



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

**“ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL REPERTORIO DE
LINFOCITOS B EN RESPUESTA A LA VACUNACIÓN POR VIRUS
DE INFLUENZA PANDEMICA”**

M. en C. Bernardo José Cortina Ceballos

bjcortina@insp.mx (044 777 2108966)

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN SALUD PÚBLICA
CON AREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

Generación 2009-2012

Director de Tesis:

Dr. Jesús Martínez Barnetche INSP-CISEI Inmunología

Asesores:

Dr. Juan Téllez Sosa INSP-CISEI Inmunología

Dr. José Moreno Rodríguez INSP-CISEI Inmunología

Dra. Ana Isabel Burguete García INSP-CISEI Epidemiología

Resumen

Uno de los factores determinantes en la generación de brotes estacionales, epidemias y pandemias de influenza es la variación antigénica de los virus de influenza. Las vacunas actuales inducen la producción de anticuerpos neutralizantes homosubtipicos de cepas virales circulantes en la temporada correspondiente. La eficacia de las vacunas estacionales se limita a alrededor de un año, puesto que dejan de proteger contra las nuevas variantes del virus. El desarrollo de una vacuna universal con capacidad de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes heterosubtipicos (ANHET) reducirá la necesidad de constante renovación, además de conferir protección contra nuevas variantes de los virus circulantes y los aún no generados.

El estudio estructural y funcional de los anticuerpos neutralizantes contra los virus de influenza ha permitido identificar la existencia de ANHET, lo cual fundamenta la posibilidad de desarrollar vacunas universales contra influenza. Dichos estudios se haazn limitado al tamizado de un número reducido de anticuerpos monoclonales.

En nuestro grupo de investigación hemos desarrollado una estrategia para la generación de repertorios digitales basada en secuenciación masiva de las regiones variables de los anticuerpos seguida de su análisis bioinformático que potencialmente permitirá la identificación de clonotipos antígeno-específicos.

Con la finalidad de identificar ANHET anti-influenza, en este trabajo se realizará una estrategia tipo sensibilización/refuerzo (prime/boost), es decir, se vacunarán con una cepa heteróloga de influenza (H1N1p) a individuos sensibilizados a las variantes estacionales, se generarán los repertorios digitales de anticuerpos correspondientes a los días 0 y 7 (pre y post-vacunación), donde esperamos encontrar un incremento significativo de células productoras de ANHET. Posteriormente, se realizará un análisis bioinformática para identificar los ANHET potenciales, mismos que se generarán mediante técnicas de ADN recombinante, expresarán *in vitro* y caracterizarán en cuanto a su capacidad neutralizante.

La información generada en este proyecto permitirá caracterizar con profundidad la dinámica del repertorio de anticuerpos generados en respuesta a la vacunación heteróloga y los ANHET identificados tendrán potencial terapéutico y servirán para seleccionar epítomos conservados como candidatos para el desarrollo de una futura vacuna universal contra influenza.

Palabras clave: Vacuna AH1N1-p, repertorio digital de anticuerpos, ANHETs (Anticuerpos Neutralizantes HETerosubtipicos), vacunación heterólooa.

a. Lista de abreviaturas, expresiones y acrónimos

*.sff	Standard Flowgram Format; tipo de archivo de salida del equipo de secuenciación GS FLX Titanium de Roche donde se almacenan los flujogramas
2X	Solución doblemente concentrada
A/PR8/8/1934	Cepa de influenza A, proveniente de Puerto Rico, número de cepa 8 y aislada en 1934.
<i>ad hoc</i>	locución latina que significa literalmente “para esto”
ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity; Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo
ADNc	ADN complementario
AID	Activation-induced (cytidine) deaminase; enzima desaminasa de citidina inducida por activación
Anti-I.E.	Anti-Influenza Estacional
Anti-I.P.	Anti-Influenza Pandémica
APHET:	<u>Anticuerpo Protector HET</u> erosubtípico
ANHET:	<u>Anticuerpo Neutralizante HET</u> erosubtípico
ARN	Ácido Ribo Nucleico
ARNm	ARN mensajero
ARN _T	ARN total
BIRMEX	Laboratorios de Biológicos Y Reactivos de México; dependencia
Bitmap	Bit Mapped Picture; imagen de mapa de bits, es un formato de imagen
Blast	Basic Local Alignment Search Tool; programa informático de búsqueda de secuencia, ya sea de ADN o de proteínas
Cap 5'	Caperuza o casquete (o CAP, su nombre en inglés); es un nucleótido modificado de guanina, la 7-metilguanosina, que se añade al extremo 5' de la cadena del ARNm transcrito primario, dentro del núcleo celular
CDC	Centers for Disease Control and Prevention; centros para el control y prevención de enfermedades, entidad gubernamental de EE.UU.
CDR3	Complementary Determining Region; Región Determinante de Complementariedad 3
CEPANHET:	<u>Células Productoras de ANHET</u> (Linfocitos B de memoria, plasma-blastos y células plasmáticas).
CISEI	Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología; dependencia gubernamental mexicana
D	Segmento D (D; Diversity) de las inmunoglobulinas
Denka Seiken	Empresa japonesa dedicada a la manufactura de reactivos de diagnóstico y vacunas

dsDNA	ADN de doble cadena
ELISA	Acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ELISPOT	Enzyme-Linked ImmunoSorbent SPOT; ensayo de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas
ESAVI	Evento Supuestamente Atribuido a la Vacunación o Inmunización
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting; separación de células activada por fluorescencia (en citometría de flujo)
FASTA	Formato de fichero informático basado en texto, representa las secuencias de ADN o proteínas con códigos de una única letra
Fc	Fracción cristalizante; se refiere a la región constante de la inmunoglobulina. Esta región le otorga el isotipo a la inmunoglobulina, que puede ser IgM, IgD, IgG, IgA o IgE.
FcγRIII	Receptor Fc específico de IgG
FPAmptA	Nombre del oligo utilizado en la generación de amplicones de regiones variables de inmunoglobulinas (Forward Primer Amplification Titanium A adapter)
g/L	Gramos por litro
G0	Gap 0; fase del ciclo celular en que la célula no se está dividiendo
H1, H2...H16	Subtipos de Hemaglutinina, existen 16 subtipos identificados
H1N1e	Cepa viral de Influenza A H1N1 estacional, 2009-2010, utilizada en la vacuna de esta estación (A/Brisbane/59/2007/H1N1)
H1N1p	Cepa viral de Influenza A H1N1 pandémica, responsable de la pandemia del 2009
H3N2e	Cepa viral de Influenza A H3N2 estacional, 2009-2010, utilizada en la vacuna de esta estación (A/Brisbane/10/2007/H3N2)
HA	Hemaglutinina; proteína del virus de influenza
HA0	HA completa antes del corte post-traducciona
HA1	HA parte 1, corresponde a la región de la cabeza de la hemaglutinina y se generó por un corte enzimático post-traducciona en HA0
HA2	HA parte 2, corresponde a la región del tallo de la hemaglutinina y se generó por un corte enzimático post-traducciona en HA0
I.HA.	Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación
Ig	Inmunoglobulina
IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	Subclases del isotipo G de inmunoglobulina
IgHG	Inmunoglobulina de cadena pesada de isotipo G
IgLK e IgLL	Inmunoglobulina de cadena Ligera de isotipos Kappa y Lambda respectivamente
IgM, IgD, IgG,	Inmunoglobulina con isotipos M, D, G, A, E respectivamente

IgA, IgE	
IMGT	ImMunoGeneTics; fuente de referencia global en inmunogenética e inmunoinformática
<i>In silico</i>	Expresión que significa "hecho por computadora o vía simulación computacional"; proviene de las frases <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> del latín
<i>In vitro</i>	Latín: dentro del vidrio; experimento en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo
<i>In vivo</i>	Latín: dentro de lo vivo; experimento realizado dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos; dependencia gubernamental mexicana
Influenza A	Influenza del tipo A; género A de la familia Orthomixoviridae ¹
Influenza B	Influenza del tipo B; género B de la familia Orthomixoviridae ¹
Influenza C	Influenza del tipo C; género C de la familia Orthomixoviridae ¹
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública; dependencia gubernamental mexicana
J	Segmento J (J; Joining) de la inmunoglobulina
Kd	Constante de disociación
L293A	células de fibroblastos de riñón embrionario humano; utilizadas para expresión de anticuerpos recombinantes
LINUX	Núcleo de sistema operativo libre tipo Unix
M1	Proteína 1 de la Matriz; proteína del virus de la influenza
M2	Proteína 2 de la Matriz, también denominada Canal iónico M2; proteína del virus de la influenza
MDCK	Madin Darby Canine Kidney; células de riñón de perro immortalizadas por S.H. Madin y N.B. Darby en 1958 de una perra cocker spaniel
Medio DMEM	Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal essential Medium; medio de cultivo
Micron	Ensayo de Microneutralización en placa
N1	Nucleótidos 1; secuencia de ADN que se encuentra entre los segmentos V y D
N1, N2...N9	Subtipos de Neuraminidasa, existen 9 subtipos identificados
N2	Nucleótidos 2; secuencia de ADN que se encuentra entre los segmentos D y J
NA	Neuraminidasa; proteína del virus de influenza
NEP	Nuclear Export Protein; proteína de exportación nuclear; proteína viral
NK	Natural Killer
NP	NucleoProteína; proteína viral que encapsula los segmentos de ARN viral
NS	NonStructural protein; proteína no estructural; proteína viral
NYMC X-157	Cepa viral rearrreglada proveniente de la cepa: A/New York/55/2004 (H3N2) con el gen M de la cepa: A/PR/8/1934

NYMC X-179A	Componente de la vacuna pandémica. Esta cepa se generó en New York Medical College y la provee el CDC; es una cepa viral rearrreglada entre las cepas A/California/07/2009/H1N1 y la cepa NYMC X-157
O.D.	Unidades de Densidad Óptica
OD ₄₁₅	Unidad de densidad óptica leída a una longitud de onda de 415 nanómetros
OMS	Organización Mundial de Salud
PA	Polimerasa ácida; proteína viral
PANENZA	Nombre comercial alternativo a: Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1) 2009 manufacturada por Sanofi Pasteur Inc.
PAXgene	Nombre comercial de un tubo para recolectar sangre que preserva el ARN de la sangre
pb	Pares de bases
PB1	Polimerasa básica 1; proteína viral
PB2	Polimerasa básica 2; proteína viral
PBS	Phosphate Buffered Saline; solución amortiguadora de sales y fosfatos
PCR	Polimerase Chain Reaction; reacción en cadena de la polimerasa
PERL	Practical Extraction and Report Language; Lenguaje Práctico para la Extracción e Informe. Aunque esta expansión ha prevalecido en muchos manuales actuales, incluyendo la página de manual de Perl, es un retroacrónimo y oficialmente el nombre no quiere decir nada
PFU	Plate Forming Unit; unidades formadoras de placa
pFUSE-CHlg-hGI-e1	Vector de expresión para segmentos VH; adiciona las regiones constantes de la cadena pesada IgG1
pFUSE-CLlg-hK	Vector de expresión para segmentos VLK; adiciona las regiones constantes de la cadena ligera Kappa
pFUSE-CLlg-hL2	Vector de expresión para segmentos VLL; adiciona las regiones constantes de la cadena ligera Lambda
PreAnalytiX	Figura de alianza comercial entre BD y Qiagen especializada en sistemas de colección de sangre, estabilización y purificación de ADN y ARN
Prime/boost	Sensibilización y refuerzo
<i>region.key</i>	tipo de archivo de salida del pirosecuenciador donde se almacenan los datos de las
454Reads.fna	secuencias en formato FASTA generadas por el equipo GS FLX Titanium de ROCHE
RNP	Complejo de RiboNucleoProteína; conformado por un segmento de ARN viral encapsulado con NP y asociado a una proteína de PB1, PB2 y PA
Sanofi Pasteur	División de vacunas del grupo Sanofi-Aventis; es la compañía más grande en el mundo dedicada exclusivamente a vacunas
SCATCHARD	Nombre del químico del MIT George Scatchard, se refiere a la gráfica que sirve para

	medir interacciones de ligando libre/ligando unido a receptor.
SMART RACE	Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript , Rapid Amplification of cDNA Ends
TBIgGHu,	Nomenclatura de oligos 3';
TBIgKHu,	T=Titanium; B=Adaptador B; Ig=Inmunoglobulina; G, K o L=Isotipo y Hu=Humano
TBIgLHu	
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos; universidad pública mexicana
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UPM	Universal Primer A Mix
V	Región Variable de Ig (incluye a V, D y J)
Vacuna H1N1p	Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1) 2009 manufacturada por Sanofi Pasteur Inc. Contiene la cepa NYMC X-179A
VDJ	Segmentos V, D y J de la Ig (Región V)
VH	Región Variable de la cadena Pesada de Ig (H; Heavy)
VH3	Familia 3 de la región variable de cadena pesada
VH3-7 JH6	Familia 3, alelo 7 de la región VH Familia 6 de la región JH
VL	Región Variable de la cadena Ligera de Ig
XL1-Blue	Cepa de <i>E. coli</i> , genotipo: endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+), en su plásmido F tiene un gen de resistencia a tetraciclina; para información sobre cada característica ver: http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes

Contenido

RESUMEN.....	1
a. <i>Lista de abreviaturas, expresiones y acrónimos</i>	2
INTRODUCCIÓN.....	10
1. LOS VIRUS DE INFLUENZA	10
a. <i>Importancia en salud pública</i>	10
b. <i>Estructura del virus</i>	11
c. <i>Clasificación y nomenclatura</i>	11
d. <i>Ciclo de vida</i>	12
e. <i>Hospedadores y reservorios</i>	12
f. <i>Deriva y cambio antigénico</i>	13
2. RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA	13
a. <i>Respuesta inmune innata</i>	13
b. <i>Respuesta inmune adaptativa</i>	14
c. <i>Respuesta inmune adaptativa celular</i>	14
d. <i>Respuesta inmune adaptativa humoral</i>	14
e. <i>Respuesta inmune primaria, secundaria y generación de memoria</i>	15
3. VACUNAS CONTRA VIRUS DE INFLUENZA.....	16
a. <i>Vacuna estacional Vs vacuna universal</i>	16
b. <i>Diseño racional de vacunas</i>	17
c. <i>Estrategia de sensibilización/refuerzo</i>	17
d. <i>Enfoque minimalista</i>	18
4. EL REPERTORIO DE ANTICUERPOS.....	18
a. <i>Teoría de la selección clonal</i>	18
b. <i>Generación, activación y selección de células B</i>	18
c. <i>Estructura de los anticuerpos</i>	19
d. <i>Generación de la diversidad de anticuerpos</i>	19
e. <i>Como se estudian los repertorios de anticuerpos</i>	20
ANTECEDENTES	22
I. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANHET DE VIRUS DE INFLUENZA	22
II. RESPUESTA AL DÍA 7 DE LINFOCITOS B CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A PARTIR DE VACUNACIÓN O INFECCIÓN	22
III. ESTUDIO DE LOS REPERTORIOS DE ANTICUERPOS EN GENERAL Y CONTRA INFLUENZA	22
IV. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES A PARTIR DE REPERTORIOS DIGITALES DE ANTICUERPOS	
23	
MARCO TEÓRICO.....	24
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
HIPÓTESIS	26
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS.	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28

DISEÑO EXPERIMENTAL	28
PRIMER OBJETIVO: ENRIQUECIMIENTO DE CEPANHET EN SANGRE PERIFÉRICA.....	31
CAMPO	31
M1 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA	31
M2 SELECCIÓN Y RECLUTAMIENTO DE VOLUNTARIOS.....	32
M3 VACUNACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS	33
SEROLOGÍA	33
M4 RECUPERACIÓN DE SUERO.....	33
M5 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN	33
M6 ENSAYO DE MICRONEUTRALIZACIÓN EN PLACA.....	34
M7 SELECCIÓN DE INDIVIDUOS PARA SECUENCIACIÓN MASIVA	34
SEGUNDO OBJETIVO: GENERACIÓN DE REPERTORIOS DIGITALES DE ANTICUERPOS	35
BIOLOGÍA MOLECULAR	35
M8 AISLAMIENTO DE ARN TOTAL.....	35
M9 SÍNTESIS DE ADNC	35
M10 GENERACIÓN DE AMPLICONES DE REGIONES VARIABLES DE INMUNOGLOBULINAS.....	35
M11 PIROSECUENCIACIÓN MASIVA EN PARALELO.....	36
TERCER OBJETIVO: IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CANDIDATOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE HETEROSUBTÍPICA EN REPERTORIOS DIGITALES	37
BIOINFORMÁTICA	37
M12 CONTROL DE CALIDAD.....	38
M13 ASIGNACIÓN DE USO DE SEGMENTO VDJ	39
M14 ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y FRECUENCIA CLONAL	39
M15 SELECCIÓN POSITIVA.....	40
M16 CONVERGENCIA CON ANHET DESCRITOS.....	40
M17 MÉTODOS DE VISUALIZACIÓN.....	41
M18 SELECCIÓN DE ANHET POTENCIALES	42
CUARTO OBJETIVO: VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DE LOS ANHET IDENTIFICADOS	43
BIOLOGÍA MOLECULAR	43
M19 SÍNTESIS <i>IN VITRO</i> DE LAS REGIONES VARIABLES	43
M20 CLONACIÓN EN VECTOR DE EXPRESIÓN	43
M21 TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS 293A, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS	43
BIOLOGÍA CECULAR.....	44
M22 DETERMINACIÓN DE LAS AFINIDADES DE UNIÓN A VIRUS INFLUENZA	44
M23 INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN Y MICRONEUTRALIZACIÓN EN PLACA	44
M24 ANÁLISIS DE INMUNOPRECIPITACIÓN	45
M25 WESTERN BLOT.....	45
RESULTADOS ESPERADOS Y APORTES DEL ESTUDIO.....	46
PERSPECTIVAS.....	47
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	47
CRONOGRAMA	48

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD.....	49
RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXOS.....	57
ANEXO I. ANHET ANTI-INFLUENZA DESCRITOS EN LA LITERATURA.....	57
ANEXO II. LA VACUNA CONTRA INFLUENZA A H1N1P.	58
ANEXO III. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	62
ANEXO IV. HISTORIA CLÍNICA.	63
ANEXO V. TARJETA DIARIA.	64

INTRODUCCIÓN.

Este trabajo, es un estudio experimental donde se inducirá la generación de ANHETⁱ en humanos, mediante la vacunación con una cepa viral de influenza en un esquema de sensibilización/refuerzo. La originalidad del estudio consiste en el uso de la secuenciación masiva en paralelo para generar repertorios digitales de anticuerpos, dentro de los cuales se analizará con herramientas bioinformáticas la diversidad y frecuencia clonal para identificar los ANHET generados y posteriormente sintetizarlos *in vitro* para su caracterización funcional. En estudios posteriores se identificarán los epitopos a los cuales van dirigidos los anticuerpos identificados con esta estrategia. El conocer estos epitopos podría ayudar en el desarrollo de una vacuna universal.

En esta introducción se discutirá sobre la importancia que tienen los virus de influenza en la salud pública, algunas de sus generalidades, de la respuesta inmune generada contra ellos, de las vacunas contra estos virus y su diseño racional. Posteriormente se discutirá sobre los anticuerpos, el repertorio de anticuerpos, la generación de su diversidad y finalmente se discutirá sobre el como se estudian los repertorios de anticuerpos y que información podemos obtener de ellos.

1. Los virus de influenza

a. Importancia en salud pública

Los virus de influenza son un grave problema de salud pública, Las epidemias estacionales de influenza pueden ejercer gran presión sobre los servicios de salud y tener importantes repercusiones económicas debido a la reducción de la productividad laboral²⁻⁴. La OMS estima que cada año se producen de 3 a 5 millones de casos graves de influenza y mueren entre 250,000 a 500,000 personas en el mundo³. En Estados Unidos de Norteamérica se estima que han muerto entre 3,000 y 49,000 individuos cada año en los últimos 30 años. El 90 % de las muertes ha sucedido en individuos mayores de 65 años y el resto son principalmente niños, mujeres embarazadas y personas inmunocomprometidas².

ⁱ ANHET; Anticuerpos Neutralizantes HETerosubtipicos

b. Estructura del virus

Los virus de influenza tienen una envoltura de bicapa lipídica que proviene de la membrana de las células del epitelioⁱⁱ del hospedero⁵. En esta bicapa lipídica se encuentran embebidas tres proteínas virales transmembranales; la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) y un canal iónico (M2 o proteína 2 de la matriz). La HA y NA son las principales glucoproteínas de la envoltura viral, y se encuentran en una proporción HA:NA que varía de 4:1 a 5:1. La razón M2:HA está en el orden de un M2 por cada 10 a 100 HA¹. La glicoproteína NA es un tetrámero anclado a la membrana viral por un dominio transmembranal y posee la capacidad de romper la parte terminal de los residuos de ácido siálico de las glucoproteínas de la superficie celular y de los gangliósidos, lo que libera a los nuevos viriones de la superficie celular. La proteína 1 de la matriz (M1), es la proteína más abundante del virión, y se encuentra por debajo de la envoltura viral y se asocia con los complejos de ribonucleoproteína (RNP)¹.

El genoma de los virus de influenza A está constituido por ocho moléculas de ARN de una sola hebra de sentido negativo cada una encapsulada por la nucleoproteína (NP) y asociadas con tres proteínas polimerasas de ARN; PB1, PB2 y PA, que en conjunto conforman el complejo ribonucleoprotéico (RNP). Las proteínas PB1, PB2 y PA son las responsables de la transcripción y replicación del ARN viral. El virus también codifica para una proteína no estructural (NS) que se expresa en las células infectadas y una proteína de exportación nuclear (NEP), que se encuentra en el virión pero se desconoce su ubicación¹.

c. Clasificación y nomenclatura

Los virus de influenza pertenecen a la familia Orthomixoviridae y se clasifican en tres tipos: A, B y C en base a sus proteínas nucleoproteína y matriz (NP y M)¹. Los virus de influenza A se clasifican en subtipos de acuerdo a sus hemaglutininas y

ⁱⁱ Los virus de influenza infectan células del epitelio de mucosas, principalmente del epitelio respiratorio, aunque también del epitelio intestinal; en autopsias de casos graves se han encontrado diseminado en varios tejidos.

neuraminidasas (HA y NA). Actualmente, los virus identificados se agrupan en 16 subtipos de HA y 9 subtipos de NA circulantes. De los cuales tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos NA (N1 y N2) han causado epidemias en el humano⁶. Los virus de la influenza tipo A infectan a una variedad de mamíferos (ej. cerdos y caballos) y especies aviarias, mientras que las infecciones del tipo B y C se limitan a los seres humanos. Sólo los tipos A y B causan enfermedad de alguna gravedad en el hombre^{1, 7, 8}. Los virus de influenza tienen una nomenclatura estándar que incluye el tipo viral, si no es un aislado humano, se especifica la especie de donde se aisló, el año cuando se aisló y el subtipo viral si es que es un virus de influenza tipo A. ej. A/Panamá/2007/1999(H3N2).

d. Ciclo de vida

La glicoproteína HA es la responsable de la unión del virus a los residuos de ácido siálico presentes en la superficie de las células epiteliales del hospedero y de la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma, lo que permite la liberación del genoma viral dentro del citoplasma. M2 funciona como un canal iónico activado por pH que permite la acidificación del interior del virión, lo que conduce al cambio conformacional de HA, la consecuente fusión (envoltura viral-endosoma) y liberación de los complejos RNP y proteínas NEP al citoplasma¹. Las proteínas de la envoltura HA, NA y M2 se sintetizan dentro del retículo endoplásmico a partir del ARNm de origen viral en ribosomas unidos a membrana, en el retículo endoplásmico se pliegan y conducen hacia el aparato de Golgi donde sufren modificaciones post-traduccionales¹. Las tres proteínas tienen señales que subsecuentemente las direccionarán hacia la membrana celular donde se ensamblarán los viriones. La extrusión de los virus de influenza ocurre en la membrana de la célula y cuando la extrusión está completa, las proteínas HA continúan unidas al ácido siálico de la superficie celular. Las partículas virales se liberan de la superficie celular por la actividad de sialidasa de la proteína NA. Los ciclos de replicación duran entre 4 y 6 horas¹.

e. Hospedadores y reservorios

Los virus de influenza son una entidad que forma parte de un ecosistema complejo. El hospedador natural de los virus de influenza son los patos chapoteadores (dabbling ducks), en los cuales se genera una enfermedad benigna, sin embargo, los virus de

influenza son muy adaptables y han sido capaces de infectar un amplio rango de hospedadores. La enfermedad asociada con la infección muestra un amplio rango de síntomas, dependiendo en parte de las propiedades genéticas del virus y de la especie de hospedador que es infectada. Los virus de influenza pueden infectar aves y mamíferos y los síntomas van de moderados a severos y finalmente la muerte⁹. Es ampliamente aceptado que todos los virus de influenza que infectan mamíferos se originaron en aves silvestres. Todos los subtipos virales se han aislado de especies aviarias, las cuales constituyen un gran reservorio⁹.

Solo los subtipos H1N1 y H3N2 de influenza A siguen un patrón epidemiológico en humanos y son considerados endémicos. Los cerdos son susceptibles de infectarse con cepas aviarias y humanas, lo que permite el intercambio de segmentos génicos de diversas cepas que eventualmente pueden generar nuevas variantes con diferentes propiedades inmunogénicas y patogénicas para el humano^{1,9}.

f. Deriva y cambio antigénico

Los virus de influenza presentan dos tipos de variación antigénica; la deriva antigénica y el cambio antigénico¹⁰.

Deriva antigénica: Se refiere a la acumulación de mutaciones en los genes de HA y NA que alteran la antigenicidad de estas proteínas y pueden otorgarle ventaja selectiva al generar variantes capaces de evadir la inmunidad pre-existente^{1,8,10}.

Cambio antigénico: el cambio antigénico se refiere a la generación de una nueva cepa viral producida por la mezcla de segmentos (HA y/o NA) virales de diferentes cepas que co-infectaron un mismo hospedero^{1,8,10}.

2. Respuesta inmune contra el virus de influenza

a. Respuesta inmune innata

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa contra la infección por el virus de influenza. Consiste de componentes (ej. Moco) cuyo fin es la prevención de la infección de las células del epitelio respiratorio y el control de la replicación viral. La respuesta inmune innata contra influenza se da en varios niveles, a nivel intracélular con el reconocimiento del ARN viral por los PRR (Pattern Recognition Receptors)¹¹. A nivel vías respiratorias con las mucosidades secretadas, a nivel alveolar con los macrófagos

alveolares que fagocitan células infectadas que sufren apoptosis y a nivel sistémico con las células dendríticas que opsonizan viriones y cuerpos apoptóticos de células infectadas y presentan péptidos virales a los linfocitos T en los ganglios linfáticos y con los linfocitos NK (natural Killer) que reconocen los anticuerpos unidos a células infectadas y las lizan¹¹.

b. Respuesta inmune adaptativa

El sistema inmune adaptativo forma la segunda línea de defensa contra la infección por el virus de influenza. Este consiste de inmunidad humoral y celular mediada por anticuerpos específicos contra influenza y células T respectivamente¹¹.

c. Respuesta inmune adaptativa celular

Después de la infección con virus de influenza, se activan los linfocitos T CD4+, los linfocitos T CD8+ y los linfocitos T reguladores. Los linfocitos T CD4+ se activan después de reconocer péptidos virales asociados al MHC clase II de células presentadoras de antígeno (APC) que también expresan moléculas coestimuladoras. Algunos linfocitos T CD4+ presentan actividad citolítica contra células infectadas, sin embargo, el fenotipo más importante de estas células es como linfocitos T ayudadores (Th, T helper). Existen diferentes subgrupos de linfocitos Th de acuerdo a su expresión de citosinas. Los linfocitos Th2 que producen IL-4 e IL-13 promueven predominantemente la respuesta de linfocitos B y los linfocitos Th1 que producen IFN (interferón) e IL-2 están involucrados principalmente en la respuesta inmune celular. Los linfocitos T reguladores y linfocitos Th17 regulan la respuesta inmune celular contra la infección por virus de influenza¹¹.

d. Respuesta inmune adaptativa humoral

La infección con virus de influenza induce la producción de anticuerpos específicos. Los anticuerpos anti-influenza neutralizantes y no neutralizantes son importantes en el desenlace de la enfermedad. A continuación se resumen los modos de acción de estos anticuerpos¹¹.

Neutralización mediada por anticuerpos anti-virus de influenza: los anticuerpos neutralizantes anti-virus de influenza actúan principalmente de tres maneras: 1) Se unen a la cabeza de HA, lo que bloquea la unión con su receptor de ácido siálico y por consiguiente la infección; 2) Se unen al tallo de HA, lo que evita la fusión de la

membrana viral con la membrana del endosoma del huésped y por consiguiente la infección y 3) Se unen al sitio activo de la NA, lo que evita el desprendimiento de los viriones de la superficie celular y por consiguiente evita la diseminación e infección de otras células¹¹⁻¹⁴.

Eliminación de viriones mediada indirectamente por anticuerpos: Los anticuerpos que se unen a epítopos no neutralizantes facilitan la eliminación de viriones mediante varios mecanismos: 1) Fagocitosis mediada por receptor de Fc. Las regiones Fc de los anticuerpos unidos a viriones (opsonizados) facilitan la ingestión y destrucción por macrófagos. La fagocitosis también permite la presentación de péptidos en moléculas MHC clase II por las células fagocíticas, lo que induce la respuesta inmune mediada por células T; 2) Modulación de la respuesta inmune innata y celular. Los receptores de Fc son proteínas transmembranales que pueden transmitir señales estimuladoras o inhibitorias a la mayoría de las células del sistema inmune, lo que permite que estos anticuerpos orquesten de manera indirecta el tipo y la fuerza de la respuesta inmune innata y celular; 3) Citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC, Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity). Los anticuerpos tipo IgG1 e IgG3 unidos al virus interactúan con receptores FcγRIII de células NK, e inducen a las células a destruir los viriones y la células infectadas y 4) Citotoxicidad dependiente de complemento. Los anticuerpos IgG unidos en la superficie de su blanco, activan proteínas del complemento que se encuentran en el suero, lo que desencadena inflamación y reclutamiento de proteínas que finalmente hacen huecos en la membrana de la envoltura viral o de la célula infectada¹¹⁻¹⁴.

e. Respuesta inmune primaria, secundaria y generación de memoria

La respuesta humoral primaria consiste en la activación de linfocitos B vírgenes en respuesta a un antígeno, se produce una expansión clonal de linfocitos específicos y se generan células plasmáticas (células B efectoras) y de memoria. La respuesta humoral secundaria consiste en la activación de células memoria. En ambos casos, la activación conduce a la producción de anticuerpos secretados de diversos isotipos que difieren en su capacidad de mediar funciones efectoras específicas¹¹.

La cinética de la respuesta primaria, medida por la concentración sérica de anticuerpo, depende de la naturaleza del antígeno, la vía de administración del antígeno, la presencia o ausencia de coadyuvantes y la especie o cepa inmunizada. Sin embargo, en todos los casos en una reacción primaria a antígeno se caracteriza por una fase de retraso, durante la cual las células B vírgenes experimentan selección clonal, expansión clonal subsecuente y diferenciación en células de memoria y/o plasmáticas. La fase de retraso va seguida de un incremento logarítmico de la concentración sérica de anticuerpo, que alcanza un máximo, continúa en una meseta por un tiempo variable y a continuación declina. Las células B de memoria que se forman durante la respuesta primaria dejan de dividirse e ingresan en la fase G₀ del ciclo celular. Estas células tienen lapsos de vida variables y algunas persisten durante toda la vida del individuo. La capacidad de desarrollar una reacción humoral secundaria depende de la existencia de poblaciones de células B de memoria y asimismo de células T de memoria. La respuesta secundaria se diferencia de la primaria en que el período de retraso es más corto, su magnitud es mayor y dura más tiempo. Otra característica de la reacción secundaria es que los anticuerpos generados tienen mayor afinidad por el antígeno y predominan isotipos diferentes a IgM¹¹.

3. Vacunas contra virus de influenza

Actualmente la vacunación es el principal método de prevención contra la influenza. Desde la primera administración de la vacuna en la década de los 40, la vacuna contra influenza ha proporcionado un gran apoyo contra las infecciones por influenza.

a. Vacuna estacional Vs vacuna universal.

Las vacunas estacionales se producen de dos maneras, con virus inactivados o con virus atenuados, ambos tipos de vacunas reducen la infectividad viral mediante la inducción de anticuerpos y memoria inmune celular. Los anticuerpos son el principal medio de prevenir la infección y la inmunidad celular es importante en la reducción de consecuentes infecciones. La vacuna de influenza inactivada se suministra de manera intramuscular e induce principalmente anticuerpos sistémicos, mientras que la vacuna de virus atenuados induce tanto anticuerpos sistémicos como anticuerpos en mucosa debido a su administración vía nasal. Ambos tipos de vacunas están compuestas por

tres componentes virales; una cepa de influenza A H1N1, una cepa de influenza A H3N2 y una cepa de influenza B. Los componentes de la vacuna se determinan mediante la evidencia epidemiológica y vigilancia global y se conforman por las cepas de influenza que tienen la mayor probabilidad de dominar en la población durante la siguiente estación de influenza. La eficacia de la vacuna estacional se reduce a 1-1.5 años hasta que una nueva variante viral inmunológicamente diferente emerge¹⁵.

En un principio se necesitaba preparar una vacuna por cada subtipo viral circulante, actualmente, gracias a los adyuvantes, se necesitan de 3 a 4 vacunas para proteger contra 16 diferentes subtipos y se espera en un futuro se desarrolle una vacuna universal contra influenza que proteja contra los subtipos actuales y contra cualquier nueva variante¹⁶⁻²⁰.

b. Diseño racional de vacunas

El diseño racional de vacunas contra influenza se basa en la síntesis de lo que sabemos sobre la respuesta humoral y celular para desarrollar nuevas estrategias que induzcan una respuesta inmune ideal. Por ahora existen dos estrategias que han demostrado su valor para el diseño de una vacuna universal, estas estrategias son consisten en la sensibilización/refuerzo y el enfoque minimalista¹⁶.

c. Estrategia de sensibilización/refuerzo

La respuesta humoral contra influenza está compuesta de células vírgenes activadas por primera vez y de células B de memoria re-activadas. Muchos de los epítomos de los virus de influenza cambian cada año por deriva antigénica, por lo que las células vírgenes activadas por primera vez serán específicas contra los antígenos únicos de la última variante viral, mientras que las células B de memoria re-activadas serán específicas para epítomos que no cambiaron, es decir, epítomos conservados^{11, 16}.

Esta estrategia consiste en la vacunación con una cepa viral y un posterior reto con otra cepa viral heteróloga, es decir, una cepa viral altamente divergente²¹⁻²⁶. El utilizar una cepa heteróloga en el reto vacunal, donde solamente los epítomos funcionales están conservados, re-activa solamente a los linfocitos B de memoria específicos para estos epítomos. De este modo la respuesta inmune se puede enriquecer con ANHET^{21, 22, 25-28}.

d. Enfoque minimalista

El enfoque minimalista trata de reducir o eliminar la respuesta de anticuerpos contra epítomos variables de virus de influenza y se enfoca a la inducción de ANHET con el uso de los epítomos funcionales altamente conservados entre todos los tipos y subtipos virales. El diseño de este enfoque se basa en la identificación de una gran variedad de ANHET dirigidos contra regiones muy conservadas del tallo y cabeza de la HA²⁹⁻³³.

4. El repertorio de anticuerpos

a. Teoría de la selección clonal

Los postulados de la teoría de la selección clonal propuestos por Burnet en 1959, explican muy bien lo que sucede durante la selección de linfocitos B. Los principales postulados se describen a continuación^{34, 35}.

- Todos los individuos tienen clonas celulares con receptores específicos, idénticos a los anticuerpos secretados (o receptores expresados por su progenie).
- Cada clona produce anticuerpos de especificidad única para cada antígeno (determinante antigénico).
- La especificidad de una clona es determinada (aleatoriamente) durante la diferenciación (ontogenia) antes del contacto con el antígeno.
- Al penetrar al organismo, el antígeno selecciona y expande sólo las clonas específicas contra él.

b. Generación, activación y selección de células B

La producción de células B plasmáticas y de memoria se puede dividir en tres etapas básicas. La primera etapa sucede en la médula ósea, es independiente de antígeno y se generan células B maduras inmunocompetentes vírgenes, proceso denominado maduración, este proceso es una secuencia ordenada de reordenamientos del gen de Ig que progresa en ausencia del antígeno. En la segunda etapa, estas células vírgenes salen de la médula ósea, circulan en la sangre y en la linfa y en los órganos linfoides secundarios pueden entrar en contacto con el antígeno para el que son específicas, cuando esto sucede, la célula se activa y prolifera, es decir se expande clonalmente. Durante la tercera etapa, las células expandidas clonalmente se diferencian

para crear una población de células plasmáticas secretoras de anticuerpo y otra población de células B denominadas plasmablastos que eventualmente se diferenciarán a linfocitos B de memoria. Como consecuencia de la activación, algunas células B experimentarán maduración de afinidad mediante hipermutación somática y selección positiva y muchas células también sufrirán cambio de isotipo del anticuerpo producido³⁶.

c. Estructura de los anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas cuya unidad esta constituida por un tetrámero formado por dos homodimeros. El primer homodímero se denomina cadena pesada y esta conformada por dos una region variable (VH, variable heavy) constituida por la recombinación de tres segmentos génicos; el segmento génico V (de region variable), el segmento génico D (de diversidad) y el segmento génico J (de junction, unión), y una region constante. El segundo homodímero se denomina cadena ligera y al igual que la cadena pesada presenta una region variable constituida por la recombinación de dos segmentos génicos; el segmento génico V (de region variable) y el segmento génico J (de junction, unión), y una region constante³⁶.

d. Generación de la diversidad de anticuerpos

Los repertorios de anticuerpos son altamente diversos, se estiman en 3.5×10^{10} ³⁷, esta diversidad les proporciona la habilidad para unirse a prácticamente cualquier antígeno. Son tres los mecanismos principales de generación de diversidad en los anticuerpos:

Recombinación somática. La recombinación somática consiste en la unión de un segmento variable (V), uno de diversidad (D) y uno de unión (J; de Joining) en la cadena pesada, y en la cadena ligera somática consiste en la unión de un segmento variable (V) y uno de unión (J; de Joining). Este proceso ocurre durante la maduración de los linfocitos B en la médula ósea, es independiente de antígeno y está mediado por el complejo enzimático denominado recombinasa VDJ. Durante la unión de los segmentos V-D y D-J se introducen regiones N1 y N2, respectivamente, que corresponden a secuencias de ADN no codificadas en la línea germinal y se generan por la adición de cantidades aleatorias de nucleótidos P y de nucleótidos N, y por la delección variable de nucleótidos V de cadena ligera y de cadena pesada. La mayor diversidad en la región

variable se encuentra en el CDR3 (Complementary Determining Region; región determinante de complementariedad) que se compone de una parte de la región V, toda la región N1-D-N2 y una parte de J³⁶.

Hipermutación somática. Consiste en la adición de mutaciones puntuales en la región VDJ de la cadena pesada y VJ de la cadena ligera. Estas mutaciones las produce la enzima desaminasa de citidina inducida por activación (AID). Es importante destacar que la hipermutación somática se genera después de la activación inducida por el antígeno y los linfocitos B que acumulen mutaciones no sinónimas que le proporcionen mayor afinidad por el antígeno se seleccionarán de manera positiva³⁸.

Cambio de clase. El cambio de clase o isotipo consiste en la capacidad de los linfocitos B de cambiar de región constante después de la activación y en respuesta a diversas señales externas como citosinas liberadas por célula T o señales mitógenas suministradas por agentes patógenos. Los linfocitos B vírgenes expresan IgM e IgD, cuando son estimulados a cambio de isotipo, pueden sustituir la región constante de IgM por la región constante de IgG, IgA o IgE. Este cambio es irreversible³⁶.

e. Como se estudian los repertorios de anticuerpos

La información que guardan los repertorios de anticuerpos es en extremo valiosa y el poder acceder e interpretar esta información nos permitirá entender muchos aspectos de la respuesta inmune adaptativa frente a vacunas o condiciones de salud-enfermedad.

El repertorio de anticuerpos se puede visualizar como una base de datos multidimensional, estrechamente relacionada con los demás componentes del sistema inmune y con el ambiente en el que se encuentra inmerso el organismo. Actualmente nuestra comprensión de esta base de datos esta muy lejos de ser exhaustiva y completa, no obstante, la acumulación del conocimiento y el avance tecnológico nos están acercando cada vez mas a su entendimiento.

El repertorio de anticuerpos se ha estudiado en varios niveles y escalas; a nivel serológico³⁹⁻⁴¹, celular^{13, 42} y de secuencia^{43, 44}. Las estrategias y metodologías que se han utilizado para el estudio del repertorio de anticuerpos son vastas y nos dan diferente tipo de información. Se ha determinado la frecuencia de linfocitos que expresan un receptor dado (IgG o TCR), mediante citometría, esto cuando se dispone de un

anticuerpo monoclonal específico en combinación con otros marcadores específicos. Por ejemplo, se realizó una descripción amplia del repertorio de TCRBVⁱⁱⁱ con anticuerpos monoclonales disponibles para casi todas las familias de BV⁴⁵. También se han desarrollado estrategias originales para analizar la diversidad del repertorio de transcritos de Ig y TCR basadas en la clonación y secuenciación de amplicones provenientes de genotecas de ADNc⁴³. El desarrollo de técnicas más prácticas y sistemáticas para el análisis en gran escala de los repertorios de Ig o TCR, como el spectratyping del CDR3⁴⁶⁻⁴⁸, que consiste en el análisis del uso de tamaños del CDR3, ha permitido la descripción del repertorio de receptores antígeno-específicos mediante firmas moleculares. También se han utilizado microarreglos de péptidos para caracterizar los cambios en los repertorios de anticuerpos⁴⁹⁻⁵¹.

Más recientemente, el uso de la secuenciación masiva en paralelo ha permitido el estudio a nivel de secuencia de ADN de cientos de miles de regiones variables de Ig o TCR, los repertorios de anticuerpos analizados de esta manera se conocen como repertorios digitales de anticuerpos, y se han utilizado para el estudio en modelos animales⁵²⁻⁵⁴ y humanos⁵⁵, en pacientes infectados con HIV^{56, 57}, y en pacientes con linfoma^{58, 59}. El estudio de repertorios digitales de anticuerpos ha generado una variedad de herramientas bioinformáticas que permiten la caracterización estructural del repertorio^{60, 61}, ya sea la identificación de los rearrreglos VDJ correspondientes a cada secuencia⁶², lo que nos da información de la diversidad clonal, la agrupación de secuencias relacionadas⁶³, la frecuencia relativa e hipermutación somática^{38, 64}, lo que nos da una idea de la selección positiva, e incluso la relación de redes que pudieran generarse en este complejo sistema⁵³. Esto sin duda, nos introduce a un nuevo nivel y escala en el estudio de los repertorios de anticuerpos.

ⁱⁱⁱ TCRBV; T Cell Receptor Beta Variable, Región variable beta de receptor de células T.

ANTECEDENTES

I. Generación y caracterización de ANHET de virus de influenza

Hasta el momento se han descrito ~110 ANHET^{12, 13, 65-85} de virus de influenza, todos ellos tienen identificado sus epítomos neutralizables y varios cuentan con ensayos de protección *in vivo* y la estructura cristalográfica antígeno-anticuerpo^{66-68, 70, 72, 75, 76, 81}. Solo se ha reportado un ANHET Pan-influenza, es decir, que neutraliza todos los subtipos de virus de influenza⁷².

II. Respuesta al día 7 de linfocitos B contra virus de influenza a partir de vacunación o infección

Existe una gran cantidad de evidencia serológica^{12, 27, 86-88} y de ANHET^{13, 72, 73} generados a partir del enriquecimiento de células productoras de anticuerpos neutralizantes heterosubtípicos (CEPANHET) en sangre periférica en el día 7 como respuesta a una infección o vacunación con una cepa homóloga o heteróloga (sensibilización/refuerzo). El trabajo más importante para nuestro proyecto es el descrito por Wrammert y colaboradores⁶⁵, en el cual se caracterizó la magnitud y la especificidad de la respuesta de plasmablastos del día 9 de individuos infectados con H1N1p. Se observó mediante ELISPOT que la mitad de las células productoras de IgG, son específicas para la cepa H1N1p y de estas el 30 al 50% son específicas contra HA. Se generaron 46 anticuerpos monoclonales derivados de los plasmablastos específicos contra influenza H1N1p se caracterizaron por su heterosubtipicidad y se observó que el 63% fueron ANHET.

III. Estudio de los repertorios de anticuerpos en general y contra influenza

En nuestro laboratorio hemos generado repertorios digitales de anticuerpos, mediante secuenciación masiva en paralelo con el equipo de pirosecuenciación 454 de Roche. La forma en que generamos el ADNc de las regiones variables de las inmunoglobulinas, es independiente de su familia de gen V, esto se hace mediante la técnica de RACE 5' que genera ADNc de todos los transcritos del ARN_T, esto es muy importante ya que se evita la introducción de sesgos de amplificación debido al uso de alrededor de 20 oligos específicos necesarios para amplificar la mayor parte de las

regiones variables de las inmunoglobulinas. Se han generado repertorios digitales de anticuerpos en individuos infectados con dengue, en pacientes con artritis reumatoide, en ratones inmunizados con lizosima y superantígenos, todos estos trabajos están por publicarse.

Actualmente el uso de repertorios digitales de anticuerpos se ha vuelto una herramienta importante para el estudio en modelos animales⁵²⁻⁵⁴ y humanos⁵⁵, en pacientes infectados con HIV^{56, 57}, y en pacientes con linfoma^{58, 59}.

Steven R. Wiley y colaboradores⁸⁹ reportaron el primer estudio del repertorio de anticuerpos pre y post-vacunación con una vacuna anti-malaria. Este trabajo se realizó en un modelo murino para analizar la diversidad y frecuencia clonal en respuesta a la vacunación con y sin adyuvantes.

Krause C.J. y colaboradores⁷⁵ publicaron el primer estudio derivado del análisis masivo de anticuerpos, de una sola familia V (VH3) comparado con cinco ANHET generados de un mismo individuo. Este grupo generó cinco ANHET, los caracterizó y después de 6 meses tomó otra muestra de sangre del mismo individuo, generó el repertorio de la familia VH3 (60,484 secuencias de regiones V) y realizó una comparación de sus ANHET con este repertorio.

IV. Generación de anticuerpos monoclonales a partir de repertorios digitales de anticuerpos

Reddy, S. T. y colaboradores⁹⁰ generaron anticuerpos monoclonales con afinidades nanomolares a partir del análisis de las frecuencias relativas de repertorios digitales de anticuerpos de ratones inmunizados con varios antígenos. Las regiones variables pesadas y ligeras identificadas se sintetizaron *in vitro* y expresaron en células de mamífero

MARCO TEÓRICO

Individuos sensibilizados a las cepas estacionales vacunados con una cepa heteróloga (H1N1p) enriquecen su sangre periférica con CEPANHET al día 7 post-vacunación. Este enriquecimiento de CEPANHET se deriva de la re-activación de linfocitos B de memoria específicos contra epítomos funcionales conservados entre los diferentes subtipos virales de influenza (Figura 1).

El análisis bioinformático del cambio en la diversidad y frecuencia clonal en los repertorios de anticuerpos digitales generados a partir de esta sangre enriquecida con CEPANHET comparada con la sangre pre-vacunación puede evidenciar la selección positiva dirigida contra el virus y permitir la identificación de posibles ANHET generados por la vacunación heteróloga.

Una vez identificados los ANHET candidatos, se puede utilizar su secuencia nucleotídica para la generación de anticuerpos recombinantes monoclonales; para posteriormente caracterizar sus capacidades neutralizantes heterosubtipicas (Figura 1)

Los ANHET generados de esta manera podrían servir como inmunoterapéuticos y para identificar epítomos funcionales conservados en diversos subtipos de influenza, que puedan utilizarse en el desarrollo de una vacuna universal contra influenza (Figura 1).

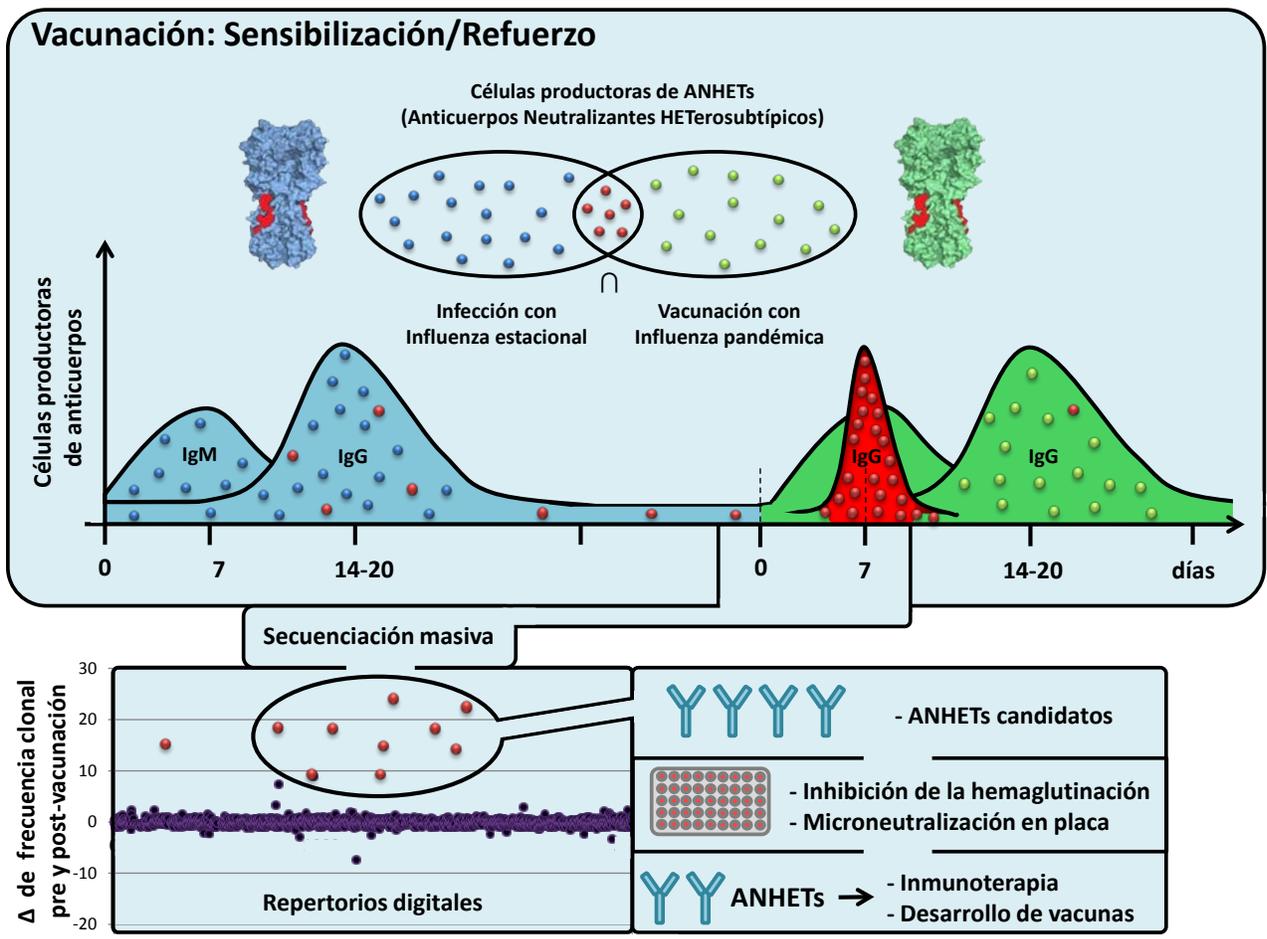


Figura 1. Marco teórico

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El análisis *in silico* del repertorio de anticuerpos digitales permite la identificación de anticuerpos neutralizantes heterosubtípicos anti-influenza?

HIPÓTESIS

El análisis de repertorios de anticuerpos digitales en individuos vacunados con antígenos heterólogos mediante un esquema de sensibilización/refuerzo permite la identificación de anticuerpos neutralizantes heterosubtípicos *in vitro*.

JUSTIFICACIÓN

Las actuales vacunas estacionales tienen un espectro reducido de protección. Existe la necesidad imperante de una vacuna universal, puesto que la población mundial está expuesta a nuevas variantes virales que pueden generarse en cualquier momento, lo que puede originar epidemias y pandemias.

Actualmente, la identificación y generación de ANHET *in vitro* aunque se ha automatizado y eficientizado, es un proceso complicado, laborioso y costoso. Además de que el tamizado de ANHET como se realiza usualmente no permite la caracterización fina de todo lo que ocurre en el repertorio de anticuerpos a nivel de clonogías y selección positiva.

Se necesita desarrollar un método de identificación de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro que sea rápido, masivo y genérico. En este sentido, un método como el que proponemos acelerará el proceso de identificación de regiones conservadas, no solo contra el virus de influenza, sino contra cualquier enfermedad generada por patógenos muy variantes y diversos, como es el caso de Hepatitis C, VIH, *Neisseria meningitidis*, *Plasmodium*, *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus*¹⁸. La identificación de estas regiones conservadas acelerará el proceso de desarrollo de vacunas de amplio espectro.

OBJETIVOS.

Objetivo general

Identificación *in silico* y validación *in vitro* de anticuerpos neutralizantes heterosubtípicos anti-virus de influenza del repertorio digital de anticuerpos humanos

Objetivos específicos

- 1.- Enriquecimiento de células productoras de anticuerpos neutralizantes heterosubtípicos en sangre periférica.
- 2.- Generación de repertorios digitales de anticuerpos.
- 3.- Identificación de anticuerpos candidatos con potencial actividad neutralizante heterosubtípica en repertorios digitales.
- 4.- Caracterización funcional de los anticuerpos identificados.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Este trabajo es un estudio experimental en humanos y está dentro del ámbito de la biología de sistemas⁹¹⁻⁹³. La variable independiente es la vacunación con una cepa heteróloga de virus de influenza y la variable dependiente es la generación de ANHET.

El diseño experimental consiste en la inducción del enriquecimiento de CEPANHET en sangre periférica mediante un esquema de vacunación de sensibilización/refuerzo. La sensibilización se refiere a que los individuos deben de presentar títulos protectores contra cepas estacionales, y el refuerzo se refiere a la vacunación con una cepa heteróloga^{14, 94, 95}, es decir, una cepa inmunogénicamente diferente a las cepas con las que los individuos han estado expuestos. En este esquema de vacunación, se genera un enriquecimiento de CEPANHET a los 7 días del refuerzo, por lo que la toma de sangre para generación de repertorios digitales se debe realizar a los 0 y 7 días. La diferencia en las frecuencias clonales de los ANHET entre los 0 y 7 días nos permitirá su identificación *in silico*. Una vez identificadas las secuencias de ADN de los ANHET, se sintetizarán *in vitro*, clonarán en vectores para su expresión en células de mamífero, se purificarán y caracterizarán sus capacidades de neutralización heterosubtípica, y finalmente se identificarán sus proteínas blanco.

A continuación se describe el diseño experimental en base a los objetivos y sus variables (Figura 2).

Primer objetivo específico: Enriquecimiento de CEPANHET en sangre periférica.

- Variable independiente (tratamiento): Vacunación heteróloga en individuos sensibilizados a cepas estacionales.
- Variables a medir: Inducción de respuesta inmune secundaria protectora contra la cepa heteróloga.
- Variable dependiente: Sangre enriquecida con CEPANHET.

Segundo objetivo específico: Generación de repertorios digitales de anticuerpos.

- Variable independiente: Sangre enriquecida con CEPANHET.
- Variables a medir:
 1. Integridad y pureza del ARN_T.
 2. Calidad, tamaño y cantidad de las lecturas de secuencia.
- Variable dependiente: Repertorios digitales de anticuerpos.

Tercer objetivo específico: Identificación de anticuerpos candidatos con potencial actividad neutralizante heterosubtípica en repertorios digitales.

- Variable independiente: Repertorios digitales de anticuerpos.
- Variables a medir:
 3. Diversidad y frecuencia clonal pre y post-vacunal.
 4. Selección positiva.
 5. Convergencia con ANHET descritos.
- Variable dependiente: Secuencias de ADN de ANHET candidatos.
- Método de transformación de la variable dependiente del 2^{do} objetivo a variable independiente del 3^{er} objetivo: Síntesis *in vitro* de las secuencias variables de los ANHET identificados, clonación en vectores de expresión, transformación de células de mamífero, expresión y purificación de los anticuerpos recombinantes.

Cuarto objetivo específico: Validación experimental de los ANHET identificados.

- Variable independiente: Anticuerpos purificados.
- Variables a medir:
 1. Neutralización heterosubtípica.
 2. Proteína blanco.
- Variable dependiente: ANHET caracterizados funcionalmente.

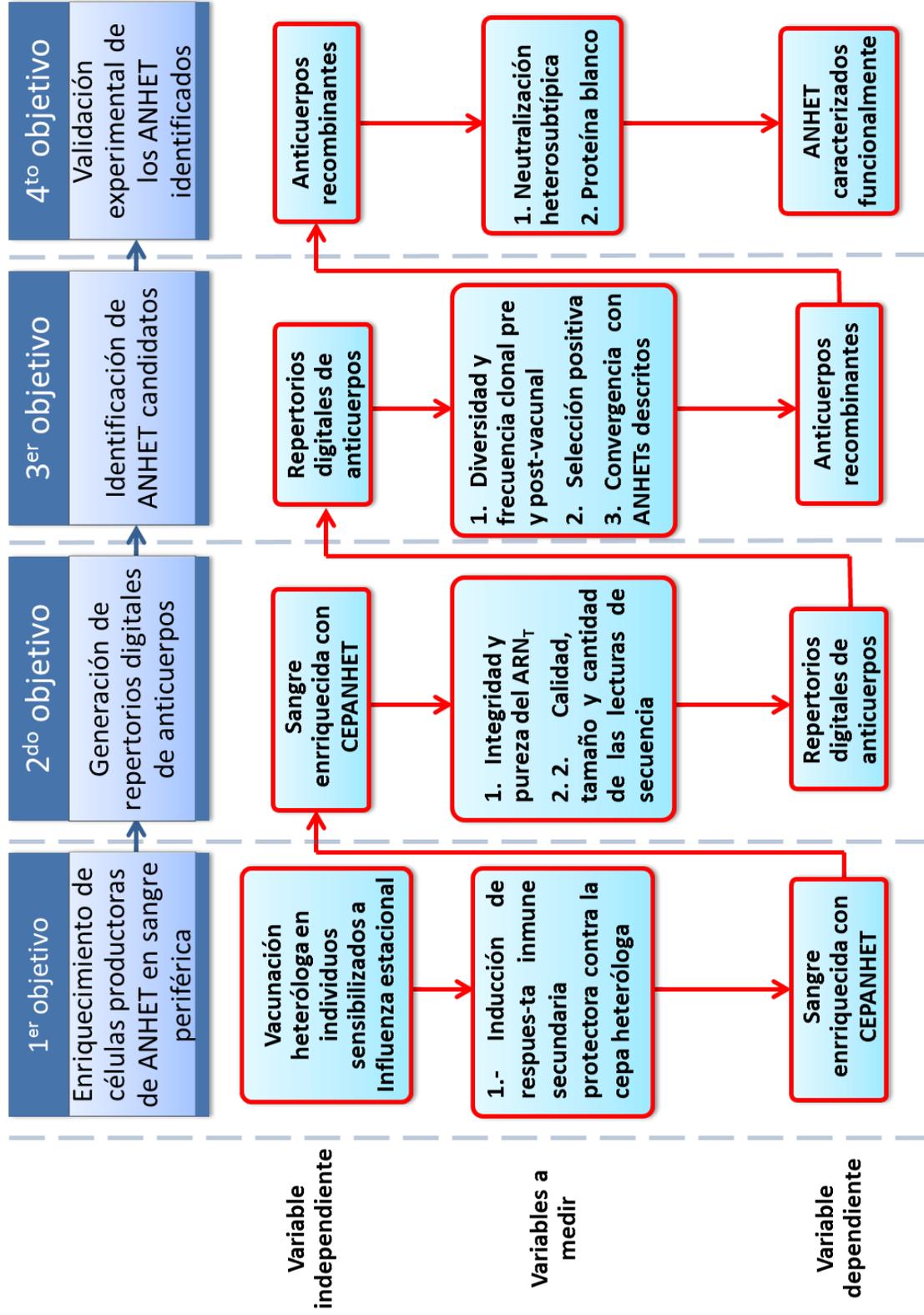


Figura 2. Diseño experimental basado en objetivos y sus variables

PRIMER OBJETIVO: Enriquecimiento de CEPANHET en sangre periférica

CAMPO

M1 Cálculo del tamaño de muestra

La finalidad de este trabajo es obtener y caracterizar ANHET, lo cual se puede conseguir con un solo individuo vacunado con una cepa de virus de influenza diferente inmunogénicamente a las cepas con que ha estado expuesto, y tomada su muestra en el momento apropiado (7-10 días)^{13, 14, 86, 88}. No obstante, también se pretende caracterizar, de manera preliminar, la variación de los repertorios de anticuerpos entre individuos, para lo cual se cuenta con financiamiento para la secuenciación de los repertorios de 4 individuos. Este estudio es el primero en su abordaje por lo que el resultado del análisis de 4 individuos puede ser de utilidad para el diseño de otros estudios con abordaje similar pero a nivel epidemiológico. Por lo anterior, el cálculo del tamaño de muestra, se enfoca a determinar la cantidad de individuos requeridos para reclutar como voluntarios a vacunación con la cepa viral de influenza pandémica, que al final nos permita identificar a cuatro individuos con el perfil de protección requerida (Tabla 1).

Se escogió un tamaño de muestra de 20 individuos en base a los siguientes criterios; de acuerdo con la prevalencia del 40% de individuos seroconvertidos en México (INDRE; comunicación personal y ^{96, 97}), se espera que de los 20 individuos reclutados, el 60% (12 individuos) presente el criterio requerido (Tabla 1), que consiste en presentar títulos de anticuerpos contra cepas estacionales pero no contra pandémica en el día 0. De los 12 individuos que se espera presenten los criterios requeridos para entrar al estudio, se pretende escoger los cuatro mejores perfiles de respuesta a la vacunación.

M2 Selección y reclutamiento de voluntarios

Se reclutarán 20 sujetos sanos mediante invitación verbal a participar en forma voluntaria en el estudio.

Criterios de inclusión:

- Sexo masculino
- Entre 18 y 50 años de edad
- Referirse sano y asintomático en los 3 meses previos al estudio
- Haber leído y firmado la carta de consentimiento informado

Criterios de exclusión:

- Referir haber sido diagnosticado de alguna enfermedad crónica inflamatoria y/o degenerativa
- Haber sido vacunados con la vacuna monovalente influenza A H1N1 2009, o con la vacuna de influenza estacional 2010-11 (ya que incluye a la cepa H1N1p).
- Presentar condiciones que contraindiquen la aplicación de la vacuna de influenza (ANEXO II)

La toma de muestra, aplicación de la vacuna, lectura de signos vitales y generación de su historia clínica los realizará un médico responsable y una enfermera capacitada en el Centro Médico Universitario de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

A los voluntarios se les explicará la finalidad científica del estudio y que su participación consiste en donar 3 muestras de sangre, una antes y dos después de ser vacunados con la vacuna monovalente influenza A H1N1 2009 de BIRMEX-Sanofi Pasteur (ANEXO II). Aquellos interesados en participar se les proporcionarán su formato de consentimiento informado (ANEXO III), de acuerdo a las normas establecidas por la comisión de ética del INSP.

El participante reportará cualquier síntoma local, general, eventos adversos, y medicación en una tarjeta, denominada tarjeta diaria, que le será proporcionada y explicada en detalle por el médico responsable (ANEXO V). El participante en el estudio podrá reportar cualquier incidente al médico responsable y en caso de ser requerido podrá ser visitado por un médico en su domicilio.

M3 Vacunación y toma de muestras

Se realizarán tomas de sangre a los 0, 7 y 14 días de aplicada la vacuna. La primera toma de sangre se realizará de la siguiente manera: Se citará al voluntario, en ayunas, en el Centro Médico Universitario de la UAEM, donde un médico responsable atenderá al voluntario, le explicará en que consiste el procedimiento de tomas de muestras y generará su historia clínica (ANEXO IV). Posteriormente una enfermera capacitada registrará los signos vitales y realizará la toma de 6.5 mL de sangre en un tubo vacutainer para recolección de suero e inmediatamente después realizará la toma de 2.5 mL de sangre en un tubo PAXgene (PAXgene Blood RNA Tube[®]; PreAnalytiX) para preservación del ARN. Después de haber recolectado la sangre procederá a la aplicación de 5 mL de la vacuna en el músculo deltoides. Se realizarán una segunda y tercera toma de muestra de sangre bajo las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior, los días 7 y 14 después de haber recibido la vacuna.

SEROLOGÍA

M4 Recuperación de suero

El suero se recolectará mediante centrifugación.

M5 Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación

Se realizarán ensayos de inhibición de la hemaglutinación para determinar los títulos de anticuerpos contra las cepas virales H1N1e, H3N2e y H1N1p. Esta técnica permite la titulación de anticuerpos neutralizantes dirigidos a la cabeza de la hemaglutinina y es cepa-específica. Brevemente; se eliminan las aglutininas inespecíficas presentes en el suero, mediante tratamiento con enzima destructora de receptores. Se hacen diluciones seriadas con el suero tratado y PBS, y se mezclan con una cantidad igual de PBS con 8 unidades hemaglutinantes de la cepa viral H1N1e, H3N2e, o H1N1p, se incuban, se adicionan de eritrocitos de pavo. Se registra el título de inhibición de la hemaglutinación como el recíproco de la última dilución que inhibió la hemaglutinación. Estos ensayos se realizarán en el INDRE^{iv} mediante colaboración.

^{iv} INDRE; Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, México, D.F.

M6 Ensayo de Microneutralización en placa.

Este ensayo permite la titulación de anticuerpos neutralizantes en general para el virus de influenza, no solamente de los dirigidos a la cabeza de la hemaglutinina. Se inactiva el suero con calor, se hacen diluciones seriadas de suero con medio DMEM con las cepas H1N1e, H3N2e, o H1N1p, se incuba en una atmósfera humidificada con CO₂, se determina la infectividad residual de la mezcla virus-suero por la infección de las células MDCK, mediante un ELISA con un anticuerpo anti-M2 revelado con peroxidasa. Los títulos de anticuerpos neutralizantes se definen como el recíproco de la mayor dilución de suero que neutralizó completamente la infectividad del virus, en base a las O.D. registradas. Estos ensayos se realizarán en el INDRE mediante colaboración.

M7 Selección de individuos para secuenciación masiva

Se seleccionarán 4 individuos para la secuenciación masiva de las regiones variables IgHG, IgLK e IgLL de las muestras recolectadas los días 0 y 7 (pre y post-vacunación con la cepa AH1N1p). Los sueros pre-vacunales (día 0) de los individuos que se seleccionarán deberán presentar en los ensayos de inhibición de la hemaglutinación, títulos mayores a 1:40 para las cepas estacionales (H1N1e y H3N2e) y títulos menores de 1:40 en la cepa pandémica H1N1p. Así mismo, sus sueros post-vacunales (día 7) deberán presentar en los ensayos de microneutralización en placa, títulos de al menos 1:1,280 para la cepa pandémica y en los ensayos de inhibición de la hemaglutinación, títulos iguales o mayores a 1:40 para la cepa pandémica (Tabla 1).

	Día 0		Día 7	
	I.HA.	Micron.	I.HA.	Micron.
H1N1e	> 1:40	> 1:40	> 1:40	> 1:40
H3N2e	> 1:40	> 1:40	> 1:40	> 1:40
H1N1p	≤ 1:5	≤ 1:40	≥ 1:40	≥1:1,280

Tabla 1. Criterio para selección de los repertorios de anticuerpos a secuenciar.

SEGUNDO OBJETIVO: Generación de repertorios digitales de anticuerpos

BIOLOGÍA MOLECULAR

M8 Aislamiento de ARN total

El ARN_T se recupera de la sangre preservada en un tubo PAXgene con el kit PAXgene Blood RNA kit[®]; PreAnalytiX, se espera obtener alrededor de 3 µg de ARN_T, se almacenarán a -70°C y una alícuota se utilizará para cuantificar la concentración e integridad con el equipo BioAnalyzer (Agilent RNA 6000 Pico kit[®]; Agilent Technologies).

M9 Síntesis de ADNc

En nuestro grupo de trabajo se ha estandarizado un método para la síntesis de ADNc basado en el protocolo del estuche comercial SMART RACE cDNA Amplification (Clontech Laboratories, Inc .PT 3269-1. 2008). El ADNc generado de esta manera, presenta en el extremo 5' la misma secuencia (CAGTGGTATCAACGCAGAGT), y en el extremo 3' la secuencia del oligo dT.

M10 Generación de amplicones de regiones variables de inmunoglobulinas

A partir del ADNc sintetizado se generarán genotecas de amplicones de las regiones variables pesadas de inmunoglobulinas del isotipo G, así como también de las regiones variables ligeras Kappa y Lambda. Para lograr esto se utilizará un oligo 5' genérico que contiene el adaptador A (oligo FPAmptA) que prima en la región 5' del ADNc, y un oligo 3' que primará en la región constante del isotipo deseado (TBIgGHu, TBIgKHu o TBIgLHu, donde T=Titanium; B=Adaptador B; Ig=Inmunoglobulina; G, K o L=Isotipo y Hu=Humano). Se estandarizarán las condiciones de PCR, se purificarán los productos de PCR a partir de geles de agarosa al 1%, (el tamaño esperado está entre 450 y 550 pb). Se evaluará la concentración y tamaño de amplicón en el equipo BioAnalyzer DNA 2100 LabChip (Agilent Biotechnologies) con el kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen).

Se generarán en total 24 genotecas; tres genotecas (IgHG, IgLK e IgLL) por cada individuo, tanto en condición pre como en post-vacunal.

M11 Pirosecuenciación masiva en paralelo

Se utilizarán 100 ng de cada una de las 24 genotecas de amplicones para su amplificación clonal por el método de PCR en emulsión con el estuche GS emPCR Kit de Roche de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pirosecuenciación de la librería de los amplicones se realizará en el equipo Genome Sequencer Titanium System desarrollado por 454 Life Sciences Corporation Roche ⁹⁸ utilizando el estuche GS LR70 Sequencing Kit de acuerdo con las instrucciones definidas por el fabricante. El acomodo de las genotecas se realizará de la siguiente manera: Se realizarán tres corridas de secuenciación, cada corrida utilizará una placa de secuenciación de 4 regiones (PicoTiterPlate). En la primera corrida se colocarán las genotecas de dos individuos; en la región 1 y 2, se depositarán las genotecas de IgHG del individuo 1 pre y post-vacunación respectivamente, lo mismo para el carril 3 y 4 con el individuo 2. En la segunda corrida se acomodarán los individuos 3 y 4. En la tercera corrida se colocarán por cada región, las genotecas IgLK e IgLL pre y post-vacunación de cada individuo.

TERCER OBJETIVO: Identificación de anticuerpos candidatos con potencial actividad neutralizante heterosubtípica en repertorios digitales

BIOINFORMÁTICA

La parte bioinformática de este proyecto se realizará en una estructura basada en filtros (estructura en pipeline)^v dentro de un entorno R⁹⁹⁻¹⁰¹^{vi}, se utilizarán funciones generadas *ad hoc* con lenguaje R, herramientas de paquetes^{vii} de Bioconductor^{102, 103}^{viii} y software libre accesible en línea^{38, 63, 64, 104-108}. El sistema operativo que se manejará será LINUX, con el cual se podrá acceder, organizar y manipular la información almacenada en el servidor local del secuenciador.

^v **Estructura en Pipeline:** En ingeniería de software, una pipeline consiste en una cadena de procesamiento de elementos (procesos, corutinas, etc.) arreglados de manera que la salida de cada elemento es la entrada del siguiente. También se conoce como “pipes and filters design pattern) y se nombra pipeline por analogía con una tubería física (Wiki).

^{vi} **Entorno R:** R es un lenguaje y ambiente para gráficos y cómputo estadístico, es libre. R provee de una amplia variedad de técnicas estadísticas y gráficas y es altamente modificable. R es un conjunto integrado de programas para manipulación de datos, cálculo y gráficos. El término “entorno” lo caracteriza como un sistema completamente diseñado y coherente. URL: <http://www.r-project.org/> .

^{vii} **Paquete:** Los paquetes son colecciones de funciones de R, datos y código compilado en un formato bien definido.

^{viii} **Bioconductor:** Software con una gran variedad de herramientas para análisis y comprensión de datos genómicos masivos. Bioconductor usa el lenguaje de programación estadístico R, es de fuente y desarrollo libre, tiene dos liberaciones cada año, cuenta con más de 516 paquetes y tiene una comunidad de usuarios muy activa. URL; <http://www.bioconductor.org/>.

M12 Control de calidad

La generación de imágenes, el procesamiento de imágenes y el procesamiento de señales para el llamado de bases se realizará de acuerdo con el software y protocolo estándar de corrida en el *on-rig* (GS 454 Life Sciences Corporation Roche). La información generada por el secuenciador se almacena en tres tipos de archivos el primero de ellos tiene la extensión *.sff (Standard Flowgram Format), que es donde se almacenan los flujogramas, el segundo archivo tiene la extensión *.qual, que contiene la información de la calidad correspondiente a cada base de cada secuencia, y el tercer archivo es el: *region.key.454Reads.fna* que contiene la base de datos de las secuencias en formato FASTA^{ix}. La información en el servidor local del secuenciador se accederá mediante comandos de LINUX.

Cada secuencia presentará la siguiente estructura: en la región 5' presentan el adaptador B de titanium (25 b), seguido del oligo (entre 43 y 50 b) que hibrida con la región constante del isotipo (este oligo puede ser; TBIgGHu, TBIgMHu, TBIgAHu, TBIgKHu o TBIgLHu), una parte de la región constante (~5 b), el segmento J (~48-63 b), la región N2 de tamaño variable, el segmento D (~11-37 b, aunque puede haber segmentos D duplicados), la región N1 de tamaño variable, la región variable (~230-296), la región del péptido señal y la región no traducida (~60 b) y finalmente el adaptador A de titanium (45 b), lo que nos da un tamaño que oscila entre 450 y 550 b.

El filtrado de las secuencias se realizará de la siguiente manera; primero se invertirá la dirección de la secuencia de manera que queden en dirección VDJ. Posteriormente, se realizará un alineamiento preliminar con Blastn para identificar la coordenada donde inicia la región del segmento V con la finalidad de cortarla en ese punto y así eliminar el principio de la secuencia que solo consumiría tiempo de procesamiento si es que se dejara. Una vez cortada las secuencias, se procederá a filtrar todas aquellas secuencias que tengan baja calidad, esto se realizará con el programa DeNoiser¹⁰⁴, que además tiene la capacidad de corregir las regiones de

^{ix} **Formato FASTA:** El formato FASTA es un formato de fichero informático basado en texto, que representa las secuencias de ADN usando códigos de una única letra.

homopolímeros. Una vez hecho esto, se tendrán archivos *.sff y *.fasta depurados, listos para su asignación final de uso de segmentos VDJ.

M13 Asignación de uso de segmento VDJ

La asignación del uso de segmentos V y J no es una tarea complicada y se pueden identificar con el uso de IgBlast, sin embargo, el uso del segmento D es más complicado debido a su corto tamaño (~11-37 b) y a su modificación en los extremos debido a la inserción y delección de bases resultado de la introducción de bases no codificadas en la línea germinal que corresponden a los elementos N1 y N2, por lo que el segmento D puede estar muy corto o muy cambiado. Afortunadamente se cuenta con un benchmark de 13,153 secuencias curadas manualmente que sirve como base para identificar los errores de asignación generados por diversos programas que se encuentran en línea⁶². Tomando en consideración los resultados de Jackson y colaboradores, se optará por el uso del programa iHMMune-align para asignación de uso de VDJ. Una ventaja del uso de este programa es que sus salidas están dadas en formato de numeración única IMGT^{61, 109, 110} ^x que es además el formato de entrada para el programa de asignación de grupos clonales; Clonal Relate (M17).

M14 Estimación de la diversidad y frecuencia clonal

Para determinar la diversidad clonal, se utilizará el programa Clonal Relate⁶³. Clonal Relate utiliza un algoritmo que permite la identificación de sets de secuencias relacionadas clonalmente, dentro de un set de secuencias muy grande de regiones variables. Este programa procesa las secuencias segmentadas por el programa iHMMune-align y utiliza comparaciones por pares de los CDR3 y similitudes en las asignaciones V y J para construir una matriz de distancia, posteriormente las secuencias se agrupan por jerarquías para identificar las secuencias relacionadas clonalmente.

^x La asignación de numeración única IMGT en las regiones VDJ permite la delimitación de los frameworks y CDRs que facilita la descripción estandarizada de las mutaciones, polimorfismos alélicos, representaciones 2D, 3D y análisis comparativos.

Para determinar la frecuencia hemi-idiotípica^{xi} y clonal, se utilizarán funciones de R existentes¹⁰⁰ y generadas *ad hoc*. Las frecuencias se expresarán como frecuencias relativas o porcentajes, esto es, la frecuencia del hemi-idiotipo entre el total de secuencias de la genoteca. La diferencia entre las frecuencias de hemi-idiotipos pre y post-vacunación se representará como la pendiente pre-post, es decir, la frecuencia relativa post-vacunación menos la frecuencia relativa pre-vacunación.

M15 Selección positiva

La selección positiva se refiere a la expansión clonal dirigida por el antígeno, en este caso la cepa vacunal de AH1N1p. La selección positiva se puede medir indirectamente por cada grupo clonal con la diferencia de las frecuencias relativas pre-post-vacunación. Esta diferencia será significativa si se presenta dos o más unidades de pendiente positiva. Y la segunda evidencia de selección positiva se puede identificar mediante la presencia de elevada proporción de hipermutación somática no sinónima. El análisis de la hipermutación somática se realizará con los programas Clip³⁸ y SHMTool⁶⁴. En conjunto estos programas nos permitirán identificar, cuantificar y analizar las mutaciones generadas en cada grupo clonal. También se podrán identificar motivos clave de hipermutación somática y estimar indirectamente la ganancia en la afinidad al antígeno.

M16 Convergencia con ANHET descritos

Hasta el momento se han caracterizado ~110 ANHET anti-virus de influenza, estos ANHET se han publicado básicamente por 7 autores^{12, 13, 65-85}. El análisis de convergencia con los ANHET descritos se pretende abordar en tres etapas:

En la primera etapa, se realizará una clasificación estructural y funcional de los ~110 ANHET descritos, esta clasificación se basará en características generales

^{xi} **Hemi-idiotipo:** se refiere a la mitad de un idiotipo, es decir, solamente la región variables de la cadena pesada o de la cadena ligera. El idiotipo está constituido por las regiones variables de ambas cadenas.

(ANEXO I)^{xii} y particulares, como lo son sus rearrreglos idiotípicos (VH/VL), el tamaño y secuencia de sus CDR3, inserciones N1 y N2^{xiii}, ubicación y frecuencia de hipermutación somática, epítomos que neutraliza y afinidades de unión a sus epítomos. Este análisis se realizará con las herramientas generadas en la pipeline. En esta etapa se realizará un análisis conjunto de las características de los anticuerpos con las características de las proteínas blanco⁶⁷.

La segunda etapa del análisis consistirá en la búsqueda de los grupos clonales, en los repertorios digitales de anticuerpos, que más se asemejen a las características de los ANHET descritos. Se asignará cada ANHET a su grupo clonal correspondiente.

La tercera etapa del análisis consistirá en la caracterización de la divergencia intra-clonal, es decir, la separación clonogénica de los clonotipos (dentro del grupo clonal) con respecto a los ANHET comparados. Y la convergencia inter-clonal, definida como el mismo aminoácido alterado introducido por mutación somática presentes en dos o más clonotipos independientes⁷⁵.

Se realizará una comparación especial con las 60,447 secuencias generadas de las familias IgH3, que corresponde a la familia compartida por sus 5 ANHET caracterizados (VH3-7|JH6)⁷⁵.

M17 Métodos de visualización

El anticuerpoma es un sistema complejo, por lo que se explorarán diversas herramientas de visualización gráfica que faciliten la clara representación de las características del sistema y de los análisis realizados en él. A continuación se describen brevemente cada una de las herramientas a explorar.

^{xii} En el **ANEXO I** se presenta un ejemplo de 5 ANHETs caracterizados en un artículo. Como parte de este trabajo, se describirán todos los artículos de ANHETs en el formato del anexo.

^{xiii} **Regiones N1 y N2:** Regiones no codificadas en la línea germinal que se encuentran en las uniones VD y DJ. Estas regiones resultan de la inserción o deleción de nucleótidos durante la ontogenia del linfocito B.

Circos¹⁰⁸. Herramienta de visualización que facilita la identificación y análisis de las similitudes y diferencias entre genomas u otro tipo de base de datos relacionales. La versatilidad de Circos permite la visualización totalmente personalizada mediante programación en PERL. Circos permite el despliegue en forma circular de histogramas, diagramas de dispersión, mapas de calor, conectores, texto, etc. Genera imágenes Bitmap o vectoriales y se puede configurar como una herramienta automatizada especial para el análisis de datos y reportes dentro de pipelines.

Pajek¹⁰⁷. Pajek se ha utilizado elegantemente en la visualización de la arquitectura de redes en repertorios de anticuerpos de peces Zebra⁵³. En Pajek, cada clonotipo representará un vértice cuyo tamaño será proporcional a su frecuencia relativa, la distancia entre cada par de nodos conectados en la red representará una mutación, delección o mutación y delección, los nodos en cada cluster tendrán su identificador por color para visualizar cada clonogrupo dentro de la red.

Walrus¹¹¹. Programa de visualización de redes en 3D, que utiliza geometría hiperbólica para desplegar gráficas bajo una distorsión tipo ojo de pescado. Con Walrus se puede modificar en cualquier momento el nivel de magnificación de una pequeña área para realzar detalles de la red¹¹².

M18 Selección de ANHET potenciales

Para seleccionar ANHET potenciales, se integrará toda la información generada, en términos generales se considerará como potenciales aquellos idiotipos con las siguientes características:

- 1) Idiotipos que presenten selección positiva; aumento en la frecuencia clonal pre/post-vacunación y presencia de alta proporción de hipermutación somática no sinónima.
- 2) Idiotipos que compartan características estructurales con ANHET caracterizados previamente.

CUARTO OBJETIVO: Validación experimental de los ANHET identificados

BIOLOGÍA MOLECULAR

M19 Síntesis *in vitro* de las regiones variables

Aproximadamente 20 de las regiones variables identificadas *in silico* serán sintetizadas *in vitro* por la compañía DNA2.0 (<https://www.dna20.com/index.php>), la cual está especializada en la síntesis de genes. Los genes sintéticos incluirán un péptido señal heterólogo, la región VH o VL, así como el re-arreglo J y diversidad de unión correspondiente al clonotipo.

M20 Clonación en vector de expresión

Los genes sintéticos de las regiones variables serán sub-clonados en vectores de expresión transitoria pFUSE-CHIg-hGI-e1 (para VH), pFUSE-CLIg-hK (para VLK) o pFUSE-CLIg-hL2 (para VLL) (Invivogen)^{xiv}. El producto de ligación se correrá y purificará a partir de un gel de agarosa al 1.5% y se electroporará en células de *E. coli* cepa XL1-Blue para amplificar los plásmidos que posteriormente se purificarán, cuantificarán y utilizarán para co-transfectar células 293A.

M21 Transfección en células 293A, expresión y purificación de anticuerpos

El siguiente protocolo se basa en trabajos anteriormente publicados^{113, 114}. Se utilizarán los plásmidos (pFUSE-CHIg-hGI-e1/ pFUSE-CLIg-hK o pFUSE-CHIg/ pFUSE-CLIg-hL2, cada uno con sus regiones VH o VL correspondientes) para co-transfectar células de fibroblastos de riñón embrionario humano 293A cultivadas en medio DMEM suplementado con ultra-low IgG FCS (GIBCO). Después de la co-transfección, las células se lavarán con DMEM libre de suero y cultivarán en DMEM suplementado con Nutridoma SP (Roche). Los sobrenadantes se colectarán después de 8 días de cultivo. Los anticuerpos se purificarán con columnas con proteína A (Pierce). La expresión apropiada y pureza de los anticuerpos se verificará por electroforesis en geles de

^{xiv} Estos vectores de expresión tienen las regiones constantes de IgG1, IgGK o IgGL de humano.

poliacrilamida y las concentraciones se determinarán con el estuche de cuantificación de proteínas EZQ (Invitrogen).

BIOLOGÍA CECULAR

M22 Determinación de las afinidades de unión a virus influenza

Todos los anticuerpos recombinantes generados se tamizarán por su unión a las cepas H1N1e, H3N2e y H1N1p con ELISAS. Las ELISAS se realizarán de la siguiente manera, se utilizarán microplacas de 96 pozos recubiertas con un coctel de las tres cepas para un tamizado rápido. Aquellos anticuerpos que den positivos para el coctel, serán caracterizados para cada cepa individual, para determinar su afinidad relativa y su especificidad. Se utilizará un anticuerpo anti-IgG humana hecho en cabra y conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) para detectar la unión de los anticuerpos recombinantes. Se utilizará peroxidasa de rábano (BioRad, Hercules, CA) como sustrato de la enzima, y se leerán las absorbancias a OD₄₁₅. El cálculo de las afinidades (Kd o constante de disociación) se determinará con un análisis de regresión lineal y una gráfica SCATCHARD^{xv} de las curvas de ELISA anti-influenza graficadas de las diluciones seriales de ocho concentraciones de anticuerpo en el rango de 10 µg/mL a 0.125 µg/mL con el software estadístico GraphPad Prism⁶⁹.

M23 Inhibición de la hemaglutinación y microneutralización en placa

La inhibición de la hemaglutinación y microneutralización en placa se realizarán con las tres cepas en los anticuerpos que den positivo en el primer tamizado por ELISA. La metodología será idéntica a la descrita en M5 y M6, a excepción de que en lugar de suero se colocará una concentración conocida del anticuerpo recombinante. Estas técnicas se realizarán en colaboración con el INDRE.

^{xv} Gráfica que lleva el nombre del químico del MIT George Scatchard, se utiliza para medir interacciones de ligando libre/ligando unido a receptor. La gráfica genera una línea recta de pendiente $-1/K$, donde K es la concentración de ligando a la que el 50% de los receptores están unidos por el ligando. La intersección en X corresponde a Bmax

M24 Análisis de inmunoprecipitación

El siguiente protocolo está de acuerdo a lo reportado por Corti *et.al*¹¹⁵. Para la inmunoprecipitación se mezclarán 8 unidades de hemaglutinina el virus y buffer de lisis, se incuban a temperatura ambiente y se adiciona el anticuerpo. La proteína A-Sepharosa se incuba con el lisado anticuerpo-virus a temperatura ambiente, se centrifuga y lava con buffer de lisis y se resuspende en Laemmli gel sample buffer (BioRad).

M25 Western Blot

Las muestras resuspendidas en Laemmli gel sample buffer, se visualizan en un gel de poliacrilamida. Para los Western Blots, se diluyen 8 unidades de HA y se hierven en buffer desnaturizante/reductor, posteriormente, se separan por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes y se transfiere a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incuban con cada anticuerpo y se detectan con un anticuerpo anti-IgG de humano HRP (Jackson Immunoresearch), se revelan con ECL plus reagent (GE health care).

RESULTADOS ESPERADOS Y APORTES DEL ESTUDIO

Resultados esperados:

1. Base de datos relacional de las regiones variables de IgG, IgK e IgL secuenciadas. La base de datos incluirá las secuencias no redundantes y depuradas de nucleótidos y aminoácidos de los hemi-idiotipos con sus características analizadas como son el rearreglo al que pertenece, relación clonal, frecuencia relativa e hipermutación somática.
2. Un análisis detallado de los anticuerpos pre y post-vacunación en cuanto a su diversidad y frecuencia clonal, selección positiva y relaciones con ANHET descritos.
3. Cinco ANHET anti-influenza identificados mediante análisis *in silico* de repertorios de anticuerpos digitales.
4. La publicación de un artículo.

Aportes del estudio:

1. Un método de caracterización y análisis de repertorios digitales de anticuerpos.
2. Un método de identificación de ANHET anti-influenza en repertorios digitales de anticuerpos.

PERSPECTIVAS

1. Propuesta de una nomenclatura específica para repertorios digitales de anticuerpos.
2. Desarrollo de un método estándar de búsqueda *in silico* de anticuerpos de interés dentro de repertorios digitales de anticuerpos.
3. Desarrollo de un método estándar de visualización y análisis de repertorios digitales de anticuerpos.
4. Identificación de perfiles de repertorios para usar como correlatos de protección de vacunas

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1. Pares VH-VL no naturales.

La asignación de pares VH-VL será artificial tomando en cuenta frecuencias de usos según rearrreglos y frecuencias relativas pre y post-vacunación. Esta falta de certeza en el apareamiento VH-VL puede conducir en apareamientos no productivos y por ende en disminución de la afinidad de unión o en el peor de los casos en la pérdida de la unión con su antígeno blanco.

2. Pruebas con todos los subtipos de HA y NA.

La falta de un sistema montado de ELISA, inhibición de la hemaglutinación, microneutralización en placa y prueba en ratones con todos los subtipos de HA y NA nos limita en la caracterización total de los ANHET identificados.

3. Ensayos de protección *in vivo*.

En este trabajo no vamos a realizar ensayos de protección *in vivo*, que sería la prueba más contundente de la funcionalidad de los ANHET identificados.

CRONOGRAMA

Actividad/Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<p>Primer objetivo: Enriquecimiento de CEPANHET en sangre periférica.</p> <ul style="list-style-type: none"> Variable independiente (tratamiento): Vacunación heteróloga en individuos sensibilizados a cepas estacionales. Variables a medir: Inducción de respuesta secundaria protectora contra la cepa heteróloga. Variable dependiente: Sangre enriquecida con CEPANEHTs. 											
<p>Segundo objetivo: Generación de repertorios digitales de anticuerpos.</p> <ul style="list-style-type: none"> Variable independiente: Sangre enriquecida con CEPANHET. Variables a medir: <ol style="list-style-type: none"> Integridad y pureza del ARNT. Calidad, tamaño y cantidad de las lecturas de secuencia. Variable dependiente: Repertorios digitales de anticuerpos. 											
<p>Tercer objetivo: Identificación de anticuerpos candidatos con potencial actividad neutralizante heterosubtípica en repertorios digitales.</p> <ul style="list-style-type: none"> Variable independiente: Repertorios digitales de anticuerpos. Variables a medir: <ol style="list-style-type: none"> Diversidad y frecuencia clonal pre y post-vacunal. Selección positiva. Convergencia con ANHET descritos. Variable dependiente: Secuencias de ADN de ANHET candidatos. Método de transformación de la variable dependiente del 2do objetivo a variable independiente del 3er objetivo: Síntesis in vitro de la secuencias variables de los ANHET identificados, clonación en vectores de expresión, transformación de células de mamífero, expresión y purificación de los anticuerpos recombinantes. 											
<p>Cuarto objetivo: Validación experimental de los ANHET identificados.</p> <ul style="list-style-type: none"> Variable independiente: Anticuerpos purificados. Variables a medir: <ol style="list-style-type: none"> Neutralización heterosubtípica. Proteína blanco. Variable dependiente: ANHET caracterizados funcionalmente. 											

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

Los beneficios de los individuos reclutados para este estudio son dos principalmente, el primero es que podrá conocer su estado de protección contra las cepas estacionales del 2009 y podrá saber si quedó protegido contra la cepa AH1N1p. El segundo beneficio es que si el individuo reúne todos los criterios de inclusión podrá ser sujeto de secuenciación masiva de sus inmunoglobulinas y conocer a detalle su repertorio de anticuerpos en condiciones basales y después de la vacunación.

La descripción precisa de la información que se entregará a los sujetos se encuentra en el consentimiento informado, ANEXO III.

RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS

Este trabajo de investigación cuenta con financiamiento de CONACYT, con el proyecto: “Análisis estructural y funcional del repertorio de linfocitos B y T en respuesta a la vacunación y a la infección natural por virus de Influenza estacional y pandémica”

Investigador Responsable: Dr. Jesús Martínez Barnetche 1

Co-Investigadores:

Dr. Mario H Rodríguez López¹, Dr. Juan Mauricio Téllez Sosa¹, Dr. Humberto Valdovinos Torres¹, M en C. Bernardo Cortina Ceballos¹, M en C. Rosa Elena Gómez Barreto¹, Dr. Martin Romero Martínez², Dr. Eduardo Gutiérrez Peña^{2,3}, M en C. María, Luisa Gontes Ballesteros⁴, Dr. Víctor Manuel Caballero Solano⁴

1.- Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud Pública.

2.- Centro de Investigación en Encuestas y Evaluación. Instituto Nacional de Salud Pública.

3.- Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas. UNAM.

4.- Servicios de Salud del Estado de Morelos. Secretaría de Salud

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bouvier N.M., P.P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **12**, D49-D53 (2008).
2. CDC Estimates of Deaths Associated with Seasonal Influenza-United States, 1976-2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **59**, 1057-1062 (2010).
3. OMS Seasonal Flu: Fact sheet No. 211 *OMS* (2009).
4. Li, C. & Freedman, M. Seasonal influenza: an overview. *The Journal of school nursing : the official publication of the National Association of School Nurses* **25 Suppl 1**, 4S-12S (2009).
5. Rossman, J.S. & Lamb, R.A. Influenza virus assembly and budding. *Virology* **411**, 229-236 (2011).
6. Palese, P., Shaw, M.L. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication., in *Fields Virology*. (ed. P.M.H. D.M. Knipe) 1647-1690 (Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia; 2007).
7. Meng, B., Marriott, A.C. & Dimmock, N.J. The receptor preference of influenza viruses. *Influenza and other respiratory viruses* **4**, 147-153 (2010).
8. Taubenberger, J.K. & Kash, J.C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & microbe* **7**, 440-451 (2010).
9. Wahlgren, J. Influenza A viruses: an ecology review. *Infection Ecology & Epidemiology* **1** (2011).
10. McHardy, A.C. & Adams, B. The Role of Genomics in Tracking the Evolution of Influenza A Virus. *PLoS pathogens* **5**, e1000566 (2009).
11. Kreijtz, J.H., Fouchier, R.A. & Rimmelzwaan, G.F. Immune responses to influenza virus infection. *Virus research* (2011).
12. Pinna, D., Corti, D., Jarrossay, D., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *European journal of immunology* **39**, 1260-1270 (2009).
13. Wrammert, J. *et al.* Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* **453**, 667-671 (2008).
14. Cox, R.J., Haaheim, L.R., Ericsson, J.C., Madhun, A.S. & Brokstad, K.A. The humoral and cellular responses induced locally and systemically after parenteral influenza vaccination in man. *Vaccine* **24**, 6577-6580 (2006).
15. Couch, R.B. Seasonal inactivated influenza virus vaccines. *Vaccine* **26 Suppl 4**, D5-9 (2008).
16. Kaur, K., Sullivan, M. & Wilson, P.C. Targeting B cell responses in universal influenza vaccine design. *Trends in immunology* (2011).
17. Robertson, J.S. & Inglis, S.C. Prospects for controlling future pandemics of influenza. *Virus research* (2011).
18. Rappuoli, R. The challenge of developing universal vaccines. *F1000 medicine reports* **3**, 16 (2011).
19. Kang, S.M., Song, J.M. & Compans, R.W. Novel vaccines against influenza viruses. *Virus research* (2011).

20. Ben-Yedidia, T. Progress towards a universal influenza vaccine. *Future Virology* **6**, 237-248 (2011).
21. Ikeno, D. *et al.* Differences in the priming effect of various clades/subclades of inactivated H5N1 vaccine for booster injection with heterologous clades of vaccine strains. *Vaccine* **29**, 4156-4161 (2011).
22. Chen, G.L., Lau, Y.-F., Lamirande, E.W., McCall, A.W. & Subbarao, K. Seasonal influenza infection and live vaccine prime for a response to the 2009 pandemic H1N1 vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 1140-1145 (2011).
23. Wang, T.T. *et al.* Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins. *PLoS pathogens* **6**, e1000796 (2010).
24. Sabarth, N. *et al.* Comparison of single, homologous prime-boost and heterologous prime-boost immunization strategies against H5N1 influenza virus in a mouse challenge model. *Vaccine* **28**, 650-656 (2010).
25. Lu, S. Heterologous prime-boost vaccination. *Current opinion in immunology* **21**, 346-351 (2009).
26. Del Giudice, G. *et al.* Seasonal influenza vaccine provides priming for A/H1N1 immunization. *Science translational medicine* **1**, 12re11 (2009).
27. Wei, C.J. *et al.* Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination. *Science* **329**, 1060-1064 (2010).
28. Doms, R.W. Immunology. Prime, boost, and broaden. *Science* **329**, 1021-1022 (2010).
29. Charles-Nino, C., Pedroza-Roldan, C., Viveros, M., Gevorkian, G. & Manoutcharian, K. Variable epitope libraries: new vaccine immunogens capable of inducing broad human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibody response. *Vaccine* **29**, 5313-5321 (2011).
30. Yamashita, A. *et al.* Highly conserved sequences for human neutralization epitope on hemagglutinin of influenza A viruses H3N2, H1N1 and H5N1: Implication for human monoclonal antibody recognition. *Biochemical and biophysical research communications* **393**, 614-618 (2010).
31. Wang, T.T. *et al.* Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 18979-18984 (2010).
32. Steel, J. *et al.* Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *mBio* **1** (2010).
33. Bommakanti, G. *et al.* Design of an HA2-based Escherichia coli expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 13701-13706 (2010).
34. Hodgkin, P.D., Heath, W.R. & Baxter, A.G. The clonal selection theory: 50 years since the revolution. *Nature immunology* **8**, 1019-1026 (2007).
35. Cohn, M. *et al.* Reflections on the clonal-selection theory. *Nature reviews. Immunology* **7**, 823-830 (2007).
36. Kurosaki, T. B lymphocyte biology. *Immunological reviews* **237**, 5-9 (2010).
37. Glanville, J. *et al.* Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20216-20221 (2009).

38. Uduman, M. *et al.* Detecting selection in immunoglobulin sequences. *Nucleic acids research* **39**, W499-504 (2011).
39. N.K., J. A study of avidity based on rabbit skin responses to diphtheria toxin-antitoxin mixtures. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* **87**, 1-183 (1951).
40. Werblin T.P., K.Y.T., Mage R, Benacerraf B, Siskind G.W. The generation of antibody diversity I. Studies on the population distribution of anti-DNP antibody affinities and on the influence of allotype on antibody affinity and concentration. *Immunology* **25**, 17-32 (1973).
41. Veguilla, V. *et al.* Sensitivity and specificity of serologic assays for detection of human infection with 2009 pandemic H1N1 virus in U.S. populations. *Journal of clinical microbiology* **49**, 2210-2215 (2011).
42. Corti, D., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. High throughput cellular screens to interrogate the human T and B cell repertoires. *Current opinion in immunology* **23**, 430-435 (2011).
43. Rosenberg, W.M.C., Moss, P.A.H. & Bell, J.I. Variation in human T cell receptor V β and J β repertoire: analysis using anchor polymerase chain reaction. *European journal of immunology* **22**, 541-549 (1992).
44. Liao, H.X. *et al.* High-throughput isolation of immunoglobulin genes from single human B cells and expression as monoclonal antibodies. *Journal of virological methods* **158**, 171-179 (2009).
45. Faint J.M., P.D., Akbar A.N., Bacon P.A., Salmon M. Quantitative flow cytometry for the analysis of T cell receptor Vbeta chain expression. *J. Immunol. Methods* **225**, 53-60 (1999).
46. Pannetier C, C.M., Darche S, Casrouge A, Zoller M, Kourilsky P. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine TCR B chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Immunology* **90**, 4319-4323 (1993).
47. Foreman, A.L. *et al.* VH gene usage and CDR3 analysis of B cell receptor in the peripheral blood of patients with PBC. *Autoimmunity* **41**, 80-86 (2008).
48. Miqueu, P. *et al.* Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases. *Molecular immunology* **44**, 1057-1064 (2007).
49. Quintana, F.J. *et al.* Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101 Suppl 2**, 14615-14621 (2004).
50. Quintana, F.J. & Cohen, I.R. The natural autoantibody repertoire and autoimmune disease. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **58**, 276-281 (2004).
51. Merbl, Y., Zucker-Toledano, M., Quintana, F.J. & Cohen, I.R. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *The Journal of clinical investigation* **117**, 712-718 (2007).
52. Jiang, N. *et al.* Determinism and stochasticity during maturation of the zebrafish antibody repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 5348-5353 (2011).
53. Ben-Hamo, R. & Efroni, S. The whole-organism heavy chain B cell repertoire from Zebrafish self-organizes into distinct network features. *BMC systems biology* **5**, 27 (2011).

54. Weinstein, J.A., Jiang, N., White, R.A., 3rd, Fisher, D.S. & Quake, S.R. High-throughput sequencing of the zebrafish antibody repertoire. *Science* **324**, 807-810 (2009).
55. Wu, Y.C. *et al.* High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood* **116**, 1070-1078 (2010).
56. Wu, X. *et al.* Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* **333**, 1593-1602 (2011).
57. Walker, L.M. *et al.* Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**, 466-470 (2011).
58. Boyd, S.D. *et al.* Measurement and Clinical Monitoring of Human Lymphocyte Clonality by Massively Parallel V-D-J Pyrosequencing. *Science translational medicine* **1**, 12ra23-12ra23 (2009).
59. Smilevska, T. *et al.* Immunoglobulin kappa gene repertoire and somatic hypermutation patterns in follicular lymphoma. *Blood cells, molecules & diseases* **41**, 215-218 (2008).
60. Zhiliang Chen, A.M.C., Yan Wang, Bruno A. Gaeta Clustering-based identification of clonally-related immunoglobulin gene sequence sets. *Immunome research* **6** (2010).
61. Brochet, X., Lefranc, M.P. & Giudicelli, V. IGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic acids research* **36**, W503-508 (2008).
62. Jackson, K.J., Boyd, S., Gaeta, B.A. & Collins, A.M. Benchmarking the performance of human antibody gene alignment utilities using a 454 sequence dataset. *Bioinformatics* **26**, 3129-3130 (2010).
63. Chen, Z., Collins, A.M., Wang, Y. & Gaeta, B.A. Clustering-based identification of clonally-related immunoglobulin gene sequence sets. *Immunome research* **6 Suppl 1**, S4 (2010).
64. Maccarthy, T., Roa, S., Scharff, M.D. & Bergman, A. SHMTool: a webserver for comparative analysis of somatic hypermutation datasets. *DNA repair* **8**, 137-141 (2009).
65. Wrammert, J. *et al.* Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *The Journal of experimental medicine* **208**, 181-193 (2011).
66. Ekiert, D.C. *et al.* A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* **333**, 843-850 (2011).
67. Xu, R., McBride, R., Paulson, J.C., Basler, C.F. & Wilson, I.A. Structure, receptor binding, and antigenicity of influenza virus hemagglutinins from the 1957 H2N2 pandemic. *Journal of virology* **84**, 1715-1721 (2010).
68. Xu, R. *et al.* Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science* **328**, 357-360 (2010).
69. Smith, K. *et al.* Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nature protocols* **4**, 372-384 (2009).
70. Ekiert, D.C. *et al.* Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* **324**, 246-251 (2009).
71. Yu, X. *et al.* Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* **455**, 532-536 (2008).
72. Corti, D. *et al.* A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins_Supplement. *Science* **333**, 850-856 (2011).

73. Corti, D. *et al.* Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1663-1673 (2010).
74. Khurana, S. *et al.* Antigenic fingerprinting of H5N1 avian influenza using convalescent sera and monoclonal antibodies reveals potential vaccine and diagnostic targets. *PLoS medicine* **6**, e1000049 (2009).
75. Krause, J.C. *et al.* Epitope-specific human influenza antibody repertoires diversify by B cell intracloal sequence divergence and interclonal convergence. *J Immunol* **187**, 3704-3711 (2011).
76. Krause, J.C. *et al.* A Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibody That Recognizes a Conserved, Novel Epitope on the Globular Head of the Influenza H1N1 Virus Hemagglutinin. *J. Virol.* **85**, 10905-10908 (2011).
77. van Maurik, A. *et al.* Seasonal influenza vaccine elicits heterosubtypic immunity against H5N1 that can be further boosted by H5N1 vaccination. *Vaccine* **28**, 1778-1785 (2010).
78. Krause, J.C. *et al.* Naturally occurring human monoclonal antibodies neutralize both 1918 and 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses. *Journal of virology* **84**, 3127-3130 (2010).
79. Han, T. *et al.* Fine epitope mapping of monoclonal antibodies against hemagglutinin of a highly pathogenic H5N1 influenza virus using yeast surface display. *Biochemical and biophysical research communications* **409**, 253-259 (2011).
80. Hashem, A.M. *et al.* Universal antibodies against the highly conserved influenza fusion peptide cross-neutralize several subtypes of influenza A virus. *Biochemical and biophysical research communications* **403**, 247-251 (2010).
81. Sui, J. *et al.* Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nature structural & molecular biology* **16**, 265-273 (2009).
82. Throsby, M. *et al.* Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells. *PloS one* **3**, e3942 (2008).
83. Mancini, N. *et al.* A potential role for monoclonal antibodies in prophylactic and therapeutic treatment of influenza. *Antiviral research* **92**, 15-26 (2011).
84. Burioni, R. *et al.* Monoclonal antibodies isolated from human B cells neutralize a broad range of H1 subtype influenza A viruses including swine-origin Influenza virus (S-OIV). *Virology* **399**, 144-152 (2010).
85. Kashyap, A.K. *et al.* Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5986-5991 (2008).
86. Sun, Y. *et al.* Immune protection induced on day 10 following administration of the 2009 A/H1N1 pandemic influenza vaccine. *PloS one* **5**, e14270 (2010).
87. Baer, J. *et al.* B cell responses to H5 influenza HA in human subjects vaccinated with a drifted variant. *Vaccine* **28**, 907-915 (2010).
88. He, X.S. *et al.* Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination. *Journal of immunological methods* **365**, 67-75 (2011).
89. Wiley, S.R. *et al.* Targeting TLRs expands the antibody repertoire in response to a malaria vaccine. *Science translational medicine* **3**, 93ra69 (2011).

90. Reddy, S.T. *et al.* Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells. *Nature biotechnology* **28**, 965-969 (2010).
91. Pulendran, B., Li, S. & Nakaya, H.I. Systems vaccinology. *Immunity* **33**, 516-529 (2010).
92. Sette, A. & Rappuoli, R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity* **33**, 530-541 (2010).
93. Oberg, A.L., Kennedy, R.B., Li, P., Ovsyannikova, I.G. & Poland, G.A. Systems biology approaches to new vaccine development. *Current opinion in immunology* **23**, 436-443 (2011).
94. Cox, R.J., Brokstad, K.A., Zuckerman, M.A., Wood, J.M., Haaheim, L.R., Oxford, J.S. An early humoral immune response in peripheral blood following parenteral inactivated influenza vaccination. *Vaccine* **12**, 993-999 (1994).
95. Kunkel, E.J., Butcher, E.C. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* **16**, 1-4 (2002).
96. Broberg, E., Nicoll, A. & Amato-Gauci, A. Seroprevalence to influenza A(H1N1) 2009 virus--where are we? *Clinical and vaccine immunology : CVI* **18**, 1205-1212 (2011).
97. Elizondo-Montemayor, L. *et al.* Seroprevalence of antibodies to influenza A/H1N1/2009 among transmission risk groups after the second wave in Mexico, by a virus-free ELISA method. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* **15**, e781-e786 (2011).
98. Margulies, M. *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-380 (2005).
99. Zhao, G., Tan Q. Integrated analysis of genetic data with R. *Human Genomics* **2**, 258-265 (2006).
100. S.K., M. *Statistical bioinformatics with R.* (Elsevier, 2010).
101. Team, R.D.C. *Introducción a R: Un entorno de programación para análisis de datos y gráficos.* (2000).
102. Gentleman R., C.V.J., Huber W., Irizarry R.A., Dudoit S. *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor.* (Springer, 2005).
103. Hahne F., H.W., Gentleman R., Falcon S. *Bioconductor Case Studies.* (Springer, 2008).
104. Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R.J. & Turnbaugh, P.J. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC bioinformatics* **12**, 38 (2011).
105. Finn, R.D., Clements, J. & Eddy, S.R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids research* **39**, W29-37 (2011).
106. Gaeta, B.A. *et al.* iHMMune-align: hidden Markov model-based alignment and identification of germline genes in rearranged immunoglobulin gene sequences. *Bioinformatics* **23**, 1580-1587 (2007).
107. Batagelj V., M.A. Pajek: Analisis and visualization of large networks, in *Graph Drawing Software.* (ed. M.P. Junger M.) 77-100 (Springer, 2003).
108. Krzywinski, M. *et al.* Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res* **19**, 1639-1645 (2009).
109. Ehrenmann, F., Kaas, Q. & Lefranc, M.P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. *Nucleic acids research* **38**, D301-307 (2010).

110. Lefranc, M.P. *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Developmental and comparative immunology* **29**, 185-203 (2005).
111. Krioukov D., P.F., Kitsak M., Vahdat A., boguñá M. Hyperbolic geometry of complex networks. *PACS Numbers* (2010).
112. Boguñá, M., Krioukov Dmitri, Claffy K. Navigability of complex networks. *Physics* (2008).
113. Koelsch K., Z.N., Zhang Q., Duty A., Helms C., Mathias M., Jared M., Smith K., Capra D., Wilson P. Mature B cells class swiched to IdD are autoreactive in health individuals. *The Journal of clinical investigation* **17**, 1559-1565 (2007).
114. Wardemann, H. *et al.* Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* **301**, 1374-1377 (2003).
115. Corti, D. *et al.* A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* **333**, 850-856 (2011).
116. Pasteur, S. Influenza A (H1N1) 2009 Monovalent Vaccine. *Sanofi Pasteur* **10 September 2009_v0.3**, LE5860-5862 (2009).
117. sanitarios, A.e.d.m.y.p. Vacuna PANENZA. *Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad C/CAMPEZO, 1-Edificio 8, 28022 Madrid* (2009).
118. NIBSC Influenza Reagent: Influenza Virus Infectious NYMC X-179A; NIBSC code: 09/216. *Health Protection Agency Version 1.0, Dated 11/11/2009* (2009).
119. NIBSC Influenza Virus Infectious NYMC X-157 (A/New York/55/2004 HGR). *Health Protection Agency NIBSC code: 05/126* (2009).
120. Doris, B. High yiel reassortants for the flu vaccine: The Darwinian approach. *New York medical College Valhalla, NY 10595* (2011).

ANEXOS

Anexo I. ANHET anti-influenza descritos en la literatura

Hasta el momento se han descrito alrededor de ~110 ANHET, a continuación se presenta la información de uno de los once sets de ANHET descritos.

Cantidad de ANHET		5
Origen	De 32 ancianos sobrevivientes de 1918 (91 a 101 años), 8 tuvieron células B circulantes positivas a la cepa AH1N1 de 1918, de los cuales 3 fueron los donadores de los ANHET	
Forma de enriquecimiento	Infección en 1918 a la edad de 2 a 12 años.	
Nombres de los ANHET	1I20, 1F1 y 2B12 (donador 6), 4D20 (donador 4) y 2D1 (donador 23)	
Método de generación	Células mononucleares de sangre periférica transformadas a células B linfoblásticas, tamizadas por I.HA de 1918, 30 pozos de 6,578 dieron positivos y fueron fusionadas a un mieloma HMMA2.5 no secretor por electrofusión, de estas quedaron 17 hibridomas (de cuatro donantes), de estas quedaron 5 hibridomas (de dos donantes).	
Blancos	Epítipo SA de la cabeza HA de cepa recombinante (A/South Carolina/1/1918), (A/Swin/Iowa/15/30) y (A/California/04/2009), se cuenta con cristalografía.	
Ensayos de neutralización	<i>In vitro</i> (Inhibición de la hemaglutinación y microneutralización en placa) e <i>in vivo</i> (en ratones)	
Observaciones	En este trabajo se demostró que los humanos podemos mantener en circulación linfocitos B de memoria por muchas décadas después de la exposición, probablemente por toda la vida.	
Referencias	68, 71, 78 <p>Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Hai R, Crowe JE, Jr., <i>et al.</i> (2010) Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. <i>Science</i> 328: 357-360.</p> <p>Krause JC, Tumpey TM, Huffman CJ, McGraw PA, Pearce MB, <i>et al.</i> (2010) Naturally occurring human monoclonal antibodies neutralize both 1918 and 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses. <i>J Virol</i> 84: 3127-3130.</p> <p>Yu X, Tsibane T, McGraw PA, House FS, Keefer CJ, <i>et al.</i> (2008) Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. <i>Nature</i> 455: 532-536.</p>	

Anexo II. La vacuna contra Influenza A H1N1p.

Datos técnicos de la Vacuna Monovalente Influenza A (H1N1) 2009¹¹⁶.

Otros nombres: Vacuna H1N1p, Vacuna pandémica y PANENZA¹¹⁷.

Manufactura:

Esta vacuna se manufacturó en USA por Sanofi Pasteur Inc. (Discovery Drive Swiftwater PA 18370 USA) para sanofi-aventis de México, S.A. de C.V. (Acueducto del Alto Lerma No. 2. Zona Industrial de Ocoyoacac, C.P. 52740. Edo. De México) y acondicionó por BIRMEX (Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México, S.A. de C.V. Mariano Escobedo No. 20 Col. Popotla C.P. 11400 México, D.F.) y distribuyó por BIRMEX (Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México, S.A. de C.V. Amores No. 1240, Col. Del Valle C.P. 03100 México, D.F.)

Componentes:

La vacuna contiene 15 µg de unidades de HA por 0.5 mL dosis. La cepa de virus de influenza utilizada en esta vacuna es NYMC X-179A¹¹⁸. Esta cepa se generó en New York Medical College y la provee el CDC; es una cepa rearmada entre las cepas A/California/07/2009/H1N1 y la cepa NYMC X-157^{xvi119}), sus HA, NA y PB1 provienen de la cepa pandémica A/California/07/2009/H1N1, y su proteína M proviene de la cepa A/PR8/8/1934^{xvii120}. La cepa NYMC X-179 se inactivó con formaldehído, creció en el líquido alantóico de huevos embrionados y fragmentó con un surfactante no iónico, el Tritón X-100.

^{xvi} **NYMC X-157:** Cepa rearmada proveniente de la cepa: A/New York/55/2004 (H3N2) con el gen M de la cepa: A/PR/8/1934

^{xvii} **A/PR8/8/1934:** Cepa de influenza A, proveniente de Puerto Rico, número de cepa 8 y aislada en 1934; La proteína M de esta cepa se utiliza en las cepas rearmadas vacunales por el hecho de que es una cepa que está muy bien adaptada a crecer en el líquido alantóico de embriones de pollo, donde se ha estado pasando desde 1934.

Otros componentes: Tiomersal usado como preservativo (45 µg por dosis), NaCl, KCl, dihidrato fosfato disódico, fosfato dihidrogenado de potasio, H₂O y posibles residuos del surfactante no iónico Tritón X-100.

Almacenamiento: de 2-8°C.

Presentación:

Un paquete con 10 frascos multidosis de 10 dosis cada uno, en total son 100 dosis por paquete. Cada dosis corresponde a 0.5 mL de la vacuna (líquido claro transparente, opalescente) (Figura 2).

Imagen del paquete:

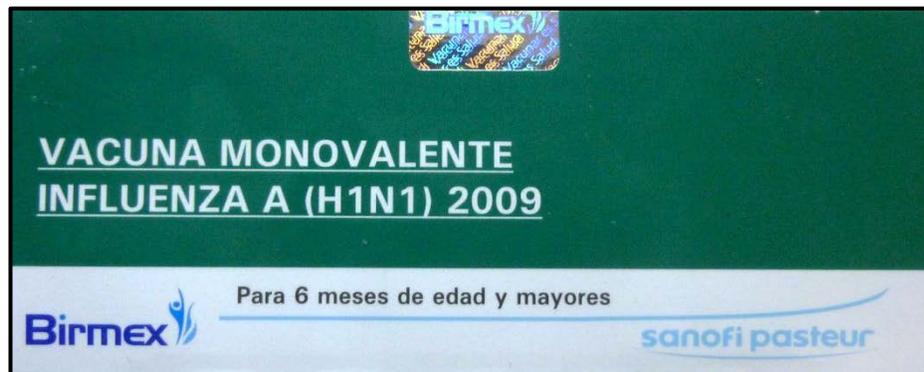


Figura 2. Presentación de paquete de la Vacuna Monovalente de Influenza A (H1N1) 2009 de Sanofi Pasteur-BIRMEX

Dosis e indicaciones:

Es una vacuna intramuscular que se puede aplicar desde niños > 6 meses, escolares, jóvenes y población adulta de acuerdo a las siguientes dosis:

- Niños de 6 meses – 35 meses de edad: media dosis (0.25 mL), no se dará el refuerzo de una segunda dosis.
- Niños de 3 – 8 años de edad: una dosis (0.5 mL), no se dará refuerzo de segunda dosis.
- Población de 9 años en adelante: una dosis (0.5 mL).

Contraindicaciones:

1. No debe aplicarse en niños menores de 6 meses.

2. Contraindicada en alergia demostrada a alguno de los componentes de la vacuna, principalmente alergia al huevo, proteína de pollo, albúmina, neomicina, formaldehído, tiomerosal. Los signos de alergia son prurito, enrojecimiento de la piel, ronchas, respiración recortada, edema facial y laríngeo (inflamación de la cara y garganta).

3. Si hay enfermedad febril por una infección severa, la vacunación debe posponerse hasta su recuperación. Una infección leve, incluyendo gripes sin fiebre no es contraindicación para la vacunación, pero debe evaluarse la posibilidad de posponerla si no hay mayor riesgo de exposición al virus A(H1N1).

4. No existe experiencia en la aplicación concomitante de Panenza® con otras vacunas, sin embargo, puede recibirse concomitante con otras vacunas inactivadas o vivas atenuadas, si se aplica en miembros diferentes. Los efectos secundarios podrían ser más intensos si esto sucede.

Posibles ESAVI^{xviii}

Posibles ESAVI leves en adultos:

Muy comunes en adultos: Dolor en el sitio de inyección, mialgia y cefalea.

Comunes: fiebre, malestar general, enrojecimiento e inflamación del sitio de inyección. Todos estos síntomas desaparecen entre 1-3 días sin tratamiento alguno.

Posibles ESAVI leves en niños:

En un estudio en niños de 2-17 años se han observado los siguientes efectos:

Muy comunes: Cefalea, mialgia, escalofríos, malestar general, enrojecimiento y dolor en sitio de inyección.

Comunes: Fiebre, inflamación y endurecimiento en el sitio de inyección.

En un estudio en niños de 6-23 meses se observaron los siguientes efectos:

Muy comunes: Llanto anormal, adormecimiento, pérdida de apetito, irritabilidad, enrojecimiento y dolor en el sitio de inyección.

Comunes: Vómito, fiebre, inflamación en sitio de inyección, endurecimiento

^{xviii} **ESAVI:** Evento Supuestamente Atribuido a la Vacunación o Inmunización; se define como cualquier trastorno, síndrome, signo o síntoma que puede o no ser causado por la vacuna o el proceso de inmunización y que ocurre después de la aplicación de una vacuna.

ESAVI graves muy raros (menos de 1 x 10,000 vacunados):

Los efectos secundarios listados a continuación fueron reportados en días o semanas después de la vacunación contra influenza estacional y pueden ocurrir también con vacuna Panenza®: Reacciones alérgicas dermatológicas que pueden dar salpullido, prurito y urticaria en todo el cuerpo, reacciones neurológicas: dolor en el trayecto del nervio afectado (neuralgia); parestesias manifestadas como disminución en la percepción del tacto, dolor, frío o calor, convulsiones febriles, desórdenes neurológicos que pueden traducirse en rigidez de nuca, confusión, desorientación, dolor o debilidad en los miembros, pérdida del equilibrio, parálisis en partes del cuerpo encefalomiелitis, neuritis, Síndrome de Guillain Barre, trombocitopenia temporal, linfadenopatías transitorias, reacciones anafilácticas que pueden llevar a shock, con edema de cara, labios, lengua, cuello, garganta (angioedema), vasculitis: con posible nefritis temporal.

Anexo III. Consentimiento informado.

Anexo IV.

Historia Clínica.

Anexo V. Tarjeta Diaria.