIV.....	67
<b>Figure 3:</b> Correlations between Hemagglutination Inhibition and Viral neutralization titers and Plasmablast and Plasma B cells on TIV vaccinees.....	70
<b>Supplementary Figure 1:</b> Gene expression profiles of children immunized with TIV and LAIV.....	72
<b>Figure 4:</b> Transcriptional profiles of children immunized with TIV and LAIV are characterized by activation of interferon.....	76
<b>Supplementary Figure 2:</b> Comparison of the IFN-related modules median expression between TIV and LAIV groups.....	78
<b>Figure 5:</b> Interferon-related genes expression post-vaccination with LAIV and TIV.....	79

## LISTA DE TABELAS

---

### *Capítulo I*

<b>Tabela 1:</b> Recomendações para administração da vacina inativada contra influenza conforme faixa etária.....	31
---	----

### *Capítulo II*

<b>Tabela 2:</b> Dados demográficos dos sujeitos recrutados.....	48
--	----

### *Capítulo III - Artigo original*

<b>Table 1:</b> Demographic data of the subjects enrolled.....	64
--	----

<b>Table 2:</b> Hemagglutinin Inhibition (A.) and Viral Neutralization (B.) antibody titers before immunization or baseline (BL) and Day 30 post-immunization with LAIV and TIV.....	68
--	----

<b>Supplementary Table 1:</b> Top 10 over and under expressed genes post-vaccination with TIV and LAIV.....	74
---	----

<b>Table 3:</b> Correlations between fold increase of HI (A.) and VN (B.) titers and the IFN-related modules and genes 1 day post-vaccination with TIV. Correlations between fold increase of VN (C.) titers and the IFN-related modules and genes 7 days post-vaccination with LAIV.....	81
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

**RNA:** Ácido Ribonucleico

**HA:** Hemaglutinina

**NA:** Neuraminidase

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PCR-TR:** Reação da Transcriptase Reversa em Tempo Real

**GIRS:** Global Influenza Surveillance and Response System

**ACIP:** Advisory Committee on Immunization Practices

**TIV:** Trivalent Inactivated Vaccine

**LAIV:** Live Attenuated Influenza Vaccine

**Tfh:** Célula T auxiliar folicular

**CG:** Centro Germinativo

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-21:** Interleucina 21

**HAI:** Ensaio de Inibição da Hemaglutinação (Hemagglutination inhibition Assay)

**VNA:** Ensaio de Neutralização Viral (Viral Neutralization Assay)

**CSA:** Célula secretora de anticorpos (Antibody secreting cell)

**IFN:** Interferon

**ELISPOT:** Enzyme-Linked Immunosorbent Spot

**CDC:** Centers for Disease Control and Prevention

**PBS:** Salina fosfatada tamponada (Phosphate Buffered Saline)

**RDE:** Receptor de destruição enzimática

**PFU:** Unidade formadora de placa (Plaque-forming unit)

**IFN- $\alpha$ :** Interferon alpha

**ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay

**HRP:** Horseradish Peroxidase

## RESUMO

---

**INTRODUÇÃO:** Estudos têm demonstrado que a vacina contra os vírus influenza LAIV é mais eficiente que a formulação TIV para a prevenção de infecção em crianças, porém os mecanismos envolvidos ainda não estão bem definidos.

**OBJETIVOS:** Acessar as diferenças na imunidade celular humoral e de expressão de perfis gênicos em crianças imunizadas com LAIV ou TIV.

**MÉTODOS:** Sangue periférico de crianças previamente híginas foi coletado pré e pós-vacinação e analisado para mensuração de células B e para titulação de anticorpos. Análise pela técnica de microarranjos foi empregada para avaliação dos perfis de expressão gênica.

**RESULTADOS:** Vacinação com LAIV induziu aumento do número absoluto de células B naïve, de memória e transitórias no após 30 dias comparado aos valores medidos antes da vacinação ( $p < 0.05$ ). Vacinação com TIV, no entanto, induziu aumento de plasmoblastos no dia 7 pós-vacinação ( $p < 0.01$ ). Os títulos de anticorpos para os três antígenos da vacina (H1N1, H3N2 e B) encontraram-se significativamente elevados no grupo vacinado com TIV quando comparado ao grupo que recebeu LAIV. Ambos os grupos vacinados induziram sinalização de genes relacionados ao interferon, porém em diferentes momentos: TIV induziu-os 1 dia pós-vacinação, enquanto LAIV 7 dias pós-vacinação, especialmente em crianças com menos de cinco anos de idade.

**CONCLUSÕES:** Esses resultados sugerem que as vacinas LAIV e TIV induzem resposta celular imune diferente em crianças e que ambas induzem sinalização de interferon pós-vacinação.

**PALAVRAS-CHAVE:** vacina influenza, vacina da gripe, LAIV, TIV.

## ABSTRACT

---

**INTRODUCTION:** Studies have shown that LAIV is more effective than TIV for prevention of influenza infection in young children, but the underlying mechanisms associated with protection are still not well defined.

**OBJECTIVES:** To assess differences in cellular immunity and gene expression profiles in children after immunization with LAIV or TIV.

**METHODS:** Peripheral blood of previously healthy children was collected pre and post-vaccination and analyzed for B cells measurement and antibodies production. Microarray analyses were applied to assess the gene expression profiles.

**RESULTS:** LAIV vaccinees showed number of naïve, memory and transitional B cells increased on day 1 compared to baseline ( $p < 0.05$ ). TIV vaccinees showed the number of plasmablasts increased on day 7 post-vaccination ( $p \leq 0.01$ ). In addition, the titers for the three strains of the vaccine (H1N1, H3N2 and B) were significantly elevated on the TIV group when compared with the LAIV group. Regarding the transcriptional profiles presented, both vaccines induced interferon signaling, but in different time points, TIV 1 day post-vaccination and LAIV 7 days post-vaccination, the last only in children younger than 5 years old.

**CONCLUSIONS:** These results indicate that LAIV and TIV induced different immune responses in peripheral blood of vaccinated children and that both vaccines induce interferon signaling post-vaccination.

**KEY-WORDS:** influenza vaccine, LAIV, TIV.

## *Capítulo I*

---

# 1. REFERENCIAL TEÓRICO

---

## 1.1. Introdução

Os vírus influenza são importantes patógenos do trato respiratório, responsáveis por uma infecção aguda, também chamada de gripe, de elevada transmissibilidade e distribuição global. Um indivíduo pode contraí-la diversas vezes ao longo da vida e, em geral, tem evolução autolimitada, no entanto, de acordo com a diversidade antigênica de seu agente etiológico, esta doença pode apresentar-se de forma branda ou evoluir para apresentação grave com necessidade de hospitalização. Desse modo, na perspectiva de saúde pública, esta condição demanda abordagens específicas de vigilância e controle, dependendo da gravidade das manifestações clínicas e do potencial pandêmico.

O agente etiológico da gripe é o *Myxovirus influenzae*, uma partícula envelopada de RNA de fita simples segmentada, da família *Orthomyxoviridae*. Os vírus influenza subdividem-se nos tipos A, B e C, de acordo com diferenças genéticas e antigênicas nas suas glicoproteínas de superfície, denominadas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Os tipos A e B têm importante relevância na infecção de humanos, por serem responsáveis pelas epidemias, sendo que o vírus C também infecta humanos, porém em menor escala, geralmente causando doença subclínica. Os vírus influenza A são os que apresentam maior variabilidade; existem 16 tipos de HA e 9 tipos de NA identificadas em diferentes espécies animais. Atualmente são conhecidas três HA (H1, H2 e H3) e duas NA (N1 e N2) presentes no vírus influenza do tipo A adaptados para infectar seres humanos [1-3].

Os vírus influenza são únicos na habilidade de causar epidemias anuais recorrentes e, menos frequentemente, pandemias, com morbidade importante em todas as faixas etárias e mortalidade mais pronunciada nos extremos de idade e nos portadores de doenças crônicas e autoimunes. A natureza fragmentada do material genético do vírus propicia altas taxas de mutação do genoma durante a fase de replicação, possibilitando intensa variabilidade e diversidade antigênica, além de aumentar a capacidade de adaptação. Estas mutações ocorrem de forma independente e habitualmente provocam o aparecimento de novas variantes para as quais a população ainda não apresenta imunidade, já que a infecção prévia por determinada cepa confere pouca ou nenhuma proteção contra os vírus de surgimento mais recente, dependendo do tipo de mutação sofrida [1, 4].

## **1.2. Epidemias e pandemias causadas pelos vírus influenza**

As epidemias são causadas por doenças geralmente de caráter infeccioso, transitório, que acomete simultaneamente um grande número de indivíduos em uma determinada localidade. Pode ser caracterizada também por um surto periódico de uma doença infecciosa em dada população ou região. As pandemias ocorrem quando a enfermidade epidêmica é amplamente disseminada e tem, geralmente, proporções mundiais. Epidemias de influenza de gravidade variável têm ocorrido de maneira sistemática a cada 1 a 3 anos, predominantemente no inverno. Já as pandemias de influenza têm ocorrido de forma irregular, geralmente com 20 a 30 anos de intervalo, por vezes em intervalos ainda menores. Desde o século XVI descreveram-se ao menos 30 episódios pandêmicos, causados por diversas variantes mutantes e combinações de subtipos virais. Como exemplos, a Gripe Espanhola de 1918 e a Gripe Suína de 2009 foram ambas causadas



por vírus influenza do tipo H1N1, a Gripe Asiática de 1957 foi causada por vírus influenza H2N2, a Gripe de Hong Kong de 1968 foi causada por vírus influenza H3N2 e a Gripe Aviária de 2004 foi causada por vírus influenza H5N1. O impacto das epidemias de influenza é reflexo da interação entre a variação antigênica viral, o nível de proteção da população para as cepas circulantes e o grau de virulência dos vírus [1, 4].

Durante a última pandemia de influenza, em 2009, causada por vírus do tipo A H1N1, a análise epidemiológica de casos notificados no Brasil evidenciou uma taxa de caso-fatalidade de 11.2% durante a primeira onda do período pandêmico. Em abril de 2009, em resposta aos alertas da Organização Mundial de Saúde (OMS), o Brasil implementou a vigilância ativa de casos suspeitos de infecção por influenza do tipo A H1N1, focando em indivíduos sintomáticos com história recente de viagem internacional [5]. No Brasil, os casos de influenza chegaram principalmente dos Estados Unidos, Argentina e Chile. [6, 7]. A curva epidêmica alcançou seu pico na primeira semana de agosto e, até 24 de setembro de 2009, 124.013 casos suspeitos de influenza A H1N1 foram notificados. Desse total, 17,4% foram descartados, porque os sintomas de influenza foram atribuídos a outras causas. Dos 102.435 casos suspeitos remanescentes, 26.396 foram confirmados por critérios laboratoriais (PCR-RT) ou epidemiológicos. Os estados do Paraná e São Paulo foram responsáveis por 73% de todos os casos reportados (52% e 21%, respectivamente). O estado do Rio de Janeiro apresentou 6.8% dos casos, seguido pelo Rio Grande do Sul (5.2% de todos os casos) e Santa Catarina (4.4% de todos os casos). Durante a fase epidêmica inicial, a média de idade dos casos detectados era de 29 anos, com 10% dos casos entre 10 e 18 anos. Com a progressão da epidemia, a taxa de casos severos reportados aumentou e a média de idade caiu para 25 anos. A proporção de casos no grupo de adolescentes aumentou 15% e a proporção de

crianças menores de dois anos passou de 5 para 10%. Entre as crianças com Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), a proporção de acometimento em menores de dois anos aumentou de 0.6 para 10%. Esta mudança no perfil etário pode ser devido ao aumento da ênfase no monitoramento e notificação de casos em crianças jovens, e/ou pode ter sido devido à exposição tardia e crescente conforme a progressão da epidemia, já que, no início, a maioria dos casos foi associada a adultos após viagem internacional [8].

Apesar de a população geral ter sido exposta ou vacinada contra diversos vírus H1N1, na pandemia de 2009 a maioria das pessoas, especialmente as nascidas após 1950, não possuía anticorpos capazes de neutralizar a infectividade viral ou inibir a agregação de hemácias causada pela nova HA dessa cepa pandêmica [9, 10]. A observação de que em poucos meses o vírus se espalhou globalmente em uma população com robusta imunidade de células B e T ao vírus H1N1 que circularam recentemente, mas não apresentavam títulos significativos de anticorpos à cepa H1N1 de 2009, corrobora a especulação de que a imunidade protetora contra o vírus influenza é primariamente conferida por anticorpos dirigidos aos vários epitopos virais, aqueles encontrados na superfície das glicoproteínas. Estudos mostraram que as cepas H1N1 de 1918 e de 2009 compartilham epitopos neutralizadores imunodominantes na HA. Após o início da circulação entre humanos do vírus tipo H1N1 em 1918, diversos sítios de glicosilação foram adicionados à HA, mascarando os epitopos protetores compartilhados. Outras HA nas cepas H1N1 modificaram-se extensivamente, logo, humanos expostos somente às cepas subsequentes de H1N1 modificadas não desenvolveram títulos de anticorpos significativos capazes de proteger contra a cepa de 2009. Exposição de idosos à infecção ou imunização com a cepa

H1N1 de 1918 explica a presença de anticorpos neutralizadores pré-existentes contra a cepa H1N1 de 2009 [9].

### 1.3. Variações antigênicas dos vírus influenza

Como todos os genomas de RNA, o genoma do vírus influenza não possui mecanismos de correção genética e sofre mutações com relativa frequência. As mutações podem oferecer ao vírus diversas vantagens seletivas, como resistência às vacinas existentes e drogas antivirais. Os vírus influenza estão sujeitos a dois tipos de variações antigênicas, 'antigenic drift' e 'antigenic shift'. As variações do tipo 'antigenic drift' são consideradas menores, uma vez que se devem a mutações pontuais nos segmentos do genoma viral que resultam em mudanças na sequência de aminoácidos que compõem as glicoproteínas de superfície, particularmente na HA (**Figura 1**). Elas ocorrem a cada dois ou três anos para os subtipos do vírus A e a cada 5 ou 6 anos para os vírus do tipo B, e são capazes de permitir que o vírus escape à imunidade adquirida. As variações do tipo 'antigenic shift' são consideradas maiores por serem associadas à completa substituição de um ou ambos os segmentos do genoma viral, que controlam a produção das glicoproteínas de superfície (**Figura 2**). Como o material genético do vírus é segmentado, o reagrupamento entre vírus humano e vírus que infectam outras espécies animais é facilitado durante infecções mistas, levando à geração de uma nova estirpe híbrida [1, 4]. Temos como exemplo, a coinfeção de vírus influenza humano com suíno gerando vírus recombinados que irão conter segmentos genômicos de RNA das duas espécies virais. Tal híbrido pode causar uma grande epidemia porque a população humana não tem imunidade natural a ele. Uma das dificuldades para o controle da disseminação dos vírus influenza se dá pela existência de diversos reservatórios

animais, especialmente aves e mamíferos, possibilitando o reagrupamento entre genes de vírus que infectam seres humanos e animais. As grandes pandemias foram consequências de variações antigênicas maiores e responsáveis por milhões de mortes nos episódios já citados das Gripes Espanhola, Asiática e de Hong Kong. Os vírus influenza do tipo B apresentam estabilidade antigênica intermediária entre os vírus do tipo A e C, este último mostra-se mais estável e, portanto, menos frequentemente envolvido em epidemias. Os vírus influenza dos tipos B e C – que não dispõem de inúmeros reservatórios animais – não têm apresentado grandes variações genéticas, muito mais frequentes nos vírus influenza do tipo A [1, 4].

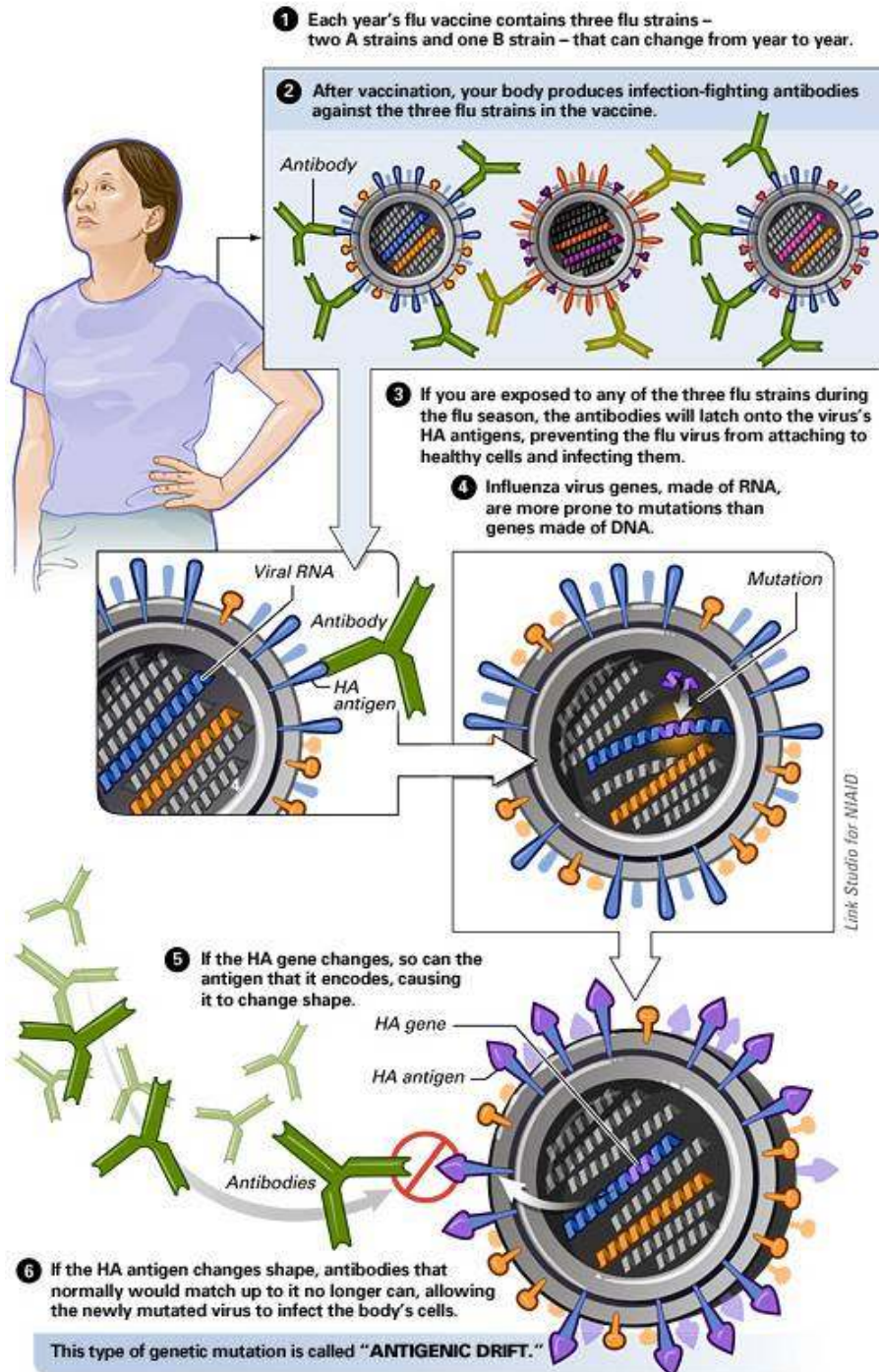


Figura 1. Variação Antigênica Menor ou Antigenic Drift

Fonte: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)



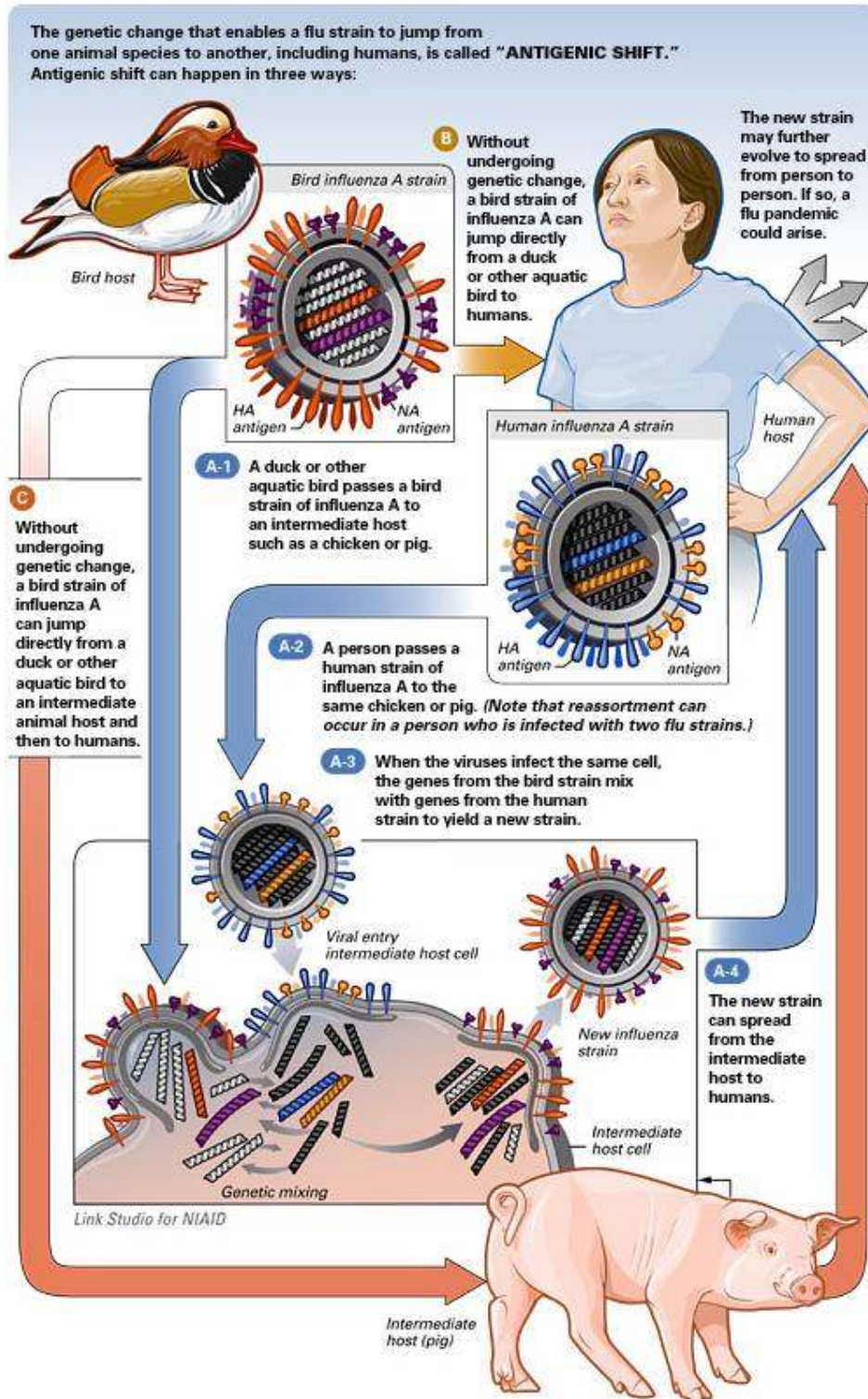


Figura 2. Variação Antigênica Maior ou Antigenic Shift

Fonte: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)

#### 1.4. Transmissão e Quadro Clínico

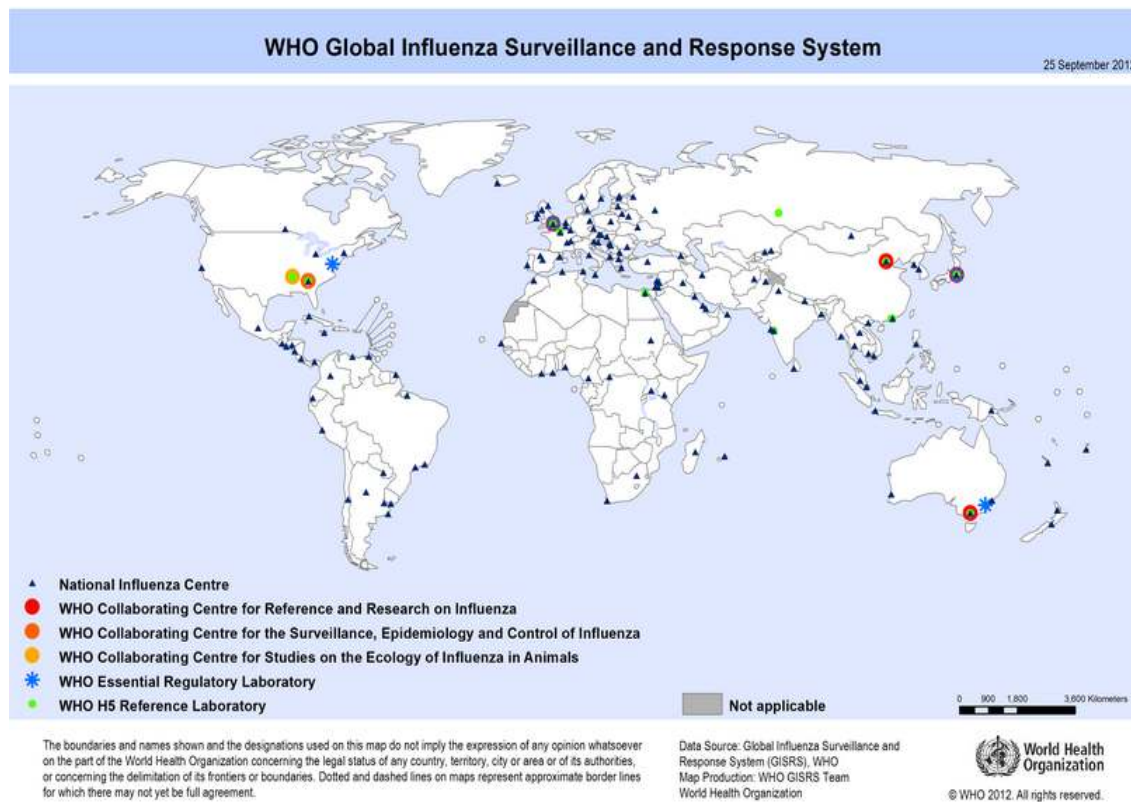
A facilidade de transmissão viral somada às altas taxas de mutação e adaptação do vírus influenza justifica a rápida infestação que é observada anualmente. Os vírus replicam-se nas células epiteliais colunares do trato respiratório superior, agregando-se às secreções respiratórias, sendo transmitidos por pequenas partículas de aerossol geradas durante o ato de espirrar, tossir ou falar e também no contato direto com uma pessoa infectada. O período de incubação do vírus influenza é de 1 a 5 dias e um único indivíduo infectado pode transmitir a doença para grande número de pessoas susceptíveis. O vírus pode ser espalhado antes do início dos sintomas e até sete dias após o aparecimento da sintomatologia [11]. A gravidade da doença é bastante variável, causando desde quadros de rinofaringite leve até pneumonia com complicações fatais. A sintomatologia inclui presença de febre acompanhada de manifestações respiratórias e sintomas sistêmicos, como obstrução nasal, tosse, dores musculares ou fadiga, e auxilia na distinção da infecção pelo vírus influenza de outras infecções respiratórias como o resfriado comum, causado por outros vírus, como o rinovírus. As infecções pelos vírus influenza A dos subtipos H1N1, H2N2 e H3N2 e pelos vírus do tipo B normalmente causam um espectro similar de quadros clínicos. No entanto, a frequência de infecções graves com necessidade de internação ou com complicações fatais é significativamente maior nas infecções causadas pelo vírus influenza do tipo A. [12, 13]. Infecções por vírus influenza são mais graves em crianças menores de dois anos de idade, em decorrência da imaturidade imunológica e do pequeno calibre das vias aéreas. Mais de 1% das infecções por vírus influenza em crianças menores de um ano de idade resulta em hospitalização. A maioria destas ocorre em crianças com

menos de seis meses de idade, ou naqueles portadores de doenças crônicas. A mortalidade varia de 1 a 8%. [14, 15].

### **1.5. Monitoramento Epidemiológico**

O monitoramento epidemiológico dos vírus influenza é fundamental frente à grande repercussão e impacto na saúde da população mundial anualmente. O acompanhamento global do comportamento dos vírus influenza tem sido conduzido pelo Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) da OMS por mais de 50 anos. A GISRS monitora a evolução dos vírus influenza e fornece recomendações relativas a diagnóstico laboratorial, vacinas, drogas antivirais e sua susceptibilidade e estimativas de risco. Também serve como um mecanismo de alerta global para a emergência de vírus com potencial pandêmico. Estabelecida primeiramente em 1952, a rede atualmente compreende seis centros colaboradores da OMS, quatro Laboratórios de Regulação Essencial ou Centros de Referência, localizados em Londres, Atlanta, Melbourne e Tóquio, e 140 instituições em 110 países membros da OMS, que são reconhecidos como Centros Nacionais de Influenza (**Figura 3**). A FluNet, neste contexto, tornou-se uma importante ferramenta para o monitoramento dos vírus influenza. Os dados virológicos registrados neste programa, por exemplo, número de vírus influenza detectados por subtipo, são críticos para o acompanhamento do movimento dos vírus globalmente e interpretação de dados epidemiológicos. Os dados, que estão disponíveis publicamente em tempo real, são disponibilizados pelos Centros Nacionais de Influenza da GISRS e dos laboratórios de colaboração da OMS. [16, 17].



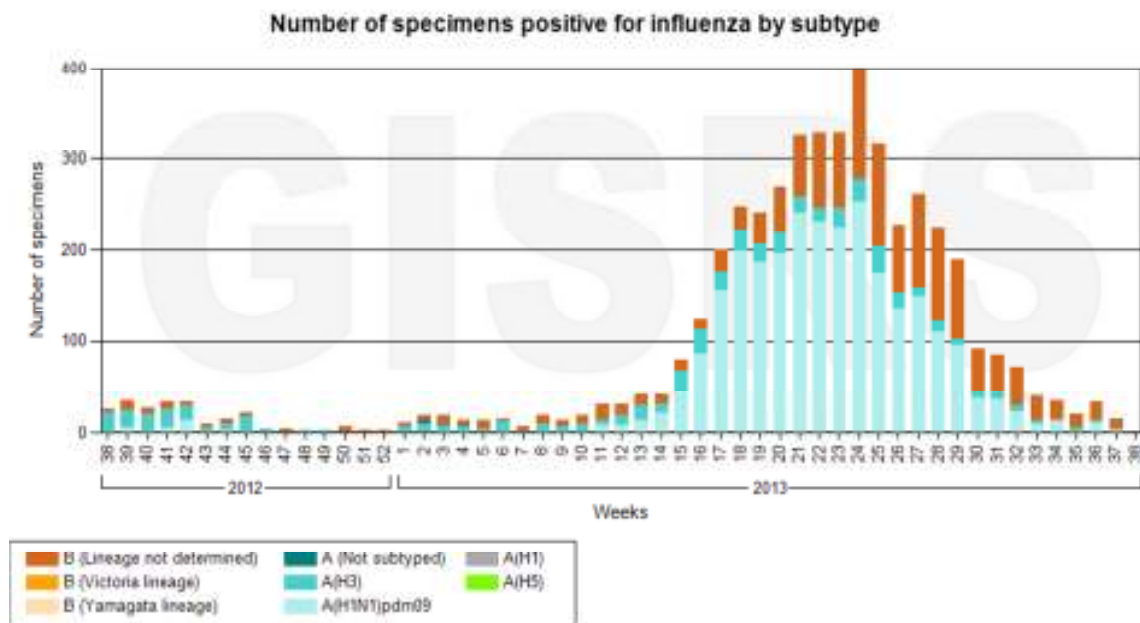


**Figura 3. Centros participantes da GIRS**

**Fonte: [www.who.int/influenza/girs\\_laboratory/national\\_influenza\\_centres](http://www.who.int/influenza/girs_laboratory/national_influenza_centres)**

As cepas de vírus influenza coletadas nas várias regiões do globo são classificadas e catalogadas através de um código oficial da OMS que se baseia em cinco tópicos. O primeiro é o tipo antigênico da nucleoproteína central, tipo A, B ou C; o segundo é o hospedeiro de origem, por exemplo, suíno, equino ou aviário; a origem é humana quando não especificado; o terceiro é a localização geográfica do primeiro isolamento, por exemplo, California, Beijing, Perth ou Sydney; o quarto é o número laboratorial da cepa, atribuído de acordo com a ordem cronológica na qual a cepa foi isolada, e o quinto corresponde ao ano de isolamento. Além disso, para o vírus influenza tipo A, os subtipos de HA e NA são discriminados entre parênteses. Seguindo esta catalogação, a cepa A/Beijing/262/95 (H1N1) é uma variante do tipo A, de origem humana, isolada na cidade de Beijing em 1995, com

antígenos de superfície H1 e N1. Com base nos dados coletados, um comitê reúne-se na OMS duas vezes ao ano para formalizar a recomendação das cepas do vírus influenza a ser incluídas na composição da vacina, para que se obtenha a formulação adequada para a próxima temporada de circulação dos vírus influenza. Ao final do mês de fevereiro de cada ano, os dados epidemiológicos coletados no ano anterior são utilizados para recomendar as cepas de vírus influenza que terão maior chance de causar epidemias no ano subsequente, e que deverão compor a vacina a ser utilizada em países do hemisfério Norte. O mesmo procedimento é realizado no final de setembro em Melbourne, Austrália, para definir a composição da vacina para o hemisfério Sul. A vacina contra o vírus influenza deve ser administrada anualmente nos meses de outono, antes do período epidêmico do vírus, que geralmente ocorre no inverno [18, 19]. Desde 1977, a recomendação para a composição da vacina contra a gripe tem incluído três cepas virais: duas do tipo A, respectivamente dos subtipos H1N1 e H3N2, e uma do tipo B, logo a vacina é considerada trivalente [20]. Na Figura 4, o gráfico mostra os tipos de vírus influenza circulantes no Brasil nos últimos doze meses.



**Figura 4. Pesquisa Laboratorial de Influenza no Brasil nos últimos 12 meses realizada pela GISRS.**

Fonte: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/flunet/charts/en/index.html](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/charts/en/index.html)

## 1.6. Prevenção da infecção pelos vírus influenza

### 1.6.1. Prevenção não vacinal

A prevenção da infecção pelo vírus influenza inicia-se com medidas simples de comportamento e higiene. Lavagem vigorosa e frequente das mãos, principalmente antes de consumir alimentos; utilizar lenço descartável para higiene nasal; cobrir nariz e boca ao tossir ou espirrar e lavar as mãos logo após; não compartilhar objetos de uso pessoal, como utensílios de alimentação e toalhas; manter ambientes bem ventilados; evitar locais aglomerados na época de maior incidência da infecção; evitar contato com indivíduos apresentando sinais e sintomas da infecção; adotar hábitos saudáveis, como hidratação e alimentação balanceada.

Os medicamentos antivirais específicos constituem ferramenta adjuvante das medidas gerais de prevenção e da vacinação. Apresentam taxas de 70-90% de efetividade na prevenção de infecção pelos vírus influenza, porém a quimioprofilaxia indiscriminada não é recomendável, uma vez que pode promover resistência viral. O antiviral deve ser administrado durante a exposição a um caso suspeito ou confirmado de influenza e continuar por sete dias após a última exposição conhecida. A quimioprofilaxia geralmente não é recomendada se a exposição a uma pessoa infectada for maior que 48 horas, pois a eficácia do medicamento é muito reduzida. As indicações de quimioprofilaxia são as seguintes: pessoas com risco elevado de complicações, como gestantes, idosos, crianças menores de dois anos de idade, povos indígenas, portadores de doenças crônicas (pneumopatia, cardiopatia, nefropatia, transtornos neurológicos); portadores de deficiências imunológicas, como em tratamento para neoplasias, síndrome da imunodeficiência adquirida, tratamentos com imunossupressores; trabalhadores da área da saúde não vacinados ou vacinados há menos de 15 dias; residentes de instituições fechadas durante surtos na instituição.

Os antivirais disponíveis para quimioprofilaxia são o fosfato de oseltamivir (Tamiflu®) e zanamivir (Relenza®), inibidores da neuraminidase de segunda geração, agindo contra os vírus influenza dos tipos A e B. Foram licenciados pelas autoridades sanitárias brasileiras e encontram-se disponíveis no mercado desde 2000. O fosfato de oseltamivir está licenciado no Brasil para o tratamento de infecção por influenza não complicada em indivíduos maiores que um ano de idade apresentando sintomas gripais há menos de 48 horas. A dose utilizada em crianças é conforme o peso, de 12 em 12 horas por cinco dias, e em adultos a dose é de 75mg de 12 em 12 horas por cinco dias. A indicação de zanamivir somente é

autorizada nos casos de impossibilidade clínica de manutenção do fosfato de oseltamivir por efeitos colaterais. Zanamivir é contraindicado em menores de cinco anos de idade e em pacientes com doença respiratória crônica pelo risco de broncoespasmo [21].

### **1.6.2. Prevenção vacinal**

O contínuo impacto causado pelos vírus influenza, tanto em indivíduos de risco - portadores de patologias crônicas e imunodeficiências, idosos e crianças com menos de dois anos de idade -, como na população geral, vem motivando o desenvolvimento de novas abordagens para sua prevenção e controle. Dentre elas, o desenvolvimento de uma vacina nasal de vírus atenuado, o surgimento de vacinas inativadas contendo adjuvantes, vacinas produzidas em culturas de células ao invés de ovos embrionados de galinha e estratégias de vacinação de toda a população, visando à redução da transmissibilidade e consequentemente dos prejuízos com despesas médicas e diminuição da produtividade e absenteísmo relacionados à doença. Baseado nas recomendações da OMS não só relacionadas à composição da vacina, mas também orientando quais os principais grupos alvo para a vacinação, as autoridades de saúde de cada país formulam políticas específicas para seus programas de imunização. No Brasil, a recomendação oficial para a vacinação contra influenza teve início direcionada aos idosos. Em 1999, o Ministério da Saúde incluiu no programa nacional de imunização a vacinação contra influenza para indivíduos com mais de 65 anos de idade, alcançando cobertura vacinal acima de 80% em todo o país. Atualmente, há campanhas anuais de vacinação contra a gripe, com orientação de vacinação da população de faixa etária de 60 anos ou mais, trabalhadores da área da saúde, crianças de 6 meses a 2 anos de idade, gestantes, povos indígenas e portadores de comorbidades a critério médico [22]. Em 2013 no Brasil, 29.133.547 habitantes foram

vacinados contra influenza (91.55% da população brasileira), dentre eles 4.269.211 crianças (97.65% da população infantil) [23]. O grau de proteção após a imunização depende da combinação antigênica entre os antígenos vacinais e aqueles circulantes na comunidade para aquela temporada.

#### **1.6.2.1. Vacinas Inativadas**

As vacinas inativadas são produzidas pela propagação do vírus em ovos embrionados de galinha. O fluido alantóico é retirado e o vírus é concentrado e altamente purificado, após é inativado com formaldeído. As vacinas podem conter traços residuais de proteínas do ovo, portanto não devem ser administradas a pessoas com hipersensibilidade. A vacina está disponível nas formas de vírus inteiro, fracionada e subunitária. A vacina de vírus inteiro é composta pela partícula viral inteira, inclusive lipídeos da membrana da célula do hospedeiro, apresentando elevada imunogenicidade e reatogenicidade, principalmente na ocorrência de febre, não sendo assim aprovada para crianças e não é mais utilizada no Brasil. Na vacina fracionada, os componentes virais são fragmentados por tratamento com agentes químicos e depois purificados. Constituem a vacina a HA, a NA e nucleoproteínas. Apresenta imunidade adequada e menores taxas de reatogenicidade, sendo seu uso aprovado para crianças. Já a vacina subunitária é constituída apenas por HA e NA, também possui taxas satisfatórias de imunidade e é a menos reatogênica [24]. De modo geral, ambas as vacinas inativadas disponíveis no Brasil, fracionada e subunitária, induzem resposta sorológica semelhante [25]. O esquema de imunização para crianças recomendado pela Academia Americana de Pediatria (AAP) e pelo Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) é apresentado na **Tabela 1** [26]. O modo de administração é por via intramuscular, na dose de 0.5 mL para adultos, idosos e crianças com mais de 36 meses de

idade, enquanto crianças com idade entre 6 e 35 meses devem receber dose de 0.25 mL intramuscular. Crianças entre seis meses e oito anos de idade que estão recebendo a vacina influenza pela primeira vez devem receber duas doses da vacina com, pelo menos, quatro semanas de intervalo entre as doses. Este esquema de dose padronizado nos Estados Unidos da América (EUA) tem como base a imunogenicidade e reatogenicidade da vacina de acordo com a faixa etária.

**Tabela 1. Recomendações para administração da vacina inativada contra influenza conforme faixa etária.**

FAIXA ETÁRIA	DOSE	NÚMERO DE DOSES
6-35 meses	0,25 ml	1 ou 2
3-8 anos	0,5 ml	1 ou 2
9-12 anos	0,5 ml	1
>12 anos	0,5 ml	1

Após a aplicação da vacina inativada, as reações adversas mais frequentes ocorrem no sítio de aplicação, como dor e vermelhidão no local da injeção, sendo autolimitadas e presentes em até 15% dos vacinados. Reações sistêmicas como febre, mialgia e outras manifestações sistêmicas são menos frequentes e também de curta duração, sendo observadas em 1% a 2% dos vacinados. Reações graves como anafilaxia ou Síndrome de Guillan-Barré mostram-se extremamente raras [27].

### **1.6.2.2. Vacina Atenuada**

A vacina contra influenza contendo vírus atenuados, licenciada nos EUA desde 2003 para indivíduos de 2 a 49 anos de idade, vem demonstrando excelentes resultados no que se refere à sua eficácia, segurança e facilidade de aplicação [28-31]. A produção da vacina atenuada leva em consideração a natureza segmentada do genoma viral por recombinação de uma cepa doadora com um tipo de vírus selvagem. Ela contém os genes que codificam as glicoproteínas de superfície (HA e NA) do vírus selvagem e seis segmentos internos remanescentes da cepa doadora atenuada (PB1, PB2, PA, M, NP e NS). As duas cepas doadoras utilizadas nos EUA para produção da vacina atenuada são A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) e B/Ann Arbor/1/66. A vacina atenuada também é produzida a partir da infecção de ovos de galinha embrionados com o vírus selvagem e doador na presença de anticorpos contra as glicoproteínas de superfície da cepa doadora [32-34]. A meta da vacinação com vírus vivo atenuado é induzir resposta imune secretória local e sistêmica que se aproxime da resposta imune observada após infecção natural pelo vírus influenza. A vacina atenuada atualmente disponível é geneticamente estável, não-transmissível, segura e imunogênica. Sua administração é feita por via intranasal, com dose de 0,1mL em cada narina. Em crianças menores de dois anos de idade a vacina de vírus vivo atenuado não é licenciada, pois um estudo demonstrou taxas significativamente aumentadas de sibilância e hospitalização pós-vacinação [31], assim como para adultos com mais de 49 anos, pois, em uma análise post hoc, a eficácia não foi demonstrada em indivíduos entre 50 e 64 anos [35]. Após aplicação da vacina de vírus atenuado, as reações adversas incluem congestão nasal, rinorréia, febre e dores musculares [31].



### **1.6.2.3. Considerações gerais sobre vacinação**

Estudos recentes demonstraram que, não somente crianças com comorbidades, mas também crianças saudáveis podem experimentar morbidade e mortalidade significativas quando infectadas pelo vírus influenza [36-41]. Diversos estudos têm demonstrado os benefícios da vacinação generalizada de crianças, entre eles, a diminuição da incidência de otite média, bem como do consumo de antibióticos, além de diminuição de absenteísmo escolar e transmissão para familiares em ambiente domiciliar [42-44]. Frente a essas colocações, somado ao advento da vacina de vírus atenuado, de mais fácil administração e eficácia comparável a de vírus inativado, o debate sobre a universalização da imunização em crianças saudáveis de todas as idades vem aumentando progressivamente.

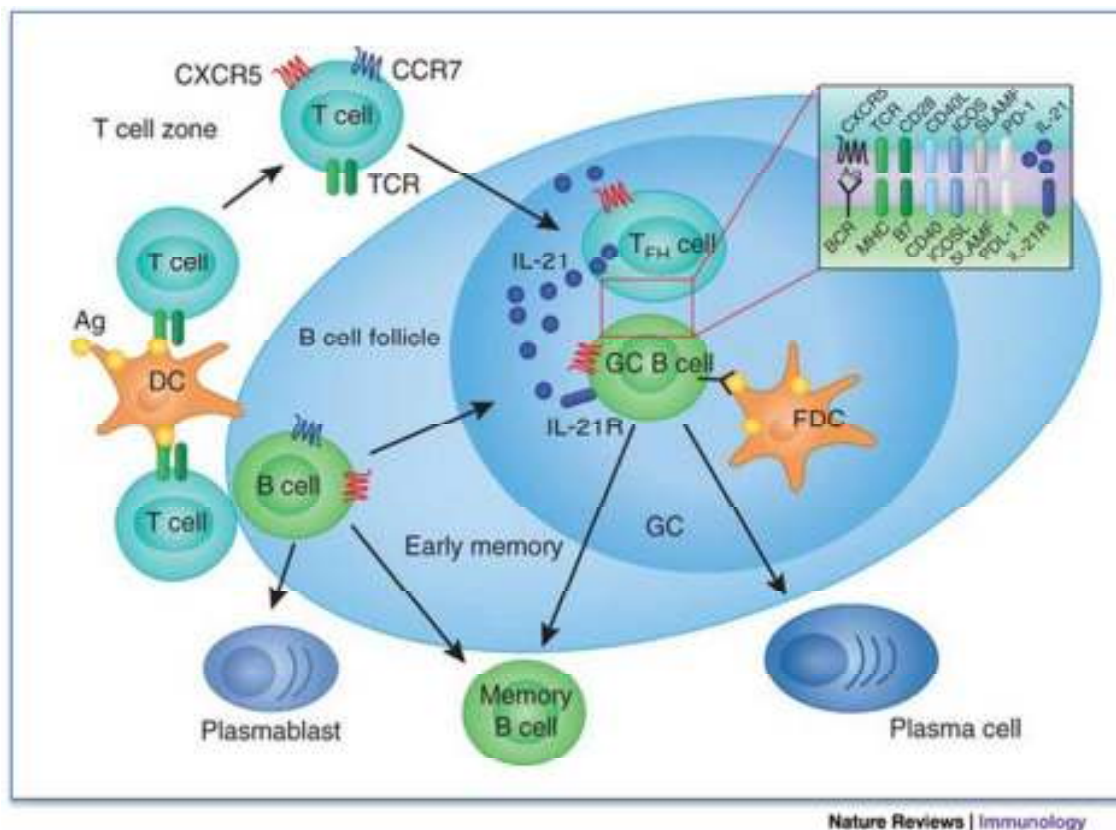
A vacinação anual contra a influenza é recomendada nos EUA para todos os indivíduos com idade igual ou maior a seis meses de idade desde 2010 pelo ACIP [45]. Existem dois tipos de vacinação para influenza aprovados para imunização de crianças nos EUA, a vacina de vírus inativado ou TIV (Trivalent Inactivated Vaccine), licenciada para todas as crianças com idade igual ou maior a seis meses, e a vacina de vírus atenuado ou LAIV (Live Attenuated Influenza Vaccine), licenciada para crianças com idade maior que dois anos. Ambas as vacinas são trivalentes, ou seja, contêm dois tipos de vírus influenza A (H1N1 e H3N2) e um tipo de vírus influenza B, e demonstraram ser eficazes na prevenção do desenvolvimento da doença em crianças em múltiplos estudos placebo-controle. [46, 47]. Alguns estudos têm demonstrado, no entanto, que a formulação LAIV tem eficácia maior contra infecção por influenza confirmada com cultura em crianças quando comparado com a formulação TIV [46, 48-50]. Um estudo conduzido por Ambrose e colaboradores mostrou que a durabilidade da proteção induzida pela vacina LAIV em crianças parece ser maior,

enquanto Beyer e colaboradores mostrou que a vacina LAIV confere proteção apesar da sua habilidade limitada em produzir títulos de anticorpos séricos [51, 52]. Globalmente, os dados sugerem que LAIV tem vantagem naqueles com imunidade prévia limitada ao vírus influenza e que TIV tem vantagem entre aqueles com maior exposição prévia. A eficácia da vacinação é avaliada quando, após a imunização, as taxas de infecção pelos vírus contidos na vacina são baixas, ou seja, quando existe coincidência entre as variantes do vírus influenza em circulação na comunidade e aquelas contidas na vacina.

### **1.7. Mecanismos imunológicos da vacinação**

A resposta imune típica é baseada na recirculação de células imunes preexistentes e na produção de anticorpos de alta afinidade, que provêm a base para a imunidade adaptativa e avaliação de eficácia da vacinação. Os linfócitos são diferenciados pela expressão de diferentes citocinas em zonas de células B ou T. Os centros germinativos (CG), localizados nos órgãos linfóides secundários, são o local onde linfócitos B e T encontram-se para promover proliferação e diferenciação das células B [53]. Células T CD4<sup>+</sup> auxiliam na promoção e manutenção das reações nos centros germinativos (CG), hipermutações somáticas, redirecionamento de células B de memória preexistentes e a geração de plasmócitos antígeno-específicos de vida longa [54, 55] (Figura 5). A diferenciação final em plasmócitos depende da atuação coordenada de fatores transcricionais, direcionando células B naïve e de memória a formar plasmócitos de vida curta e longa, respectivamente, as principais células produtoras de anticorpos do sistema imune [56]. Células B transitórias representam uma fase transitória da diferenciação entre células B imaturas da medula óssea e células B periféricas maduras, e acredita-se que elas representem um

compartimento de seleção negativa a células B autorreativas, uma vez que somente uma porção das células B imaturas sobrevivem para atingir o estado de células B naive maduras [57].



**Figura 5: Ilustração de um Centro Germinativo (CG).** Células T antígeno-específicas ativam quimiocinas, como CXCR5 e CCR7, e migram para os folículos das células B. Após interagir com as células B, elas maturam e se transformam em células T auxiliares foliculares (Tfh). No CG, células Tfh interagem com células B do CG através de pareamentos moleculares, incluindo CD40-ligand e ICOS, o que culmina na secreção de citocinas pelas células T, particularmente interleucina 4 (IL-4) e interleucina 21 (IL-21), recebidas pelas células B como estímulo à diferenciação em células B de memória maduras e plasmócitos de vida-longa, respectivamente. **Fonte: Nutt S et al. Nature Imm 2011.**

Após a imunização, células B naïve e de memória antígeno-específicas são ativadas no local da imunização e migram para os linfonodos de drenagem local, onde elas proliferam e diferenciam-se em plasmoblastos dentro dos CG. Após um curto período de tempo, geralmente 6-8 dias, os plasmoblastos deixam o CG para adentrar a circulação e migrar para tecidos específicos onde eles se desenvolvem em plasmócitos [58-61]. Outros plasmoblastos dirigem-se a diferentes sítios mucosos incluindo o trato respiratório, e secretam anticorpos de mucosa que estão diretamente envolvidos na proteção de infecções respiratórias. Os títulos de anticorpos produzidos por essas populações específicas de células B são mensurados através do tradicional ensaio de inibição da hemaglutinação (HAI), considerado padrão-ouro, e do ensaio de neutralização viral (VNA), este com maior sensibilidade, que detecta anticorpos funcionais contra os epitopos específicos dos vírus influenza no soro de pessoas imunizadas. De acordo com o Food and Drug Administration (FDA), soroconversão pode ser definida por um título de hemaglutinação maior ou igual a 1:40 ou um mínimo de aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos pós-vacinação, quando comparado com os títulos pré-vacinação.

Imunização com vacinas inativadas contra influenza resulta em resposta imune sistêmica e local. Entre 15 a 30 dias pós-vacinação, 90% dos vacinados apresentam títulos protetores de anticorpos séricos [62]. A resposta sérica é composta basicamente por anticorpos IgG influenza-específicos, com menores concentrações de anticorpos IgM e IgA [63, 64]. Os anticorpos produzidos pós-vacinação são específicos para aquele subtipo viral, porém podem ter reação cruzada, promovendo proteção para cepas antigas ou novas. A vacina inativada estimula resposta imune contra as glicoproteínas de superfície virais (HA e NA) e a resposta imune local é induzida nas tonsilas e saliva. Predominantemente, células

secretoras de anticorpos (CSA) influenza-específicas do tipo IgG e IgA foram detectadas no sangue periférico e tonsilas, com pico em torno de uma semana pós-vacinação [65].

A meta da utilização das vacinas atenuadas é induzir resposta sistêmica e secretória semelhante à resposta imune obtida após infecção natural. Vacinas atenuadas contra influenza induzem resposta imune local e sistêmica e, uma vez que a vacina é administrada por via intranasal, a replicação viral é limitada ao trato respiratório superior e inferior [66]. A resposta primária à vacina atenuada é caracterizada por anticorpos séricos IgA e IgM com pico após duas semanas da imunização e declínio após quatro semanas, enquanto a resposta de anticorpos IgG tem seu pico 4-12 semanas pós-vacinação e é sustentada por aproximadamente um ano. Também induzem anticorpos no lavado nasal, particularmente IgA, com pico de 2-11 semanas pós-vacinação com declínio gradual geralmente seis meses pós-vacinação [67]. Existe relação positiva entre anticorpos séricos e nasais, sendo que altos títulos nasais são observados em indivíduos com alta titulação sérica. Geralmente, crianças soronegativas apresentam maior resposta sérica que adultos pós-imunização, enquanto crianças soropositivas mais frequentemente desenvolvem resposta local mensurada no lavado nasal, do que resposta sérica mensurada por HAI e VNA [68, 69].

Nakaya e colaboradores [70] mostraram em uma coorte de adultos vacinados com TIV e LAIV que a produção de anticorpos mensurados por HAI 28 dias pós-vacinação foi seis vezes maior nos recipientes de TIV comparado a LAIV. Também mostraram que houve rápida expansão clonal de plasmoblastos sete dias pós-vacinação com TIV mensurados em sangue periférico por citometria de fluxo. Outro achado relevante desse estudo foi a observação de que ambas as vacinas induziram diferente expressão gênica; a expressão de diversos genes relacionados ao interferon (IFN) estava alterada três dias pós-vacinação com

LAIV, mas não após vacinação com TIV. Sasaki e colaboradores [71] mostraram que CSA específicas para o vírus influenza mensuradas por ELISPOT eram detectáveis 7 e 12 dias após vacinação com TIV ou LAIV em adultos e crianças. Este foi o primeiro estudo mostrando detecção de CSA em indivíduos vacinados com LAIV, e está de acordo com estudos prévios em que adultos vacinados com TIV tiveram resposta de CSA detectada 4 a 15 dias pós-vacinação com pico de 7 a 8 dias [72, 73]. Também mostram que a produção de anticorpos mensurada por HAI após vacinação com LAIV foi significativamente menor que após vacinação com TIV. Alguns estudos sugerem que a forma mais adequada de acessar produção de anticorpos após vacinação com LAIV seja através da mensuração dos mesmos em lavado nasal, uma vez que a vacina contém vírus vivo atenuado que, quando administrado na mucosa nasal, deve infectar e replicar nas células de revestimento da nasofaringe para induzir imunidade [74].

## 2. JUSTIFICATIVA

---

Apesar de seu comprovado sucesso em prevenir doenças infectocontagiosas, a grande maioria das vacinas utilizadas hoje para imunização de humanos foi desenvolvida empiricamente, muitas vezes com escasso entendimento dos mecanismos imunológicos pelos quais elas induzem imunidade protetora. Acredita-se que a maioria das vacinas confere proteção através de anticorpos neutralizadores, que são correlacionados à proteção contra diversos tipos virais. Estudos pontuam o papel de células T na imunidade induzida pelas vacinas, evidenciando que diferentes estímulos induzem respostas de classes distintas de células T auxiliares, programadas pelas células dendríticas. Após a imunização, células T auxiliares foliculares produzem interleucinas que auxiliam na diferenciação de células B e geração de células B de memória e plasmócitos, as principais células produtoras de anticorpos do sistema imune [75].

A maioria dos estudos clínicos em vacinação contra influenza prioriza a resposta a anticorpos, enquanto a imunidade celular é menos frequentemente investigada. Não obstante, alcançar títulos altos e sustentados de anticorpos de alta afinidade através da imunização requer resposta imune inata e adaptativa coordenadas, incluindo o suporte de células B mediado por células T CD4<sup>+</sup>. Imunização para os vírus influenza ativa células B de memória de vida longa, através de CSA ou células B de memória recirculantes que estavam quiescentes. A presença dessas células e altos títulos de anticorpos específicos para a HA do vírus H1N1 pandêmico de 1918 entre indivíduos nascidos em, ou antes, desta pandemia, que ainda não haviam sido expostos ao vírus pandêmico de 2009, sugere persistência de memória por quase um século [76].

Uma vez que há poucos estudos na literatura mostrando os mecanismos de imunidade celular pelos quais as duas vacinas, LAIV e TIV, conferem proteção contra os vírus influenza em crianças, conduzimos um ensaio clínico randomizado controlado não cegado para acessar a resposta imune de células B a ambas as formulações e os títulos de anticorpos gerados após a imunização. Também mostramos as mudanças na expressão de perfis gênicos após a imunização com LAIV e TIV.



## 3. OJETIVOS

---

### 3.1. Objetivo Geral:

Avaliar as diferenças na resposta imune à vacinação contra os vírus influenza, utilizando duas formulações disponíveis nos EUA, a vacina inativada injetável (TIV) e a vacina atenuada intranasal (LAIV), em uma coorte de crianças recrutadas na cidade de Columbus, Ohio, EUA.

### 3.2. Objetivos Específicos:

Avaliar e comparar a resposta imune da população de células B, mensurada no sangue periférico das crianças recrutadas, às duas vacinas através do método de citometria de fluxo.

Mensurar a produção de anticorpos específicos para o vírus influenza no soro das crianças pré e pós-vacinação através dos ensaios de Inibição da Hemaglutinação e da Neutralização Viral.

Avaliar os perfis de expressão gênica gerados após imunização com ambas as vacinas através do método de microarranjos, a fim de pesquisar biomarcadores específicos gerados pelas diferentes formulações.

## 4. REFERÊNCIAS

---

1. Cox, N.J. and K. Subbarao, *Influenza*. Lancet, 1999. 354(9186): p. 1277-82.
2. Salazar, M.I., et al., [The origin of the genetic variability of influenza viruses]. Gac Med Mex. 146(3): p. 199-206.
3. Barik, S., *New treatments for influenza*. BMC Med. 10: p. 104.
4. Cox, N.J. and K. Fukuda, *Influenza*. Infect Dis Clin North Am, 1998. 12(1): p. 27-38.
5. Oliveira, W., et al., *Pandemic H1N1 influenza in Brazil: analysis of the first 34,506 notified cases of influenza-like illness with severe acute respiratory infection (SARI)*. Euro Surveill, 2009. 14(42).
6. Grais, R.F., J.H. Ellis, and G.E. Glass, *Assessing the impact of airline travel on the geographic spread of pandemic influenza*. Eur J Epidemiol, 2003. 18(11): p. 1065-72.
7. Massad, E., et al., *The risk of acquiring the new influenza A(H1N1) for Brazilian travelers to Chile, Argentina and the USA*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 105(2): p. 179-83.
8. Codeco, C.T., et al., *The epidemic wave of influenza A (H1N1) in Brazil, 2009*. Cad Saude Publica. 28(7): p. 1325-36.
9. Hancock, K., et al., *Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus*. N Engl J Med, 2009. 361(20): p. 1945-52.
10. Rizzo, C., et al., *Cross-reactive antibody responses to the 2009 A/H1N1v influenza virus in the Italian population in the pre-pandemic period*. Vaccine. 28(20): p. 3558-62.
11. Belshe, R.B., et al., *Correlates of immune protection induced by live, attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine*. J Infect Dis, 2000. 181(3): p. 1133-7.
12. Lul, K.-J. and A.P. Kendal, *Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985*. American journal of public health, 1987. 77(6): p. 712-716.
13. Simonsen, L., et al., *The impact of influenza epidemics on mortality: introducing a severity index*. Am J Public Health, 1997. 87(12): p. 1944-50.
14. Neuzil, K.M., et al., *The effect of influenza on hospitalizations, outpatient visits, and courses of antibiotics in children*. N Engl J Med, 2000. 342(4): p. 225-31.
15. Munoz, F.M., *The impact of influenza in children*. Semin Pediatr Infect Dis, 2002. 13(2): p. 72-8.
16. Hannoun, C., *Role of international networks for the surveillance of influenza*. Eur J Epidemiol, 1994. 10(4): p. 459-61.
17. [www.who.int/influenza](http://www.who.int/influenza). [cited].
18. Pickering, L.K., et al., *Immunization programs for infants, children, adolescents, and adults: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America*. Clinical Infectious Diseases, 2009. 49(6): p. 817-840.
19. *Report of the Committee on Infectious Diseases, in Red Book*. 2006. p. 401-11.
20. Organization, W.H., *Weekly Epidemiological Record*. 2000. p. 281-88.
21. Treanor, J.J., et al., *Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza*. JAMA: the journal of the American Medical Association, 2000. 283(8): p. 1016-1024.
22. [cited; Available from: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_tecnico\\_campanha\\_influenza\\_2012.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tecnico_campanha_influenza_2012.pdf).
23. <http://pni.datasus.gov.br>. [cited].
24. Bridges, C.B., et al., *Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*. MMWR. Recommendations and reports:

- Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports/Centers for Disease Control, 2003. 52(RR-8): p. 1.
25. Beyer, W.E.P., A.M. Palache, and A. Osterhaus, *Comparison of serology and reactogenicity between influenza subunit vaccines and whole virus or split vaccines*. Clinical drug investigation, 1998. 15(1): p. 1-12.
  26. *Recommended childhood and adolescent immunization schedule--United States, 2013*. Pediatrics. 131(2): p. 397-8.
  27. Nichol, K.L., et al., *Side effects associated with influenza vaccination in healthy working adults. A randomized, placebo-controlled trial*. Arch Intern Med, 1996. 156(14): p. 1546-50.
  28. Belshe, R.B., et al., *The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenzavirus vaccine in children*. N Engl J Med, 1998. 338(20): p. 1405-12.
  29. Bergen, R., et al., *Safety of cold-adapted live attenuated influenza vaccine in a large cohort of children and adolescents*. Pediatr Infect Dis J, 2004. 23(2): p. 138-44.
  30. Piedra, P.A., et al., *Live attenuated influenza vaccine, trivalent, is safe in healthy children 18 months to 4 years, 5 to 9 years, and 10 to 18 years of age in a community-based, nonrandomized, open-label trial*. Pediatrics, 2005. 116(3): p. e397-e407.
  31. Belshe, R.B., C.S. Ambrose, and T. Yi, *Safety and efficacy of live attenuated influenza vaccine in children 2-7 years of age*. Vaccine, 2008. 26 Suppl 4: p. D10-6.
  32. Murphy, B.R. and K. Coelingh, *Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines*. Viral immunology, 2002. 15(2): p. 295-323.
  33. Wareing, M.D. and G.A. Tannock, *Live attenuated vaccines against influenza; an historical review*. Vaccine, 2001. 19(25): p. 3320-3330.
  34. Palese, P. and A. García-Sastre, *Influenza vaccines: present and future*. Journal of Clinical Investigation, 2002. 110(1): p. 9-13.
  35. Ambrose, C.S., M.J. Levin, and R.B. Belshe, *The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults*. Influenza Other Respi Viruses, 2011. 5(2): p. 67-75.
  36. Principi, N., et al., *Burden of influenza in healthy children and their households*. Arch Dis Child, 2004. 89(11): p. 1002-7.
  37. Principi, N., et al., *Socioeconomic impact of influenza on healthy children and their families*. Pediatr Infect Dis J, 2003. 22(10 Suppl): p. S207-10.
  38. Iskander, M., R. Booy, and S. Lambert, *The burden of influenza in children*. Curr Opin Infect Dis, 2007. 20(3): p. 259-63.
  39. Esposito, S., P. Marchisio, and N. Principi, *The global state of influenza in children*. Pediatr Infect Dis J, 2008. 27(11 Suppl): p. S149-53.
  40. Poehling, K.A., et al., *The underrecognized burden of influenza in young children*. N Engl J Med, 2006. 355(1): p. 31-40.
  41. Poehling, K.A., et al., *The burden of influenza in young children, 2004-2009*. Pediatrics. 131(2): p. 207-16.
  42. Belshe, R.B. and W.C. Gruber, *Prevention of otitis media in children with live attenuated influenza vaccine given intranasally*. Pediatr Infect Dis J, 2000. 19(5 Suppl): p. S66-71.
  43. Vesikari, T., et al., *Safety, efficacy, and effectiveness of cold-adapted influenza vaccine-trivalent against community-acquired, culture-confirmed influenza in young children attending day care*. Pediatrics, 2006. 118(6): p. 2298-312.
  44. Block, S.L., et al., *The efficacy of live attenuated influenza vaccine against influenza-associated acute otitis media in children*. Pediatr Infect Dis J, 2011. 30(3): p. 203-7.
  45. Fiore, A.E., et al., *Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010*. MMWR Recomm Rep, 2010. 59(RR-8): p. 1-62.

46. Rhorer, J., et al., *Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children: A meta-analysis of nine randomized clinical trials*. *Vaccine*, 2009. 27(7): p. 1101-10.
47. Zangwill, K.M. and R.B. Belshe, *Safety and efficacy of trivalent inactivated influenza vaccine in young children: a summary for the new era of routine vaccination*. *Pediatr Infect Dis J*, 2004. 23(3): p. 189-97.
48. Ashkenazi, S., et al., *Superior relative efficacy of live attenuated influenza vaccine compared with inactivated influenza vaccine in young children with recurrent respiratory tract infections*. *Pediatr Infect Dis J*, 2006. 25(10): p. 870-9.
49. Fleming, D.M., et al., *Comparison of the efficacy and safety of live attenuated cold-adapted influenza vaccine, trivalent, with trivalent inactivated influenza virus vaccine in children and adolescents with asthma*. *Pediatr Infect Dis J*, 2006. 25(10): p. 860-869.
50. Belshe, R.B., et al., *Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children*. *N Engl J Med*, 2007. 356(7): p. 685-96.
51. Beyer, W., et al., *Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy: a meta-analysis*. *Vaccine*, 2002. 20(9): p. 1340-1353.
52. Ambrose, C.S., X. Wu, and R.B. Belshe, *The efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in children as a function of time postvaccination*. *Pediatr Infect Dis J*, 2010. 29(9): p. 806-11.
53. Nutt, S.L. and D.M. Tarlinton, *Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends?* *Nat Immunol*, 2011. 12(6): p. 472-7.
54. Lanzavecchia, A., *Antigen-specific interaction between T and B cells*. *Nature*, 1985. 314(6011): p. 537-9.
55. Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster, *Germinal-center organization and cellular dynamics*. *Immunity*, 2007. 27(2): p. 190-202.
56. Calame, K.L., *Plasma cells: finding new light at the end of B cell development*. *Nat Immunol*, 2001. 2(12): p. 1103-8.
57. Palanichamy, A., et al., *Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy*. *J Immunol*, 2009. 182(10): p. 5982-93.
58. El-Madhun, A.S., et al., *Systemic and mucosal immune responses in young children and adults after parenteral influenza vaccination*. *Journal of Infectious Diseases*, 1998. 178(4): p. 933-939.
59. Sasaki, S., et al., *Influence of prior influenza vaccination on antibody and B-cell responses*. *PLoS One*, 2008. 3(8): p. e2975.
60. Wrammert, J., et al., *Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus*. *Nature*, 2008. 453(7195): p. 667-71.
61. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, *Plasma-cell homing*. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(10): p. 822-9.
62. Manz, R.A., et al., *Humoral immunity and long-lived plasma cells*. *Curr Opin Immunol*, 2002. 14(4): p. 517-21.
63. Zuckerman, M., et al., *Rapid immune response to influenza vaccination*. *Lancet*, 1993. 342(8879): p. 1113.
64. Brokstad, K.A., et al., *Parenteral influenza vaccination induces a rapid systemic and local immune response*. *J Infect Dis*, 1995. 171(1): p. 198-203.
65. Brokstad, K.A., et al., *Cross-reaction but no avidity change of the serum antibody response after influenza vaccination*. *Vaccine*, 1995. 13(16): p. 1522-1528.
66. Abramson, J.S., *Intranasal, cold-adapted, live, attenuated influenza vaccine*. *Pediatr Infect Dis J*, 1999. 18(12): p. 1103-4.
67. Clements, M. and B.R. Murphy, *Development and persistence of local and systemic antibody responses in adults given live attenuated or inactivated influenza A virus vaccine*. *Journal of clinical microbiology*, 1986. 23(1): p. 66-72.

68. Boyce, T.G., et al., *Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults*. *Vaccine*, 2000. 19(2-3): p. 217-26.
69. Gruber, W.C., et al., *Live attenuated and inactivated influenza vaccine in school-age children*. *Am J Dis Child*, 1990. 144(5): p. 595-600.
70. Nakaya, H.I., et al., *Systems biology of vaccination for seasonal influenza in humans*. *Nat Immunol*, 2011. 12(8): p. 786-95.
71. Sasaki, S., et al., *Comparison of the influenza virus-specific effector and memory B-cell responses to immunization of children and adults with live attenuated or inactivated influenza virus vaccines*. *J Virol*, 2007. 81(1): p. 215-28.
72. Brokstad, K.A., et al., *Parenteral vaccination against influenza does not induce a local antigen-specific immune response in the nasal mucosa*. *J Infect Dis*, 2002. 185(7): p. 878-84.
73. Cox, R.J., et al., *An early humoral immune response in peripheral blood following parenteral inactivated influenza vaccination*. *Vaccine*, 1994. 12(11): p. 993-999.
74. Clements, M.L., et al., *Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type virus*. *J Clin Microbiol*, 1986. 24(1): p. 157-60.
75. Crotty, S., *Follicular Helper CD4 T Cells (T<sub>fh</sub>)*. *Annual review of immunology*. 29: p. 621-663.
76. Yu, X., et al., *Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors*. *Nature*, 2008. 455(7212): p. 532-6.

## *Capítulo II*

---

# 1. MÉTODOS

---

## 1.1. Sujeitos recrutados, protocolos de vacinação e coleta de amostras.

Esta foi uma coorte prospectiva de crianças previamente híginas recrutadas entre outubro de 2011 e fevereiro de 2012 no Nationwide Children's Hospital, em Columbus, Ohio, EUA. Trinta e sete sujeitos foram randomizados para receber uma dose de LAIV (FluMist®, MedImmune) (n= 20) ou TIV (Fluzone®, Sanofi Pasteur) (n= 17). Duas exceções aplicaram-se à randomização: quatro crianças com idade entre 6 meses e 2 anos de idade receberam TIV, uma vez que LAIV não é licenciada nesse grupo etário, e quatro crianças com asma controlada também receberam TIV conforme as recomendações do Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Uma criança com 6 meses de idade ao recrutamento recebeu 2 doses da vacina com 4 semanas de intervalo, uma vez que foi sua primeira vacinação contra influenza. Os dados demográficos dos sujeitos recrutados estão apresentados na **Tabela 2**. Os critérios de inclusão eram crianças previamente híginas com idade entre 6 meses e 14 anos. Critérios de exclusão compreendiam comorbidades médicas ou condições crônicas (doença pulmonar, renal e/ou cardíaca), uso de esteróides sistêmicos nas duas semanas prévias ao recrutamento, imunodeficiências congênitas ou adquiridas. Nenhum dos sujeitos recrutados apresentava alergia aos componentes da vacina ou alergia a ovos ou produtos. O protocolo de estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Nationwide Children's Hospital. Consentimento informado livre e esclarecido foi obtido de um dos pais ou guardião legal de todos os participantes.

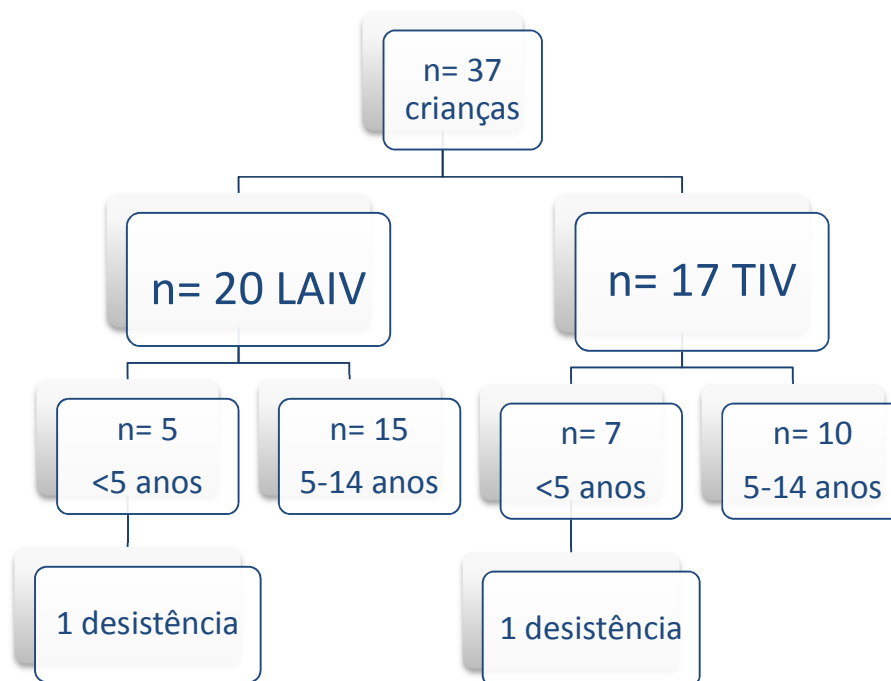
Tabela 2: Dados demográficos dos sujeitos recrutados

	LAIV (n=20)	TIV (n=17)	Valor de p
<b>Idade, média (std) mediana [IQR]</b>	9,89 (4,6) 11,44 [4,2-14,0]	8,47 (4,98) 10,94 [3,7-12,9]	0,24*
<b>Grupos, n (%) de 5-14 anos &lt;5 anos</b>	15 (75) 5 (25)	10 (58,9) 7 (41,2)	0,29**
<b>Gênero, n (%) sexo masculino</b>	10 (50)	8 (47,1)	0,85**
<b>Raça, n (%) de Caucasiano Asiático Afro Americano Caucasiano/Afro Americano</b>	16 (80) 1 (5) 1 (5) 2 (1)	13 (76,5) 2 (11,8) 0 (0) 2 (11,8)	0,70**
<b>Etnia, n (%) de Não-Hispânico</b>	19 (95)	17 (100)	0,35**
<b>Vacina Influenza em 2010, n (%) de vacinados</b>	19 (95)	16 (94)	0,9**

As vacinas LAIV e TIV para o inverno de 2011-2012 continham os seguintes antígenos: A/California/7/2009 (H1N1)-like, A/Perth/16/2009 (H3N2)-like e B/Brisbane/60/2008-like, os mesmo antígenos utilizados no ano anterior. Crianças vacinadas com TIV com idade entre 6 e 35 meses receberam 0,25 mL intramuscular e crianças com idade entre 36 meses ou mais receberam 0,5 mL intramuscular, enquanto crianças vacinadas com LAIV receberam 0,2 mL por rota intranasal, sendo 0,1 mL em cada narina.

As amostras foram coletadas em quatro momentos, no dia zero ou pré-vacinação, dia 1, dia 7 (variação 6-8) e dia 30 (variação 27-33) pós-vacinação.





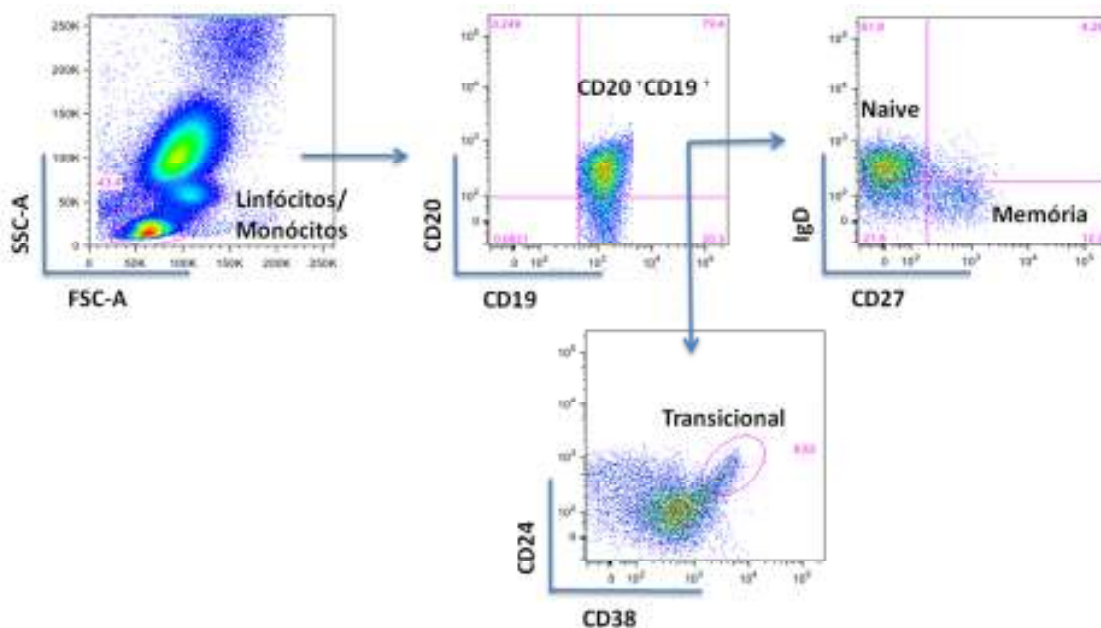
**Figura 6: Esquema de recrutamento dos sujeitos do estudo.**

LAIV: Live Attenuated Influenza Vaccine; TIV: Trivalent Inactivated Influenza Vaccine.

## 1.2. Citometria de Fluxo

Amostras de sangue periférico foram coletadas de cada sujeito nas quatro visitas. O seguinte painel de anticorpos contra marcadores humanos foi utilizado para identificar as diferentes populações de células B: CD45 (Pacific Orange, Invitrogen), CD14 (Alexa Fluor 700, BD Pharmingen), CD19 (ECD, Beckman-Coulter), CD20 (Pe-Cy5, BD Pharmingen), IgD (FITC, BD Pharmingen), CD27 (APC-Cy7, BioLegend), CD24 (PE, BD Pharmingen), CD38 (Pe-Cy7, BD BioScience) e CD138 (APC, BD BioScience). O protocolo de coloração para antígenos de superfície celular foi executado da seguinte forma, 200  $\mu$ L de sangue periférico foram adicionados ao painel de coloração em uma placa de 2 mL e incubado em temperatura

ambiente por 15 minutos. Após a incubação, 1,5 mL de solução BD FACSLyse (BD Biosciences) foram adicionadas e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. A placa foi centrifugada (500g, 5 min, 4°C) e lavada com 1,5 mL de PBS (500g, 5 min, 4°C). O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas com 250 µL de PBS e armazenadas a 4°C até o momento da análise. Foram coletados 100.000 eventos por amostra em um citômetro LSRII instrument (BD Biosciences, San Jose, CA), os eventos foram adquiridos utilizando o software BD FACSDiva™ e a análise realizada com o software FlowJo™ (Treestar, Inc version 9.4.11). Células B naïve foram identificadas como  $CD19^+IgD^+CD27^-$ , células B de memória como  $CD19^+IgD^-CD27^+$ , células B transicionais como  $CD19^+CD24^+CD38^+$ , plasmoblastos como  $CD19^+CD27^+CD38^+$  e plasmócitos como  $CD19^+CD27^+CD38^+CD138^+$ .



**Figura 7: Estratégia de análise de células B naïve, de memória e transicionais.** As células, suspensas em meio líquido, são submetidas a fluxo contínuo possibilitando sua contabilização e classificação de acordo com suas características físicas e/ou químicas.

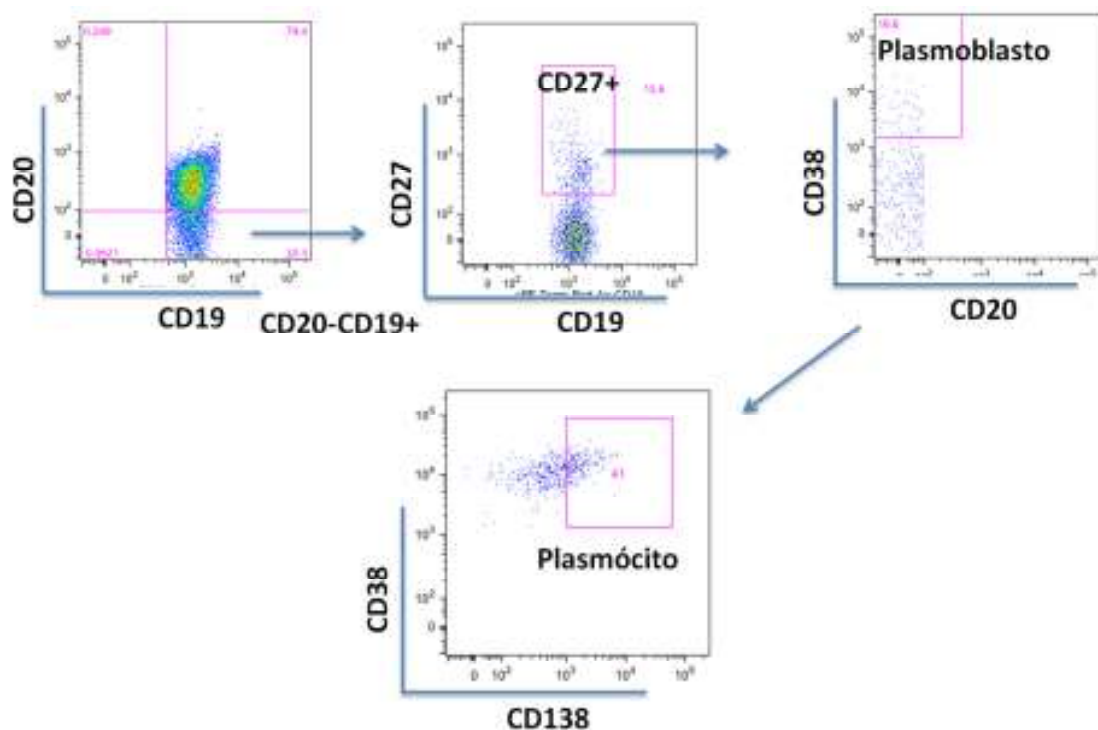


Figura 8: Estratégia de análise de plasmoblastos e plasmócitos

### 1.3. Ensaio de Inibição da Hemaglutinação e Ensaio de Neutralização Viral

Amostras séricas foram coletadas de cada sujeito em duas visitas, dia zero pré-vacinação e dia 30 pós-vacinação. O soro foi tratado com receptor de destruição enzimática (RDE; *Vibrio cholera* filtrado; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) essencialmente como descrito previamente [77]. O tratamento com RDE elimina inibidores não específicos que podem confundir os resultados do experimento. Diluições de RDE foram preparadas reconstituindo-se um frasco de *Vibrio cholera* filtrado com 5 mL de água destilada estéril. Um volume de soro misturado a quatro volumes de RDE foram incubados a 37°C por 12 a 18 horas. Três volumes de solução de citrato de sódio a 2,5% foram adicionados a cada amostra sérica e incubados a 56°C por 30 minutos. Dois volumes de PBS foram adicionados a cada amostra sérica resultando em uma diluição inicial de 1:10 para cada amostra.

HAI foi realizado como descrito previamente [77]. Estoques de cada antígeno do vírus influenza foram preparados diluindo-se o estoque do vírus a uma titulação final de 8 HA unidades/50µL. Diluições duplas (25 µL) de soro tratado com RDE em PBS preparado em placas de 96 poços foram misturadas a 25 µL dos estoques de cada antígeno do vírus influenza. As amostras soro-vírus foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente para permitir que qualquer anticorpo HA-específico presente no soro fosse capaz de neutralizar o vírus influenza. 50 µL de uma suspensão de 0,5% de hemácias foram adicionados a cada poço. O experimento foi incubado no gelo até que as hemácias em PBS da amostra controle formassem um botão e hemaglutinassem no poço controle não contendo soro. O título de inibição da hemaglutinação foi definido como a mais alta diluição em que o soro inibiu a hemaglutinação das hemácias.

VNA foi realizado como descrito previamente [78]. Resumidamente, soro tratado com RDE em Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) diluído duas vezes (50 µL) foi misturado a 200 PFU de vírus influenza (5 µL). As amostras séricas foram incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente para permitir que qualquer anticorpo hemaglutinina-específico presente no soro fosse capaz de neutralizar o vírus influenza. As amostras soro-vírus (55 µL) foram transferidas para cultura de células MDCK em placas de 96 poços. Seguindo-se absorção viral por 60 minutos, os inóculos soro-vírus foram removidos e as células MDCK permaneceram em cultura por quatro dias em Opti-MEM suplementado com 1 µg/ml de (TPCK)-tripsina (Sigma-Aldrich). A produção viral foi determinada por HAI. O título de neutralização foi definido como a mais alta diluição que o soro neutralizou 200 PFU de vírus influenza.

Soroconversão à vacina do vírus influenza, como definido previamente [79-81], é baseada no seguinte critério: um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos entre

as amostras séricas pré-vacinação e convalescentes, ou um aumento no título de anticorpos de <10 para  $\geq 40$  para amostras séricas pré-vacinação e convalescentes.

#### **1.4. Análise pela Técnica de Microarranjos**

Amostras de sangue (1-3 mL) foram coletadas em Tempus tubes (Applied Biosystems, CA, USA) e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O RNA foi processado e hibridizado em Illumina Human WG-6 V4 beadchips (47.323 probes).

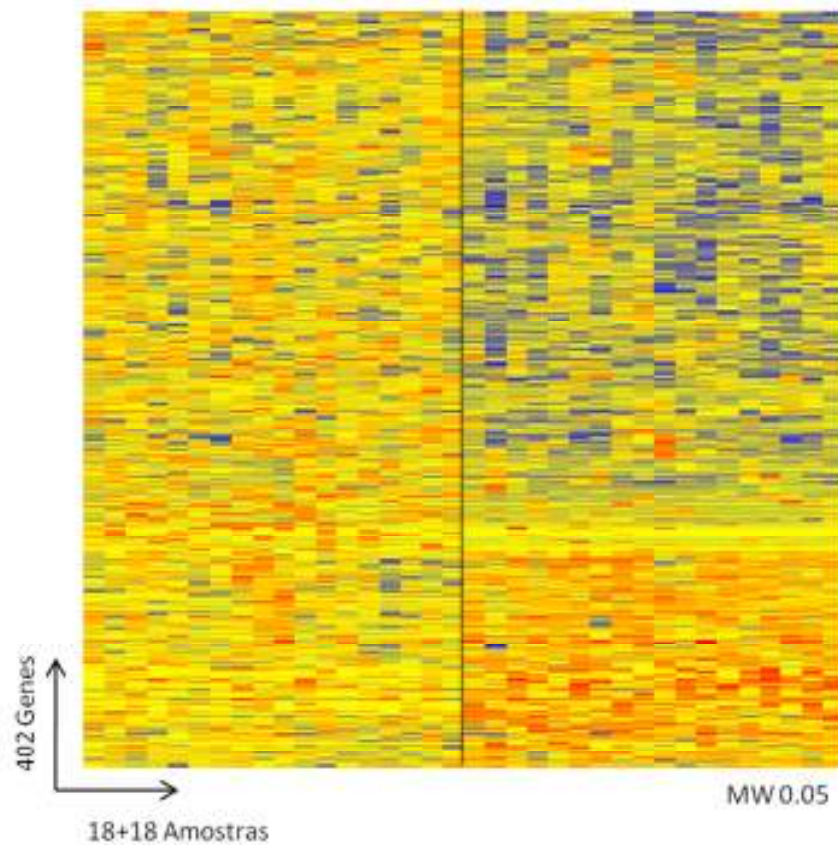
O software Illumina GenomeStudio Versão 4 foi utilizado para subtrair o plano de fundo e escalar a intensidade média do sinal de cada amostra para a intensidade média do sinal global de todas as amostras. A fim de realizar normalização e análise foi utilizado o software GeneSpring™ GX 7.3 (Agilent Technologies) como previamente descrito [82-84]. Os transcritos foram selecionados se eles estavam presentes em mais de 10% de todas as amostras e depois filtrados para selecionar os probes com maior variação (aqueles que apresentaram um mínimo de duas vezes na mudança da expressão quando comparados com a média de intensidade de todas as amostras, em mais de 10% de todas as amostras).

Primeiramente, foi utilizado o software GeneSpring para realizar as análises não supervisionada e supervisionada. Agrupamento não supervisionado foi realizado em 140 amostras que passaram o controle de qualidade para acessar se as amostras foram agrupadas de acordo com fatores conhecidos e identificar se existem subclasses desconhecidas entre o grupo de amostras. Análise supervisionada foi realizada utilizando filtros estatísticos e comparações de classes para identificar transcritos diferentemente expressos entre os grupos estudados como previamente descrito [84]. Teste não

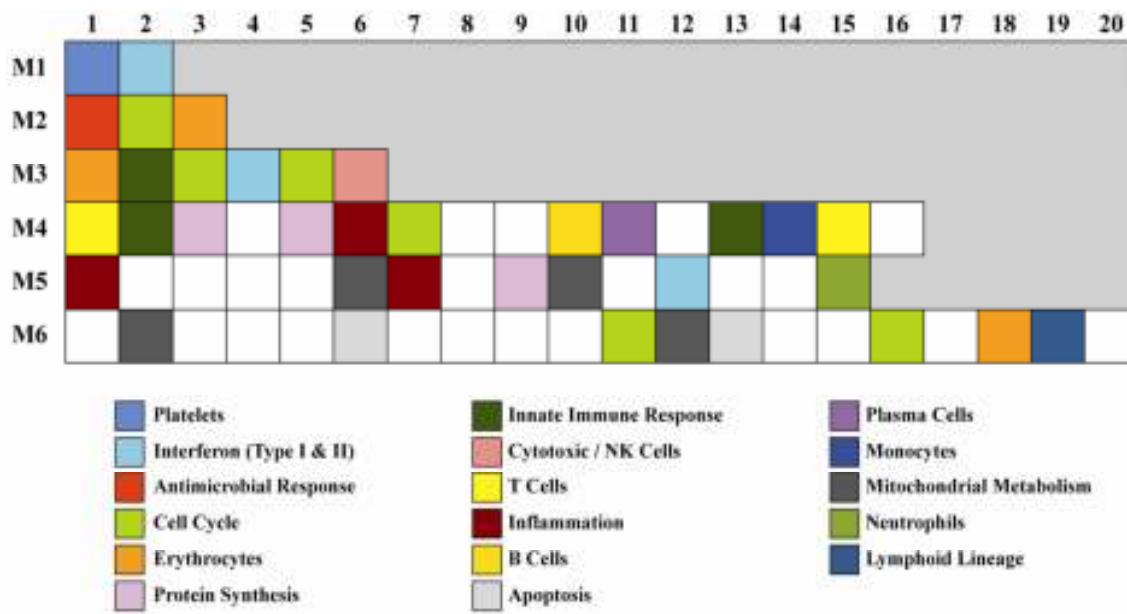
paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney foi aplicado para comparações entre os grupos estudados com um valor de p de 0,05.

Em um segundo momento, foi realizada a análise funcional dos genes diferencialmente expressados utilizando a análise de mapa modular. Um conjunto de 62 módulos transcripcionais foi utilizado como um quadro pré-existente para a análise modular. Os níveis de expressão gênica foram comparados entre as crianças vacinadas e controles saudáveis baseado em módulos como previamente descrito [85]. A atividade modular foi mensurada pela porcentagem de transcritos derivados pela comparação entre amostras e controles saudáveis que mostravam diferenças significativas. A intensidade da coloração do ponto indica a porcentagem de transcritos diferentemente expressos para cada módulo. Módulos contendo transcritos mostrando super expressão ou sub expressão, quando comparados aos controles saudáveis, são mostrados em vermelho e azul, respectivamente. O mapa modular e suas anotações estão disponíveis publicamente no endereço: [http://www.bior.net/public\\_wikis/module\\_annotation/V2\\_Trial\\_8\\_Modules](http://www.bior.net/public_wikis/module_annotation/V2_Trial_8_Modules).

A fim de confirmar e validar os achados baseados na análise de mapa modular, uma terceira abordagem analítica foi utilizada. Os valores de expressão gênica foram transformados em log (base 2) e analisados utilizando-se um modelo linear misto para os grupos LAIV e TIV separadamente. Especificamente, o tempo foi incluído no modelo como uma variável categórica, uma vez que os sujeitos recrutados apresentaram mensurações repetidas. O software JMP Genomics 6.0 (SAS Institute, Cary, NC) foi utilizado nesta análise. Genes com expressão média com valor de  $p < 0.01$  foram considerados diferencialmente expressados [86].



**Figura 9: Representação de um heat map.** No heat map, cada coluna representa um sujeito recrutado e cada linha representa um gene. Amarelo representa uma expressão gênica semelhante a dos controles, que estão sempre representados à esquerda. Azul representa genes sub expressados, enquanto vermelho representa genes super expressados em comparação com a média de expressão dos controles.



**Figura 10: Representação do mapa modular.** No mapa modular, os genes estão organizados em módulos transcripcionais que dividem uma função biológica. A intensidade do módulo corresponde à proporção de genes que apresentaram sua expressão modificada em comparação aos controles. Vermelho representa super expressão, azul representa sub expressão, enquanto branco representa ou que não houve diferenças significativas comparado aos controles, ou proporção balanceada de genes super e sub expressados.

### 1.5. Mensuração de Interferon alpha em amostras séricas

Amostras séricas dos sujeitos vacinados (18 LAIV e 16 TIV) foram utilizadas para quantificar a produção de interferon alpha (IFN- $\alpha$ ) através do método de ELISA no dia zero pré-vacinação e nos dias 1 e 7 pós-vacinação. As amostras séricas foram processadas em placas de 96 poços de acordo com as instruções do fabricante do kit (VeriKine<sup>TM</sup> Human IFN- $\alpha$  Serum Sample ELISA Kit – Pestka Biomedical Laboratories; Piscataway, NJ). Resumidamente, 50  $\mu$ l de cada amostra foram adicionados a 50  $\mu$ l de diluente e incubadas por 1 hora. Após a lavagem, 100  $\mu$ l de solução de anticorpos diluída foram adicionadas a



todos os poços e incubado por 1 hora. Após três lavagens, 100 µl de solução HRP diluída foram adicionadas, incubada por 1 hora e lavada novamente por quatro vezes. 100 µl de solução de substrato TMB foram adicionadas a cada poço, incubada por 15 minutos no escuro e 100 µl de solução para parar a reação finalmente foi adicionada. A placa foi lida utilizando-se um leitor de micro-placa, com absorvância de 450 nm. A titulação de interferon presente nas amostras foi determinada através da densidade óptica utilizando-se um 4-parameter fit para a curva padrão 1000-0 pg/ml.

## **1.6. Análise Estatística**

A análise estatística de variáveis contínuas e categóricas foi realizada através do software Graph Pad Prism versão 6 para Windows. Significância estatística foi acessada utilizando-se os testes de Mann Whitney e Wilcoxon para variáveis contínuas e os testes de Qui-quadrado e exato de Fisher para variáveis categóricas. A análise de correlações dos títulos de anticorpos foi realizada utilizando-se teste de correlação não paramétrica de Spearman com o software Sigma Plot versão 12.0 para Windows. A análise estatística das variáveis derivadas da citometria de fluxo foi realizada utilizando-se um modelo de análise mista. Os dados foram transformados em log (base 2) e correção de Bonferroni foi utilizada para ajuste de múltiplos testes.

## 2. REFERÊNCIAS

---

77. Wang, S., et al., *Hemagglutinin (HA) proteins from H1 and H3 serotypes of influenza A viruses require different antigen designs for the induction of optimal protective antibody responses as studied by codon-optimized HA DNA vaccines*. J Virol, 2006. 80(23): p. 11628-37.
78. Steel, J., et al., *Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza*. J Virol, 2009. 83(4): p. 1742-53.
79. Brady, R.C., et al., *Safety and immunogenicity of a subvirion inactivated influenza A/H5N1 vaccine with or without aluminum hydroxide among healthy elderly adults*. Vaccine, 2009. 27(37): p. 5091-5.
80. Keitel, W.A., et al., *Safety and immunogenicity of an inactivated influenza A/H5N1 vaccine given with or without aluminum hydroxide to healthy adults: results of a phase I-II randomized clinical trial*. J Infect Dis, 2008. 198(9): p. 1309-16.
81. Services, U.S.D.o.H.a.H., F.a.D. Administration, and C.f.B.E.a. Research, *Guidance for Industry: Clinical Data Needed to Support the Licensure of Seasonal Inactivated Influenza Vaccines*. 2007: p. 1-16.
82. Allantaz, F., et al., *Blood leukocyte microarrays to diagnose systemic onset juvenile idiopathic arthritis and follow the response to IL-1 blockade*. J Exp Med, 2007. 204(9): p. 2131-44.
83. Berry, M.P.R., et al., *An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis*. Nature, 2010. 466(7309): p. 973-977.
84. Ramilo, O., et al., *Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections*. Blood, 2007. 109(5): p. 2066-77.
85. Chaussabel, D., et al., *A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus*. Immunity, 2008. 29(1): p. 150-64.
86. Wang, L., et al., *A unified mixed effects model for gene set analysis of time course microarray experiments*. Stat Appl Genet Mol Biol, 2009. 8: p. Article 47.

## *Capítulo III*

---

## 1. ARTIGO ORIGINAL

---

**Differences in Antibody Responses between TIV and LAIV Influenza Vaccines  
Correlate with the Kinetics and Magnitude of Interferon Signaling in Children.**

**Raquel Giacomelli Cao**

**Orientadores: Prof. Dr. Renato Tetelbom Stein**

**Prof. Dr. Octavio Ramilo**

**Differences in Antibody Responses between TIV and LAIV Influenza Vaccines  
Correlate with the Kinetics and Magnitude of Interferon Signaling in Children**

**Authors:** Raquel G. Cao<sup>1</sup>, Nicolas M. Suarez<sup>1</sup>, Gerlinde Obermoser<sup>4</sup>, Santiago M.C. Lopez<sup>1</sup>, Emilio Flano<sup>1</sup>, Sara E. Mertz<sup>1</sup>, Randy A. Albrecht<sup>5,6</sup>, Adolfo Garcia-Sastre<sup>5,6,7</sup>, Asuncion Mejias<sup>1,2,3</sup>, Hui Xu<sup>4</sup>, Huanying Qin<sup>4</sup>, Derek Blankenship<sup>4</sup>, Karolina Palucka<sup>4</sup>, Virginia Pascual<sup>4</sup>, Octavio Ramilo<sup>1,2,3\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Center for Vaccines & Immunity, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, Columbus, OH.

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Division of Infectious Diseases, Nationwide Children's Hospital.

<sup>3</sup>The Ohio State University College of Medicine, Columbus, OH.

<sup>4</sup>Baylor Institute for Immunology Research, Baylor Research Institute, Dallas, TX.

<sup>5</sup>Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY.

<sup>6</sup>Global Health and Emerging Pathogens Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY.

<sup>7</sup>Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY.

\*Octavio Ramilo, MD

Division of Pediatric Infectious Diseases & Center for Vaccines & Immunity

The Research Institute at Nationwide Children's Hospital

The Ohio State University College of Medicine

700 Children's Drive, W4022 - Columbus, OH 43205

Phone number: 614-722-2735

Fax number: 614-722-3680

E-mail: [Octavio.Ramilo@Nationwidechildrens.org](mailto:Octavio.Ramilo@Nationwidechildrens.org)

**One Sentence Summary**

Children immunized with TIV and LAIV showed significant differences in B cell populations and antibody responses, which were more robust after TIV and correlated with the kinetics and magnitude of interferon signaling.

**Abstract**

LAIV and TIV are effective for prevention of influenza infection in children, but the mechanisms associated with protection are not well defined. We analyzed the differences in B cell responses and transcriptional profiles in children 6 months to 14 years old immunized with these vaccines. LAIV elicited a significant increase in naïve, memory and transitional B cells on day 30 post-vaccination, while TIV elicited an increased number of plasmablasts on day 7. Antibody titers against the three vaccine strains (H1N1, H3N2 and B) were significantly higher in the TIV group and correlated with number of antibody-secreting cells. Both vaccines induced over expression of interferon signaling genes, but with different kinetics. TIV induced expression of interferon genes on day 1 in all age groups, and LAIV on day 7 post-vaccination but only in children younger than 5 years old. Interferon-related genes over expressed in both vaccinated groups correlated with H3N2 antibody titers. These results suggest that LAIV and TIV induced significantly different B cell responses in vaccinated children. Early induction of interferon appears important for development of antibody responses.

## **Introduction**

Influenza viruses are major respiratory tract pathogens that cause annual epidemics and intermittent pandemics worldwide. Recent studies have demonstrated that in addition to children with high-risk underlying medical conditions, otherwise healthy children also experience significant morbidity and mortality when infected by influenza viruses [1-4]. Since 2010 the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) in USA recommends annual influenza vaccination for all individuals aged 6 months and older [5].

There are two major types of influenza vaccines approved for children in the United States, the trivalent inactivated influenza vaccine or TIV, licensed for all children 6 months and older, and the live attenuated influenza vaccine or LAIV, licensed for children aged 2 years and older. Both vaccines have been shown in several randomized controlled studies to be efficacious in reducing the rates of influenza infection in children [6-9]. Some studies, however, suggest that the LAIV formulation has higher efficacy than TIV in young children [10-12]. The immune mechanisms by which these two vaccines induce protective immune responses in children are not well understood. We conducted a prospective study in children immunized with the 2011/12 TIV or LAIV vaccine to characterize the differences in: a) B cell populations by flow cytometry, b) serum antibody titers by hemagglutination inhibition (HAI) and viral neutralization assays (VNA), and c) transcriptional profiles in whole blood samples to determine if early changes in expression of certain immune related genes correlated with antibody responses.

## **Results**

*Immunization with LAIV and TIV induce distinct changes in B cell populations*

We immunized 20 children with LAIV and 17 children with TIV (**Table 1**). Sequential flow cytometry samples in all four time points (day 0 or pre-vaccination, days 1, 7 and 30 post-vaccination) were available for 16 and 13 subjects, respectively. Of the 37 children enrolled, 14 presented adverse events post-vaccination, all related to upper respiratory tract symptoms, such as nasal congestion/runny nose, cough and mild sore throat. Seven of these 14 children were immunized with LAIV and 7 with TIV. The frequency of adverse events was not affected by the age of the subjects.

**Table 1: Demographic data of the subjects enrolled**

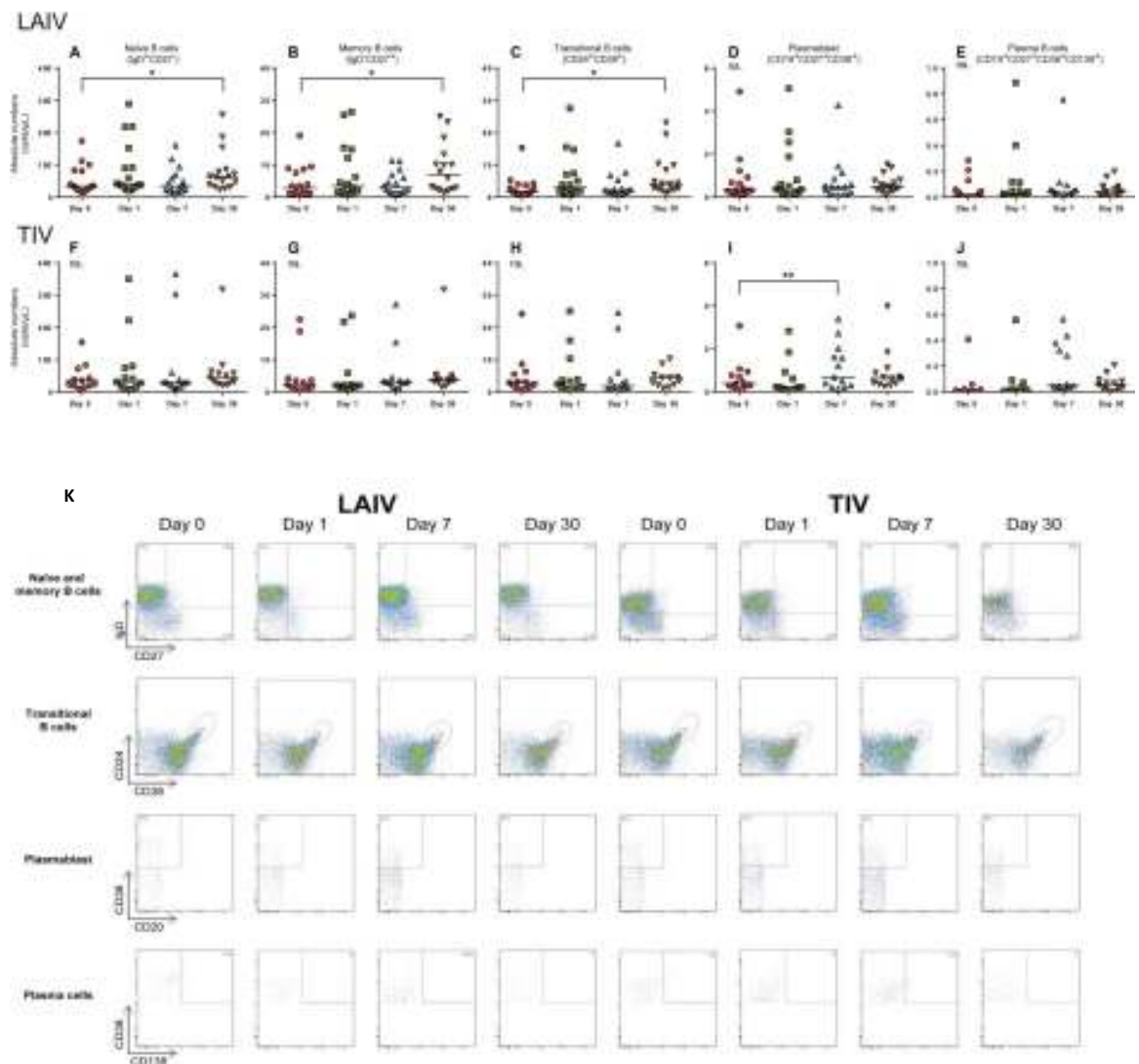
	<b>LAIV (n=20)</b>	<b>TIV (n=17)</b>	<b>P value</b>
<b>Age, mean (std) median [IQR]</b>	9.89 (4.6) 11.44 [4.2-14.0]	8.47 (4.98) 10.94 [3.7-12.9]	0.24*
<b>Age group, n (%) of 5-14 years old &lt;5 years old</b>	15 (75) 5 (25)	10 (58.9) 7 (41.2)	0.29**
<b>Gender, n (%) of Males</b>	10 (50)	8 (47.1)	0.85**
<b>Race, n (%) of White Asian African American White/African American</b>	16 (80) 1 (5) 1 (5) 2 (1)	13 (76.5) 2 (11.8) 0 (0) 2 (11.8)	0.70**
<b>Ethnicity, n (%) of Non-Hispanic</b>	19 (95)	17 (100)	0.35**
<b>Influenza Vaccination in 2010, n (%) of vaccinated</b>	19 (95)	16 (94)	0.9**

\*Mann-Whitney test \*\*Chi-square test

In the LAIV group, we found a significant increase at 30 days post-vaccination in the absolute numbers of naïve, memory and transitional B cells compared to baseline ( $p < 0.05$ ).



In contrast, there were no significant differences in the numbers of plasmablasts and plasma cells measured after immunization with LAIV. On the other hand, children immunized with TIV showed a significant increase in absolute numbers of plasmablasts at day 7 post-vaccination ( $p < 0.01$ ) with no significant changes in the numbers of naïve, memory and transitional B cell populations (**Fig 1**).



**Fig. 1. B cell immune responses after immunization with LAIV or TIV.** Whole blood samples obtained from healthy children were stained for B cells populations, Naïve B cells

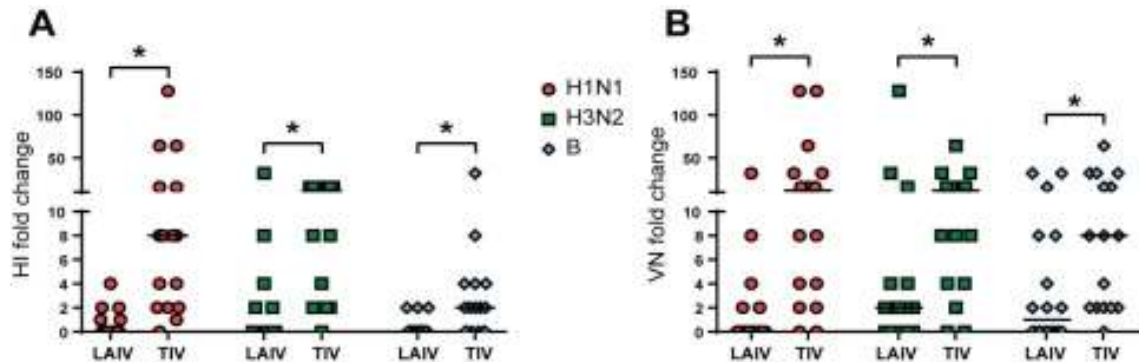
(CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>); Memory B cells (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>), Transitional B cells (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>), Plasmablast (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) and Plasma cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>), and analyzed by flow cytometry on day zero and days 1, 7 and 30 post-vaccination. LAIV vaccinees (n=16) and TIV vaccinees (n=13). The graphs consist of column scatter plots representing absolute numbers of B cell populations along the four time points. **A.** Naïve B cells in LAIV vaccinees. **B.** Memory B cells in LAIV vaccinees. **C.** Transitional B cells in LAIV vaccinees. **D.** Plasmablast in LAIV vaccinees. **E.** Plasma cells in LAIV vaccinees. **F.** Naïve B cells in TIV vaccinees. **G.** Memory B cells in TIV vaccinees. **H.** Transitional B cells in TIV vaccinees. **I.** Plasmablast in TIV vaccinees. **J.** Plasma cells in TIV vaccinees. Linear Mixed Model with Bonferroni correction (\*p<0.05, \*\*p<0.01, ns. no statistical significance). Bars represent median. **K. The B cell compartment responds differently to LAIV and TIV vaccination.** Kinetics of B cell response to LAIV vaccine (on the left) and TIV vaccine (on the right) are shown in two representative subjects. Measurement of number of naïve, memory, transitional, plasmablast and plasma cells was performed by flow cytometry in whole blood samples on day 0, or baseline, and days 1, 7 and 30 post-vaccination.

*TIV induces a more robust serum antibody response than LAIV*

Antibody responses were evaluated in 34 of the 37 subjects enrolled (LAIV n=18; TIV n=16). Hemagglutination inhibition (HI) and viral neutralization (VN) titers for each of the 3 influenza strains contained in both vaccines were measured in serum samples obtained at baseline (day 0) and at day 30 (range 27-33) post-vaccination.

TIV induced a significantly greater increase in HI titers than LAIV for the three vaccine strains (p<0.01), as previously described [18, 19] (**Fig 2A**). In addition, TIV elicited

a greater rate of seroconversion (70% H1N1, 70% H3N2, 30% B) compared with LAIV (5% H1N1, 2% H3N2, 0% B). Rates of seroconversion were defined by an HI titer  $\geq 1:40$  or a minimum 4-fold increase in antibody titer post-vaccination. Children less than 5 years old had the highest rate of seroconversion among TIV vaccines. When we measured the maximum fold-change increase in HI titers against any of the three strains of the vaccines, the mean HI response of TIV vaccinees was 8-fold higher than LAIV vaccinees ( $p < 0.001$ ). Next, we classified the vaccinees in high or low HI responders based on post-vaccination titers  $\geq 4$ -fold. Most of the TIV vaccinees (14/16; 87%) were considered as high responders while only three LAIV vaccinees (3/18; 17%) were considered high responders.



**Fig. 2. Fold increase of Hemagglutination Inhibition and Viral Neutralization titers pre and post-vaccination in LAIV and TIV.** Serum samples obtained at baseline or day zero, and 30 days post-vaccination from each subject were assayed for HI and VN titers. LAIV vaccinees (n=18) and TIV vaccinees (n=16). **A.** Column scatter plot representing fold increase of HI titers of TIV and LAIV vaccinees for H1N1, H3N2 and B vaccine strains on day 0 and day 30 post-vaccination. **B.** Column scatter plot representing fold increase of VN titers of TIV and LAIV vaccinees for H1N1, H3N2 and B vaccine strains on day 0 and day 30 post-vaccination. Mann Whitney test ( $*p < 0.05$ ). Bars represent medians.

With respect to VN titers, TIV vaccinees showed a significantly greater increase in serum VN titers for the three vaccine strains compared with the LAIV group ( $p < 0.05$ ). However, in LAIV vaccinees there was a significant increase in titers against the B strain ( $p < 0.05$ ) and a trend for the H3N2 strain ( $p = 0.05$ ), which was not observed on HAI analysis (**Fig 2B**). The rates of seroconversion for VNA were 75% H1N1, 81% H3N2 and 62% B for TIV vaccinees and 16% H1N1, 27% H3N2 and 33% B for LAIV vaccinees. According to this analysis, most of the TIV vaccinees (15/16; 94%) were considered high responders, while a greater number of LAIV vaccinees (10/18; 55%) were also considered high responders compared with HAI titers. **Table 2** shows HI and VN geometric mean titers at baseline and 30 days post-vaccination, as well as mean and median fold increase for LAIV and TIV.

**Table 2: Hemagglutinin Inhibition (A.) and Viral Neutralization (B.) antibody titers before immunization or baseline (BL) and Day 30 post-immunization with LAIV and TIV**

**A.**

	HI Antibody Titers				HI Fold Increase			
	LAIV		TIV		LAIV		TIV	
	BL	Day 30	BL	Day 30	Mean	Median	Mean	Median
H1N1	34.2	44.8	29.5	293.4*	0.5	0.0	20.9	8.0
H3N2	32.9	54.4	21.8	190.2*	2.6	0.0	9.7	12.0
B	10.0	12.1	11.3	30.8*	0.3	0.0	3.8	2.0

**B.**

	VN Antibody Titers				VN Fold Increase			
	LAIV		TIV		LAIV		TIV	
	BL	Day 30	BL	Day 30	Mean	Median	Mean	Median
H1N1	96.9	100.7	64.4	640.0*	2.6	0.0	28.7	12.0
H3N2	68.5	172.8	91.1	794.7*	10.7	2.0	15.1	12.0
B	63.4	166.2*	83.5	586.8*	5.8	1.0	14.3	8.0

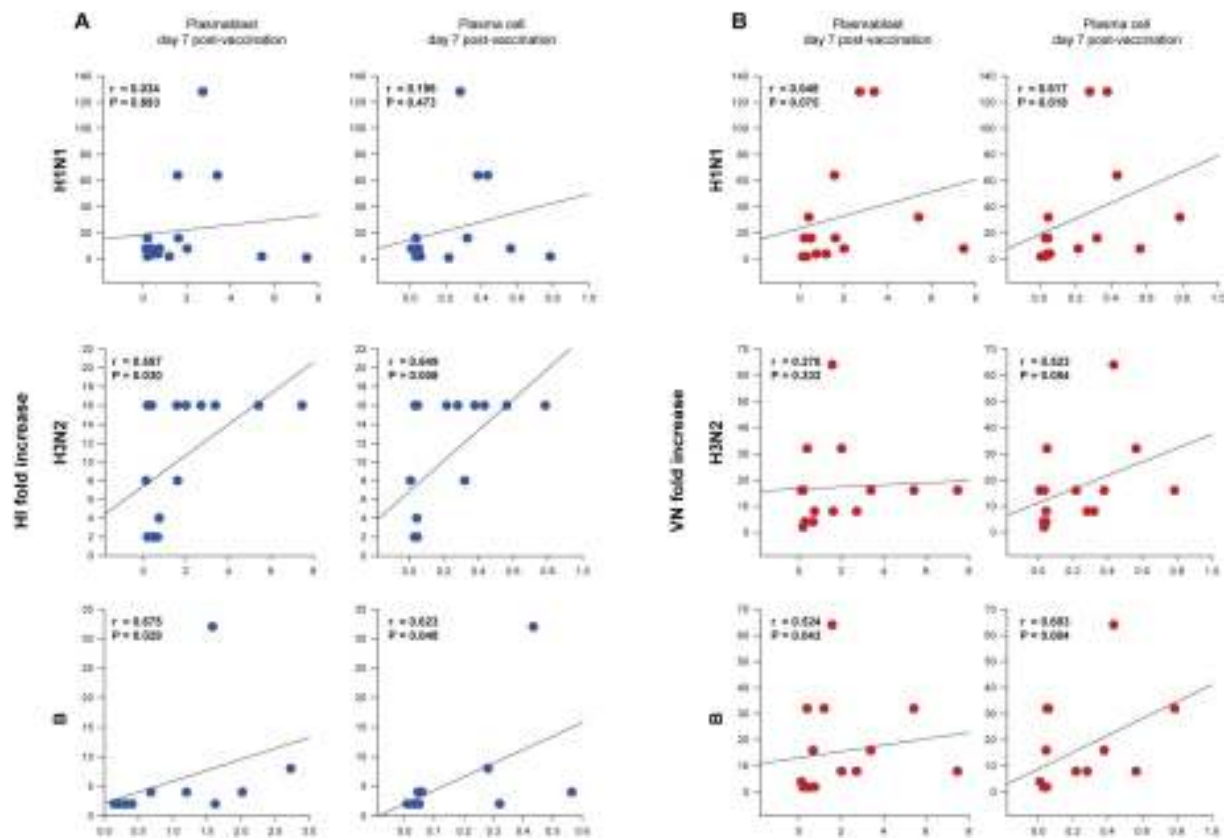
HI and VN antibody titers are depicted as geometric means

\*  $p < 0.05$

*Antibody secreting cells correlate with antibody titers on TIV recipients*

Next, we examined the correlations between the numbers of plasmablasts and plasma cells with antibody titers. For correlations with HI titers we only included TIV vaccinees, since we found very low responses after LAIV immunization. We found a significant correlation between the number of plasmablasts and plasma cells on day 7 post-immunization and fold increase HI titers to H3N2 and B strains. Despite good rates of seroconversion for the H1N1 strain among TIV vaccinees, we did not find any significant correlation between the number of plasmablasts and plasma cells and H1N1 titers (**Fig 3A**). We also found significant correlations between the numbers of plasma cells on day 7 and VN titers against the three vaccine strains; as well as the number of plasmablasts at 7 days post-vaccination and VN titers only against the B strain (**Fig 3B**). As expected, the fold increase of HI titers significantly correlated with the fold increase of VN titers among TIV vaccinees for the three vaccine strains (H1N1:  $r = 0.594$ ,  $p < 0.05$ ; H3N2:  $r = 0.815$ ,  $p < 0.001$ ; B:  $r = 0.694$ ,  $p < 0.05$ ). Although we did not find significant differences on the number of antibody-secreting cells

over time in LAIV vaccinees, we observed a significant correlation between absolute numbers of plasmablasts on day 7 post-LAIV vaccination and H3N2 VN titers 30 days post-vaccination ( $r=0.668$ ;  $p<0.05$ ).

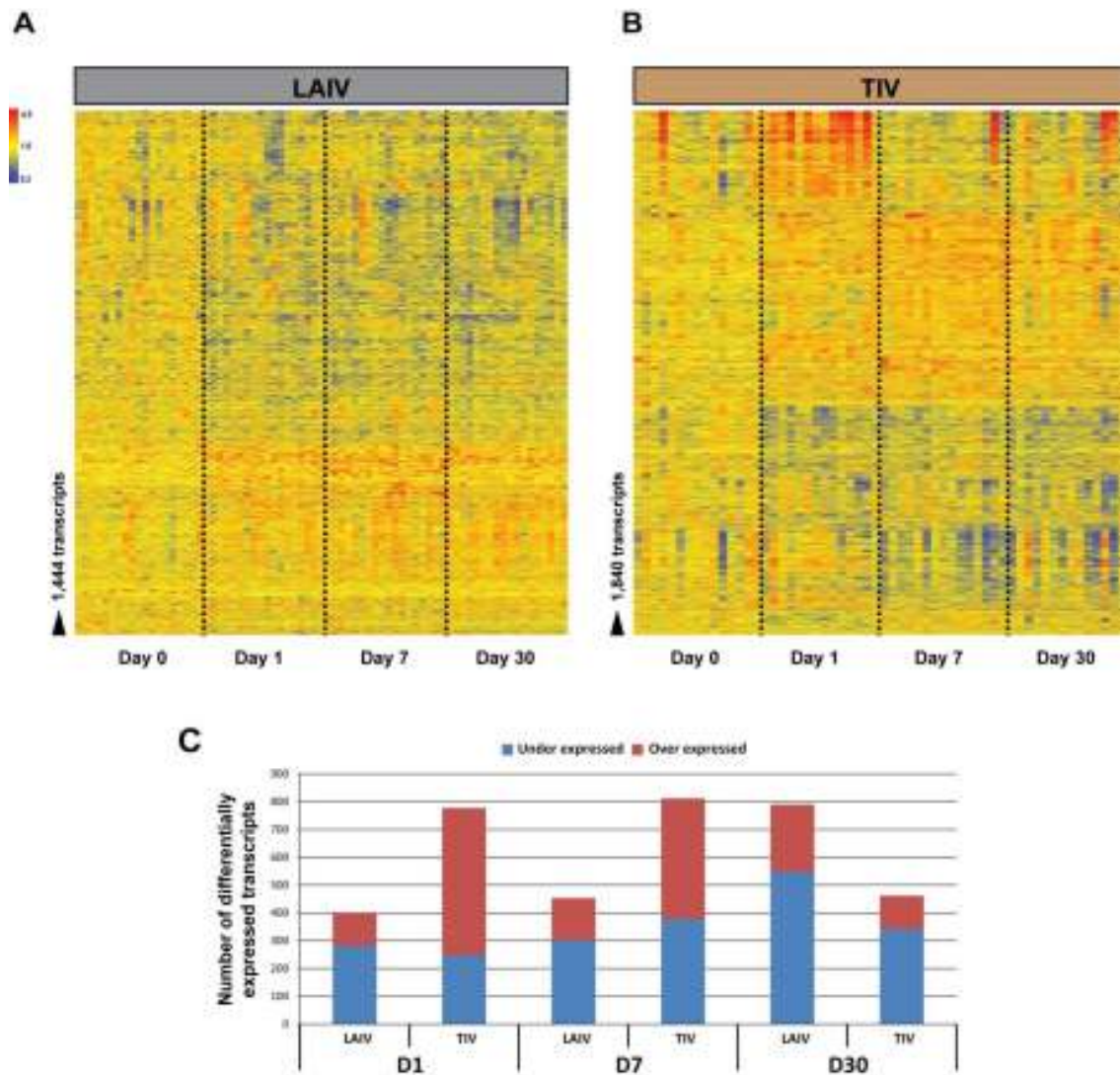


**Fig. 3. Correlations between Hemagglutination Inhibition and Viral neutralization titers and Plasmablast and Plasma B cells on TIV vaccinees. A.** Each plot represents the correlation between absolute numbers of plasmablast and plasma cells 7 days post-vaccination with TIV and fold increase of H1N1, H3N2 and B HI titers from day 0 to day 30 post-vaccination. **B.** Each plot represents the correlation between absolute numbers of plasmablast and plasma cells 7 days post-vaccination with TIV and fold increase of H1N1, H3N2 and B VN titers from day zero to day 30 post-vaccination. Spearman correlation,  $r$ : correlation coefficient.

*TIV and LAIV induce distinct immune transcriptional profiles*

We analyzed the gene expression profiles in whole blood samples of 18 children vaccinated with LAIV and 14 children with TIV at baseline (or day 0) and at days 1, 7 and 30 post-vaccination (**Supp Fig 1A-B**). Samples obtained at baseline were used as the reference for subsequent comparisons.

Statistical group comparisons identified a significantly larger number of differentially expressed transcripts on TIV vaccinees on days 1 and 7 post-vaccination compared with children who received LAIV (day 1: TIV 777 genes vs. LAIV 402 genes; day 7: TIV 812 vs. LAIV 453 genes). On day 30 post-vaccination, we observed the opposite pattern as LAIV vaccinees had 790 differentially expressed transcripts while TIV had 462. Overall, for LAIV vaccinees, there was a predominance of under expressed genes at all three time points compared with day 0, while for TIV vaccinees we observed a higher proportion of over expressed genes on days 1 and 7 post-vaccination, but a predominant pattern of under expressed genes at 30 days post-vaccination (**Supp Fig 1C**).



**Supp Fig 1. Gene expression profiles of children immunized with TIV and LAIV.** We analyzed the gene expression profiles in whole blood samples of 18 children vaccinated with LAIV and 14 children with TIV at baseline (or day 0) and at days 1, 7 and 30 post-vaccination. Pairwise comparisons between each time point post-vaccination and the baseline were performed (Man Whitney  $p < 0.05$ ). The significantly differentially expressed genes obtained in each pairwise comparison were merged per vaccine type (**Fig S1A and S1B**) and represented using a supervised hierarchical clustered. Numbers of significantly expressed genes for LAIV and TIV on days 1, 7 and 30 post-vaccination are shown (**Fig S1C**).



To investigate the differences in transcriptional responses over time between the two vaccines, we compared the significant top ten over and under expressed transcripts per time-point per vaccine type. Among the top over expressed transcripts identified on day 1 post-TIV vaccination, the majority were interferon (IFN)- related genes, while on the LAIV group there was over expression of genes related to cell cycle activity. On day 7 post-vaccination, we found over expression of plasma cell related genes and under expression of inflammation genes in the TIV group, while LAIV vaccinees displayed over expression of IFN and cell cycle related transcripts. On day 30 post-vaccination, cell cycle related transcripts were over expressed, while inflammation transcripts were under expressed in the LAIV vaccinees, while in the TIV group we did not identified significant under or over expression of any transcripts with well-defined function (**Supp Table 1**).

Supp Table 1. Top 10 over and under expressed genes post-vaccination with TIV and LAIV.

	<b>TIV Day 1</b>	<b>Fold Change</b>	<b>TIV Day 7</b>	<b>Fold Change</b>	<b>TIV Day 30</b>	<b>Fold Change</b>
<b>Over</b>	SERPING1	7.28	LOC653600	2.90	TSHZ2	1.88
	INDO	4.10	PDIA4	2.20	ALG3	1.81
	FCGR1A	3.60	CEACAM8	2.17	DUSP10	1.74
	FCGR1B	3.45	TNFRSF17	2.07	SALL2	1.69
	IFIT3	3.42	SNORD3C	1.97	ADCK5	1.69
	BATF2	3.41	IIGL3	1.95	LOC100132652	1.65
	LOC728744	3.35	ZFP30	1.94	METTL2A	1.63
	IFIT3	3.11	HS.149244	1.90	LOC644363	1.63
	FCGR1C	3.08	C12ORF49	1.83	BTRC	1.62
	IDO1	2.92	WFS1	1.81	C12ORF49	1.60
<b>Under</b>	ORM1	0.42	LRRK2	0.44	P2RY14	0.44
	TGM3	0.48	MRV11	0.53	F112	0.50
	LOC642342	0.48	FCAR	0.53	TMEM229B	0.53
	CACNA1	0.55	LOC653604	0.54	HS.558485	0.55
	PHOSPHO2	0.55	LOC652578	0.55	PHOSPHO2	0.55
	HS.575085	0.56	CTBP2	0.56	AIFM1	0.55
	CACNA2D2	0.58	P2RY14	0.56	CCDC51	0.56
	HS.520328	0.58	KIAA1026	0.56	USP1	0.56
	C20ORF107	0.58	LOC1001321	0.57	CTDSP1	0.57
	PGM3	0.59	PLAUR	0.58	LOC728772	0.58

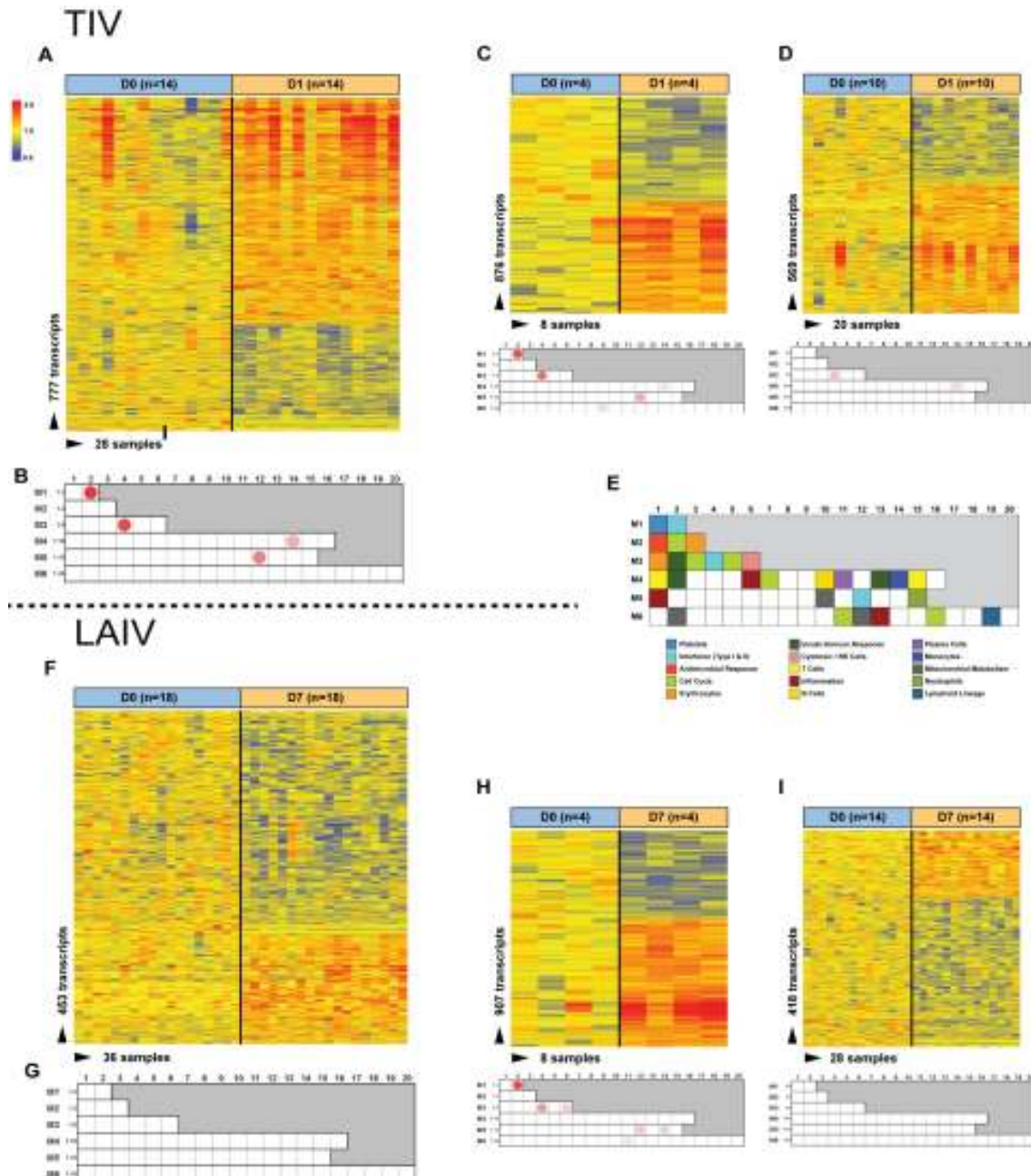
	<b>LAIV Day 1</b>	<b>Fold Change</b>	<b>LAIV Day 7</b>	<b>Fold Change</b>	<b>LAIV Day 30</b>	<b>Fold Change</b>
<b>Over</b>	STK40	1.67	OAS2	2.32	LOC647363	1.74
	DSCC1	1.67	ICA1	1.87	TERF1	1.71
	FLVCR1	1.64	DSCC1	1.78	FLVCR1	1.68
	LOC641788	1.63	LOC653382	1.73	LOC653382	1.66
	HNRNPA3P1	1.62	LOC647363	1.71	IL3RA	1.60
	TRAPPC6B	1.59	MASTL	1.66	DSCC1	1.54
	URB1	1.58	C11ORF24	1.62	PPP1R3F	1.53
	CPT1A	1.58	BCAS2	1.62	HS.98330	1.53
	CHTF8	1.57	PDIA3P	1.52	KIAA1908	1.52
	LOC391825	1.52	FASLG	1.51	LOC100133017	1.51
<b>Under</b>	MTCH2	0.53	PPP1R8	0.56	LOC642684	0.53
	NSUN5B	0.57	C17ORF65	0.60	LOC651738	0.54
	PCGF3	0.60	FGFBP3	0.61	HEMGN	0.55
	C19ORF28	0.60	LOC10013296	0.61	SERPINA1	0.56
	ATP9B	0.61	LOC729602	0.61	NFTA5	0.57
	MSRB3	0.62	MYBPH	0.62	C7ORF53	0.57
	SASS6	0.62	RSC1A1	0.62	FAM21A	0.58
	PRDM10	0.64	BMF	0.63	VPS41	0.58
	LOC653994	0.64	TBC1D17	0.63	XCR1	0.58
	RORA	0.65	RASGRP4	0.64	CBR1	0.58

*TIV and LAIV induce expression of interferon-related genes with different kinetics*

To better understand the differences of immune related genes induced by both vaccines, we used an analytical framework of transcriptional modules that share a biological function as previously described [22, 23]. Gene expression levels were compared between samples obtained at the different time points and the baseline (day 0) on a module-by-module basis. For each module, the percentage of genes significantly expressed (Mann-Whitney  $p < 0.05$ ) are shown in the modular map, derived independently for LAIV and TIV vaccinees [57] (**Fig 4A-I**). In TIV, but not LAIV, the IFN-related modules (M1.2, M3.4, and M5.12) were over expressed on day 1 post-vaccination and included genes coding for IFN-inducible proteins, such as OASL, OAS3, IFIT1, IFIT3, IFI44L, RSAD2, ISG15 and Guanylate Binding Proteins GBP1, GBP4 and LOC400759 (**Fig 4A-B**). Next, to assess whether age influenced the host response to LAIV and TIV, study subjects were stratified in two age groups; those who were less than five years old, and those equal or older than five years old (LAIV:  $n=4$  and  $14$ , respectively; TIV:  $n=4$  and  $10$ , respectively). TIV vaccine induced over expression of the IFN-related modules in both age groups 1 day post-vaccination, although the IFN over expression was more pronounced in the younger children (median expression [25%-75% interquartile range, IQR]  $2.11$  [ $1.52-2.91$ ] in younger vs.  $1.35$  [ $1.14-1.59$ ] in older;  $p < 0.001$ ) (**Fig 4C-D**). On the other hand, only in TIV vaccinees older than 5 years of age there was over expression of B cell related genes (M4.10; including genes related to B cell differentiation, such as BLK, CD79A and CD79B) at 7 days post-vaccination which coincided with the peak of antibody-secreting cells number measured by flow cytometry.

Transcriptional profiles in LAIV vaccinees were more attenuated. We observed over expression of the IFN-related modules only on day 7 post-vaccination and only for younger children (median expression [25%-75% IQR]  $2.25$  [ $1.45-4.41$ ] in younger vs.  $1.00$  [ $0.96-1.08$ ] in older;  $p < 0.001$ ), also including genes coding for IFN-inducible antiviral proteins,

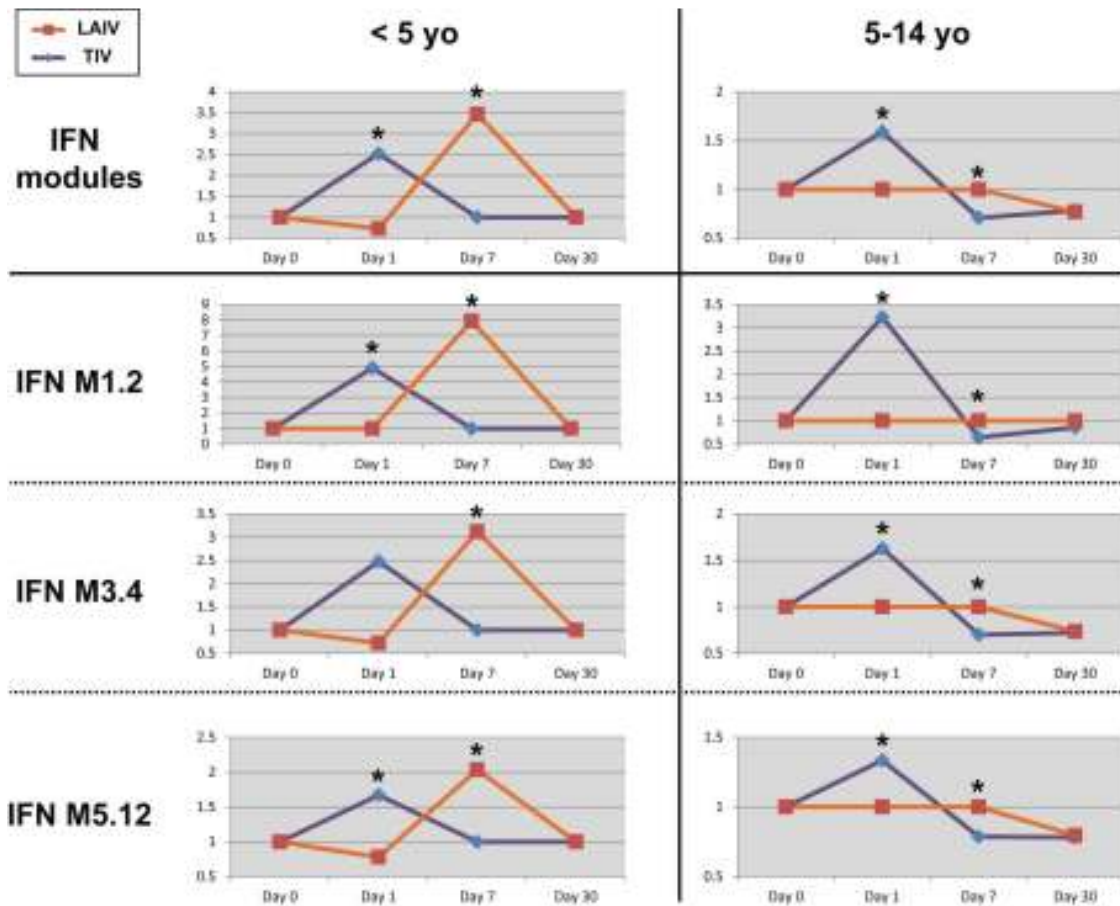
such as OASL, OAS1, OAS2, IFIT1, IFIT3, IFITM3, RSAD2, RTP4, Guanylate Binding Proteins GBP1, GBP5 and Tumor Necrosis Factor induced protein TNFAIP6 (Fig 4F-I).



**Fig. 4. Transcriptional profiles of children immunized with TIV and LAIV are characterized by activation of interferon. A. Statistical group comparison (Mann Whitney**

$p < 0.05$ ) between the TIV group ( $n=14$ ) on day 1 post-vaccination vs. baseline (day 0) yielded 777 differentially expressed genes. Transcripts were organized by hierarchical clustering where each row represents a single transcript and each column an individual subject. Normalized expression levels are indicated by red (over expressed) or blue (under expressed) compared to the median expression of the baseline (yellow). **B.** Modular analysis 1 day post-TIV immunization showed significant over expression of IFN-related modules (M1.2, M3.4, and M5.12). Color intensity of the spots represent percentage of significantly over expressed (red), under expressed (blue) or no differences (blank) genes compared with healthy controls ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test). **C. and D.** Heat maps and modular maps from TIV vaccinees stratified by age. Both groups displayed over expression of the IFN-related modules, more pronounced on the younger group ( $n=4$ ). **E.** Modular map legend. **F.** Statistical group comparison (Mann Whitney  $p < 0.05$ ) between the LAIV ( $n=18$ ) group on day 7 post-vaccination vs. day 0 yielded 453 differentially expressed genes. **G.** Modular analysis 7 days post-LAIV immunization. No modules were found significantly over or under expressed. **H. and I.** Heat maps and modular maps from LAIV vaccinees stratified by age. Only younger children ( $n=4$ ) displayed significant over expression of the IFN-related modules (M1.2, M3.4, and M5.12).

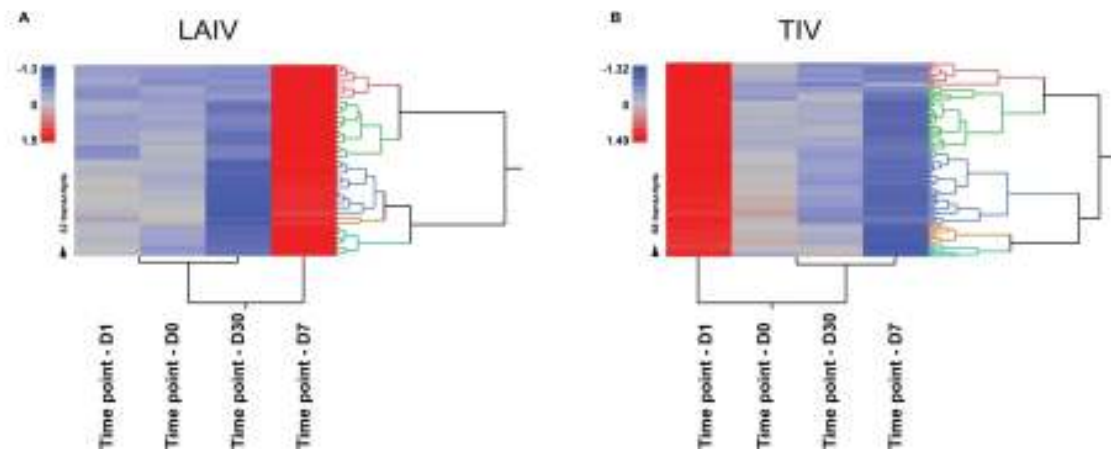
Modular-based analysis and specifically expression of IFN related modules, on day 30 post-vaccination was not significantly different compared with samples obtained at baseline before immunization in children vaccinated with either LAIV or TIV. Kinetics of IFN-related modules expression stratified by age and vaccine type is summarized on **Supplementary Figure 2.**



**Supp Fig 2. Comparison of the IFN-related modules median expression between TIV and LAIV groups.** The median expression of the IFN-related modules together, and each module independently was plotted for TIV and LAIV groups along the time points of the study. Children were divided in 2 groups; a) those younger than 5 years old, and b) those older or equal than 5 years old. IFN modules (M1.2+M3.4+M5.12). M1.2: IFN module. M3.4: IFN module. M5.12: IFN module.

To validate the IFN profile induced by both vaccines over time we applied linear mixed-model analyses. As we observed with the modular analysis, IFN-related genes were over expressed on day 1 post- vaccination with TIV and on day 7 post-vaccination with LAIV (**Fig 5**). Linear mixed models identified 25 and 6 IFN-related genes post-TIV and

LAIV vaccination respectively that passed the statistical cut-off  $p$  value of  $< 0.01$ , confirming that TIV induces a more robust over expression of IFN genes in blood. These significantly expressed genes were also identified in the modular analyses described above.



**Fig. 5. Interferon-related genes expression post-vaccination with LAIV and TIV.**

Significantly expressed genes derived from linear mixed model analyses ( $p < 0.01$ ) are displayed in a heat map format. **(A)** IFN-related genes were significantly over expressed and clearly different on day 7 post-LAIV vaccination compared with other time points (days 0, day 1 and day 30). **(B)**. IFN responses are markedly different on day 1 after TIV vaccination.

#### *Interferon-alpha production post-immunization with LAIV and TIV*

To confirm at the protein level the over expression of IFN genes observed on day 1 post-TIV and day 7 post-LAIV vaccination, we measured IFN- $\alpha$  concentrations by ELISA in serum samples on day 0 prior to vaccination, and days 1 and 7 post-vaccination in all subjects enrolled. We found detectable concentrations of IFN- $\alpha$  in only 2 of the 34 serum samples analyzed (LAIV  $n=18$ ; TIV,  $n=16$ ). One sample was obtained from a TIV vaccinee (51

pg/ml) on day 1 post-vaccination, and the other from a LAIV vaccinee (30 pg/ml) on day 7 post-vaccination, the time points where we found over expression of IFN transcripts. Both children were younger than five years of age (3 years old and 6 month old, respectively). As expected, we found no detectable concentrations of IFN- $\alpha$  prior to vaccination.

#### *Expression of interferon genes correlates with antibody production*

Next, we examined the correlations between IFN-inducible gene expression and antibody production. For this analysis we correlated fold increase of HI and VN antibody titers with IFN-inducible gene expression per individual module (M1.2= 36 transcripts; M3.4= 62 transcripts; M5.12= 63 transcripts); combination of IFN modules (161 transcripts) and specific top 10 over expressed IFN genes on day 1 post-TIV vaccination and on day 7 post- LAIV vaccination (**Table 3**). On LAIV vaccinees, we were able to perform correlations only with VN titers since HI titers were too low. Among TIV vaccinees, H3N2 HI titers consistently correlated with all the IFN-related modules and 6 out of the 10 genes tested. Interestingly, only expression of IFN-induced Guanylate Biding Protein 1 (GBP1) significantly correlated with H3N2 and B VN titers. Among LAIV vaccinees, we also observed significant correlations only between H3N2 VN titers and all IFN-related modules, and 9 out of the top 10 selected genes.



**Table 3: Correlations between fold increase of HI (A.) and VN (B.) titers and the IFN-related modules and genes 1 day post-vaccination with TIV. Correlations between fold increase of VN (C.) titers and the IFN-related modules and genes 7 days post-vaccination with LAIV.**

**A.**

Median Expression	HI Fold Increase					
	H1N1		H3N2		B	
	Spearman's r	p	Spearman's r	p	Spearman's r	P
IFN (161genes)	-0.22	0.444	<b>0.531</b>	<b>0.049</b>	-0.112	0.742
M1.2	-0.134	0.637	<b>0.633</b>	<b>0.013</b>	-0.0745	0.844
M3.4	-0.244	0.39	<b>0.531</b>	<b>0.049</b>	-0.0373	0.913
M5.12	-0.179	0.532	<b>0.592</b>	<b>0.024</b>	0.0745	0.844
OASL	-0.141	0.615	<b>0.695</b>	<b>&lt;0.01</b>	-0.186	0.612
OAS3	-0.271	0.34	0.493	0.069	-0.0373	0.913
IFIT1	-0.0941	0.738	<b>0.571</b>	<b>0.032</b>	-0.112	0.742
IFIT3	-0.114	0.693	<b>0.585</b>	<b>0.026</b>	0	0.983
IFI44L	-0.184	0.521	<b>0.578</b>	<b>0.029</b>	-0.0373	0.913
RSAD2	-0.224	0.435	0.507	0.061	-0.0373	0.913
ISG15	0.0291	0.916	<b>0.659</b>	<b>0.010</b>	-0.149	0.676
GBP1	0.125	0.659	<b>0.566</b>	<b>0.033</b>	0.224	0.55
GBP4	-0.152	0.594	0.469	0.087	0.0373	0.913
LOC400759	-0.213	0.453	0.393	0.157	0.0373	0.913

**B.**

Median Expression	VN Fold Increase					
	H1N1		H3N2		B	
	Spearman's r	p	Spearman's r	p	Spearman's r	P
IFN (161genes)	0.075	0.792	0.372	0.199	0.346	0.219
M1.2	0.0417	0.878	0.468	0.102	0.487	0.074
M3.4	0.0861	0.764	0.372	0.199	0.373	0.184
M5.12	0.136	0.643	0.476	0.093	0.459	0.094
OASL	0.158	0.591	0.378	0.192	0.466	0.087
OAS3	0.114	0.696	0.358	0.221	0.403	0.148
IFIT1	0.161	0.591	0.4	0.166	0.444	0.109
IFIT3	0.0611	0.835	0.471	0.097	0.351	0.212
IFI44L	0.103	0.723	0.42	0.148	0.496	0.069
RSAD2	0.0667	0.821	0.4	0.166	0.493	0.069
ISG15	0.211	0.481	0.48	0.093	0.505	0.0636
GBP1	0.0139	0.949	<b>0.664</b>	<b>0.012</b>	<b>0.568</b>	<b>0.032</b>
GBP4	-0.0889	0.764	0.414	0.154	0.38	0.173
LOC400759	-0.383	0.186	0.324	0.269	0.199	0.482

## C.

Median Expression	VN Fold Increase					
	H1N1		H3N2		B	
	Spearman's r	p	Spearman's r	p	Spearman's r	P
IFN (161 genes)	-0.616	0.233	<b>0.934</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.581	0.087
M1.2	-0.41	0.45	<b>0.889</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.641	0.058
M3.4	-0.462	0.45	<b>0.921</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.359	0.308
M5.12	-0.616	0.233	<b>0.83</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.419	0.243
OASL	-0.462	0.45	<b>0.937</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.641	0.058
OAS1	-0.359	0.517	<b>0.74</b>	<b>&lt;0.01</b>	0.197	0.58
OAS2	0.205	0.683	<b>0.762</b>	<b>&lt;0.01</b>	0.65	0.050
IFIT1	-0.103	0.783	<b>0.762</b>	<b>&lt;0.01</b>	0.522	0.138
IFIT3	-0.41	0.45	<b>0.921</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.41	0.243
IFITM3	-0.616	0.233	<b>0.791</b>	<b>&lt;0.01</b>	0.624	0.067
RSAD2	-0.41	0.45	<b>0.889</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.641	0.058
RTP4	-0.718	0.133	0.525	0.107	0.539	0.124
GBP1	-0.872	0.083	<b>0.869</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.641	0.058
GBP5	-0.205	0.683	<b>0.701</b>	<b>0.021</b>	-0.00855	0.948

Spearman correlation test, r: correlation coefficient. IFN: 161 genes (M1.2+M3.4+M5.12).

M1.2: IFN module. M3.4: IFN module. M5.12: IFN module.

## Discussion

Although influenza vaccine is effective in preventing disease and its complications, especially when there is a good antigenic match between vaccine strains and the circulating wild type influenza virus, we still lack a full understanding of the signaling pathways responsible for the protective immune responses induced by these vaccines. The goal of this study was to compare the B cell populations, antibody responses and transcriptional immune profiles elicited after immunization with the inactivated and the live attenuated formulations of the influenza vaccine in children aged 6 months to 14 years old. Our results show that both vaccines evoked different responses in all three parameters analyzed. While TIV elicited an early increase in antibody-secreting cells and robust antibody titers, LAIV elicited an increase

in naïve and memory B cells, but not in antibody-secreting cells and less robust antibody responses. Lastly, both vaccines induced IFN-inducible genes, but with very different kinetics. Thus, TIV induced over expression of IFN genes 1 day post-vaccination, while the effect of LAIV on IFN-inducible genes was detected at 7 days post-vaccination.

Previous studies showed that TIV induced greater antibody and B-cell responses than LAIV. Sasaki et al reported that adults and children vaccinated with TIV and LAIV had detectable influenza virus-specific antibody-secreting cells at 7 to 12 days post-vaccination, and that the number of adults and children with a significant antibody (HAI and/or VNA) responses after LAIV immunization was lower than after TIV immunization [18]. Another study in adults immunized with TIV showed a rapid clonal expansion of influenza-specific plasmablasts 7 days post-vaccination and mean HI responses (maximum fold-change increase at day 28 post-vaccination), which were 6-fold higher than those in LAIV vaccinees [24]. In agreement with those studies we also found higher antibody titers and significant increase in numbers of plasmablasts in children immunized with TIV. One of the goals of this study was to assess the kinetics of the immune response to both influenza vaccines and, although we did not assess vaccine efficacy, studies clearly showed that both types of vaccines are efficacious in protecting children from influenza infection [8, 29-33]. We did find significant differences in the numbers of naïve, memory and transitional B cells at day 30 post-LAIV immunization, which, to our knowledge, is a novel observation. LAIV is a live vaccine and therefore its efficacy depends on viral replication in the nasal mucosa. Whether and when antibody-secreting cells appear in the blood after mucosal immunization is not known and we may have not detected these cells because of our sampling times. An alternative hypothesis would be that LAIV-induced responses are predominantly local, in the nasal mucosa and upper respiratory tract, so only part of these cells would actually recirculate in blood.

Our study confirms previous reports showing that TIV vaccination elicits significantly higher rates of seroconversion than LAIV [18, 19], when measured by HAI, which is considered the standard assay to measure post-vaccination antibody production. We observed significant rates of seroconversion for the three vaccine strains among TIV vaccinees, and the increase in antibody titers significantly correlated with increased numbers of antibody secreting cells at 7 days post-vaccination, with the exception of the H1N1 strain. It is intriguing that despite the significant increase in H1N1 titers measured with two different assays (HIA and VNA), these titers did not correlate with the number of plasmablasts, or with the increased expression of interferon genes. Fewer previous exposures to this virus, as this strain corresponds to the 2009 pandemic, or unique characteristics of this particular antigen may account for these findings. Although LAIV did not elicit good rates of seroconversion when measured by HAI, we observed substantially better rates when we measured VNA titers, supporting the concept that HAI may underestimate the protection provided by LAIV. The HAI detects antibodies against viral hemagglutinin (HA), blocking the interaction of HA with erythrocytes and subsequently inhibiting their agglutination, while VNA detects functional neutralizing antibodies that inhibit viral entry and/or replication in mammalian cells. Some authors suggest that neutralizing assays are more sensitive than HAI assays, especially for measuring H1N1 antibody responses to LAIV in adults and children [34-36]. A good way to assess LAIV antibody production would be to measure HI titers in the nasal wash, but these assays are not yet fully developed or standardized. Some authors have shown that IgA titers in the nasal mucosa correlate with protection after LAIV immunization [37-40], supporting the idea that the relevant response to LAIV takes place locally.

Applying systems immunology to the characterization of vaccine responses is becoming more common, although few studies have addressed influenza vaccine responses in children. Nakaya et al showed that the expression of several IFN-related genes was altered in

adults 3 days post-LAIV vaccination, but not after TIV vaccination [24]. Zhu et al showed that children immunized with LAIV had greater variation in whole blood transcriptional profiles than those who received TIV. Further analysis showed that LAIV induced significant over expression of type 1 IFN-inducible genes 7-10 days post-vaccination, but there were no significant changes in TIV recipients [41]. Other studies conducted in adults showed that TIV-induced IFN-inducible signature appeared 24 hours post-vaccination [23, 42]. Our study is the first conducted in children that evaluated both vaccines at days 1, 7 and 30 post-immunization and correlated IFN expression with B-cell responses and antibody titers. Our results clearly demonstrate that both vaccines induce expression of interferon genes but with very clear different kinetics. TIV induced expression of interferon genes on day 1 post-vaccination and LAIV on day 7, and this was more evident in younger children. It is important to note that children less than 5 years of age displayed higher expression values of IFN-related genes in response to both vaccines. This might be related to their fewer previous exposures to influenza infection and/or immunization compared to older children

Our study has some limitations, starting with the relatively small number of subjects enrolled, mainly in the younger group, due to the challenge of enrolling infants to collect longitudinal blood and nasal samples. Nevertheless, the robustness and consistency of the biological changes and immune responses measured pre and post-vaccination indicate that LAIV and TIV elicit different blood transcriptional, cellular and serological responses. We were not able to define if all the vaccine strains, or a predominant one, was driving the IFN responses, but the correlations among fold change in antibody titers and IFN-related genes were found mainly with the H3N2 strain, suggesting that this strain is a more robust vaccine antigen, or that the vaccinees have been exposed more often to this antigen. Lastly, we were unable to measure responses in nasal wash samples, due to the challenge of consistently

obtain sufficient number of cells for flow cytometry analyses and the lack of standardized assays to characterize mucosal antibody responses.

In summary, we have uncovered profound differences in B cell populations elicited by two influenza vaccines over time and have established their relatedness to antibody responses to the unique components of these vaccines. In addition, we have found significant kinetic differences in IFN responses between these vaccines and showed the influence of age in these responses. These studies set the stage for more comprehensive analyzes of vaccine responses according to viral strains, age and route of administration.

## **Material and Methods**

### *Experimental Design*

This was a prospective cohort of previously healthy children 6 months to 14 years of age enrolled between October 2011 and February 2012. Thirty seven subjects were randomized to receive one dose of either LAIV (FluMist®, MedImmune) (n= 20) or TIV (Fluzone®, Sanofi Pasteur) (n= 17). Two exceptions were applied to the randomization: four children with ages between 6 months and 2 years old received TIV, since LAIV is not licensed on this age group, and four children with controlled asthma also received TIV following CDC's recommendations. One child aged 6 months at the time of enrollment received two doses of the vaccine with one month interval apart, since it was his first influenza vaccination. Demographic data is presented on **Table 1**. Exclusion criteria included any medical comorbidities or chronic conditions (lung, kidney or heart disease), use of systemic steroids in the previous 2 weeks, and congenital or acquired immunodeficiencies

Blood samples were collected at four time points, on day zero prior to vaccination, and day 1, day 7 (range 6-8) and day 30 (range 27-33) post-vaccination to determine B-cell, antibody responses and gene expression profiles. The vaccines used for the study included the 2011-2012 LAIV and TIV vaccines which contained A/California/7/2009 (H1N1)-like, A/Perth/16/2009 (H3N2)-like and B/Brisbane/60/2008-like antigens, the same strains used on the 2010-2011 influenza vaccine. TIV recipients aged 6 to 35 months old received 0.25 mL intramuscularly and recipients aged 36 months and older received 0.5 mL. LAIV recipients received 0.2 mL by intranasal route, 0.1 mL per nostril. The study protocol was approved by the institutional review board at Nationwide Children's Hospital (IRB09-00262) and Baylor Institute for Immunology Research (IRB011-221). Written informed consent was obtained from a parent or legal guardian for all participants.

#### *Flow Cytometry*

Peripheral whole blood samples were collected from each subject at the indicated four time points. The following antibody panel against human markers was used to identify the different B cell populations: CD45 (Pacific Orange) (Invitrogen); CD14 (Alexa Fluor 700), CD20 (Pe-Cy5), IgD (FITC), CD24 (PE) (BD Pharmingen); CD19 (ECD, Beckman-Coulter); CD27 (APC-Cy7, BioLegend); CD38 (Pe-Cy7), CD138 (APC) (BD BioScience). The protocol for staining cell surface antigens is described elsewhere [15]. Briefly, two hundred  $\mu$ L of whole blood were added to the listed multicolor staining panel and incubated at room temperature for 15 minutes, followed by lysis of red blood cells (BD FACS Lyse Solution). Events were collected on a LSRII instrument (BD Biosciences, San Jose, CA) and analysis performed using FlowJo™ software (Treestar, Inc version 9.4.11). Naïve B cells were identified as CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>; memory B cells as CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>; transitional B cells as CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>; plasmablasts as CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> and plasma cells as CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>.

### *Hemagglutination Inhibition Assay and Virus Neutralization Assay*

Serum samples were collected from each subject at two time points, day zero prior to vaccination and day 30 post-vaccination. Sera were treated with receptor destroying enzyme (RDE; *Vibrio cholera* filtrate; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as described elsewhere [43]. HAI was performed as previously described [43]. Working stocks for each influenza virus strain were prepared to a final hemagglutination titer of 8 hemagglutinin (HA) units/50 $\mu$ L and mixed with two-fold dilutions of the RDE-treated sera. The serum-virus samples were incubated at room temperature for 30 minutes and a 0.5% suspension of red blood cells were added to each well. The HI titer was defined as the reciprocal of the highest dilution of serum that inhibits red blood cell hemagglutination. VNA was performed as previously described [44]. Briefly, two-fold dilutions of the RDE-treated sera in sterile Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) were mixed with 200 PFU of influenza virus. The serum-virus samples were incubated at room temperature for 60 minutes and transferred to MDCK cell cultures cultured in 96-well plates. The VN titer was defined as the reciprocal of the highest dilution of serum that neutralizes 200 PFU of influenza virus. Seroconversion to the influenza virus vaccine, as defined elsewhere [45-47], was based on the following criteria: a 4-fold increase in antibody titers between the pre-vaccination and the convalescent serum samples, or an increase of antibody titers from  $<10$  to  $\geq 40$  for pre-vaccination and the convalescent serum samples.

### *Microarray Data and Statistical Analysis*

Blood samples (1-3 mL) were collected in Tempus tubes (Applied Biosystems, CA, USA) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Whole blood RNA was processed and hybridized into Illumina Human WG-6 V4 beadchips (47,323 probes) and scanned on the Illumina Beadstation 500 as described [21, 48]. The data is deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO accession number: GSE52005).



Illumina GenomeStudio version 4 software was used to subtract background and scale average signal intensity for all samples. Further normalization and analyses was performed using GeneSpring™ GX 7.3 software (Agilent Technologies) as previously described [49-51]. Transcripts were first selected if they were present in greater than 10% of all samples and then filtered to select the most variable probes (those that had a minimum of two fold expression change compared with the median intensity across all samples, in greater than 10% of all samples) [50]. For the analyses we used several analytical tools and followed different approaches to obtain robust and validate the data. First we used GeneSpring to perform the supervised analysis with all the samples (140 samples) using statistical filtering and class comparisons to identify transcripts differentially expressed between study groups as previously described [50][63]. Non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test for comparisons across the studied groups was applied with a p value of  $< 0.05$ .

Second, we performed functional analyses of differentially expressed genes using modular analysis [22]. A set of 62 transcriptional modules was used as pre-existing framework. Gene expression levels were compared between each time point post-vaccine and the baseline (pre-vaccine) on module-by-module basis. Spot intensity indicates the percentage of differentially expressed transcripts for each module. Modules containing transcripts showing over expression or under expression when compared to the baseline are shown in red and blue, respectively. Modular transcript content and annotations are publicly available [http://www.biir.net/public\\_wikis/module\\_annotation/V2\\_Trial\\_8\\_Modules](http://www.biir.net/public_wikis/module_annotation/V2_Trial_8_Modules) online at

Third, to confirm and validate the findings derive from the module-based analyses, an alternative differential expression analysis was conducted. Gene expression values were log<sub>2</sub> transformed and analyzed using a linear mixed model for the LAIV and TIV cohorts separately. Specifically, time was included in the model as a categorical variable with a

spatial power covariance matrix to account for correlation due to subjects having repeated measures. Each time point was then compared to baseline. JMP Genomics 6.0 (SAS Institute, Cary, NC) software was used for this analysis. Genes with a p value  $< 0.01$  were considered differentially expressed [52].

Statistical analysis of continuous and categorical demographic data was performed using Graph Pad Prism version 6 for Windows. Statistical significance was assessed using Mann Whitney and Wilcoxon tests for continuous variables and Chi-Square and Fisher's exact tests for categorical variables. Antibody titer correlation analyses were performed using Spearman non-parametric correlation test on Sigma Plot software version 12.0. The statistical analysis of flow cytometry derived variables was performed using the same linear mixed model analysis approach as described for microarray data analysis section. The data was log (base 2) transformed and a Bonferonni correction was used to adjust for multiple testing.

#### *Interferon-alpha measurement on serum samples*

Serum samples from the vaccinees (18 LAIV and 16 TIV) were used to quantitate IFN- $\alpha$  concentrations by ELISA pre-vaccination (day 0) and on days 1 and 7 post-vaccination. Serum samples were processed in a 96-well plate following the instructions of the kit (VeriKine<sup>TM</sup> Human IFN- $\alpha$  Serum Sample ELISA Kit – Pestka Biomedical Laboratories; Piscataway, NJ). Briefly, 50  $\mu$ l of sample was added to 50  $\mu$ l of sample diluent and incubated for 1 hour. Addition followed by incubation, of diluted antibody solution, HRP solution and TMB substrate solution was performed and the stop solution was finally added. The plate was read using a micro-plate reader (Viktor 3 Multilabel Counter - Perkin Elmer), with the absorbance at 450 nm. Interferon concentration in the samples was determined by plotting the optical densities (OD) using a 4-parameter fit for the standard curve 1000-0 pg/m.

## References

1. Izurieta HS, Thompson WW, Kramarz P, Shay DK, Davis RL, DeStefano F, Black S, Shinefield H, Fukuda K. 2000. Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children. *N Engl J Med* 342: 232-9
2. Neuzil KM, Zhu Y, Griffin MR, Edwards KM, Thompson JM, Tollefson SJ, Wright PF. 2002. Burden of interpandemic influenza in children younger than 5 years: a 25-year prospective study. *Journal of Infectious Diseases* 185: 147-52
3. Heikkinen T, Silvennoinen H, Peltola V, Ziegler T, Vainionpaa R, Vuorinen T, Kainulainen L, Puhakka T, Jartti T, Toikka P, Lehtinen P, Routi T, Juven T. 2004. Burden of influenza in children in the community. *J Infect Dis* 190: 1369-73
4. Poehling KA, Edwards KM, Weinberg GA, Szilagyi P, Staat MA, Iwane MK, Bridges CB, Grijalva CG, Zhu Y, Bernstein DI, Herrera G, Erdman D, Hall CB, Seither R, Griffin MR, New Vaccine Surveillance N. 2006. The underrecognized burden of influenza in young children. *N Engl J Med* 355: 31-40
5. Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, Finelli L, Euler GL, Singleton JA, Iskander JK, Wortley PM, Shay DK, Bresee JS, Cox NJ, Centers for Disease C, Prevention. 2010. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Recomm Rep* 59: 1-62
6. Negri E, Colombo C, Giordano L, Groth N, Apolone G, La Vecchia C. 2005. Influenza vaccine in healthy children: a meta-analysis. *Vaccine* 23: 2851-61
7. Rhorer J, Ambrose CS, Dickinson S, Hamilton H, Oleka NA, Malinoski FJ, Wittes J. 2009. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children: A meta-analysis of nine randomized clinical trials. *Vaccine* 27: 1101-10
8. Zangwill KM, Belshe RB. 2004. Safety and efficacy of trivalent inactivated influenza vaccine in young children: a summary for the new era of routine vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 23: 189-97
9. Jefferson T, Rivetti A, Harnden A, Di Pietrantonj C, Demicheli V. 2008. Vaccines for preventing influenza in healthy children. *Cochrane Database Syst Rev*: CD004879
10. Ashkenazi S, Vertruyen A, Aristegui J, Esposito S, McKeith DD, Klemola T, Biolek J, Kuhr J, Bujnowski T, Desgrandchamps D, Cheng SM, Skinner J, Gruber WC, Forrest BD, Group C-TS. 2006. Superior relative efficacy of live attenuated influenza vaccine compared with inactivated influenza vaccine in young children with recurrent respiratory tract infections. *Pediatr Infect Dis J* 25: 870-9
11. Fleming DM, Crovari P, Wahn U, Klemola T, Schlesinger Y, Langussis A, Øymar K, Garcia ML, Krygier A, Costa H. 2006. Comparison of the efficacy and safety of live attenuated cold-adapted influenza vaccine, trivalent, with trivalent inactivated influenza virus vaccine in children and adolescents with asthma. *Pediatr Infect Dis J* 25: 860-9
12. Belshe RB, Edwards KM, Vesikari T, Black SV, Walker RE, Hultquist M, Kemble G, Connor EM, Group C-TCES. 2007. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. *N Engl J Med* 356: 685-96
13. El-Madhun AS, Cox RJ, Søreide A, Olofsson J, Haaheim LR. 1998. Systemic and mucosal immune responses in young children and adults after parenteral influenza vaccination. *Journal of Infectious Diseases* 178: 933-9
14. Sasaki S, He XS, Holmes TH, Dekker CL, Kemble GW, Arvin AM, Greenberg HB. 2008. Influence of prior influenza vaccination on antibody and B-cell responses. *PLoS One* 3: e2975

15. Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, Zheng NY, Mays I, Garman L, Helms C, James J, Air GM, Capra JD, Ahmed R, Wilson PC. 2008. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* 453: 667-71
16. Kunkel EJ, Butcher EC. 2003. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* 3: 822-9
17. Manz RA, Arce S, Cassese G, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. 2002. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 14: 517-21
18. Sasaki S, Jaimes MC, Holmes TH, Dekker CL, Mahmood K, Kemble GW, Arvin AM, Greenberg HB. 2007. Comparison of the influenza virus-specific effector and memory B-cell responses to immunization of children and adults with live attenuated or inactivated influenza virus vaccines. *J Virol* 81: 215-28
19. Beyer W, Palache A, De Jong J, Osterhaus A. 2002. Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy: a meta-analysis. *Vaccine* 20: 1340-53
20. Pankla R, Buddhisa S, Berry M, Blankenship DM, Bancroft GJ, Banchereau J, Lertmemongkolchai G, Chaussabel D. 2009. Genomic transcriptional profiling identifies a candidate blood biomarker signature for the diagnosis of septicemic melioidosis. *Genome Biol* 10: R127
21. Berry MP, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SA, Oni T, Wilkinson KA, Banchereau R, Skinner J, Wilkinson RJ, Quinn C, Blankenship D, Dhawan R, Cush JJ, Mejias A, Ramilo O, Kon OM, Pascual V, Banchereau J, Chaussabel D, O'Garra A. 2010. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* 466: 973-7
22. Chaussabel D, Quinn C, Shen J, Patel P, Glaser C, Baldwin N, Stichweh D, Blankenship D, Li L, Munagala I, Bennett L, Allantaz F, Mejias A, Ardura M, Kaizer E, Monnet L, Allman W, Randall H, Johnson D, Lanier A, Punaro M, Wittkowski KM, White P, Fay J, Klintmalm G, Ramilo O, Palucka AK, Banchereau J, Pascual V. 2008. A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus. *Immunity* 29: 150-64
23. Obermoser G, Presnell S, Domico K, Xu H, Wang Y, Anguiano E, Thompson-Snipes L, Ranganathan R, Zeitner B, Bjork A, Anderson D, Speake C, Ruchaud E, Skinner J, Alsina L, Sharma M, Dutartre H, Cepika A, Israelsson E, Nguyen P, Nguyen QA, Harrod AC, Zurawski SM, Pascual V, Ueno H, Nepom GT, Quinn C, Blankenship D, Palucka K, Banchereau J, Chaussabel D. Systems scale interactive exploration reveals quantitative and qualitative differences in response to influenza and pneumococcal vaccines. *Immunity* 38: 831-44
24. Nakaya HI, Wrammert J, Lee EK, Racioppi L, Marie-Kunze S, Haining WN, Means AR, Kasturi SP, Khan N, Li GM, McCausland M, Kanchan V, Kokko KE, Li S, Elbein R, Mehta AK, Aderem A, Subbarao K, Ahmed R, Pulendran B. 2011. Systems biology of vaccination for seasonal influenza in humans. *Nat Immunol* 12: 786-95
25. Coffey F, Alabyev B, Manser T. 2009. Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles. *Immunity* 30: 599-609
26. Nutt SL, Tarlinton DM. 2011. Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat Immunol* 12: 472-7
27. Calame KL. 2001. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol* 2: 1103-8
28. Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C, Looney RJ, Sanz I, Anolik JH. 2009. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol* 182: 5982-93

29. Bergen R, Black S, Shinefield H, Lewis E, Ray P, Hansen J, Walker R, Hessel C, Cordova J, Mendelman PM. 2004. Safety of cold-adapted live attenuated influenza vaccine in a large cohort of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J* 23: 138-44
30. Piedra PA, Gaglani MJ, Riggs M, Herschler G, Fewlass C, Watts M, Kozinetz C, Hessel C, Glezen WP. 2005. Live attenuated influenza vaccine, trivalent, is safe in healthy children 18 months to 4 years, 5 to 9 years, and 10 to 18 years of age in a community-based, nonrandomized, open-label trial. *Pediatrics* 116: e397-e407
31. Hambidge SJ, Glanz JM, France EK, McClure D, Xu S, Yamasaki K, Jackson L, Mullooly JP, Zangwill KM, Marcy SM, Black SB, Lewis EM, Shinefield HR, Belongia E, Nordin J, Chen RT, Shay DK, Davis RL, DeStefano F, Vaccine Safety Datalink T. 2006. Safety of trivalent inactivated influenza vaccine in children 6 to 23 months old. *JAMA* 296: 1990-7
32. Heinonen S, Silvennoinen H, Lehtinen P, Vainionpaa R, Ziegler T, Heikkinen T. 2011. Effectiveness of inactivated influenza vaccine in children aged 9 months to 3 years: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 11: 23-9
33. Belshe RB, Mendelman PM, Treanor J, King J, Gruber WC, Piedra P, Bernstein DI, Hayden FG, Kotloff K, Zangwill K, Iacuzio D, Wolff M. 1998. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenzavirus vaccine in children. *N Engl J Med* 338: 1405-12
34. Lee MS, Mahmood K, Adhikary L, August MJ, Cordova J, Cho I, Kemble G, Reisinger K, Walker RE, Mendelman PM. 2004. Measuring antibody responses to a live attenuated influenza vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 23: 852-6
35. Veguilla V, Hancock K, Schiffer J, Gargiullo P, Lu X, Aranio D, Branch A, Dong L, Holiday C, Liu F. Sensitivity and specificity of serologic assays for detection of human infection with 2009 pandemic H1N1 virus in US populations. *Journal of clinical microbiology* 49: 2210-5
36. Papenburg J, Baz M, Hamelin ME, Rheume C, Carbonneau J, Ouakki M, Rouleau I, De Serres G, Boivin G. Evaluation of serological diagnostic methods for the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Clin Vaccine Immunol* 18: 520-2
37. Belshe RB, Gruber WC, Mendelman PM, Mehta HB, Mahmood K, Reisinger K, Treanor J, Zangwill K, Hayden FG, Bernstein DI, Kotloff K, King J, Piedra PA, Block SL, Yan L, Wolff M. 2000. Correlates of immune protection induced by live, attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine. *J Infect Dis* 181: 1133-7
38. Clements ML, Betts RF, Tierney EL, Murphy BR. 1986. Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type virus. *J Clin Microbiol* 24: 157-60
39. Ambrose CS, Wu X, Jones T, Mallory RM. 2012. The role of nasal IgA in children vaccinated with live attenuated influenza vaccine. *Vaccine* 30: 6794-801
40. Barria MI, Garrido JL, Stein C, Scher E, Ge Y, Engel SM, Kraus TA, Banach D, Moran TM. 2013. Localized mucosal response to intranasal live attenuated influenza vaccine in adults. *J Infect Dis* 207: 115-24
41. Zhu W, Higgs BW, Morehouse C, Streicher K, Ambrose CS, Woo J, Kemble GW, Jallal B, Yao Y. 2010. A whole genome transcriptional analysis of the early immune response induced by live attenuated and inactivated influenza vaccines in young children. *Vaccine* 28: 2865-76
42. Bucacas KL, Franco LM, Shaw CA, Bray MS, Wells JM, Nino D, Arden N, Quarles JM, Couch RB, Belmont JW. Early patterns of gene expression correlate with the humoral immune response to influenza vaccination in humans. *J Infect Dis* 203: 921-9

43. Wang S, Taaffe J, Parker C, Solorzano A, Cao H, Garcia-Sastre A, Lu S. 2006. Hemagglutinin (HA) proteins from H1 and H3 serotypes of influenza A viruses require different antigen designs for the induction of optimal protective antibody responses as studied by codon-optimized HA DNA vaccines. *J Virol* 80: 11628-37
44. Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solorzano A, Albrecht R, Perez DR, Garcia-Sastre A, Palese P. 2009. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol* 83: 1742-53
45. Brady RC, Treanor JJ, Atmar RL, Keitel WA, Edelman R, Chen WH, Winokur P, Belshe R, Graham IL, Noah DL, Guo K, Hill H. 2009. Safety and immunogenicity of a subvirion inactivated influenza A/H5N1 vaccine with or without aluminum hydroxide among healthy elderly adults. *Vaccine* 27: 5091-5
46. Keitel WA, Campbell JD, Treanor JJ, Walter EB, Patel SM, He F, Noah DL, Hill H. 2008. Safety and immunogenicity of an inactivated influenza A/H5N1 vaccine given with or without aluminum hydroxide to healthy adults: results of a phase I-II randomized clinical trial. *J Infect Dis* 198: 1309-16
47. Services USDoHaH, Administration FaD, Research CfBEa. 2007. Guidance for Industry: Clinical Data Needed to Support the Licensure of Seasonal Inactivated Influenza Vaccines. 1-16
48. Banchereau R, Jordan-Villegas A, Ardura M, Mejias A, Baldwin N, Xu H, Saye E, Rossello-Urgell J, Nguyen P, Blankenship D, Creech CB, Pascual V, Banchereau J, Chaussabel D, Ramilo O. 2012. Host immune transcriptional profiles reflect the variability in clinical disease manifestations in patients with *Staphylococcus aureus* infections. *PLoS One* 7: e34390
49. Allantaz F, Chaussabel D, Stichweh D, Bennett L, Allman W, Mejias A, Ardura M, Chung W, Smith E, Wise C, Palucka K, Ramilo O, Punaro M, Banchereau J, Pascual V. 2007. Blood leukocyte microarrays to diagnose systemic onset juvenile idiopathic arthritis and follow the response to IL-1 blockade. *J Exp Med* 204: 2131-44
50. Berry MPR, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SAA, Oni T, Wilkinson KA, Banchereau R, Skinner J, Wilkinson RJ. 2010. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* 466: 973-7
51. Ramilo O, Allman W, Chung W, Mejias A, Ardura M, Glaser C, Wittkowski KM, Piqueras B, Banchereau J, Palucka AK, Chaussabel D. 2007. Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections. *Blood* 109: 2066-77
52. Wang L, Chen X, Wolfinger RD, Franklin JL, Coffey RJ, Zhang B. 2009. A unified mixed effects model for gene set analysis of time course microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 8: Article 47

**Acknowledgements:** We would like to thank individuals recruited to this study; S. Farley and P. Davies for the subjects' enrollment. **Funding:** This study is supported by NIH grant U19 AI089987 and Nationwide Children's Hospital intramural funds. RC was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant 201277/2011-5 from the Brazil Government. Author contributions: R.C. performed and

analyzed flow cytometry experiments. G.O., E.F. and S.L. developed panels for flow cytometry assay. R.C. and N.S. performed microarrays analysis. R.C., S.L and S.M. organized and managed the vaccine study and the collection of samples. R.A. and A.G.-S. analyzed antibody titers. D.B. and G.O. contributed to the statistical analysis. R.C. and O.R. wrote the manuscript. G.O., E.F., A.M., K.P., V.P and O.R. designed the study and reviewed the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

## *Capítulo IV*

---



## 1. CONCLUSÃO

---

Embora as vacinas disponíveis para imunização contra os vírus influenza sejam efetivas ao prevenir o desenvolvimento da doença e suas complicações, ainda não possuímos conhecimento pleno do mecanismo responsável por induzir resposta imune protetora. As metas desse estudo foram comparar as respostas geradas após administração das formulações inativada e atenuada com relação a populações de células B, produção de anticorpos e perfis de expressão gênica em crianças de 6 meses a 14 anos de idade.

Os resultados com relação à produção de células secretoras de anticorpos pós-vacinação com TIV eram esperados, porém não observamos diferenças significativas nessa população celular após vacinação com LAIV, embora, 30 dias após administração dessa vacina, tenhamos observado diferenças nas populações de células B naïve, de memória e transitórias. Sendo LAIV uma vacina viva, ela depende de certo grau de replicação viral na mucosa nasal a fim de gerar resposta imune adaptativa e uma hipótese é que tenhamos perdido o pico de circulação de células secretoras de anticorpos. Outra hipótese seria que a resposta induzida por LAIV possa ser predominantemente local, na mucosa nasal e no trato respiratório superior, e somente parte dessas células realmente ganhariam a circulação sistêmica.

Nosso estudo confirma achados prévios que mostram que vacinação com TIV promove taxas significativamente mais altas de soroconversão quando comparada a LAIV principalmente com relação ao ensaio HAI, que é considerado padrão-ouro para mensuração de produção de anticorpos séricos pós-imunização. Embora LAIV não tenha induzido altas taxas de soroconversão mensuradas por HAI, observamos taxas

substancialmente melhores quando mensuradas por VNA, suportando que o ensaio HAI pode subestimar a proteção provida por LAIV. Outra maneira de acessar a produção de anticorpos pós-vacinação com LAIV seria a mensuração de títulos de HI no lavado nasal, porém os ensaios ainda necessitam ajustes para aplicação.

Nossos dados suportam que a sinalização de genes relacionados ao IFN está super expressada 7 dias pós-vacinação com LAIV e 1 dia pós-vacinação com TIV. Ambas as vacinas induziram respostas transcricionais diversas, porém o pico de atividade de IFN, até mesmo em diferentes momentos, sugere ativação da resposta imune inata, uma vez que o IFN tem papel central na resposta inata ao vírus. É importante notar que crianças com menos de 5 anos de idade apresentaram maior expressão média de genes relacionados ao IFN quando comparadas a crianças com mais de 5 anos de idade para ambas vacinas. Essa observação pode ser explicada devido ao fato de crianças mais jovens apresentarem menor número de exposições prévias aos vírus influenza e responderem à vacinação de uma forma mais robusta. Não é possível definir se todas as cepas ou somente uma é responsável pela resposta de IFN, porém as correlações encontradas entre aumento de títulos de anticorpos e genes relacionados ao IFN foram encontradas principalmente com a cepa H3N2, sugerindo que esta foi mais antigênica que as outras. A abordagem baseada em perfis transcricionais em grandes coortes, possibilitando a estratificação dos sujeitos recrutados em grupos de idade, e análise de múltiplos momentos pós-vacinação permitiria a avaliação das mudanças que podem auxiliar na identificação de preditores mais específicos à eficácia da vacina.

Embora nossa coorte seja relativamente pequena, a consistência das mudanças biológicas e de resposta imune permitiu-nos demonstrar que LAIV e TIV promoveram diferentes respostas transcricionais, celulares e de produção de anticorpos, ativando o

sistema imune inato e adaptativo de forma aparentemente distintas. Tivemos a oportunidade de realizar experimentos em quatro diferentes momentos e avaliar as mudanças ao longo deles, confirmando resultados prévios e adicionando novos, como as diferenças nas respostas de células B e a resposta de IFN nos diferentes momentos, mais pronunciada nas crianças menores de 5 anos de idade. Mais estudos, com uma coorte com número maior de sujeitos e inclusão de crianças mais jovens, com maior probabilidade de ser influenza naïve, podem prover melhor entendimento da cinética da vacina de influenza e melhor identificação de biomarcadores de proteção imune.

Google

Gmail

ESCREVER

Entrada

Com estrela

Importante

Enviados

Rascunhos

› Círculos

BRIGHT

Michel

Respirologia Pediátrica

Rondon

From: Science Translational Medicine Editors <[scitransmededitors@aaas.org](mailto:scitransmededitors@aaas.org)>  
Date: November 11, 2013 at 10:50:07 PM CST  
To: <[Octavio.Ramilo@nationwidechildrens.org](mailto:Octavio.Ramilo@nationwidechildrens.org)>  
Subject: Science Translational Medicine manuscript received

Manuscript Title: "Differences in Antibody Responses between TIV and LAV Influenza Vaccines Correlate with the Kinetics and Magnitude of Interferon Signaling in Children"

Manuscript Number: 3008005

Dear Dr. Octavio Ramilo,

Thank you for submitting your manuscript to Science Translational Medicine. We will notify you of the results of our evaluation as soon as possible. Your manuscript number is noted above. Please refer to it in future communication with us.

Sincerely,

The Editors