

Virus Influenza: Aplicación de nuevas estrategias para el desarrollo de una vacuna

Lesly Romero-Beltrán, Guadalupe Ayora-Talavera

Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México

RESUMEN

Los virus influenza causan epidemias anuales y pandemias ocasionales, siendo responsables de alrededor de 300,000 muertes anualmente. Las opciones de tratamiento son limitadas y el desarrollo de resistencia por parte de los virus obligan a tomar medidas en la prevención de la enfermedad. Actualmente, se cuenta con vacunas de virus atenuados y de virus inactivados, generadas a partir de cultivo en huevo; aunque las nuevas tendencias son utilizar cultivos celulares, ya que esto permitiría obtener vacunas en cantidades mayores y en menor tiempo que lo requerido para la generación en huevo; la utilización de técnicas como las de genética reversa permiten el desarrollo de vacunas con virus recombinantes mejor adaptados. En este trabajo, se pretende describir las características del virus influenza, la respuesta inmune ante este virus, las opciones de vacunas y hacia dónde se dirige la generación de vacunas contra influenza.

Palabras clave: tipos de vacunas, influenza

ABSTRACT

Strategies for generate influenza vaccines generation

Influenza viruses cause annual epidemics and occasional pandemics, making them responsible for approximately 300,000 annual deaths.

Treatment options are limited and the development of resistant strains have forced us to take action to prevent the disease. Currently there are attenuated and inactivated virus vaccines generated from egg cultures, even though the new tendency is to use cellular cultures that allow us to obtain vaccines quicker and in more quantities. The use of techniques as reverse genetics allows the development of adapted recombinant virus vaccines. This paper aims to describe the influenza virus characteristics, immunology, vaccines options and the future of the development of influenza virus vaccines.

Key words: types of vaccines

INTRODUCCIÓN

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda causada por el virus influenza, responsable de 3 a 5 millones de casos de enfermedad severa y de 250,000 a 500,000 muertes anualmente. Esta enfermedad afecta principalmente a niños, adultos mayores y personas inmunodeprimidas (1). A través de la historia se han presentado brotes epidémicos anuales de influenza y algunas pandemias ocasionales (2).

Los virus influenza tienen un genoma segmentado que permite su recombinación y el surgimiento de virus con potencial pandémico,

Autor para correspondencia: M.Cs. Lesly Romero Beltrán, CIR-Biomédicas, UADY, Edificio Inalámbrica, calle 96 s/n x Ave. Jacinto Canek y calle 47, Paseo de Las Fuentes. Mérida, Yucatán, México. CP 97225. **E-mail:** lesly289@hotmail.com

Recibido: el 15 de octubre de 2013. **Aceptado para publicación:** el 15 de enero de 2014

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb132435.pdf>

como el que se presentó en 2009 (3); en ese caso, sería necesario generar vacunas suficientes para inmunizar a la población en poco tiempo.

Las vacunas generadas en huevo requieren mucho tiempo y pueden introducir mutaciones en la hemaglutinina (HA) del virus; por lo que se requiere analizar otros métodos de obtención de vacunas, que puedan obtenerse más rápido y en mayores cantidades, así como que se mantenga la secuencia de la HA original (4).

En este trabajo, se describen las características de los virus influenza, las opciones de tratamiento y prevención contra este virus, el comportamiento de la respuesta inmune ante una infección, los tipos de vacunas y hacia dónde se dirigen las investigaciones para la generación de vacunas más efectivas y seguras que las actualmente utilizadas.

Virus influenza. Es un virus RNA, perteneciente a la familia Orthomyxoviridae, tiene un genoma de 8 segmentos, que codifica para 12 proteínas (5); algunos de los segmentos codifican para dos proteínas, es de polaridad negativa, tiene envoltura, que es una bicapa lipídica tomada de la membrana celular; en el exterior de la envoltura se encuentran las proteínas HA y NA y en el interior una capa formada por la proteína matriz y, más internamente, encontramos la nucleocápside helicoidal formada por siete segmentos de RNA en el caso de los virus C y ocho segmentos en los virus A y B; este virus es pleomórfico (6), tiene un diámetro que va de 50 a 120 nm, y se divide en 3 tipos serológicamente diferentes, A, B y C (2).

El virus influenza tipo B ocasiona enfermedades en el humano; el tipo C se ha encontrado en humanos y en cerdos; pero el tipo A, que es el responsable de todas las pandemias de las que se tenga registro, se ha logrado aislar en cerdos, caballos, perros, aves acuáticas, aves de corral, humanos y otros mamíferos (7). Esto le permite a este virus recombinarse con facilidad y generar nuevas cepas; el cerdo es considerado el principal huésped intermediario para que se lleve a cabo la diseminación del virus influenza interespecies,

esto es debido a que posee receptores tanto para los virus aviares como para los de mamíferos (8). Los virus influenza A son clasificados en subtipos dependiendo de las proteínas HA y NA. Se han descrito 18 tipos de HA y 11 tipos de NA (9). En las aves acuáticas pueden coexistir 16 tipos de HA y 9 de NA y pueden presentarse hasta 144 combinaciones. En humanos, actualmente sólo se encuentran en circulación dos diferentes subtipos, H3N2 y H1N1 (7).

Además de los antígenos de superficie, el genoma viral codifica para otras diez proteínas, que son polimerasa básica 1 (PB1), polimerasa básica 2 (PB2), polimerasa ácida (PA), proteína de la nucleocápside (NP), proteína de la matriz 1 (M1), proteína de la matriz 2 (M2); tanto M1 como M2 son codificadas por el mismo segmento de RNA pero con diferente marco de lectura, lo mismo sucede con la proteína no estructural 1 (NS1) y la proteína no estructural 2 (NS2) (10). La proteína PB1-F2 es una proteína proapoptótica que se presenta en algunas cepas de los virus influenza; se ha descubierto recientemente la proteína N40, que es una proteína no estructural de función desconocida (11).

Epidemias y pandemias. Entre las pandemias del siglo XX tenemos que en 1918 surgió la pandemia de influenza más devastadora que infectó cerca del 25% de la población mundial y causó la muerte de 50 millones de personas; este virus de origen aviar era del subtipo H1N1 (12); posteriormente, en 1957 surgió la pandemia asiática, el virus responsable de alrededor de tres millones de muertes fue un virus del subtipo H2N2; finalmente, el responsable de la conocida como gripe de Hong Kong fue un virus H3N2, que ocurrió entre 1968 y 1970. Debido a que las pandemias anteriores se habían presentado con intervalos de 30 a 50 años, se esperaba que para principios del siglo XXI se presentara una nueva pandemia (2).

En febrero de 2009, en el municipio de La Gloria, Veracruz, en México, se presentó el primer caso registrado de un nuevo brote de una enfermedad tipo influenza; para principios de

abril ya se tenía en el país un gran número de casos, en los que en su mayoría se presentaba fiebre, tos, dolor de garganta, en algunos diarrea y/o vómito; en los casos más severos, se presentaba dificultad respiratoria, neumonía e, incluso, la muerte. El Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos reportó el 15 de abril en San Diego, California, un caso en el que se identificó un virus similar al reportado por la OMS. El 21 de abril la CDC informó de una nueva cepa de virus influenza A H1N1; a los dos días que se identificó esta nueva cepa, el 23 de abril la Agencia de Salud Pública de Canadá identificó un virus influenza de origen porcino A H1N1 en muestras recibidas de México; debido a esto, la OMS el 24 de abril informó un nuevo brote de influenza; solo 5 días después, el 29 de abril, se declaró una alerta pandémica de fase 5 (13). La dimensión de esta pandemia fue tal que el 21 de mayo, 41 países ya habían reportado 11,034 casos y 85 muertes. En junio del mismo año, se declaró la alerta pandémica de fase 6 y esta se mantuvo durante catorce meses. En agosto de 2010, la OMS declaró el inicio de la fase postpandémica con un recuento de más de 18,000 muertos a nivel mundial (14).

La situación en México mostró que, para el 25 de junio de 2009, se habían reportado 9,028 casos en todo el país y un total de 119 defunciones; los estados del centro y sur de la república fueron los que presentaron un mayor número de casos, siendo el Distrito Federal el más afectado con 2,085 casos, seguido por Yucatán y Chiapas que presentaron 913 y 657 casos, respectivamente. Los síntomas más frecuentes fueron fiebre, tos y dificultad respiratoria (15). Se presentaron tres olas epidémicas en el país a lo largo de 2009: la primera fue la ola de primavera, que se presentó entre el 1 de abril y el 20 de mayo, la ola de verano se presentó del 21 de mayo al 1 de agosto y la ola de otoño del 2 de agosto al 31 de diciembre.

Tratamientos y prevención. Una vez que la enfermedad se presenta, se cuenta con dos tipos

de drogas antivirales, los amantanos y los inhibidores de la neuraminidasa (13). Dentro de los amantanos, están la amantadina y la rimantadina que bloquean el canal iónico formado por la proteína M2 y, de esta manera, evitan el paso de iones hidrógeno a la vesícula endocítica, previniendo la acidificación, que es necesaria para que se lleve a cabo la disociación de la proteína M1 y la liberación del complejo ribonucleoproteico (16). Sin embargo, el uso de los amantanos se ha restringido debido a que tienen algunos efectos tóxicos, no tienen efectividad contra los virus de influenza B y ni contra la mayor parte de los virus humanos H1N1, H3N2; también los virus aviares H5N1 y los porcinos H1N1, H3N2 y H1N2, al igual que el A/H1N1 de 2009, han generado resistencia contra este tipo de antivirales (17).

Los inhibidores de la neuraminidasa son el zanamivir y el oseltamivir; debido a que la neuraminidasa tiene la función de cortar las uniones del ácido siálico y la hemaglutinina, estas drogas se mimetizan con el sustrato e interfieren con la liberación de la progenie viral (18) y, de esta manera, evitan que los viriones puedan invadir nuevas células, previenen la digestión del ácido neuramínico del mucus y reducen la capacidad de los virus para colonizar el epitelio respiratorio (19); a diferencia de los amantanos, los inhibidores de la neuraminidasa son poco tóxicos y el desarrollo de resistencia es lento. El zanamivir es un derivado deshidratado del ácido siálico, este antiviral debe inhalarse, y el oseltamivir es un profármaco oral del carboxilato de oseltamivir que es el compuesto activo, contiene en su estructura un anillo ciclohexano y se utiliza por vía oral (20).

El zanamivir tiene una biovariabilidad de 10% a 20%, es decir, que, del total de la dosis, del 10 al 20% se va al sistema circulatorio; el 90% de la dosis inhalada es eliminada en la orina, la vida media en suero es de 2.5 a 5.1 horas, la dosis es de 10 mg dos veces al día por 5 días iniciando dentro de las 48 horas de presentarse síntomas, las dosis para niños son las mismas (21); como efectos

adversos se ha relacionado con broncoespasmos (19), por lo que normalmente es utilizado como segunda opción de tratamiento.

El oseltamivir es hidrolizado por el hígado a carboxilato de oseltamivir; la biovariabilidad de este es del 2%, tiene una vida media de 6 a 10 horas, la dosis en adultos es de 75 mg tomados dos veces al día por 5 días; en niños la dosis es de 2 mg/kg dos veces al día por 5 días (21). Como efectos adversos se observa leve incomodidad intestinal; este antiviral es utilizado como primera opción de tratamiento de influenza, esto puede contribuir a la resistencia que ha sido reportada, mientras que la resistencia contra zanamivir se ha presentado en menor cantidad; la resistencia contra los antivirales se genera por mutaciones que se presentan en el virus influenza (19).

Para la prevención de la influenza se utiliza la vacunación como método primario. La vacuna se elabora con virus inactivados o atenuados: las vacunas normalmente contienen HAs de tres tipos: dos de virus A y una de B. Los virus se cultivan en huevos y posteriormente se purifican y se inactivan haciendo que pierdan su infectividad (22); las vacunas pueden cambiar periódicamente dependiendo de los virus que se presenten en una región (10), por lo que la vacunación debe ser anual; la elaboración de una vacuna contra un virus emergente tarda de 3 a 6 meses y se basa en la respuesta inmune que se presenta contra influenza (17).

Respuesta inmune contra influenza. La infección causada por el virus influenza es capaz de inducir en el huésped una respuesta inmune innata, así como también una respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune innata contra influenza se caracteriza por un infiltrado de neutrófilos en los pulmones, así como citocinas proinflamatorias. La síntesis de estas citocinas se debe a la activación de las células que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). En el caso de virus influenza, los receptores intracelulares TLR7 y TLR8 tienen la capacidad de reconocer RNA de cadena sencilla,

activarse y desencadenar una serie de reacciones que culminarán con la síntesis de citocinas proinflamatorias (23). Los neutrófilos no son las únicas células de la inmunidad innata que participan en la respuesta contra los virus influenza; células como las *natural killer* (NK), los macrófagos y las dendríticas se encuentran de manera considerable en los infiltrados celulares (24). Como parte de la inmunidad innata están los macrófagos y neutrófilos que no solo tienen la capacidad de fagocitar al antígeno viral, sino también a las células que se encuentren infectadas y, de esta manera, procesar los antígenos por la vía endocítica y presentarlos mediante MHC II (25).

La respuesta al virus influenza varía dependiendo de la cepa. La respuesta a cepas altamente patogénicas es diferente a la respuesta a cepas de moderada patogenicidad; prueba de esto es que el patrón de citocinas generado para cada tipo de virus es diferente. En virus altamente patogénicos predominan IL-6, IL-8, MCP-1 y TNF- α , mientras que en los virus de mediana patogenicidad las citocinas y quimiocinas que se encuentran principalmente expresadas son IP-10, MIG, IL-17 e IFN- γ . La presencia de citocinas proinflamatorias se asocia con la severidad de la enfermedad, en tanto que en los virus de mediana patogenicidad las citocinas que predominan se asocian a una respuesta inmune adaptativa que conduce a la eliminación de la infección (26).

La respuesta adaptativa a influenza involucra la activación de linfocitos B, que después de estar en contacto con el antígeno generarán anticuerpos neutralizantes; estos anticuerpos son los elementos más efectivos para la eliminación viral, pero no solo los linfocitos B se activan en infecciones por influenza; los linfocitos T juegan un papel muy importante. El virus de la influenza tiene la capacidad de estimular una respuesta tanto de linfocitos T CD4 como de linfocitos T CD8; los linfocitos T CD4 son necesarios para una óptima activación de los linfocitos B (27). La actividad de los linfocitos T no depende de la presencia de los linfocitos B, ya que, aun en casos de influenza en que los pacientes carezcan

de linfocitos B, las respuestas específicas de linfocitos T CD4 y T CD8 no se ven afectadas (28).

Tipos de vacunas. Las vacunas que actualmente se aplican para prevenir la influenza van dirigidas a la generación de anticuerpos contra la hemaglutinina del virus (4). Actualmente existen dos tipos de vacunas, las que utilizan virus inactivados y las que utilizan virus atenuados (29); las vacunas de virus inactivados normalmente contienen tres tipos de hemaglutinina, una cepa viral de influenza A de subtipo H1, una cepa de influenza A del subtipo H3 y una de influenza tipo B. Para la generación de vacunas comúnmente los virus se cultivan en huevos; una vez generados estos virus, se purifican y luego se inactivan haciendo que pierdan su infectividad y puedan utilizarse como vacunas (30). Las vacunas cambian periódicamente dependiendo de los virus que se presenten en una región (10) y, por lo tanto, la vacunación debe ser anual. Sin embargo, la elaboración de estas, ya sea ante la aparición de un virus emergente o como parte de la formulación anual, tarda de 3 a 6 meses (17).

En el caso de las vacunas de virus vivos atenuados, existen diferentes tipos; los más comunes son los adaptados para crecer solo en condiciones frías. Esta característica les permite infectar el tracto respiratorio superior, presentando una leve sintomatología, pero su replicación se ve limitada al tracto respiratorio inferior por la temperatura que predomina en esa región corporal. Las vacunas atenuadas por el frío se administran por vía intranasal (31). Entre las ventajas que los virus atenuados presentan está la de inducir una respuesta inmune sistémica y de mucosas; sin embargo, en los estudios en los que se ha comparado la efectividad de ambos tipos de vacunas no se han encontrado diferencias significativas (17).

Algunos hechos que han venido a agilizar la búsqueda de nuevas opciones en el diseño de las vacunas contra la influenza son el brote de influenza aviar AH5N1 en Asia y su inminente

amenaza de causar una pandemia, la baja protección que ofrece la vacuna trivalente en personas mayores de 65 años, así como la emergencia del virus de influenza A(H1N1)pdm09 y la pandemia de 2009, que demostró que el sistema actualmente utilizado para la generación de vacunas requiere mucho tiempo y deja a la población desprotegida ante un brote (31,32).

Técnicas para la generación de vacunas contra influenza. La primera vacuna contra influenza se aprobó en 1945 en Estados Unidos y fue una cepa crecida en huevo e inactivada con formalina; la primera fue hecha por Parke Davis y después Merck generó vacunas del mismo tipo (31). Actualmente, las vacunas más utilizadas contra influenza son las generadas en huevo; estas vacunas presentan algunas deficiencias, ya que el proceso es lento, pueden presentarse algunas mutaciones en HA que es el principal antígeno de la vacuna y, en personas alérgicas a la albúmina, está contraindicada; por lo que se ha optado por la generación de vacunas utilizando otros sistemas (3,33).

Como alternativa a las vacunas con virus inactivados, surgieron las vacunas de virus vivos atenuados; estas vacunas se crecen en huevo pero se mantienen a temperaturas bajas, esto se realiza para que se presenten mutaciones que le permitan replicarse solo en frío, esto evita que se repliquen en el tracto respiratorio; la aplicación de esta vacuna es intranasal. La desventaja que presenta es que las mutaciones que adquiere para adaptarse al frío pueden revertirse (31).

La tendencia en la generación de vacunas contra influenza es sustituir el crecimiento en huevo por cultivo celular; al crecer las cepas en células, se pueden obtener vacunas de manera más rápida y evitar las mutaciones en HA que adquieren algunos virus para adaptarse a crecer en huevo; existen diferentes vacunas obtenidas a partir de cultivo celular (3,4).

La utilización de adyuvantes en las vacunas contra influenza está aprobada en Europa; algunos fosfolípidos y emulsiones de aceites

son utilizados para potenciar la respuesta y se obtienen títulos de anticuerpos altos al utilizar adyuvantes. Este tipo de vacunas está pensado principalmente para personas mayores de 65 años, quienes presentan una respuesta pobre ante la inmunización contra influenza (3,31).

Una opción para las vacunas contra virus influenza que no contiene virus atenuados ni inactivados es la generación de partículas similares a virus conocidas como VLPs por sus siglas en inglés; estas partículas se generan en células sf9 que se infectan con baculovirus y expresan las proteínas HA, NA, M1 y M2 (34). Estas VLPs tienen una muy buena capacidad de ser reconocidas por las células dendríticas y de activar la respuesta inmune (31).

Mediante técnicas de genética reversa basadas en plásmidos, se han generado virus influenza que genéticamente carecen de un segmento de su genoma, pero que estructuralmente poseen todas sus proteínas, debido a que se generan en células que expresan en su superficie una de las proteínas de superficie del virión; así, aunque carezca del segmento codificante, obtendrá la proteína de la célula en la que se está generando. Estos virus tienen solo un ciclo de replicación en células que no expresen esta proteína viral en su superficie y podrían ser una alternativa segura, ya que se elimina un segmento completo; estos virus siguen en experimentación (35).

CONCLUSIONES

Debido al constante surgimiento de nuevos virus influenza contra los cuales no se tiene protección, es necesario el desarrollo de vacunas que puedan obtenerse en poco tiempo y en grandes cantidades; por esto, en los últimos sesenta años se ha trabajado en este campo.

Los virus influenza, al poseer un genoma segmentado, presentan la ventaja de poder manipular su genoma utilizando plásmidos independientes; el desarrollo de técnicas como las de genética reversa permite diseñar vacunas que presenten proteínas antigénicas específicas y, así,

evaluar la inmunogenicidad de cada una de estas.

La tendencia en vacunación contra influenza es sustituir las vacunas que se crecen en huevo por vacunas obtenidas a partir de cultivo celular; dentro de las que se obtienen de células, se pueden tener virus atenuados, virus inactivados y otras como los VLPs que no son virus, pero que presentan la capacidad de inducir una respuesta inmune y conferir protección.

La utilización de adyuvantes así como los virus de un solo ciclo de replicación son opciones prometedoras para la generación de nuevas vacunas contra influenza.

La información general del virus influenza y de la respuesta inmune contra este virus es crucial para el desarrollo de nuevas opciones en la generación de vacunas.

REFERENCIAS

1. **Organización mundial de la salud.** (Consultado 10 febrero 2014) disponible en URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/es/index.html>.
2. **Martin, M, Hans, WD, Jindrich, CJ.** Novel swine-origin influenza A virus in humans: another pandemic knocking at the door. *Med Microbiol Immunol.* 2009 Ago; 198 (3): 175-183.
3. **Lambert, LC, Fauci, AS.** Influenza vaccines for the future. *NEJM.* 2010 Nov; 363 (21): 2036-2044.
4. **Dormitzer, PR, Tsai, TF, Del Giudice, G.** New technologies for influenza vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 2012 Ene; 8 (1): 45-58.
5. **Bhounik, P, Hughes, AL.** Reassortment of ancient neuraminidase and recent hemagglutinin in pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis.* 2010 Nov; 16 (11): 1-7.
6. **Vega, BRS, Reyes-Terán, G.** El virus de la influenza. *Nct.* 2007 Mar; 66 (Suppl 1): 12-14.
7. **Talledo, M, Zumaeta, K.** Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. *Rev Peru Biol.* 2009 Dic; 16(2): 227-238.
8. **Vaqué, RJ, Gil, CJ, Brotons, AM.** Principales características de la pandemia por el nuevo virus influenza A (H1N1). *Med Clin (Barc).* 2009 Oct; 133(13): 513-521.
9. **Tong, S, Zhu, X, Li, Y, Shi, M, Zhang, J, Bourgeois, M, et al.** New world bats harbour diverse influenza A viruses. *PLoS pathog.* 2013 Oct; 9 (10):1003657.
10. **Rovid, SA.** Influenza. The Center for food security and public health. Iowa State University. Technical

- Fact sheet. 2010 Jan; 1-46. Tomado de: (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/influenza.pdf>), accesado el 10 de julio de 2013.
11. **Medina, RA, Garcia-Sastre, A.** Influenza A viruses: new research developments. *Nat rev micro.* 2011 Ago; 9 (8): 590-603.
 12. **Belshe, RB.** The Origins of Pandemic Influenza-Lessons from the 1918 Virus. *N Engl J Med.* 2005 Nov; 353 (21): 2209-2211.
 13. **Dawood, SF, Jain, S, Finely, L, Shaw, MW, Lindstrom, S, Garten, RJ, et al.** Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 2009 Jun; 360 (25): 2605-15.
 14. **Agencia noticiosa CNN,** tomado de: (<http://mexico.cnn.com/salud/2010/08/10/la-oms-anuncia-el-fin-de-la-pandemia-por-ah1n1-despues-de-14-meses>) 2010, accesado el 30 de abril de 2012.
 15. **Secretaria de salud.** Tomado de: <http://portal.salud.gob.mx/contenidos/noticias/influenza/estadisticas.html>. 2009. Accesado el 20 de mayo de 2012.
 16. **Piñón-Ramos, A, Oropesa-Fernández, S, Aragonés-López, C, Galindo, B, Acosta-Herrera, B, Hernández-Espinosa, B.** Influenza y vacunación. *Rev Biomed.* 2005 Ene; 16 (1): 45-53.
 17. **Bridges, CB, Fakunda, K, Uyeki, TM, Cox, NJ, Singleton, JA.** Prevention and control of influenza. Recommendations of the advisory committee on immunization practice (ACIP). *MMWR.* 2002 Feb; 51(3): 1-36.
 18. **Gubareva, LV.** Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus res.* 2004 Jul; 103 (1): 199-203.
 19. **Democratis, J, Pareek, M, Stephenson, I.** Use of neuraminidase inhibitors to combat pandemic influenza. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006 Sep. 58 (5): 911-915.
 20. **Moscona, A.** Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *N Engl J Med.* 2005 Sep; 353 (13): 1363-73.
 21. **Tanaka, T, Nakajima, K, Murashima, A, Garcia-Bournissen, F, Koren, G, Ito, S.** Safety of neuraminidase inhibitors against novel influenza A (H1N1) in pregnant and breastfeeding women. *Cmaj.* 2009 Jul; 181 (1): 55-58.
 22. **Newmann, G, Noda, T, Kawaoka, Y.** Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* 2009 Jun; 459 (7249): 931-939.
 23. **Wang, JP, Bowen, GN, Padden, C, Cerny, A, Finberg, RW, Newburger, PE, et al.** Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus Phagocytes. 2008 Sep; 112(5): 2028-2034.
 24. **Sanderson, SD, Thoman, ML, Kis, K, Virts, EL, Herrera, EB.** Innate Immune Induction and Influenza Protection Elicited by a Response-Selective Agonist of Human C5a. *PLoS ONE.* 2012 Jul; 7(7): e40303.
 25. **Hashimoto, Y, Moki, T, Takizawa, T, Shiratsuchi, A, Nakanishi, Y.** Evidence for Phagocytosis of Influenza Virus-Infected, Apoptotic Cells by Neutrophils and Macrophages in Mice. *The Journal of Immunology.* 2007 Feb; 178(4): 2448-2457.
 26. **Lee, N, Wong, CK, Chan, PKS, Chan, MCW, Wong, RYK.** Cytokine Response Patterns in Severe Pandemic 2009 H1N1 and Seasonal Influenza among Hospitalized Adults. *PLoS ONE.* 2011 Oct; 6(10): e26050.
 27. **Lee, HY, Topham, DJ, Park, Y, Hollenbaugh, J, Treanor, J, Mosmann, TR, et al.** Simulation and Prediction of the Adaptive Immune Response to Influenza A Virus Infection. *J. Virol.* 2009 Jul; 83 (14): 7151-7165.
 28. **Liu, Y, Wu, Y, Lam, KT, Lee, PPW, Tu, W, Lau, YL.** Dendritic and T Cell Response to Influenza is Normal in the Patients with X-Linked Agammaglobulinemia. *J Clin Immunol.* 2012 Jun; 32 (3):421-429.
 29. **Jung, EJ, Lee, KH, Seong, BL.** Reverse genetic platform for inactivated and live-attenuated influenza vaccine. *Experimental and molecular medicine.* 2010 Feb; 42 (2): 116-121.
 30. **Cargnelutti, DE, Sánchez, MV, Mattion, NM, Scodeller, EA.** Development of a universal CTL-based vaccine for influenza. *Bioengineered.* 2013 Ene; 4 (6): 1-5.
 31. **Shaw, A.** New technologies for new influenza vaccines. *Vaccine.* 2012 Jul; 30(33): 4927-4933.
 32. **Reisinger, KS, Block, SL, Izu, A, Groth, N, Holmes, SJ.** Subunit Influenza Vaccines Produced from Cell Culture or in Embryonated Chicken Eggs: Comparison of Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity. *JID.* 2009 Sep; 200 (6):849-857.
 33. **Caubet, JC, Wang, J.** Current understanding of egg allergy. *Pediatr Clin North Am.* 2011 Abr; 58(2): 427-443.
 34. **Galarza, JM, Latham, T, Cupo, A.** Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral immunol.* 2005 Mar; 18(1): 244-251.
 35. **Baker, SF, Guo, H, Albrecht, RA, Garcia-Sastre, A, Topham, DJ, Martinez-Sobrido, L.** Protection against lethal influenza with a viral mimic. *JVI.* 2013 Ago; 1(8): 8591-8605.