

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BUENOS AIRES – ITBA**

**ESCUELA DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA**

# **IMPACTO DEL GENOTIPO TLR4 EN LA RESPUESTA HUMORAL CONTRA EL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO**

**AUTOR: LEVY, Hernán (Leg. N° 54310)**

**TUTOR: Dr. ACOSTA, Patricio Leandro**

**TRABAJO FINAL PRESENTADO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
BIOINGENIERO**

**BUENOS AIRES**

**PRIMER CUATRIMESTRE, 2018**

**"IF THERE WERE NO INDIVIDUAL VARIABILITY, MEDICINE  
WOULD HAVE BEEN SCIENCE NOT AN ART."**

**WILLIAM OSLER**

## ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

aPV: Pneumovirus aviar

BCR: receptor de célula B

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: células presentadoras de antígeno

CTL: linfocitos T citotóxicos

DAB: diaminobencidina

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco

DO: densidad óptica

ELISA: ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas

EPA: enfermedad pulmonar aumentada por la vacuna FIRSV

EROs: especies reactivas de oxígeno

FIRSV: vacuna de virus sincicial respiratorio inactivada por formalina

hMPV: Metapneumo virus humano

IF: inmunofluorescencia

IFN: interferón

IL: interleuquina

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

LT: linfocito T

LPS: lipopolisacárido

NF: factor nuclear de necrosis

NK: células asesinas naturales

MARCO: receptor de macrófago con estructura de colágeno

MEM: medio mínimo esencial  
MM: medio de mantenimiento  
PBS: buffer fosfato salino  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PMAPs: patrones moleculares asociados a patógenos  
PRNT50: ensayo de neutralización por reducción de placas al 50%  
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real  
QR: cantidad relativa de ARNm  
RRPs: receptores de reconocimiento de patrones  
RT: transcripción inversa  
SE: semana epidemiológica  
SNP: Polimorfismo de nucleótido simple  
TCR: receptor de célula T  
TGF: Factor de crecimiento transformante  
Ths: Linfocitos T colaboradores  
TLRs: receptores Toll-símil  
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina  
TNF: factor de necrosis tumoral  
Treg: células T reguladoras  
UFP: unidad formadora de placa  
VSR: virus sincicial respiratorio  
WT: wild type (tipo natural)

<b>I. Resumen.....</b>	<b>7</b>
<b>II. Introducción .....</b>	<b>11</b>
2.1. Reseña histórica.....	12
2.2. El virus.....	13
2.3. Epidemiología.....	16
2.4. Manifestaciones clínicas.....	17
2.5. Respuesta inmune.....	18
2.5.1. Respuesta inmune innata .....	18
2.5.3. Respuesta inmune adaptativa.....	24
2.5.4. Determinantes antigénicos.....	34
2.6. Complejo Receptor TLR4-CD14 .....	35
2.6.1 Receptor de Tipo Toll 4.....	35
2.6.2 Polimorfismos simples de nucleótidos de TLR4 .....	38
2.7 Severidad y TLR4.....	40
2.8. Vacuna FIRSV y enfermedad pulmonar aumentada .....	42
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
4. Metodología General .....	48
4.1. Medios de cultivo .....	48

4.2 Cultivo celular .....	48
4.3. Preparación de los inóculos del virus .....	48
4.4. Titulación viral (técnica de inmuno-tinción).....	49
4.5. Extracción de ADN a partir de sueros humanos mediante columnas magnéticas .....	50
4.6. Genotipificación .....	51
4.7. Caracterización de los antisueros por ensayo de ELISA .....	52
4.8. Determinación del título neutralizante de los anticuerpos presentes en los sueros. ....	53
4.9. Análisis estadístico .....	54
<b>V. Resultados .....</b>	<b>56</b>
5.1. Genotipificación. ....	57
5.2. Cálculo del título de punto final. ....	59
5.3. Cálculo del PRNT50. ....	62
5.4. Análisis estadístico .....	64
<b>VI. Discusion y Conclusiones .....</b>	<b>69</b>
<b>VII. Referencias .....</b>	<b>73</b>

# **I. RESUMEN**

**Estado actual del tema:**

El virus sincicial respiratorio (VSR) es la principal causa viral de hospitalización por enfermedad respiratoria en bebés y niños en todo el mundo con manifestaciones clínicas como bronquiolitis y/o neumonía.

En 1966, una vacuna inactivada con formalina (FIRSV) contra el VSR fue administrada a niños en Estados Unidos. Durante el invierno de 1967, los niños inmunizados que se infectaron con VSR desarrollaron una forma aumentada de enfermedad por VSR (caracterizada por una bronconeumonía grave, broncoconstricción y aumento de la producción de moco); dos de los niños inmunizados murieron a causa de la infección. Las principales características de la respuesta inmune encontradas en los infantes fueron; producción atípica de anticuerpos (baja afinidad y baja neutralización), acumulación de inmunocomplejos y una respuesta inmune sesgada hacia Th2. Hoy, 52 años más tarde, sigue sin existir una vacuna comercial contra este virus. Trabajos previos vinculan al receptor de tipo toll 4 (TLR4) con las características de la respuesta inmune antes mencionadas. Dado el creciente interés por la medicina genómica, en este trabajo se propone estudiar el papel de un polimorfismo de nucleotido simple (SNP) en el gen codificante para TLR4 en la respuesta de anticuerpos contra el VSR.

**Objetivo:**

Caracterizar la respuesta inmune humoral frente al virus del VSR de una muestra poblacional con diferentes genotipos en el gen codificante para TLR4 para determinar el papel del genotipo en la respuesta.

**Objetivos particulares:**



1. Determinar la presencia y calcular el título de punto final en ensayos de adhesión de los anticuerpos en los sueros a caracterizar.
2. Cuantificar el título neutralizante de dichos anticuerpos.
3. Determinar el papel del genotipo en el título de punto final de los anticuerpos.
4. Determinar el papel del genotipo en el potencial neutralizante de los anticuerpos.

#### **Materiales y métodos:**

Se utilizó sueros humanos reclutados previamente por Fundación INFANT. Se realizó genotipificación mediante PCR en tiempo real. Ensayos de ELISA para detección y cuantificación parcial de anticuerpos contra VSR. Ensayos de neutralización por reducción de placas virales. Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

#### **Resultados:**

1. De la población total de 186 individuos solo un 8,06% fueron portadores del genotipo heterocigota para el SNP de TLR4 estudiado. No se encontró individuos con genotipo homocigota mutado.
2. No se observó diferencias estadísticamente significativas entre el título de punto final de los ensayos de adhesión a virus inactivado y el genotipo estudiado.
3. No se observó diferencias estadísticamente significativas entre el título neutralizante de los anticuerpos presentes en los sueros y el genotipo estudiado.

#### **Discusión y Conclusiones:**

Si bien el gen estudiado está involucrado en la respuesta inmune contra la infección por VSR, no se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre el SNP con la respuesta humoral, en cuanto al título de punto final y al título neutralizante. Futuros análisis deberían incluir la expresión del receptor, estudiar

otros genes y SNPs de interés, discriminar el impacto producido en los anticuerpos contra las diferentes conformaciones de la proteína F viral, analizar el impacto en la avidéz de los anticuerpos y analizar la relación entre genotipo/fenotipo y las condiciones ambientales de los sujetos a evaluar.

## **II. INTRODUCCIÓN**

## 2.1. Reseña histórica

El virus sincicial respiratorio (VSR) fue aislado por primera vez en 1956 por Morris y colaboradores a partir de las secreciones de un chimpancé de laboratorio que padecía coriza[1]. Posteriormente Chanock y colaboradores aislaron de las secreciones de dos niños, microorganismos idénticos al agente etiológico responsable de la coriza en el chimpancé[2]. Chanock sugirió el nombre de “virus sincicial respiratorio” en referencia a las manifestaciones clínicas y de laboratorio que producía[3].

Para 1960, el VSR ya era considerado a nivel mundial como principal agente causal de las infecciones respiratorias en la infancia[4]. A mediados de la década de 1960, Chanock y Parrott desarrollaron una vacuna que contenía virus sincicial respiratorio inactivado por formalina que fue administrada en dos o tres dosis por vía intramuscular a niños de entre 2 meses y 7 años. Esta vacuna no solo no protegió contra el VSR, sino que además el 80% de los niños vacunados desarrolló bronquiolitis o neumonía lo suficientemente grave como para requerir internación, mientras que del grupo que recibió placebo (grupo control) sólo un 5% de los pacientes requirió hospitalización. Dos de los niños que recibieron la vacuna (de 14 y 16 meses de edad) murieron cuando contrajeron la infección por VSR[5]. En las 3 últimas décadas, se dedicó mucho trabajo en clarificar la patogénesis de la EPA. Hoy nuevas vacunas están emergiendo y se ha informado sobre numerosos tipos de células, genes, SNPs, citoquinas y quimoquinas que promueven o mitigan la EPA, supliendo la necesidad de encontrar biomarcadores específicos de la EPA que puedan servir de parámetros de seguridad a la hora de

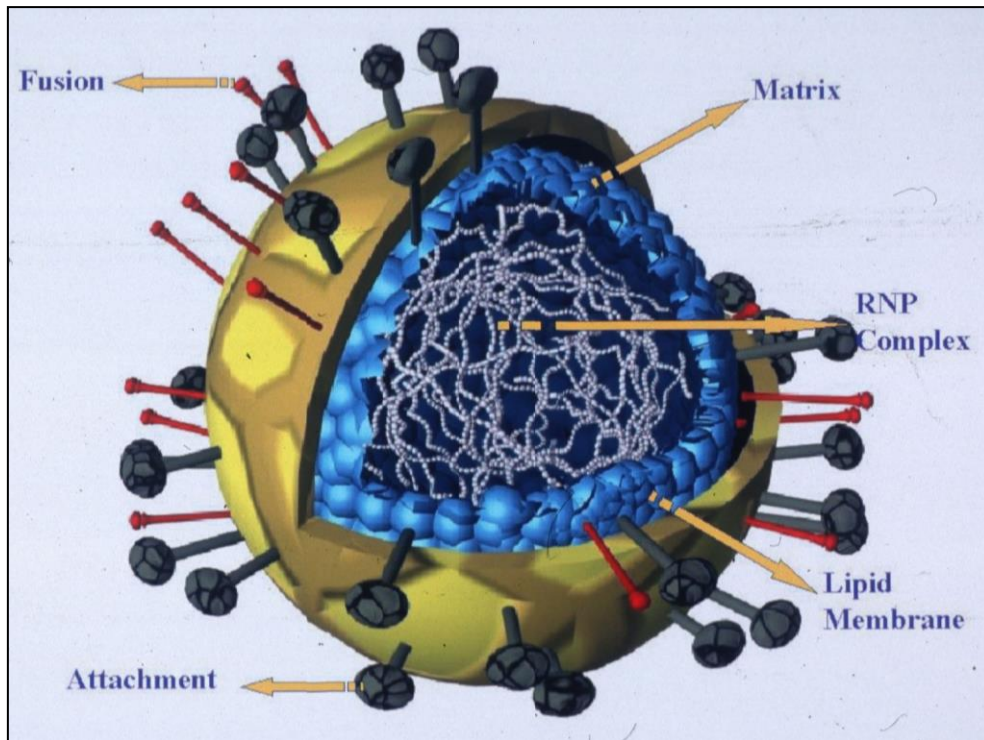
evaluar estos nuevos tratamientos[6]. Sin embargo, no hay vacunas comerciales a la fecha contra el VSR.

## 2.2. El virus

El virus pertenece a la familia *Paramyxoviridae*. Es un virus RNA negativo, no segmentado, de cadena simple, envuelto[7].

El virión consiste en una nucleocápside contenida dentro de una envoltura lipídica. Se puede visualizar a través de microscopía electrónica como partículas esféricas de 150 a 300 nm de diámetro. Contiene 10 genes que codifican para 11 proteínas dependiendo del marco de lectura[7].

El virión tiene una nucleocápside compuesta por la proteína de nucleocápside (N), la fosfoproteína (P), la polimerasa (L) y un factor de anti-terminación (M2-1). La envoltura consiste en una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática del huésped. Contiene tres proteínas transmembrana codificadas por el virus: la de anclaje (G), la de fusión (F) y la proteína hidrofóbica pequeña (SH). También hay una proteína de matriz (M), que se encuentra sobre la cara interna de la envoltura. Estas glicoproteínas virales están organizadas en proyecciones de la superficie de 11-20nm de longitud y cercanas entre sí (6-10nm de separación entre ellas). Por último, el virus contiene también dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) que son prescindibles para la viabilidad del virus tanto in vitro como in vivo. **(Figura 1)**



**Figura 1:** Estructura del virus sincicial respiratorio. Fuente: “*The Universal Virus Database* [8].

La proteína G es producida en dos formas: una forma transmembrana y una forma soluble. La forma secretada constituye alrededor de un 20% del total de proteína G sintetizada en las células infectadas por VSR in vitro, pero, debido a su rápida secreción, esto da cuenta de más del 80% de la proteína G liberada en cultivo celular a las 24 horas postinfección[9]. El ectodominio de la proteína G incluye dos segmentos similares a mucina, con secuencias aminoacídicas divergentes y una región corta, circunscripta, que está altamente conservada entre los subgrupos antigénicos A y B (GCRR). Esta región conservada incluye cuatro residuos de cisteína (posiciones 173,176,182 y 186) que forman un bucle (*noose* o *loop*) de cisteína sostenido por dos puentes disulfuro entre los aminoácidos de las posiciones 173 y 186 y los de las posiciones 176 y 182 [7, 10].

Originalmente, se presumía que la región conservada rica en cisteína jugaba un rol en la unión al receptor para la entrada del virus a la célula, pero datos posteriores demostraron que no es requerida para una eficiente infección *in vitro* en ratones. De todas maneras, el GCRR puede modular la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de la activación de TLR4 y la translocación de NF- $\kappa$ B[11].

La proteína F genera anticuerpos neutralizantes contra VSR (contra todos los serogrupos, a diferencia de la proteína G, que es grupo específica), presenta epitopes para linfocitos T citotóxicos en ratones y en humanos, y ha sido asociada con la producción aumentada de citoquinas de tipo Th1[7, 12, 13]. A su vez, la proteína F interactúa con el TLR4 de manera similar a como lo hace la endotoxina y estimula la producción de intermediarios del oxígeno y nitrógeno reactivos, la iniciación de la red de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, etc) y la expresión de moléculas coestimuladoras que relacionan la respuesta innata rápida con la inmunidad específica. Por lo tanto, la interacción de la proteína F con TLR4 desencadena la activación de efectores esenciales para la respuesta inmune[7, 12, 14].

Existen dos subgrupos de VSR distinguibles serológicamente: VSR-A y VSR-B. La variabilidad entre las cepas de VSR se debe principalmente a la proteína G, ya que G<sub>A</sub> y G<sub>B</sub> difieren en un 47% de la secuencia nucleotídica y en un 95% de la composición aminoacídica[7, 10].

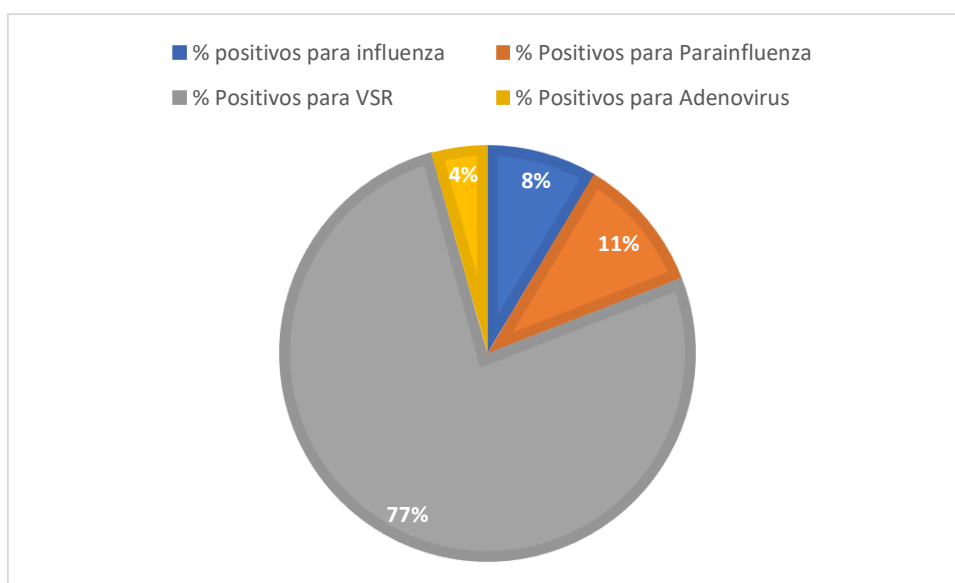
## 2.3. Epidemiología

El VSR es un virus que afecta sólo a humanos[15] y es la principal causa de hospitalización de índole respiratoria en lactantes y niños en todo el mundo[16, 17]. Durante el período pico de una epidemia se puede aislar el VSR en más del 70% de los niños pequeños ingresados en hospitales con patología aguda de vías respiratorias bajas (**Figura 2**). Infecta principalmente a niños que se encuentran en edades comprendidas entre las seis semanas y los nueve meses, causando bronquiolitis agudas y neumonía[18]. La infección primaria ocurre aun en presencia de anticuerpos maternos y las reinfecciones pueden ocurrir a lo largo de la vida, aunque con la edad disminuye la incidencia y la gravedad de los síntomas, no obstante, se han descrito infecciones serias en ancianos y pacientes inmunodeprimidos, principalmente pacientes con trasplante de médula[19-22]. Por otra parte, las infecciones graves con este virus constituyen un riesgo importante en niños prematuros y en niños con enfermedad crónica del pulmón o congénita del corazón[23].

La distribución del VSR es mundial y tiene un notable efecto estacional en las zonas templadas. Las epidemias se producen anualmente en los meses de invierno y comienzos de la primavera, pero nunca en verano. En las zonas tropicales o subtropicales las epidemias se producen durante los meses de lluvia[24-26]. La mitad de los niños se infecta con este virus en el primer año de vida, y para los dos años de edad casi todos los niños se han infectado y aproximadamente un 50% se ha infectado dos veces[26].



Las tasas de hospitalización por enfermedad causada por VSR van entre 1 a 20 cada 1000 niños infectados menores de 1 año, con un 9% de los pacientes con requerimiento de asistencia mecánica respiratoria. En cuanto a la tasa de mortalidad, las estimaciones varían entre el 0,3 al 1% de los niños hospitalizados, la cual es más alta en países en desarrollo, como así también entre los pacientes con enfermedades crónicas de base, llegando al 20-60% en los niños y adultos inmunocomprometidos[27-30].



**Figura 2:** Porcentaje de positividad según tipo de virus respiratorio en menores de 2 años. Argentina SE 1 a 50 n= 20602. (Datos extraídos del boletín integrado de vigilancia. SE 02 - 2018 Ministerio de Salud de la Nación).

## 2.4. Manifestaciones clínicas

Como se mencionó anteriormente este virus afecta especialmente a niños entre 6 semanas y 9 meses de edad, causando síntomas en el tracto respiratorio alto principalmente. De estas infecciones, entre el 25 y el 40% también afectan el tracto

respiratorio bajo, produciendo como principales manifestaciones clínicas la bronquiolitis y la neumonía[28]. Otros síntomas de una enfermedad leve son la tos, febrícula y posibles sibilancias[31]. En la mayoría de los casos la recuperación sucede en el curso de siete a doce días[16].

En los casos en que la enfermedad es grave, la tos y las sibilancias progresan; los niños comienzan con disnea, se evidencia la hiper-expansión del tórax con retracciones subcostales e intercostales. La taquipnea grave es común y en etapas avanzadas de la enfermedad donde la hipoxia es extrema, ocurre fallo respiratorio[32].

## **2.5. Respuesta inmune**

### **2.5.1. Respuesta inmune innata**

El ingreso del VSR al organismo acontece en el epitelio respiratorio, que es el sitio inicial de encuentro entre el virus y el huésped y que constituye la primera línea de defensa, ya que sirve como barrera física, pero que es atravesada normalmente por el virus. Como parte de dicha barrera se incluye al moco y al movimiento de los cilios que pueden ayudar a la eliminación viral de la superficie del epitelio evitando el establecimiento del foco infeccioso, aunque parece que en la mayoría de las veces el VSR puede resistir estas primeras líneas de defensa[33].

Como resultado de esta interacción inicial con el epitelio respiratorio, se induce en el sitio de infección una respuesta inmune innata temprana. Los componentes del

VSR son detectados por las células del sistema inmune innato a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRPs). Estos RRP reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs) que forman parte de patógenos, como por ejemplo el lipopolisacárido (LPS), un constituyente de la membrana externa de las bacterias gram (-) o el ARN doble cadena de los virus, entre otros. El reconocimiento de los PMAPs por parte de los RRP activa la fagocitosis. Además, la estimulación de ciertos receptores en macrófagos y células dendríticas puede producir su maduración y ocasionalmente inducir una respuesta de tipo adaptativo. Entre los componentes más destacados de RRP de la respuesta inmune innata se destacan los receptores Toll-símil (*Toll-like receptors*, TLRs)[34] (**tabla 1**).

La activación de los TLRs resulta en la activación de cascadas que producen señales pro-inflamatorias y es un importante nexo con la respuesta inmune adaptativa (**Tabla 1**). Se ha demostrado que diferentes tipos de TLRs están implicados en el reconocimiento del VSR, entre los que se destacan TLR3 y TLR4. TLR3 es uno de los más expresados constitutivamente en el epitelio respiratorio[35] y reconoce ARN de cadena doble. El mismo contribuye al reconocimiento del VSR, mediante la identificación de ARN viral generado durante la replicación del virus. Como consecuencia, la activación de NF-κB aumenta la expresión de interferones de tipo I y la producción de interleuquina 8 (IL-8/CXCL8)[36, 37].

Se observó también que el VSR induce una respuesta inflamatoria luego de la interacción de su proteína F con CD14 y TLR4 sobre la superficie de

macrófagos[38]. Cuando TLR4 interactúa con la proteína F unido a CD14, emite una señal al núcleo de la célula que activa NF-κB. Esto desencadena la producción de diversos mediadores de la inmunidad innata, como citoquinas y quimiocinas. Por último, se observó que el VSR interactúa con TLR2 y que éste estimula la migración de neutrófilos al pulmón. La presencia de neutrófilos en el pulmón se correlaciona con la gravedad de la enfermedad por VSR y más aún, estas células secretan mediadores inflamatorios incluyendo especies reactivas de oxígeno (EROs) y citoquinas (como IL-8) que conducen a la inflamación y matan indiscriminadamente células infectadas y no infectadas[39].

En la infección por VSR las células más importantes de la respuesta inmune innata son los neutrófilos y los macrófagos.

TLRs	Patógenos	Ligando	Consecuencia
TLR1/2/6	Bacterias	Lipoproteínas, Lipopéptidos, Liporabinomano, Ac. Lipoteicoico, Peptidoglicano, LPS atípico	Activación de NF-κB y Citoquinas proinflamatorias
TLR2/6	Hongos y Protozoos	Zimozan, Glicolípidos	Activación de NF-KB y Citoquinas proinflamatorias
TLR3	Virus	ARNdc	Activación de NF-KB, activación de IRF3/7, interferones de tipo 1, citoquinas proinflamatorias
TLR4 (más CD14 y MD- 2)	Bacterias	LPS	Activación de NF-KB y Citoquinas proinflamatorias
	Virus	Proteína F de VSR	Activación de NF-KB, activación de IRF3/7, interferones de tipo 1, citoquinas proinflamatorias
TLR5	Bacterias	Flagelina	Activación de NF-KB y Citoquinas proinflamatorias
TLR7/8	Virus	ARNsc	Activación de NF-KB, activación de IRF3/7, interferones de tipo 1, citoquinas proinflamatorias

TLR9	Bacterias	ADN CpG	Activación de NF-KB y Citoquinas proinflamatorias
	Virus		Activación de NF-KB, activación de IRF3/7, interferones de tipo 1, citoquinas proinflamatorias
TLR11	Bacterias	Proteína UPEC	Activación de NF-KB y Citoquinas proinflamatorias
	Hongos y Protozoos	Proteína Profilin-like	Activación de NF-KB y Citoquinas proinflamatorias

**Tabla 1:** Receptores Toll-símil, sus ligandos y consecuencias.

Neutrófilos: los neutrófilos son las células predominantes en la bronquiolitis por VSR[40]. En un estudio de niños infectados por VSR se demostró que estas células representan el 76% del total de células encontradas en el tracto respiratorio bajo. Éste, junto a otros estudios sugieren que los neutrófilos desempeñan un papel importante en los cambios patológicos que ocurren durante la bronquiolitis. Se ha observado que en la infección por VSR, la quimiotaxis es dependiente de la producción de IL-8 por parte de las células epiteliales y los macrófagos[41]. Por otra parte, se ha demostrado una asociación entre las concentraciones de IL-8 en nasofaringe y la gravedad de la bronquiolitis por VSR[42]. Otros estudios han encontrado niveles elevados de IL-8 en suero y lavados bronco-alveolares de pacientes ventilados con bronquiolitis por VSR[43, 44]. Un estudio muestra que cuanto más tiempo dura la infección, más aumenta el reclutamiento de neutrófilos en las vías aéreas. Por último, estudios *in vitro* muestran que el VSR puede dañar las células epiteliales respiratorias en una extensión limitada, pero que el daño es aumentado cuando están presentes los neutrófilos[41].

Macrófagos: estas células desempeñan un rol importante en el control de la respuesta inmune en las infecciones virales, no solamente porque interactúan con las células T colaboradoras y células T citotóxicas, sino también por la producción de citoquinas. Los macrófagos junto a las células del epitelio respiratorio son las primeras células en encontrar al VSR en las vías respiratorias[45], los cuales responden a la infección secretando citoquinas, principalmente IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  entre otras[46, 47].

Posteriormente, la activación del sistema inmune adaptativo depende de las moléculas inducidas como consecuencia del reconocimiento y señalización del sistema inmune innato. Las células presentadoras de antígeno (CPA) deben migrar hacia el nódulo linfático que drena para la zona de ingreso del antígeno para encontrar las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes y así poner en marcha la respuesta inmune adaptativa.

### **2.5.2. Células dendríticas**

Las células dendríticas convencionales (también llamadas mieloides) desempeñan un rol fundamental en varios aspectos de la inmunidad. Su función principal es la de presentar a los linfocitos T los antígenos, pero difiere de otras CPA porque son las únicas capaces de activar a los linfocitos T vírgenes. Pero no sólo los activan, sino que también van a orientar la respuesta inmune, ya que producen citoquinas y otros mediadores que actúan en las células T para promover su diferenciación en una célula efectora con diferentes perfiles: Th1, Th2, Th17 y Treg[33].

Existen 2 poblaciones de células dendríticas, denominadas inmaduras y maduras. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan por su extraordinaria capacidad de reconocimiento (a través de su colección de RRP), capacidad endocítica y de procesamiento de antígenos, por encontrarse en piel y mucosas y por su baja expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH I) y de clase II (CMH II) y coestimuladoras CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2)[33, 48]. Estas células dendríticas inmaduras una vez que reconocen un PMAP (o citoquinas y quimiocinas) se activan, produciéndose cambios fenotípicos que van a permitir la activación de los linfocitos T vírgenes. La maduración de las células dendríticas comienza con el reconocimiento del PMAP en el sitio de infección y termina en el ganglio linfático. Por su parte, las células dendríticas maduras se caracterizan por encontrarse en los órganos linfáticos secundarios, poseer una baja capacidad endocítica y de procesamiento de antígenos, poseer una alta expresión de moléculas coestimuladoras y del CMH I y CMH II que incrementan su capacidad de presentar antígenos y estimular a los linfocitos T. También aumentan la expresión de CCR7, que permite la migración de las células dendríticas desde la periferia hacia los ganglios, ya que su ligando (CCL19 y CCL21) es producido constitutivamente en estos últimos[33].

El VSR puede interactuar con TLR2 y TLR4 en la superficie de las células dendríticas y TLR3 en su interior (reconoce el ARN de doble cadena que el virus genera al replicar). Las señales desencadenadas por éste y otros patógenos harán que la célula dendrítica secrete citoquinas como IL-6, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  entre otras[36, 38, 39].

### **2.5.3. Respuesta inmune adaptativa**

#### 2.5.3.1. Introducción

Las células del sistema inmune adaptativo también se comunican con el ambiente a través de una variedad de receptores de membrana. La función principal de los linfocitos T y B es la de responder a antígenos. La unión del receptor de célula T (TCR) o B (BCR) al antígeno genera señales intracelulares que alteran el funcionamiento celular. Estos receptores tienen una extraordinaria capacidad de reconocimiento, permitiendo que cada individuo sea capaz de montar una respuesta inmune contra una enorme variedad de patógenos a lo largo de su vida[33]. La linfopoyesis ocurre en los órganos linfáticos primarios, es decir en la médula ósea para los linfocitos B y en el timo para la mayoría de las células T[49-51]. También la diversidad del repertorio del BCR o del TCR ocurre durante su ontogenia. Luego de atravesar una selección positiva y una selección negativa (mecanismos de control a fin de eliminar las células autorreactivas capaces reconocer lo propio como extraño y generar respuestas autoinmunes) los linfocitos terminan su maduración y salen a circulación hacia los tejidos linfoides periféricos[33, 52].

#### 2.5.3.2. Linfocitos T

##### **Activación**

La respuesta inmune adaptativa no se inicia en el tejido donde el patógeno establece su foco de infección, sino que ocurre en el órgano linfático secundario



que drena dicho sitio, por donde los linfocitos T recirculan permanentemente. El transporte del antígeno desde el sitio de infección al tejido linfoide para su presentación a las células T vírgenes (es decir linfocitos T maduros que no han encontrado a su antígeno específico), es un proceso activo a cargo del sistema inmune innato[33].

Dentro de los órganos linfáticos secundarios, estos linfocitos interactúan con las células dendríticas a fin de reconocer los péptidos antigénicos presentados por las moléculas del CMH[53]. Si estos linfocitos T vírgenes que se han extravasado a los órganos linfáticos secundarios no encuentran el antígeno, vuelven a circulación sanguínea[33]. En caso contrario, si el TCR encuentra su péptido antigénico, el linfocito T se va a activar. La activación requiere de 2 señales, una (señal 1) es provista por el reconocimiento del péptido antigénico presentado por una molécula del CMH y la segunda (señal 2) es transmitida (a través de CD28) por las moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) que son expresadas en las células dendríticas[33].

Las células T vírgenes para poder desempeñar correctamente su función (luego de reconocer su péptido antigénico específico) necesitan una expansión clonal que requiere la señal 2 (interacción entre CD80/CD86 y CD28) y su diferenciación a células T efectoras para una vez finalizado este proceso pasar nuevamente a circulación para migrar al sitio de infección[33, 54]. El reconocimiento del péptido antigénico no sólo induce a la célula a entrar en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, sino que induce la producción de IL-2 (por la propia célula T activada), la cual permite su proliferación y diferenciación. Luego de 4-5 días de rápida proliferación

inducida por IL-2, las células T activadas se diferencian en células T efectoras. Éstas sufren diferentes cambios que las distinguen de las células T vírgenes, siendo uno de los más relevantes la posibilidad de activarse sin la necesidad de reconocer moléculas coestimuladoras. Las células T CD4, se diferencian en distintos tipos de células T efectoras, con una variedad de funciones que varían desde la intervención en los sitios de infección para activar macrófagos o ayudar en el reclutamiento de células como eosinófilos y neutrófilos, también ejercen un rol crucial al proveer la ayuda necesaria para que los linfocitos B produzcan anticuerpos o para limitar la respuesta inmune[33].

### **Perfiles efectores de las células T CD4<sup>+</sup>**

En 1986, Mosmann y Coffman introdujeron el concepto de tipos distintos de células T, basados en los tipos de citoquinas que las células producen cuando son estimuladas para diferenciarse[55]. Llamaron a estas células, linfocitos T colaboradores de tipo 1 (Th1) y de tipo 2 (Th2). Éstas están caracterizadas por la producción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fundamental en la protección contra patógenos intracelulares y por la producción de interleuquina 4 (IL-4), implicada en la defensa contra las infecciones parasitarias respectivamente[55, 56]. Un tercer perfil de células T CD4<sup>+</sup> denominado Th17 fue descubierto posteriormente y se caracteriza principalmente por la producción de interleuquina 17A (IL-17), molécula que se destaca por su función de reclutar neutrófilos y en la protección contra bacterias y hongos[53, 56, 57] . A continuación, se describe brevemente las particularidades de cada perfil de células T colaboradoras.

1. **Células Th1:** El desarrollo de este perfil está inducido por la IL-12 e IFN- $\gamma$  (señal 3) durante los estadios tempranos de la activación de la célula T. El receptor de IL-12 señala a través de JAK/STAT y activa los factores de transcripción STAT1 y STAT4. Estos factores son importantes para el desarrollo del perfil Th1 y son activados por citoquinas producidas por el sistema inmune innato durante la infección. STAT1 induce la expresión de otro factor de transcripción llamado T-bet en las células T CD4<sup>+</sup> activadas, que induce la expresión de los genes de IFN- $\gamma$  y del receptor de IL-12. La IL-12 producida por las células dendríticas y los macrófagos puede entonces activar STAT4, la cual promueve la expansión y diferenciación de las células Th1. Las células efectoras Th1 generan cuantiosas cantidades de IFN- $\gamma$  cuando reconocen su antígeno. El IFN- $\gamma$  induce la activación de los macrófagos en un perfil inflamatorio y si bien otras citoquinas como IL-1 o IL-6 pueden activarlos, es el IFN- $\gamma$  la única citoquina capaz de activar los macrófagos con todo su potencial microbicida. Además, estimula la activación de células asesinas naturales (NK) y la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que favorece la inmunidad antiviral[33, 58].
2. **Células Th2:** El desarrollo del perfil Th2 está favorecido por la IL-4 (señal 3), la citoquina más potente en la inducción de los linfocitos T vírgenes en este perfil. La IL-4 activa STAT6 el cual promueve la expresión del factor de transcripción GATA3 en estas células. GATA3 activa genes de numerosas citoquinas típicamente producidas por el perfil Th2 como IL-4 e IL-13. GATA3 induce su propia expresión ayudando así a estabilizar la diferenciación hacia

Th2. Las células de este perfil se caracterizan por la producción de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-25 y poseen un papel fundamental en la inmunidad frente a parásitos extracelulares y el desarrollo de los procesos alérgicos. La IL-4 promueve el cambio de isotipo en las células B para generar IgE, mientras IL-5 induce el reclutamiento de eosinófilos produciendo eosinofilia. También mediante IL-4, IL-9 e IL-13 el perfil Th2 estimula la producción mucosa y la hiperreactividad bronquial[33, 58, 59].

3. **Células Th17:** La generación de células con perfil Th17 es resultado de la interacción entre TGF- $\beta$  y una citoquina inflamatoria. TGF- $\beta$  más IL-21, TGF- $\beta$  + IL-6 + IL-23 o IL-6 + IL-21 pueden inducir la expresión del perfil Th17[60, 61]. Así como T-bet y GATA3 son los factores de transcripción característicos de los perfiles Th1 y Th2, las células Th17 se caracterizan por expresar el factor de transcripción llamado ROR $\gamma$ -t. Este factor de transcripción actúa en cooperación con otros factores de transcripción que incluyen ROR- $\alpha$ , STAT3, IRF-4 y Runx1 para el desarrollo del linaje Th17[62-65]. El perfil Th17 se caracteriza por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 que participan de manera específica en determinadas respuestas inflamatorias[66] (**tabla 2**).

Citoquina	Principal fuente	Función
Interferón- $\gamma$	Células Th1, NK y NKT	Inmunidad mediada por células, control de patógenos intracelulares
IL-1	Monocitos	Citoquina pro-inflamatoria; inducción del perfil Th17
IL-4	Células Th2 y células NKT	Inmunidad mediada por anticuerpos; control de infecciones por parásitos.
IL-6	Monocitos	Inducción de proteínas de fase aguda; inducción de células Th17

IL-8	Monocitos	Quimiocina principal de neutrófilos
IL-12	Monocitos y células dendríticas	Inducción del perfil Th1
IL-17	Células Th17, NK y NKT	Citoquina pro-inflamatoria; control de patógenos extracelulares; inducción de la destrucción de la matriz
IL-18	Monocitos y células dendríticas	Inducción del perfil Th1
IL-21	Células Th17, NKT	Amplificación del perfil Th17
IL-22	Células Th17	Inducción de la proliferación de células epiteliales y de proteínas antimicrobianas en queratinocitos.
IL-23	Monocitos y células dendríticas	Expansión y estabilización del perfil Th17
IL-25	Células Th2	Inducción de citoquinas asociadas a Th2
TGF- $\beta$	Varias líneas celulares	Inducción de células T reguladoras en ausencia de IL-6; en presencia de IL-6, IL-21 e IL-1 inducción de perfil Th17
TNF	Monocitos y células dendríticas	Citoquina pro-inflamatoria

**Tabla 2:** Citoquinas, funciones y principales fuentes.

En la infección por VSR, el virus activa linfocitos T con la participación de las células dendríticas lo que resulta en la inducción y diferenciación de los linfocitos T en distintos perfiles de linfocitos T colaboradores (Th), en un número detectable en los pulmones a los 6-8 días post-infección[67, 68]. La evidencia científica sostiene un papel de las respuestas Th1, Th2 e inclusive para la respuesta de tipo Th17 en las infecciones por VSR[69-72].

Por un lado, algunos estudios demuestran que los linfocitos Th1 son inducidos durante la infección por VSR y que estos producen citoquinas pro-inflamatorias como el INF- $\gamma$  que junto a los LT CD8 producen efectivamente el aclaramiento viral en la mayoría de los individuos[69].

Por otra parte, dado que la patología pulmonar inducida por el VSR comparte algunas características con el asma (como hiper-respuesta de las vías aéreas o la producción de moco) y esta enfermedad está asociada a respuestas de tipo Th2, se ha implicado a las respuestas de este tipo (Th2) como contribuyentes a la patogénesis de la enfermedad asociada con la infección grave por VSR, sobre todo en niños pequeños. Esta teoría está sostenida por estudios que muestran una tendencia en los niños menores de un año a producir respuestas de tipo Th2 por una señalización insuficiente de las células dendríticas que producirían menos IL-12, lo cual es importante en la inducción del perfil Th1[70].

#### 2.5.3.3. Linfocitos B y respuesta inmune humoral

Las células B se activan y diferencian a células productoras de anticuerpos y de memoria por el reconocimiento del antígeno y usualmente requiere la cooperación de las células T colaboradoras, las cuales van a proporcionar su ayuda para la activación de la célula B, así como también en el proceso de hipermutación somática y cambio de isotipo [33, 73].

Los anticuerpos van a contribuir a la inmunidad de diferentes maneras. Por ejemplo, para entrar a las células, el virus necesita unirse a moléculas específicas sobre la superficie de la célula blanco. Los anticuerpos que se unen al patógeno

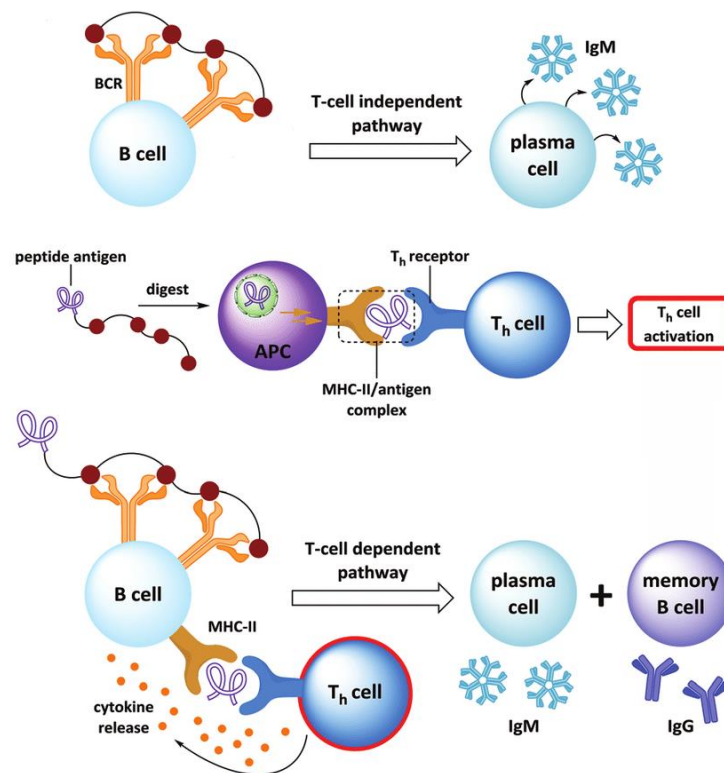
y bloquean esta interacción, se denominan anticuerpos neutralizantes. Otro de los mecanismos utilizados por los anticuerpos es la opsonización, en el cual recubren al patógeno, lo que favorece su fagocitosis. Luego de unido al patógeno, los anticuerpos también pueden activar el sistema del complemento, colaborando en la resolución de la infección[33, 74].

Las respuestas de anticuerpo a antígenos proteínicos requieren la ayuda de las células T colaboradoras. La célula B puede recibir estas señales adicionales cuando el antígeno unido por la inmunoglobulina de superficie es internalizado y luego es presentado en la superficie celular como péptido unido a moléculas del CMH de clase II. Entonces, los antígenos proteicos unidos a la célula B desencadenan una señalización específica mediante el entrecruzamiento del receptor antigénico (BCR) y le permite a la célula B atraer a las células T específicas que le otorgarán apoyo para una completa diferenciación y maduración. Estos antígenos son los conocidos como T-dependientes ya que son incapaces de desencadenar una respuesta inmune en ausencia de estas células **(figura 3)**[33].

Por otra parte, también hay antígenos T-independientes, es decir que son capaces de generar una respuesta de anticuerpos en ausencia de células T **(figura 3)**[33, 73].

Es de destacar que las células B también expresan ciertos receptores TLR que, cuando se unen a sus ligandos, desencadenan cascadas de señalización que sirven para amplificar la respuesta inmune humoral. Es así como moléculas

reconocidas por el sistema inmune innato también colaboran en la respuesta inmune adaptativa[75].



**Figura 3:** Activación T dependiente e independiente del linfocito B[76].

Las células B al igual que las T, recirculan permanentemente a través de los órganos linfoides secundarios hasta encontrar su antígeno. En el caso de la célula B, entra al nódulo linfático y atraviesa la zona T donde puede realizar una sinapsis inmunológica con linfocitos T específicos para el mismo antígeno. Tras este contacto los linfocitos B que reciben cooperación T pueden:

- Convertirse en células plasmáticas de vida media corta llamados plasmablastos que secretan IgM en los denominados focos primarios.



- Moverse a los folículos primarios del ganglio y formar un centro germinal, el cual está compuesto básicamente por células en proliferación. La reacción del centro germinal provee de una respuesta tardía, más efectiva por si el individuo se re-infecta. Para esto la célula B atraviesa modificaciones que se llevan a cabo en el centro germinal, incluyendo el proceso de hipermutación somática, que altera las regiones V de los genes de inmunoglobulinas; la maduración de afinidad, que selecciona a las células B con mayor afinidad por el antígeno y el cambio de clase, que permite que los clones B seleccionados expresen una variedad de funciones efectoras en la formación de anticuerpos de diferentes isotipos. Las células B que resulten seleccionadas se diferenciarán en células de memoria o plasmáticas, que comenzarán a secretar grandes cantidades de anticuerpos de alta afinidad y con otro isotipo durante la fase tardía de la respuesta inmune humoral primaria[33, 73, 77-79].

La infección con VSR provoca la producción de anticuerpos inclusive en los niños más pequeños, aunque los títulos de anticuerpos producidos por los niños son bajos si se los compara con los de los adultos[80]. Se ha demostrado que durante la infección primaria los anticuerpos IgM se encuentran presentes en suero a los 5-7 días del momento de la infección. Los anticuerpos IgG aparecen en la segunda semana con un pico a las 4 semanas post-infección y disminuyen luego de 1 a 2 meses. En cuanto a la respuesta de IgA en niños es muy variable y puede no ocurrir[81]. Por su parte, el posible rol de la IgE en la bronquiolitis por VSR y el subsiguiente desarrollo de sibilancias es todavía un tema de debate. Welliver *et*

*al.* encontraron IgE específicas para VSR en las secreciones de los niños durante la fase de recuperación en la bronquiolitis por VSR. Sin embargo, también se encontró altos niveles de IgE (y correlacionada con el grado de hipoxia) en niños con bronquiolitis grave[80]. Por último, otros estudios no han detectado IgE específicas para VSR tanto en muestras provenientes de niños en la etapa aguda como durante la convalecencia[82].

#### **2.5.4. Determinantes antigénicos**

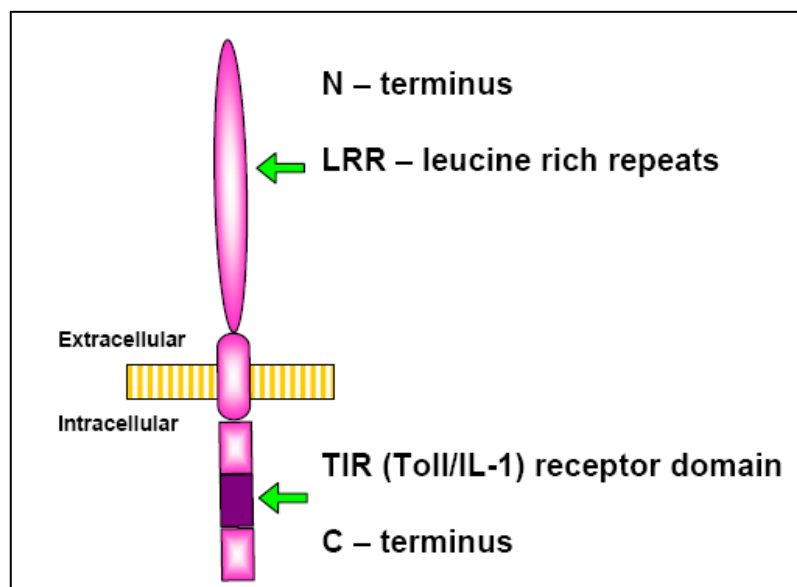
Las proteínas G y F son los principales antígenos del VSR y son capaces de producir una respuesta inmune protectora[16]. La inmunización con estas proteínas con vectores recombinantes que codifican para F & G, confieren protección al tracto respiratorio inferior mediante anticuerpos neutralizantes[33]. Los seres humanos desarrollan anticuerpos contra la mayoría de las proteínas de VSR; sin embargo, sólo F & G estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes[16]. La proteína F es el principal antígeno neutralizante, y genera anticuerpos protectores a través de epítopes que se encuentran en su subunidad F1[83]. Por su parte, la proteína G es un antígeno sub-neutralizante y aunque genera anticuerpos protectores, modula de forma negativa la activación de TLR4[11]. A pesar que las secuencias de la proteína G son altamente variables, la modulación de TLR4 es ejercida a través de una región altamente conservada y rica en cisteínas; por lo tanto, aunque la presión selectiva ejercida por el sistema inmune sobre G y F es importante, la conservación de sus interacciones con TLR4

indica que ambas son de suma relevancia tanto para el huésped como para el patógeno[84].

## 2.6. Complejo Receptor TLR4-CD14

### 2.6.1 Receptor de Tipo Toll 4

Los receptores Toll fueron descritos en humanos en 1998[85]. Constituyen una familia de receptores celulares que inician una señal intracelular en respuesta a una amplia gama de “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs) seguido del reclutamiento de adaptadores. Son proteínas transmembrana tipo I que contienen un dominio extracelular rico en leucina (LRR) y un dominio intracelular que tiene similitudes con el dominio intracitoplasmático del receptor de IL-1[86-88]. **(Figura 4)**

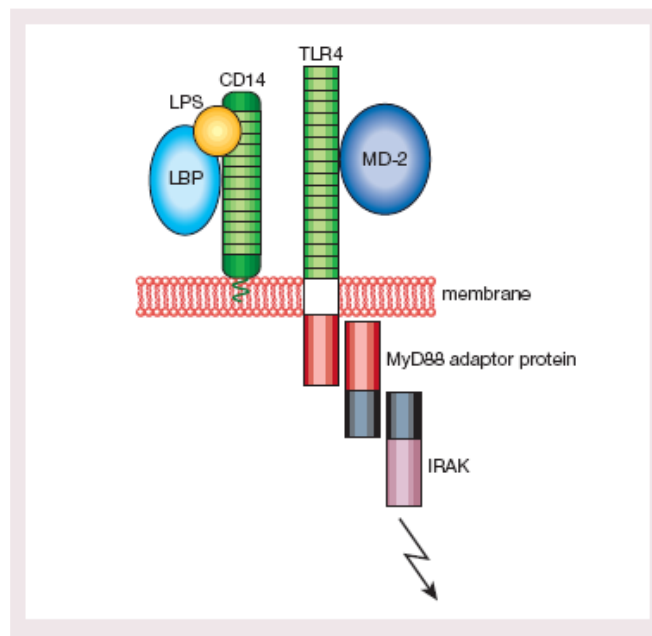


**Figura 4:** Estructura de los receptores Toll-like. Fuente: Sandor y Buc [88]

Toll 4 reconoce estructuras diversas y no relacionadas[89-91] entre las que se destacan el lipopolisacárido (LPS) de las bacteria Gram negativas (también conocido como endotoxina) y la proteína F del VSR[92, 93].

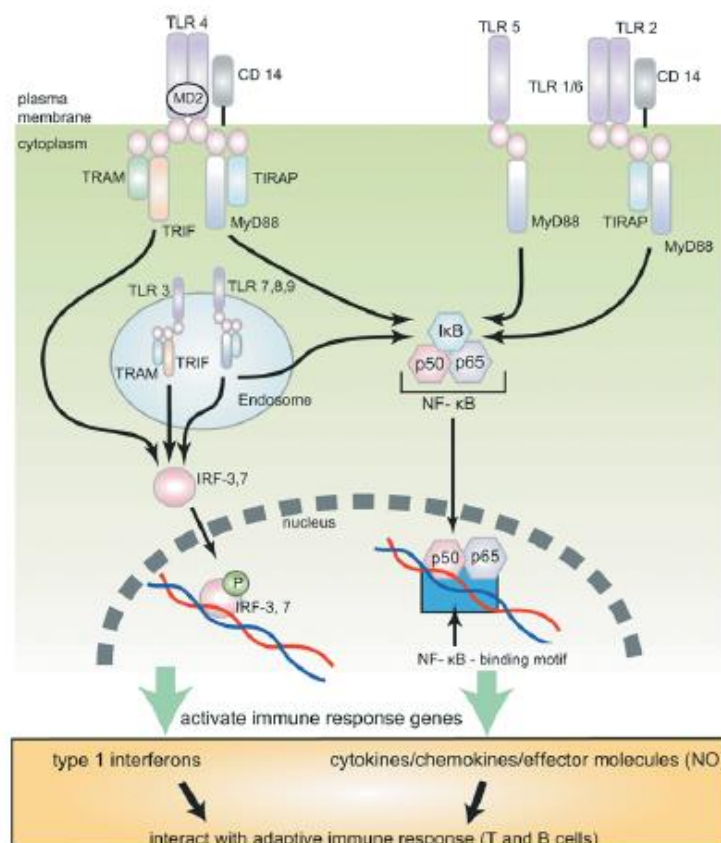
TLR4 funciona usualmente como monómero, pero puede hacerlo también como dímero. Está codificado en el brazo largo del cromosoma 9. Se encuentra en monocitos, células dendríticas inmaduras, células endoteliales, adipocitos, miocitos cardíacos, células epiteliales intestinales y células epiteliales de la vía aérea[85-88].

Para una óptima respuesta a LPS mediada por TLR4 se necesita la unión al dominio extracelular de TLR4 de la proteína secretoria MD2 y la funcionalidad del correceptor CD14 (soluble o como glicoproteína de membrana). El complejo formado por CD14-LPS interactuaría con TLR4/MD2 de la superficie celular para iniciar la señalización[86-88, 94]. **(Figura 5)**



**Figura 5:** Estructura del complejo TLR4-CD14. Fuente: Buc y col. [88]

La unión con el ligando resulta en el reclutamiento de varias moléculas al complejo receptor. Esto es seguido por una compleja cascada de eventos que permite la translocación al núcleo de factores como NF- $\kappa$ B. Este último es un regulador clave de la transcripción de una variedad de genes proinflamatorios como, por ejemplo, TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 [86, 95-97].(Figura 6)



**Figura 6:** Esquema de la señalización de los Receptores Toll- Like en humanos Fuente: Misch EA y Hawn TR[95]

## **2.6.2 Polimorfismos de nucleótido simple de TLR4**

La susceptibilidad a la mayoría de las infecciones sigue un modo de herencia poligénica en el que la enfermedad resulta de un intrincado interjuego entre el ambiente y los factores genéticos. Gracias a los avances en las técnicas de genotipificación y la bioinformática, el entendimiento de enfermedades con patrones de herencia complejos se está tornando posible. Aunque los seres humanos somos idénticos en la mayoría de los tres billones de pares de bases de nuestro genoma, la variación interindividual está presente en aproximadamente tres millones de nucleótidos (0,1% del genoma). Un tipo común de variación es el polimorfismo de nucleótido simple (SNP), en el cual una de dos bases alternativas ocurre con una determinada frecuencia en la población[98-100].

Dos mutaciones polimórficas puntuales en los nucleótidos A896G y C1196T en el ADN humano han sido enfatizadas hasta el momento. Estas codifican cambios en los aminoácidos Asp299Gly y Thr399Ile dentro del dominio extracelular de TLR4. Estos polimorfismos son referidos en la literatura con la denominación de D299G y T399I, respectivamente. Ambas mutaciones están codificadas en el cuarto exón del gen TLR4 y se ha postulado que afectarían la región de unión al ligando y la unión al correceptor de la molécula, respectivamente. Hay estudios que sugieren, además, que las mutaciones extracelulares de TLR4 pueden afectar su expresión, su transporte a membrana o su detección[101].

Dado el papel de TLR4 dentro del sistema inmune innato, numerosos estudios funcionales han examinado el significado de los SNPs de este gen en relación con las enfermedades infecciosas[91, 93, 95, 102-116]. D299G fue asociado con

hiporrespuestas a LPS cuando es medido el broncoespasmo, problemas al mediar la señalización por LPS *in vitro* en algunos tipos celulares (incluyendo las células epiteliales de la vía aérea) [101], hiporrespuesta inflamatoria sistémica luego de la inhalación de LPS (incluyendo respuestas medidas de proteína ligadora de LPS en plasma, proteína C reactiva y conteo de leucocitos)[108] y con secreción alterada de IL- 12 p70 por las células mononucleares de sangre estimuladas por LPS[117]. Contrariamente, otros estudios no hallaron defectos en la señalización en individuos heterocigotos para D299G cuando se estimula sangre entera o células mononucleares con LPS[118-121]. Estos resultados contradictorios pueden ser explicados por diferentes condiciones de estimulación, el uso de muestras de tamaño pequeño, la comparación entre distintos tipos celulares, el uso de diferentes dosis y tipos de endotoxina y la medición de diferentes marcadores de inflamación.

Por otro lado, estudios genéticos han examinado la asociación entre los SNPs de TLR4 y la susceptibilidad a infecciones bacterianas o a sepsis[91, 102, 105, 106, 122]. La mayoría de estos estudios han demostrado que la presencia de estos dos polimorfismos confiere un incremento del riesgo para algunas infecciones. No obstante, este hallazgo no es universal. La presencia de D299G y T399I también se ha asociado con resistencia a la enfermedad pulmonar causada por *Legionella pneumophila* (bacteria flagelada Gram negativa cuya endotoxina tiene una estructura inusual)[123].

Datos sugieren que TLR4 no solamente juega un rol en el reconocimiento de patógenos y en la iniciación de la respuesta inmune, sino que también tiene un

papel fundamental en la patogenia de enfermedades no infecciosas[92, 95, 122, 124-126]. Existe evidencia para apoyar un rol para TLR4 en la patogenia de la enfermedad pulmonar por VSR [14, 38, 127, 128].

## **2.7 Severidad y TLR4**

Se estima que entre el 30% y el 70% de los lactantes desarrollan bronquiolitis ante la primera Infección por VSR, solo 1% - 3% de estos requieren hospitalización. Incluso aunque se han identificado factores de riesgo para la hospitalización, el mecanismo de la bronquiolitis severa por VSR no se conoce del todo[129].

Tres hipótesis han sido ampliamente aceptadas como probables explicaciones para la gravedad de la enfermedad [130] . La primera atribuye la severidad de la bronquiolitis al daño producido, por el VSR, a las vías respiratorias y es respaldada por estudios en los que dosis más altas de candidato intranasal de virus en vacunas aumentan los síntomas en los pacientes receptores de estas[131]. La segunda hipótesis postula que la severidad es una consecuencia de la inflamación[132] y la explicación final atribuye la bronquiolitis grave por VSR a una polarización CD4<sup>+</sup> Th2 de la respuesta inmune en el tracto respiratorio[133] y es respaldada por la semejanza de los síntomas de la bronquiolitis y el asma, los altos niveles de citoquinas Th2 en infantes severamente enfermos, y estudios de asociación genética con genes Th2[129, 134-136].



Aunque uno o más mecanismos de patogenia puedan independientemente afectar la severidad de la enfermedad por VSR, la activación de TLR4 puede integrar estas respuestas en algún nivel. En otras palabras, los SNPs de TLR4 pueden alterar el control de la replicación viral promoviendo el daño viral directo y coincidentemente disminuir la producción de IFN- $\gamma$  promover una polarización Th2 de la respuesta inmune. Más aún, la replicación persistente (y la consecuente permanencia de la estimulación antigénica) ha sido asociada con la polarización Th2 en otros modelos[12]. Todos estos mecanismos postulados de enfermedad pueden estar en un juego interrelacionado resultando en una enfermedad por VSR suficientemente severa como para requerir hospitalización y oxigenoterapia.

Por otro lado, y tal como está descrito para CD14 en su relación con el asma[8, 137-140], y como lo sugieren los resultados en direcciones opuestas de los estudios, los factores ambientales, y en el caso particular de este receptor la exposición a endotoxina del ambiente, podrían tener un impacto importante en el desarrollo de enfermedad y en el significado patogénico de los distintos polimorfismos. A la vez, estudios recientes que buscan identificar genes relevantes en la susceptibilidad contra el VSR también señalan al TLR4 como un gen de importancia en la enfermedad y remarcan la importancia de estudiar la relación entre esta y la diversidad genotípica humana[141].

## **2.8. Vacuna FIRSV y enfermedad pulmonar aumentada**

Una de las contribuciones más importantes a la salud pública en los últimos 100 años fue la vacunación, que disminuyó notoriamente las muertes por enfermedades infecciosas. El objetivo de la vacunación es generar inmunidad protectora de larga duración.

El primer intento de una vacuna contra el VSR fue la vacuna FIRSV, la cual fue desarrollada en 1961 en Estados Unidos. El VSR fue inactivado por formaldehído y adsorbido con hidróxido de aluminio. La vacuna se administró en 1966 a niños y lactantes seronegativos y seropositivos para VSR[5, 142-144]. Durante el invierno de 1966-1967 los niños inmunizados estuvieron expuestos al VSR circulante en la comunidad y aquellos que eran seronegativos para el virus antes de la vacunación experimentaron un significativo aumento en la frecuencia y gravedad de la enfermedad del tracto respiratorio bajo, presentando bronconeumonía, broncoconstricción y mayor producción de moco. Además, aumentó significativamente la incidencia de hospitalización en comparación con el grupo control, siendo del 80% para aquellos individuos que recibieron la vacuna FIRSV contra el 5% de los niños del grupo control[5, 142-144]. Más aún, dos de los niños vacunados murieron como consecuencia de la infección subsiguiente por VSR[5].

La primera evaluación de la patogénesis EPA mostró una mayor producción de interleucina 4 (IL-4) en pulmones de ratones BALB/c afectados mediante el uso de análisis Northern Blot [13]. La depleción posterior de linfocitos T CD4 junto a la

codepleción de IL-4 e IL-10 modularon la patología pulmonar de la EPA, lo que sugiere que la enfermedad se debió a una respuesta de Th2 exacerbada [145]. Estudios más recientes en ratones BALB/c confirmaron un papel crítico para el sesgo Th2 (pero no para los eosinófilos) en la hiperreactividad de las vías respiratorias y la hipersecreción de moco[13]. El formaldehído, utilizado para la inactivación de virus en FIRSV, puede haber contribuido a la polarización Th2 durante la EPA generando grupos carbonilo en los antígenos virales [146].

Otro elemento crítico en la patogenia de la EPA es la incapacidad para provocar linfocitos T citotóxicos (CTL) en sujetos inmunizados con FIRSV. La ausencia de una respuesta CTL durante la inmunización se asocia con la replicación del virus en los pulmones y con la polarización Th2 durante la infección por VSR, corregir este déficit condujo a respuestas Th1 protectoras, abrogando el fenotipo patógeno [133, 147].

Por último, FIRSV provocó la producción de anticuerpos que no protegieron contra la infección por VSR[5]. Esta respuesta es el resultado de una falta de maduración de afinidad en las células B y su baja avidéz es consecuencia de una activación deficiente de los TLR durante la inmunización. Esto, tras la infección por el VSR, desencadena la formación de complejo inmune y la activación de complemento, potenciando la broncoconstricción mediada por Th2, neumonía y producción de moco [148, 149]. Estudios murinos demostraron que la estimulación de TLR4 a la vez que se vacunaba a los animales con el agonista del receptor, el liposacarido (LPS), promovía la maduración de la afinidad contra la proteína F del VSR y el desarrollo de anticuerpos protectores contra el virus[149].

En resumen, la ausencia de CTL y anticuerpos no protectores permite la replicación de VSR después del desafío y, en el contexto de linfocitos T CD4 sensibilizados, sienta las bases para una respuesta aberrante que resulta en EPA[6]. La EPA impidió el desarrollo de tratamientos contra el VSR durante mucho tiempo. Sin embargo, el estudio de su mecanismo y fenotipo logro revivir los intentos de desarrollar nuevas técnicas.

Trabajos previos han encontrado que los receptores de tipo Toll, en especial el TLR4, tienen un papel importante en el desarrollo tanto de la severidad de la bronquiolitis producida por el VSR como en la respuesta patológica a la vacuna FIRSV que produce la EPA [6, 38, 129, 141, 150]. En la actualidad hay un aumento significativo de estudios de asociación genética que buscan entender el rol de la variabilidad genética en la respuesta ante agentes patógenos, con el fin de desarrollar tratamientos más seguros, personalizados y eficientes[129, 141, 151].

### **III. OBJETIVOS**

A pesar de que la enfermedad respiratoria por VSR es una causa importante de morbilidad entre los lactantes de todo el mundo, aún no se conocen los mecanismos de protección y patogenia implicados en la severidad de la misma. Uno de los mecanismos que podría determinar severidad durante la infección por este virus es la respuesta inmune, del cual forma parte el receptor Toll 4.

El objetivo general de este trabajo está dirigido a:

**Caracterizar la respuesta inmune humoral frente al virus del VSR de una muestra poblacional con diferentes genotipos en el gen codificante para TLR4 para determinar el papel del genotipo en la respuesta.**

Para lograr este objetivo general se proponen los siguientes objetivos particulares:

1. Determinar la presencia y calcular el título de punto final en ensayos de adhesión de los anticuerpos en los sueros a caracterizar.
2. Cuantificar el título neutralizante de dichos anticuerpos.
3. Determinar el papel del genotipo en el título de punto final de los anticuerpos.
4. Determinar el papel del genotipo en el potencial neutralizante de los anticuerpos.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **4. Metodología General**

### **4.1. Medios de cultivo**

OptiMEM (Gibco): Con suero fetal bovino; antibióticos, penicilina 100U/ml; estreptomycin 100µg/ml; L-glutamina 2mM; piruvato de sodio 1mM; aminoácidos no esenciales 0,1mM; Hepes 10mM y bicarbonato de sodio 23mM.

### **4.2 Cultivo celular**

Se utilizaron células Vero (ATCC CCL-81), línea celular continua proveniente de riñón de mono verde africano adulto *Cercopithecus aethiops*. Éstas fueron crecidas en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) (GIBCO) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), inactivado 30 minutos a 56 °C y con una mezcla de antibiótico y antimicótico que contenía anfotericina B- estreptomycin- penicilina (GIBCO). El medio MEM fue suplementado con HEPES 20 mM (GIBCO) y se llevó a pH 7,2 con bicarbonato de sodio 7,5% (GIBCO). Para el medio de mantenimiento (MM) la concentración de suero se redujo a 2%. Las células se crecieron en estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.3. Preparación de los inóculos del virus**

El VSR se creció sobre monocapa de células Vero en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. La infección de la monocapa se realizó colocando 0,1- 0,05 unidades formadoras de placas (ufp)/1 célula en mínimo volumen de medio de cultivo OptiMEM y se dejó actuar (infectar) al virus durante 1 hora en rotación. Al finalizar esa incubación se completó con medio de cultivo hasta llegar al nivel adecuado del frasco y se incubó por 4-5 días a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Luego se rescató el virus



del sobrenadante y del interior de las células mediante lisis por calentamiento/congelación. Se centrifugó a 1400 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos para eliminar los restos celulares y se conservó a -80°C hasta su titulación y uso[152].

#### **4.4. Titulación viral (técnica de inmuno-tinción)**

La titulación viral se realizó sobre una monocapa de células Vero en placas de 24 pocillos. Se utilizaron placas con células con un 70-80% de confluencia. Se retiró el medio de crecimiento de las células de la placa y se colocaron 0,2 ml de cada dilución del virus a titular por pocillo por duplicado. Posteriormente, se incubó durante 60 minutos a 37°C rotando cada 5 min. Luego de la infección se cubrió con 1ml/pocillo de metilcelulosa 0,8% (Sigma) preparada en medio OptiMEM y se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> por 4-5 días.

Transcurridos los días de incubación se retiró la capa de metilcelulosa y se colocó 1ml por pocillo de la mezcla 1:1 Acetona:Metanol para fijar la placa y se incubó por 60 minutos a 4°C. Luego se retiró el fijador, se lavó con PBS y se incubó por 60 min. a 37°C con un anticuerpo anti-VSR en una dilución 1/4000 (US Biologicals) en PBS + 5% de leche descremada. Luego de la incubación, se lavó 2 veces con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti-Ig (KLP) de ratón marcado con HRP (dilución 1/1000 en PBS + leche 5%). El revelado se realizó con el sustrato diaminobencidina (DAB, Sigma). Se utilizó 0,2 ml/pocillo, tanto de los anticuerpos como del sustrato. La reacción se detuvo agregando 1 ml/pocillo de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, se retiró, se dejó secar y se contó las placas. Se calculó el promedio de placas/pocillo

de los duplicados y se multiplicó por los factores de dilución empleados para conocer el título viral de la muestra utilizada[149].

#### **4.5. Extracción de ADN a partir de sueros humanos mediante columnas magnéticas**

Para el genotipado mediante RT-PCR en tiempo real, primero se procedió a la extracción del ADN total a partir de muestras de suero humano de pacientes reclutados por la Fundación INFANT.

Para ello, se utilizó el equipo comercial DNA Minikit (QIAGEN) y se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante. En primer lugar, se descongelaron las muestras (con un volumen aproximado de 800 µl) a temperatura ambiente y se le agregó, a cada una, buffer RLT. Se mezclaron por pipeteo y vórtex varias veces, para lograr la disrupción celular. La mezcla obtenida fue transferida a columnas QIAshredder (QIAGEN), que estaban ubicadas dentro de un tubo de recolección de 2 ml y se procedió a centrifugar a 16100 x g durante 2 minutos a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5415 R). Seguidamente, se agregó un volumen de etanol 70% a la muestra resultante en el tubo de recolección y se mezcló vigorosamente por pipeteo. Se transfirieron 700 µl de esta mezcla a las columnas del equipo comercial, ubicadas dentro de un tubo de recolección de 2 ml, se centrifugó durante 15 seg a 16100 x g y finalmente se descartó el líquido del tubo de recolección. Posteriormente, el filtro de la columna se lavó una vez con buffer RW1 (15 seg a 8000 x g) y dos veces con buffer RPE (durante 15 seg y 2 minutos a 8000 x g, respectivamente). Se pasó la columna a un nuevo tubo de 2 ml y se centrifugó durante 1 minutos a 16100 x g. Luego, se ubicó la columna dentro de

un nuevo tubo de recolección de 1,5 ml y se agregó agua libre de ADNasas. Consecutivamente, se centrifugó a 8000 x g durante 1 minutos para eluir el ADN y se descartó la columna. Finalmente, se cuantificó el ADN total obtenido en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260 nm. Las muestras de ADN obtenidas se guardaron a -80°C.

#### **4.6. Genotipificación**

La mutación TLR4 Asp299Gly fue evaluada por discriminación alélica con ensayos preoptimizados de Invitrogen.

Los sitios polimórficos de TLR4 se amplificaron a partir de 10 ng de ADN genómico, 12.5 µl TaqMan Genotyping Master Mix, y 1.25 µl de un mix de ensayo preoptimizado x 20 que contiene C\_11722238 (Asp299Gly, rs4986790). Cada mezcla x 20 consistió en 18 µM de cebadores directos e inversos y 8 µM de cada sonda marcada con fluorescencia específica al alelo. Se utilizaron condiciones de ciclo de PCR estándar, con desnaturalización inicial a 95 ° C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos a 92 ° C durante 15 segundos y 60 ° C durante 1 minuto.

Los productos de PCR específicos del alelo se detectaron en un sistema de PCR tiempo real StepOnePlus (Invitrogen) y agrupados por genotipo usando el software de detección de secuencia StepOnePlus. Las muestras ambiguas se descartaron.

#### **4.7. Caracterización de los antisueros por ensayo de ELISA**

Para caracterizar la reactividad frente a VSR de los sueros obtenidos, se llevó a cabo el Ensayo por Inmunoadsorción ligado a Enzima (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA). Para ello, primeramente, se realizaron diluciones de preparaciones de VSR en buffer carbonato (carbonato de sodio 0,1 M; pH 9,5) de forma tal de obtener una suspensión viral conteniendo  $10^5$  UFP/ml. Luego, se agregaron 100  $\mu$ l de la suspensión viral ( $10^4$  UFP) por pocillo en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano (poliestireno) y se incubó la microplaca durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se descartó el sobrenadante de la microplaca por volcado y se lavó con buffer fosfato salino (PBS) el cual contenía 0,1% de Tween-20 (PBS-T) y seguidamente se bloqueó con PBS-T que contenía 5% de leche descremada (100  $\mu$ l por pocillo) durante 1 hora a 37°C. Luego de la incubación, se descartó la solución de bloqueo, se lavó con PBS-T y se agregaron diluciones seriadas de los sueros humanos (1/20, 1/80, 1/320, 1/1280 y 1/5120) preparadas en PBS-T con 5% de leche descremada. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se descartaron las diluciones de los antisueros de la microplaca, se lavó con PBS-T y se agregó una dilución 1/2000 del anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-humano conjugado con peroxidasa) preparada en PBS-T con 5% de leche descremada (100  $\mu$ l por pocillo). Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se descartó el anticuerpo secundario, se lavó con PBS-T y se agregaron 75  $\mu$ l por pocillo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Se dejó reaccionar 10-15 minutos en oscuridad y una vez detectado el cambio de color se agregó una solución de ácido sulfúrico 1 M para detener la reacción y se colocó la microplaca en un lector de ELISA para

medir la densidad óptica (D.O.) a 450 nm. Los valores de D.O. resultantes se graficaron en función de la dilución de antisuero. Las curvas de ajuste óptimo se calcularon mediante regresión no lineal a una función sigmoidea usando GraphPad Prism. El título del punto final se definió como el recíproco de la mayor dilución de sueros que tenía una lectura por encima del valor de corte, definido como el doble de la señal medida en los controles (*background*).

#### **4.8. Determinación del título neutralizante de los anticuerpos presentes en los sueros.**

Para determinar el título neutralizante de los anticuerpos de los sueros anti-VSR se realizó un ensayo de neutralización.

Primeramente, se inactivó una alícuota de los sueros durante 30 minutos a 56°C. Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas 1:4 de los sueros desde 1/20 hasta 1/5120 en medio de mantenimiento y éstas se colocaron en una microplaca de 96 pocillos. Las diluciones de los sueros inactivados se mezclaron separadamente con una dilución de una suspensión de VSR, de forma tal que la mezcla contuviera 100 UFP/pocillo. Se incubó la microplaca durante 1 hora a 37°C para producir la neutralización de las partículas de VSR por los anticuerpos presentes en los sueros inmunes. Finalmente, se tituló la infectividad viral remanente en las mezclas por ensayo de formación placas de lisis en células Vero. Se calculó el título del suero como la inversa de la dilución del suero que produce un 50% y un 80% de inhibición en la infectividad remanente (del inglés *Plaque Reduction Neutralization Titer*, PRNT50, PRNT80).

#### **4.9. Análisis estadístico**

Se utilizó un gráfico de comparación de cuantiles y un test de normalidad Shapiro-Wilk para el análisis de la distribución de los datos. Para la descripción de métodos estadísticos se consultó la página web del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de los Estados Unidos. El gráfico expresa la media y la desviación estándar del conjunto de datos y representa sus cuantiles frente a los cuantiles de la distribución estándar teórica con la misma media y desviación. Si la distribución es normal, los datos se alinearán cerca de la diagonal del gráfico. Cuanto más se alejen, menos probable es que los datos sigan una distribución normal. El test plantea como hipótesis nula que la distribución de los datos es normal y se rechaza dicha hipótesis con una probabilidad ( $P_{>z}$ ) menor a 0,05.

Luego, se utilizó el análisis de Mann-Whitney y un test de medias para comparar la distribución de los grupos. El test de Mann-Whitney asume como hipótesis nula que es igual de probable que un valor seleccionado aleatoriamente de un grupo sea mayor o menor que uno seleccionado aleatoriamente del otro grupo. La hipótesis es posible rechazarla con un valor de probabilidad menor a 0,05 y esto afirmaría que las muestras vienen de conjuntos de datos con distribución distinta.

El test de medianas prueba la hipótesis nula en la cual las muestras vienen de una población con un mismo valor de mediana. El aspecto relevante de la prueba es que solo considera la posición de cada observación relativa a la mediana global, mientras que la prueba de Mann-Whitney tiene en cuenta los rangos de cada observación. La hipótesis es posible rechazarla con un valor de probabilidad

menor a 0,05 y esto afirmaría que las muestras vienen de conjuntos con medianas distintas.

Los resultados se representaron en términos de media y el error estándar de la media. En todos los casos se consideró significativo un valor de “ $p$ ” menor a 0,05. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático Stata 13.0 y los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism.

## **V. RESULTADOS**

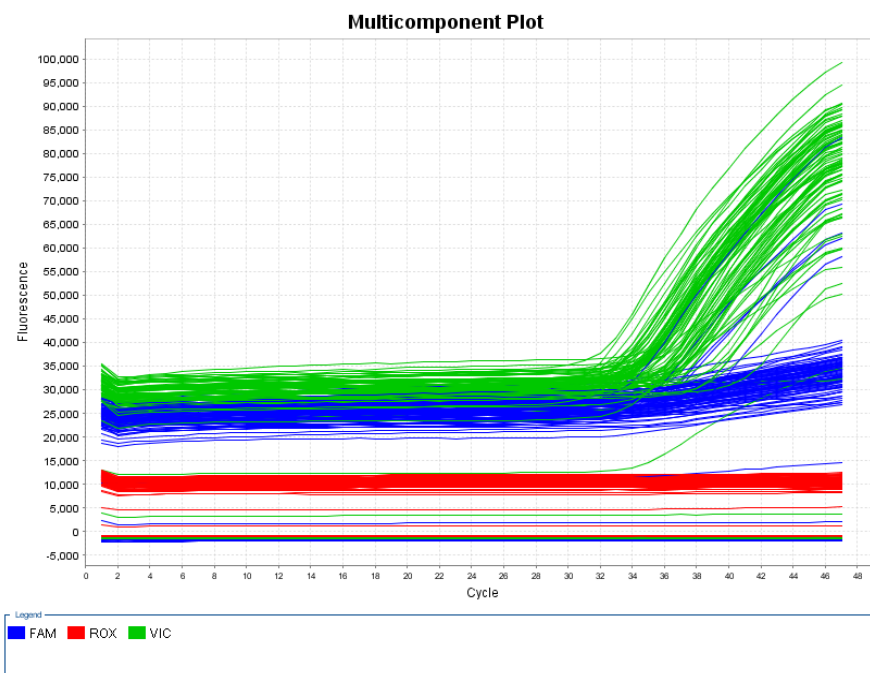


### 5.1. Genotipificación.

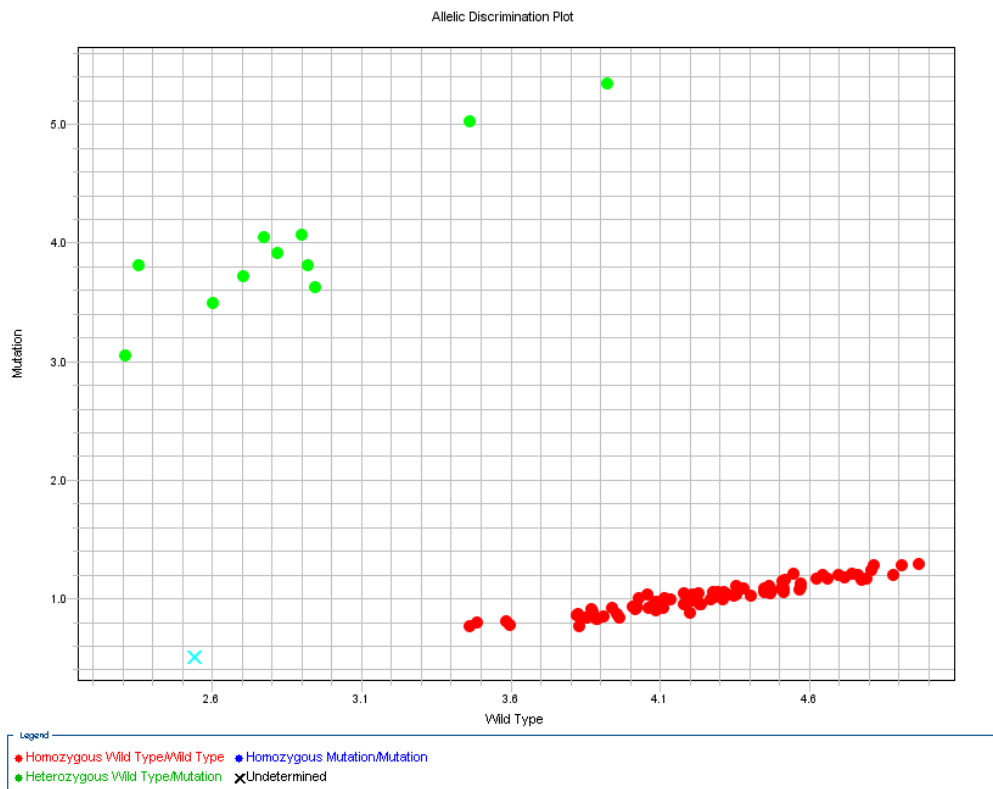
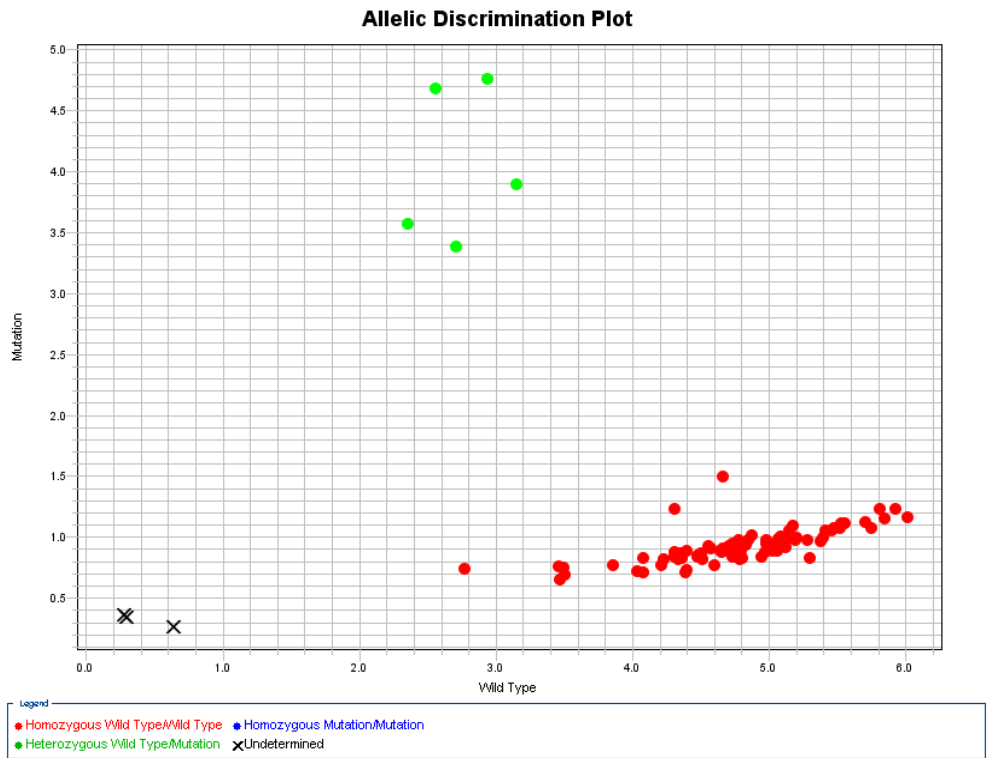
Del total de las muestras se obtuvieron 15 muestras heterocigotas (8,064%), 167 homocigota para el tipo salvaje (89,785%) y 4 muestras fueron indeterminadas (tabla 3) (figura 7 y 8).

Genotipo	AA	AG	GG	Indeterminado
Cantidad	167	15	0	4

**Tabla 3:** Número de pacientes para cada genotipo. AA genotipo homocigota para tipo salvaje. AG genotipo heterocigota. GG genotipo homocigota mutado.



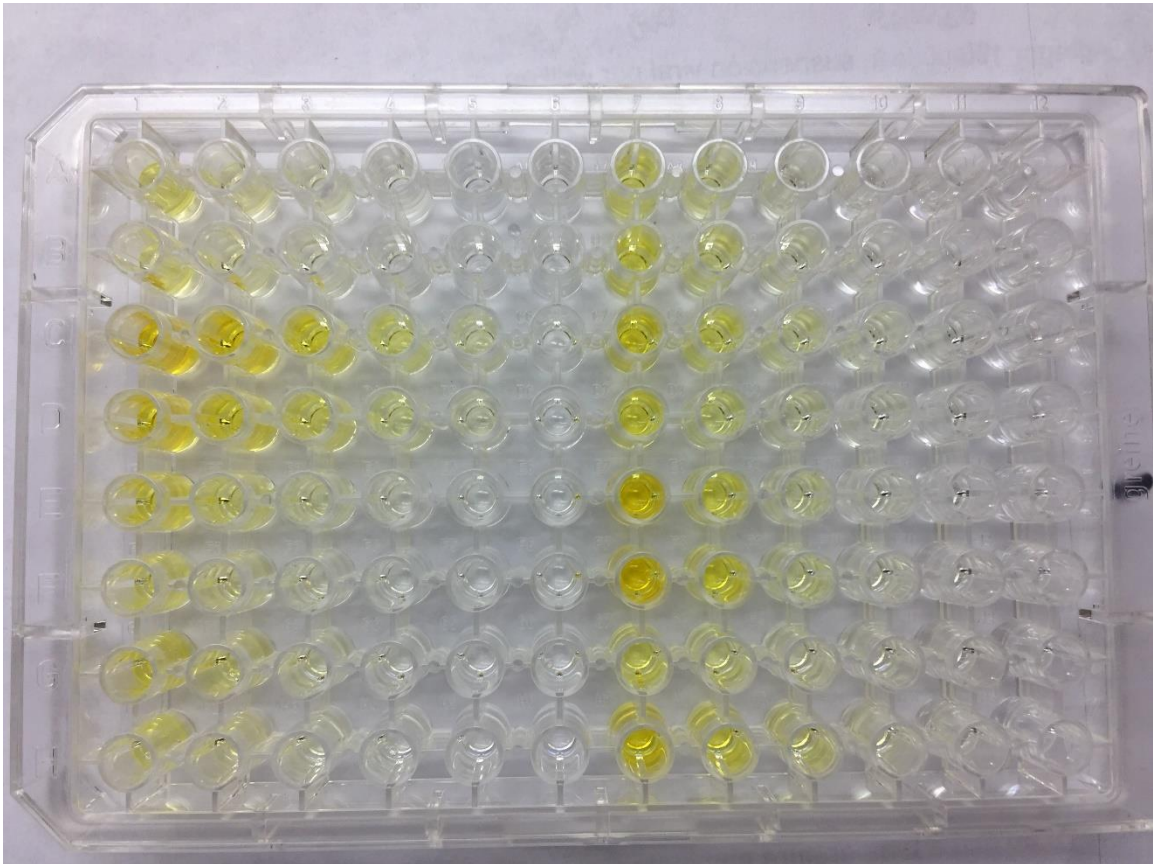
**Figura 7:** Grafico multicomponente de amplificación de fluorescencia por ciclo.



**Figura 8:** Discriminación alélica por fluorescencia.

## 5.2. Cálculo del título de punto final.

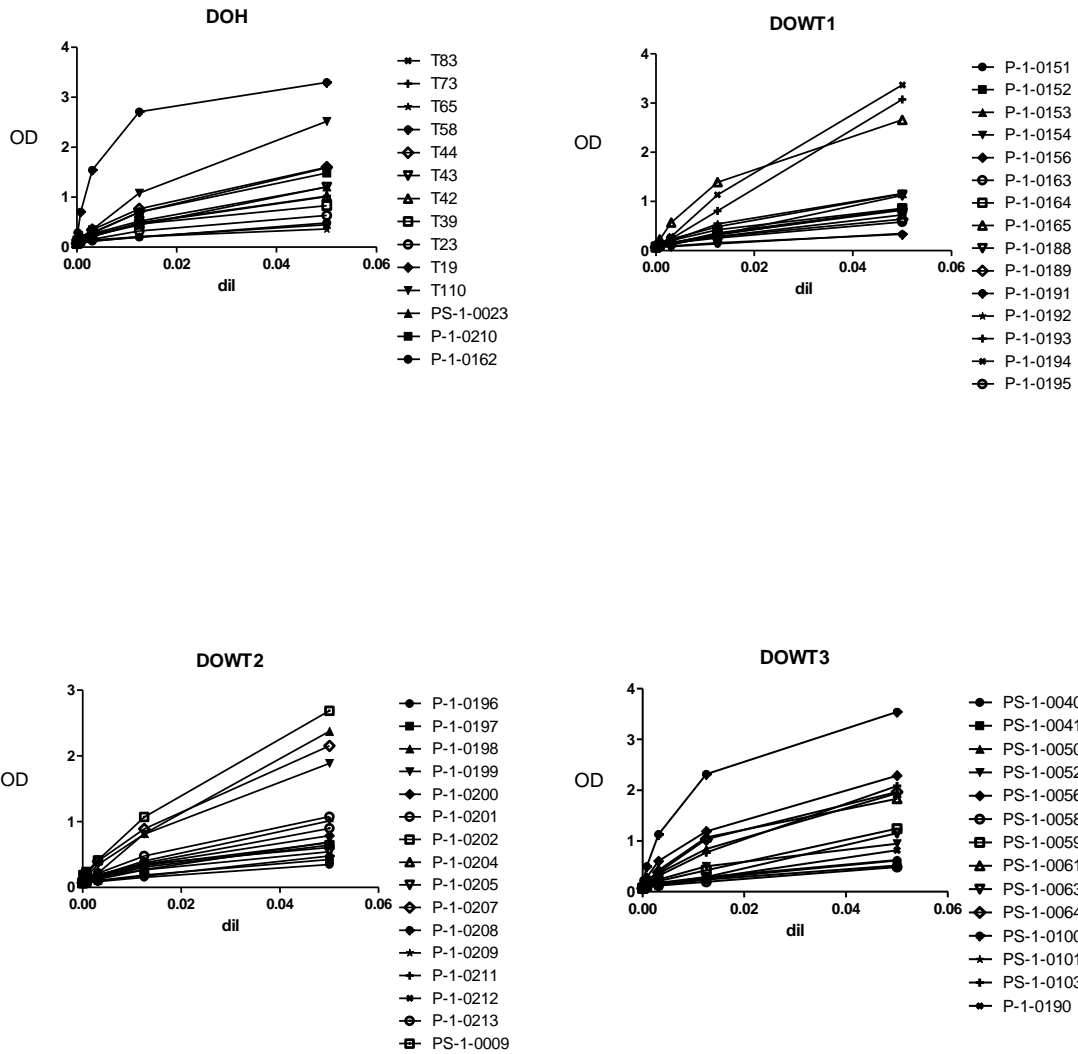
Se realizaron los ensayos de ELISA para analizar 62 sueros humanos, 48 con genotipo de tipo salvaje seleccionados al azar y 14 con genotipo heterocigota para TLR4, discriminados en la etapa previa de genotipificación (un suero de genotipo heterocigota no pudo utilizarse por no haber cantidad suficiente).



**Figura 9:** Foto de una placa, resultado de un ensayo ELISA.

Se obtuvieron para los 62 sueros analizados valores de densidad óptica para cada dilución y se ajustaron a curvas calculadas mediante regresión no lineal a una función sigmoidea. **(figura 10)**

## Densidad óptica medida a 450nm



**Figura 10:** Gráficos de densidad óptica medida a 450nm en función de las diluciones de suero. DOH: Densidad óptica para pacientes con genotipo heterocigota para TLR4. DOWT1-3: Densidad óptica para pacientes con genotipo de tipo salvaje.

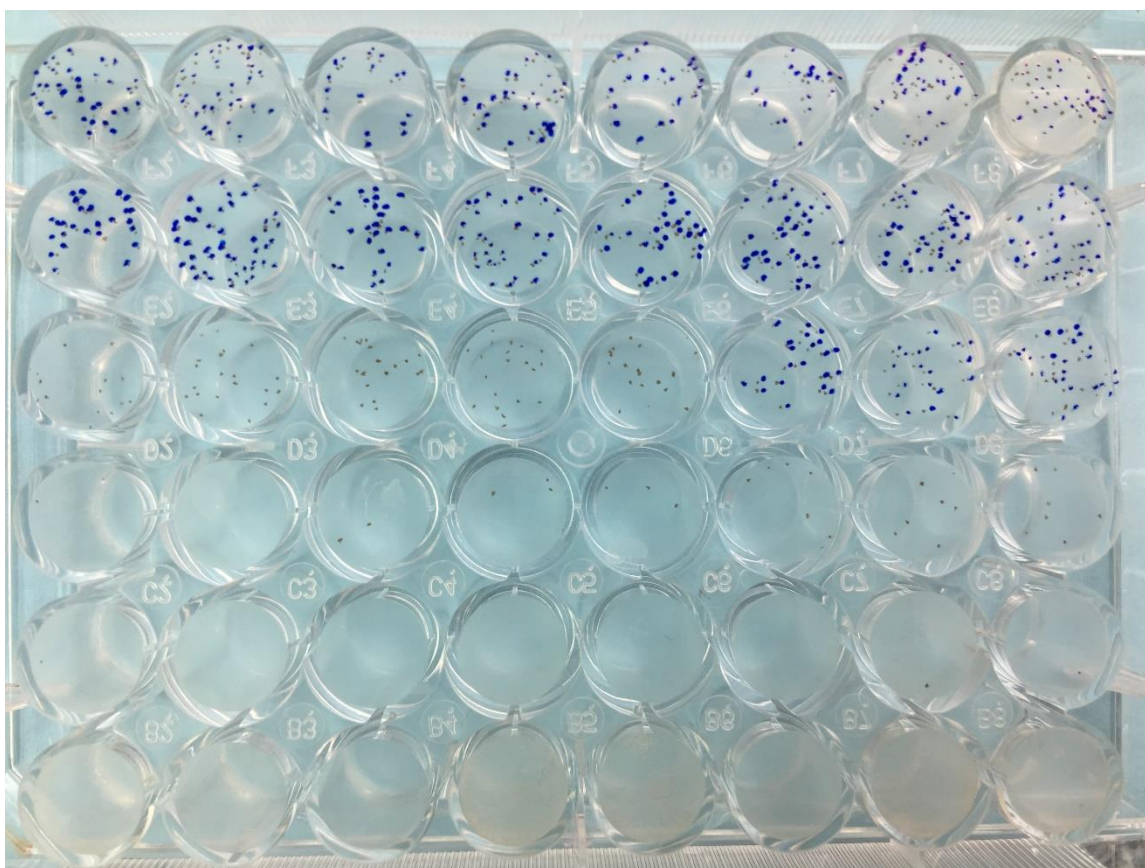
A las muestras analizadas por ELISA se les calculó el título de punto final definido como el recíproco de la mayor dilución de sueros que tenía una lectura por encima del valor de corte, definido como el doble de la señal de fondo. También se calculó el EC50 definido como la concentración de suero que da la mitad de la respuesta máxima. (Tabla 3)

Identificación	EC50	EndPoint Titer	Genotipo	Identificación	EC50	EndPoint Titer	Genotipo
P-1-0139	17,6897223	153,3542979	wt	P-1-0210	41,5282392	611,6971641	H
P-1-0141	32,1646832	272,3267277	wt	P-1-0211	26,1506276	309,4068496	wt
P-1-0144	50,7356672	253,527966	wt	P-1-0212	137,023842	514,7144739	wt
P-1-0150	36,5096751	687,5833614	wt	P-1-0213	30,4785126	294,698837	wt
P-1-0151	29,1036088	222,1942205	wt	PS-1-0009	23,5960359	818,3980645	wt
P-1-0152	28,0898876	257,5015753	wt	PS-1-0022	21,4822771	278,1617954	wt
P-1-0153	28,6615076	439,3428335	wt	PS-1-0023	34,7947112	336,8685996	H
P-1-0154	37,3831776	406,1311769	wt	PS-1-0040	50,9164969	206,126705	wt
P-1-0162	24,2424242	159,972085	H	PS-1-0041	33,0797221	208,5133022	wt
P-1-0163	37,4672162	278,5454987	wt	PS-1-0050	69,2520776	705,4497993	wt
P-1-0164	31,4070352	402,3083686	wt	PS-1-0052	63,8162093	529,8196924	wt
P-1-0165	54,6448087	1335,244925	wt	PS-1-0056	37,3831776	1297,442811	wt
P-1-0188	52,8262018	205,5323055	wt	PS-1-0058	16,2786912	161,4727431	wt
P-1-0189	45,8505273	251,5922231	wt	PS-1-0059	70,5716302	307,9602493	wt
P-1-0191	72,2543353	140,1561413	wt	PS-1-0061	3,04043782	1119,368671	wt
P-1-0192	38,1679389	106,1462401	wt	PS-1-0063	51,2820513	188,2817868	wt
P-1-0193	2,09643606	487,5599615	wt	PS-1-0064	117,15089	954,2573544	wt
P-1-0194	10,4351456	728,5019307	wt	PS-1-0100	55,7724484	3336,09502	wt
P-1-0195	47,9846449	232,5509295	wt	PS-1-0101	19,0766883	278,3345219	wt
P-1-0196	47,7554919	119,3144863	wt	PS-1-0103	15,7183276	565,9359803	wt
P-1-0197	45,4132607	152,4858272	wt	T110	26,5886732	818,3069384	H
P-1-0198	11,5420129	528,8706462	wt	T19	32,2372663	562,9211603	H
P-1-0199	30,9981401	659,7177449	wt	T23	61,1246944	303,0181759	H
P-1-0200	41,3052458	302,014925	wt	T39	95,1474786	572,5781442	H
P-1-0201	37,5234522	404,7443729	wt	T42	44,9640288	422,1189056	H
P-1-0202	47,1475719	261,3944434	wt	T43	35,4484225	441,1367779	H
P-1-0204	30,1114122	217,9973812	wt	T44	45,4959054	702,6088221	H
P-1-0205	54,5553737	233,4832139	wt	T58	271,370421	6610,763905	H
P-1-0207	28,5551114	721,5584696	wt	T65	174,216028	292,5996902	H
P-1-0208	24,1312741	126,029496	wt	T73	43,6871997	421,4697401	H
P-1-0209	53,1632111	299,9200082	wt	T83	50,9943906	173,9461122	H

**Tabla 3:** Valores obtenidos para el título de punto final para cada suero, genotipo, y EC50. (wt: genotipo de tipo salvaje, H: genotipo heterocigota).

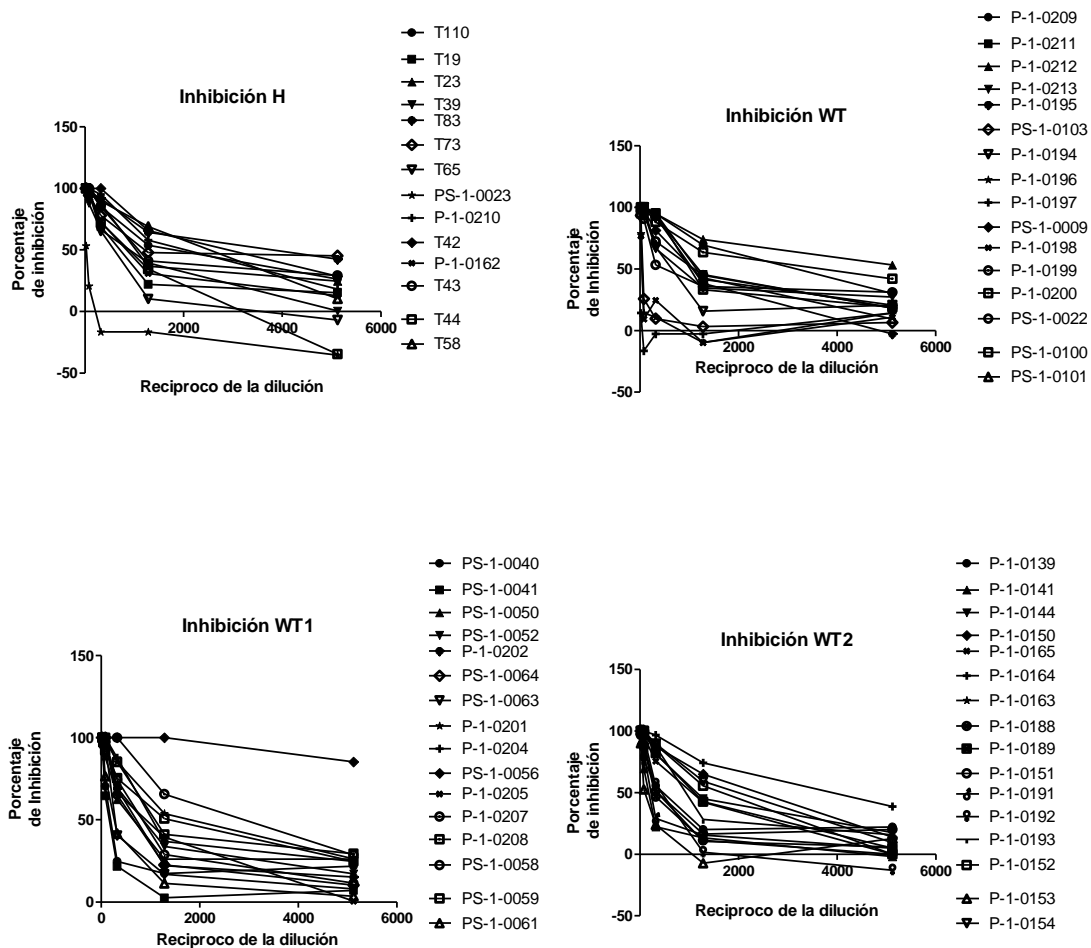
### 5.3. Cálculo del PRNT50.

Se realizaron ensayos de neutralización viral con revelado por inmunotinción (**figura 14**) se obtuvieron curvas de inhibición como porcentaje de la reducción de placas con respecto al control (**Figura 15**) y se calculó el PRNT50 y el PRNT80 por duplicado para el total de 62 muestras de sueros humanos. Los valores se presentan como el promedio entre duplicados y el desvío estándar (**Tabla 4**). Los valores por fuera de los límites de detección se ajustaron a límites máximos y mínimos establecidos en 5120 y 10 respectivamente.



**Figura 14:** Foto de una placa de ensayo de neutralización viral y revelado por inmunotinción.

## Porcentaje de inhibición



**Figura 15:** Gráficos de porcentaje de inhibición en función del recíproco de las diluciones de suero. Inhibición H: Curvas de pacientes con genotipo heterocigota para TLR4. Inhibición WT, WT1 y WT2: Curvas de pacientes con genotipo de tipo salvaje.

Identificación	PRNT50	DS PRNT50	PRNT80	DS PRNT80	Genotipo	Identificación	PRNT50	DS PRNT50	PRNT80	DS PRNT80	Genotipo
P-1-0139	438,43	± 58,03	139,37	± 3,12	wt	P-1-0210	1492,88	± 274,73	548,62	± 17,55	H
P-1-0141	111,23	± 43,03	37,82	± 6,22	wt	P-1-0211	2027,42	± 1281,25	523,70	± 85,26	wt
P-1-0144	939,39	± 171,11	334,30	± 2,5	wt	P-1-0212	5120,00	± 0	1211,98	± 500,35	wt
P-1-0150	1605,23	± 451,66	473,53	± 50,09	wt	P-1-0213	679,58	± 31,96	191,22	± 28,53	wt
P-1-0151	624,47	± 406,14	114,88	± 5,94	wt	PS-1-0009	1016,82	± 84,19	350,32	± 21,15	wt
P-1-0152	1565,14	± 134,08	510,14	± 66,49	wt	PS-1-0022	341,41	± 107,45	111,38	± 10,66	wt
P-1-0153	78,02	± 17,78	29,01	± 0,04	wt	PS-1-0023	23,80	± 1,04	10,00	± 0	H
P-1-0154	1541,91	± 157,72	482,20	± 23,65	wt	PS-1-0040	139,61	± 12,97	41,53	± 8,14	wt
P-1-0162	577,61	± 145,05	179,93	± 48,86	H	PS-1-0041	142,98	± 20,82	39,75	± 2,34	wt
P-1-0163	309,39	± 35,05	105,27	± 12,11	wt	PS-1-0050	481,65	± 45,41	163,31	± 5,55	wt
P-1-0164	2646,24	± 915,88	787,68	± 153,44	wt	PS-1-0052	768,25	± 123,58	276,10	± 110,27	wt
P-1-0165	802,15	± 175,5	188,85	± 65,49	wt	PS-1-0056	5120,00	± 0	5120,00	± 0	wt
P-1-0188	350,03	± 89,98	75,11	± 38,17	wt	PS-1-0058	722,97	± 70,02	270,69	± 65,57	wt
P-1-0189	639,79	± 491,05	227,60	± 161,87	wt	PS-1-0059	1090,67	± 339,72	259,00	± 57,18	wt
P-1-0191	211,97	± 38,56	86,74	± 3,79	wt	PS-1-0061	217,56	± 16,83	71,90	± 9,94	wt
P-1-0192	268,27	± 156,76	55,02	± 11,88	wt	PS-1-0063	294,93	± 60,64	107,17	± 15,73	wt
P-1-0193	853,68	± 119,21	365,76	± 23,25	wt	PS-1-0064	515,36	± 13,41	171,68	± 8,28	wt
P-1-0194	569,93	± 78,69	205,30	± 22,68	wt	PS-1-0100	1138,57	± 363,85	427,99	± 31,32	wt
P-1-0195	1224,96	± 391,09	434,70	± 5,83	wt	PS-1-0101	1680,29	± 877,9	752,16	± 386,37	wt
P-1-0196	37,31	± 0,36	10,00	± 0	wt	PS-1-0103	67,78	± 26,9	30,44	± 5,73	wt
P-1-0197	10,00	± 0	10,00	± 0	wt	T110	2923,58	± 3106,2	446,99	± 169,57	H
P-1-0198	46,38	± 16,54	10,00	± 0	wt	T19	1161,73	± 303,21	490,84	± 25,51	H
P-1-0199	741,91	± 359,65	175,66	± 31,48	wt	T23	927,31	± 91,57	435,22	± 29,74	H
P-1-0200	2158,72	± 1303,66	485,45	± 33,51	wt	T39	957,82	± 264,81	363,61	± 116,34	H
P-1-0201	1416,34	± 196,83	417,43	± 19,13	wt	T42	776,00	± 164,22	275,38	± 0	H
P-1-0202	596,93	± 50,38	199,93	± 18,06	wt	T43	862,89	± 26,02	363,21	± 20,8	H
P-1-0204	1139,61	± 346,16	405,74	± 13,08	wt	T44	790,13	± 90,75	252,78	± 64,76	H
P-1-0205	739,69	± 7,21	156,58	± 33,21	wt	T58	1465,35	± 762,4	512,80	± 139,01	H
P-1-0207	2104,14	± 275,5	698,60	± 25,36	wt	T65	540,83	± 96,52	170,72	± 4,46	H
P-1-0208	1101,51	± 188,54	408,49	± 43,65	wt	T73	3142,28	± 2796,92	387,17	± 162,58	H
P-1-0209	3833,74	± 1819,05	858,33	± 194,13	wt	T83	3285,88	± 150,93	947,26	± 518,24	H

**Tabla 4:** Valor medio y desvió estándar calculado para el PRNT50 y PRNT80 de pacientes y su genotipo. (wt: genotipo de tipo salvaje, H: genotipo heterocigota)

## 5.4. Análisis estadístico

### 5.4.1 Normalidad

Se realizó un test de Shapiro-Wilk W y un gráfico cuantil-cuantil (**figura 16 y 17**) para probar la distribución normal de los resultados de ambos ensayos.

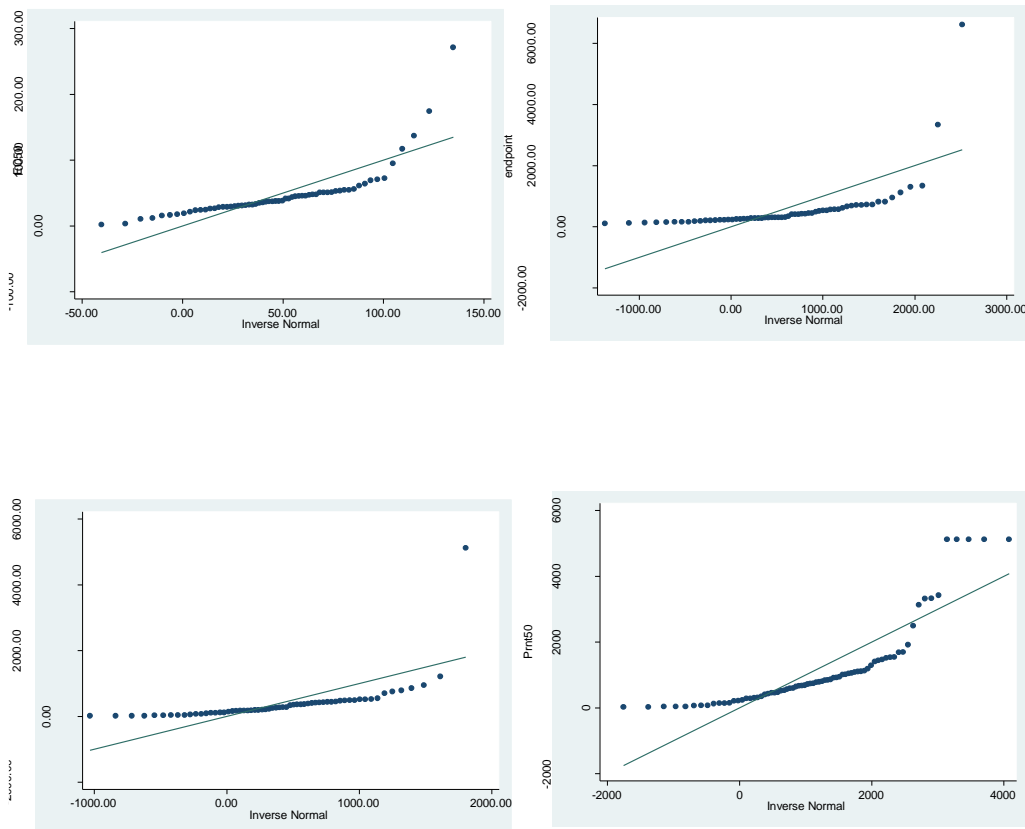


Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Prnt50p	62	0.79474	11.455	5.266	0.00000
prnt80p	62	0.40289	33.322	7.572	0.00000
endpoint	62	0.40371	33.276	7.569	0.00000
EC50	62	0.65115	19.468	6.411	0.00000

**Figura 16:** Resultado del test de Shapiro-Wilk para los valores medios de PRNT50 y PRNT80, los títulos de punto final y los EC50.

**Gráficos de comparación de cuantiles**



**Figura 17:** Gráficos cuantil-cuantil para para los valores medios de PRNT50 y PRNT80, los títulos de punto final y los EC50.

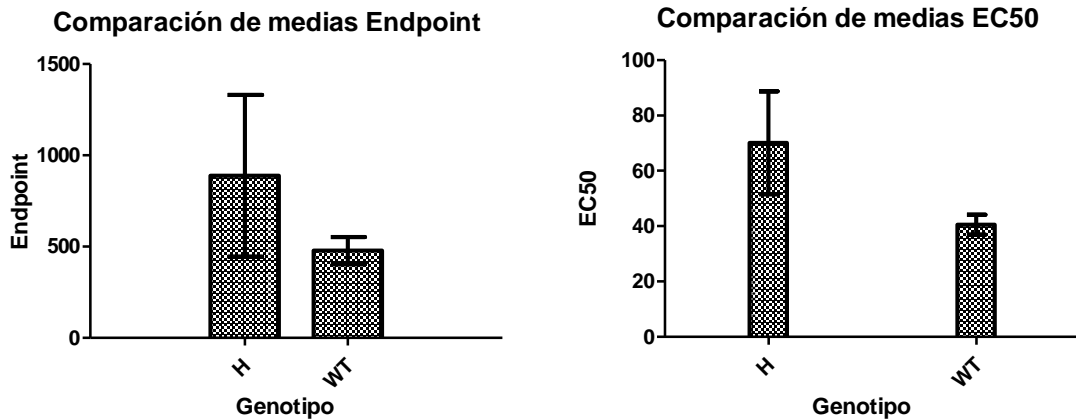
Tanto los gráficos como los tests determinaron la no normalidad de los datos.

#### 5.4.1 Significancia

Analizada la distribución de los datos se procedió a evaluar las significancias estadísticas del SNP en los valores de ambos ensayos, para esto, se utilizó un test de Mann-Whitney  $U$ , y para corroborar los resultados un test de medianas. Dichas pruebas fueron elegidas ya que los conjuntos de datos no siguen una distribución normal.

##### Título de punto final

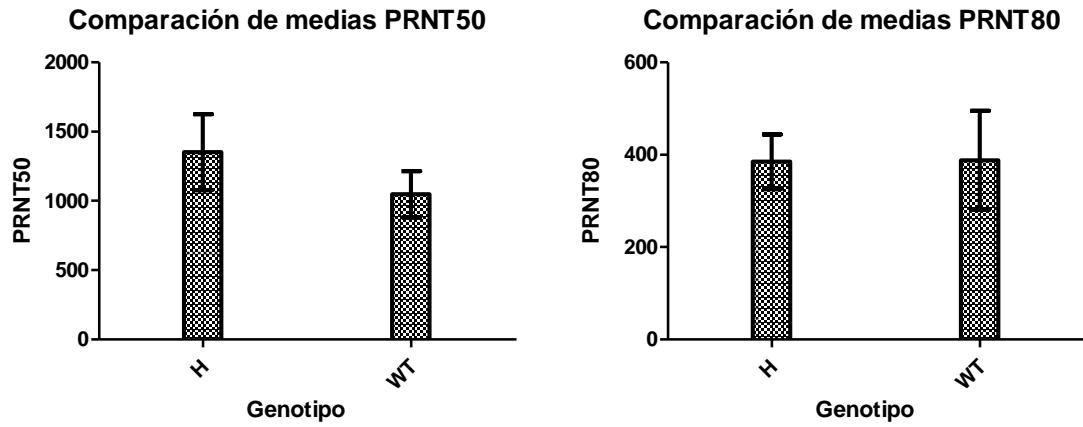
El resultado del test de Mann-Whitney para el título de punto final es de  $\text{Prob} > |z| = 0,1430$  por lo que no es posible rechazar la hipótesis nula considerada. Esto quiere decir que el título de punto final de ambos grupos (personas con genotipo WT y heterocigota) posee la misma distribución, por lo que no se puede demostrar que con respecto a la cantidad de anticuerpos IgG de los sueros estudiados, el SNP tenga un rol estadísticamente significativo. El resultado coincide con el resultado del test de medianas ( $\text{Pr} = 0,129$ ) y se corresponde con los resultados de ensayar el EC50 (Mann-Whitney:  $\text{Prob} > |z| = 0,1340$ ; test de medianas:  $\text{Pr} = 0,362$ ). El valor máximo-mínimo para los heterocigotas y los homocigotas fue de 6610,7-159,9 y 3336,1-106,1 y los valores de media-error estándar 887,8-443,1 y 478,4-74,4 respectivamente. **(figura 18)**



**Figura 18:** Gráficos de medias y errores estándar para el valor de Endpoint y EC50 (WT: genotipo de tipo salvaje, H: genotipo heterocigota).

### PRNT50

El resultado del test de Mann-Whitney es de  $\text{Prob} > |z| = 0,1385$  por lo que no es posible rechazar la hipótesis nula considerada. Esto quiere decir que el PRNT50 de ambos grupos (personas con genotipo WT y con un alelo mutado) posee la misma distribución por lo que no se puede demostrar que con respecto al título neutralizante de los anticuerpos IgG, el SNP tenga un rol estadísticamente significativo. El resultado coincide con el resultado del test de medianas ( $\text{Pr} = 0,129$ ) y se corresponde con los resultados de ensayar el PRNT80 (Mann-Whitney:  $\text{Prob} > |z| = 0,1042$ ; test de medianas:  $\text{Pr} 0,129$ ). El rango en el que se encuentran los valores asociados al título es de 10 a 5120, el valor máximo-mínimo para los heterocigotas y los homocigotas fue de 3285,9- 23,8 y 5120- 10 y los valores de media-error estándar 1352-274,6 y 1047,3-166 respectivamente.



**Figura 19:** Gráficos de medias y errores estándar para el valor de PRNT50 y PRNT80 (WT: genotipo de tipo salvaje, H: genotipo heterocigota).

## **VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES**

El gen codificante para el receptor de tipo toll 4 interactúa con las proteínas virales F y G del VSR a través de su proteína codificada. Esta interacción podría afectar ampliamente diferentes aspectos de la respuesta inmune tanto humoral como celular[38, 101, 129, 150, 153-155]. En este trabajo se decidió realizar un análisis preliminar de las consecuencias que tiene una modificación genética de tipo SNP en algunas características de la respuesta inmune humoral como son la cantidad de anticuerpos contra el virus (analizada a través del título de punto final), y el poder neutralizante (representado por el título resultado de ensayos de neutralización). En este primer análisis se observó que aproximadamente un 8% de la población posee genotipo heterocigota para el gen que codifica TLR4, estableciendo un grupo de interés significativo a la hora de estudiar la reacción de posibles tratamientos futuros. Sin embargo, no se pudo demostrar una diferencia significativa en las características analizadas de los anticuerpos presentes en los sueros utilizados.

Si bien el estudio no pudo demostrar una respuesta humoral atípica, vale la pena mencionar que este estudio no abarca todo el espectro digno de análisis en lo que a este gen se refiere. Los caracteres de estudio seleccionados no son todos los que importan a la hora de caracterizar la relación anticuerpo-antígeno ya que dejan de lado la avidéz. La avidéz de un anticuerpo indica la fuerza total de la interacción entre el anticuerpo y el antígeno[149] y es de mayor importancia a la hora de analizar la funcionalidad de estos.

No solo es importante completar la caracterización de los anticuerpos, futuros estudios también deberían focalizar su atención en la discriminación de los

anticuerpos estudiados en función de su antígeno. En los sueros analizados había una vasta diversidad de anticuerpos; anticuerpos contra otros virus, anticuerpos contra diferentes proteínas del VSR, hasta anticuerpos contra diferentes conformaciones de una misma proteína, como es la proteína de fusión. Estudios recientes distinguen entre dos conformaciones de la proteína F del virus, la pre-fusión y la post-fusión[156, 157]. En el conjunto de anticuerpos presentes en los sueros coexisten tanto anticuerpos específicos para una como para otra conformación de la proteína así como también los que pueden unirse a ambos[158]. En el contexto de la inmunización mediante antígenos virales y no mediante viriones completos no es seguro ignorar esta diferencia, un estudio que caracterice la respuesta humoral específica a las diferentes proteínas del virus, principalmente la F y la G, y que incluya la conformación de F en el análisis, es de vital interés para el desarrollo y producción de vacunas seguras.

Con relación a lo genético, existen formas de ampliar el conocimiento sobre el VSR y complementar este estudio. En principio, vale mencionar dos cosas, la primera es que existen otros SNPs para TLR4. Como por ejemplo, Thr399Ile que a pesar de su relevancia en la literatura, no fue incluido en el estudio[121]. La segunda es que en este estudio se analizó el impacto de un genotipo mutado en la respuesta inmune, sin embargo, esto poco nos dice sobre la posterior expresión y funcionalidad del receptor de interés, ya que no por tener un genotipo determinado los mecanismos que lleven a su expresión y funcionalidad no se encuentren alterados de alguna forma. Lo cual, si bien no es frecuente es un escenario posible y podría estar confundiendo los resultados obtenidos. Otro

aspecto interesante con respecto al genotipo sería evaluar el impacto que tiene un genotipo homocigoto mutado en la respuesta inmune. Si bien estos individuos representan un porcentaje muy bajo de la población mundial, al no poseer ningún alelo WT podrían mostrar de forma más visible la implicancia de las mutaciones. Además, es importante resaltar que el gen estudiado no es el único implicado en la respuesta inmune contra el VSR ni tampoco el único que debería considerarse de interés. Sería interesante hacer un análisis de los genes involucrados en la maduración de los linfocitos B luego de la infección con VSR, así como también estudiar otros genes que intervienen en la respuesta inmune como MARCO, TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 y MX1 que han mostrado relevancia en la susceptibilidad a la infección y la inmunidad[141, 151].

Por último, debe considerarse que no solo los factores genéticos y virales tienen implicancias en la respuesta inmune ante el VSR[159], las condiciones ambientales en las que viven los individuos repercuten directamente en el desarrollo del sistema inmune y en la respuesta de este ante una potencial infección. Muchos estudios analizan la interacción genético-ambientales en la respuesta inmune en diferentes patologías[160, 161]. Realizar este tipo de análisis sería apropiado para abarcar un espectro más completo.



## **VII. REFERENCIAS**

- [1] R. E. Blount, Jr., J. A. Morris, and R. E. Savage, "Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza," *Proc Soc Exp Biol Med*, vol. 92, pp. 544-9, Jul 1956.
- [2] R. Chanock and L. Finberg, "Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children," *Am J Hyg*, vol. 66, pp. 291-300, Nov 1957.
- [3] M. R. Hilleman, "Respiratory Syncytial Virus," *Am Rev Respir Dis*, vol. 88, pp. SUPPL 181-97, Sep 1963.
- [4] V. Hemming, "Respiratory syncytial virus: a brief history In: Weisman LE, Groothuis JR, editors. Contemporary diagnosis and management of respiratory syncytial virus. ," *Newtown PA: Handbooks in Health Care Co*, pp. 7-23, 2007.
- [5] H. W. Kim, J. G. Canchola, C. D. Brandt, G. Pyles, R. M. Chanock, K. Jensen, *et al.*, "Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine," *Am J Epidemiol*, vol. 89, pp. 422-34, Apr 1969.
- [6] P. L. Acosta, M. T. Caballero, and F. P. Polack, "Brief History and Characterization of Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease," *Clin Vaccine Immunol*, vol. 23, pp. 189-95, Dec 16 2015.
- [7] C. R. Collins PL, and Murphy BR, "Respiratory Syncytial Virus," in *Fields Virology*, H. P. Knipe MD, Ed., ed New York: Raven Press, 2001, pp. 1443-1486.
- [8] M. Baldini, D. Vercelli, and F. D. Martinez, "CD14: an example of gene by environment interaction in allergic disease," *Allergy*, vol. 57, pp. 188-92, Mar 2002.
- [9] M. A. K. Hendricks D.A., Patterson J.L., "Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus.," *J Virol*, vol. 62, pp. 2228-2233, 1998.
- [10] I. Martinez, J. Dopazo, and J. A. Melero, "Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants," *J Gen Virol*, vol. 78 ( Pt 10), pp. 2419-29, Oct 1997.
- [11] F. P. Polack, P. M. Irusta, S. J. Hoffman, M. P. Schiatti, G. A. Melendi, M. F. Delgado, *et al.*, "The cysteine-rich region of respiratory syncytial virus attachment protein inhibits innate immunity elicited by the virus and endotoxin," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, pp. 8996-9001, Jun 21 2005.
- [12] W. H. Alwan, F. M. Record, and P. J. Openshaw, "Phenotypic and functional characterization of T cell lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins," *J Immunol*, vol. 150, pp. 5211-8, Jun 15 1993.

- [13] B. S. Graham, G. S. Henderson, Y. W. Tang, X. Lu, K. M. Neuzil, and D. G. Colley, "Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus," *J Immunol*, vol. 151, pp. 2032-40, Aug 15 1993.
- [14] B. Tian, Y. Zhang, B. A. Luxon, R. P. Garofalo, A. Casola, M. Sinha, *et al.*, "Identification of NF-kappaB-dependent gene networks in respiratory syncytial virus-infected cells," *J Virol*, vol. 76, pp. 6800-14, Jul 2002.
- [15] C. Tang, *Respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. In: manual of clinical microbiology*: ASM Press, 2007.
- [16] B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, *Fields' virology*, 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- [17] E. A. Simoes, "Respiratory syncytial virus infection," *Lancet*, vol. 354, pp. 847-52, Sep 4 1999.
- [18] C. J. Holberg, A. L. Wright, F. D. Martinez, C. G. Ray, L. M. Taussig, and M. D. Lebowitz, "Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life," *Am J Epidemiol*, vol. 133, pp. 1135-51, Jun 1 1991.
- [19] J. A. Englund, L. J. Anderson, and F. S. Rhame, "Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults," *J Clin Microbiol*, vol. 29, pp. 115-9, Jan 1991.
- [20] S. F. Dowell, L. J. Anderson, H. E. Gary, Jr., D. D. Erdman, J. F. Plouffe, T. M. File, Jr., *et al.*, "Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults," *J Infect Dis*, vol. 174, pp. 456-62, Sep 1996.
- [21] M. J. Cox, R. S. Azevedo, P. A. Cane, E. Massad, and G. F. Medley, "Seroepidemiological study of respiratory syncytial virus in Sao Paulo state, Brazil," *J Med Virol*, vol. 55, pp. 234-9, Jul 1998.
- [22] A. R. Falsey and E. E. Walsh, "Respiratory syncytial virus infection in adults," *Clin Microbiol Rev*, vol. 13, pp. 371-84, Jul 2000.
- [23] R. C. Welliver, "Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection," *J Pediatr*, vol. 143, pp. S112-7, Nov 2003.
- [24] R. Y. Sung, R. C. Chan, J. S. Tam, A. F. Cheng, and H. G. Murray, "Epidemiology and aetiology of acute bronchiolitis in Hong Kong infants," *Epidemiol Infect*, vol. 108, pp. 147-54, Feb 1992.
- [25] M. W. Weber, E. K. Mulholland, and B. M. Greenwood, "Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries," *Trop Med Int Health*, vol. 3, pp. 268-80, Apr 1998.
- [26] P. A. Cane, "Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus," *Rev Med Virol*, vol. 11, pp. 103-16, Mar-Apr 2001.

- [27] C. D. Brandt, H. W. Kim, J. O. Arrobio, B. C. Jeffries, S. C. Wood, R. M. Chanock, *et al.*, "Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. 3. Composite analysis of eleven consecutive yearly epidemics," *Am J Epidemiol*, vol. 98, pp. 355-64, Nov 1973.
- [28] W. P. Glezen, L. H. Taber, A. L. Frank, and J. A. Kasel, "Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus," *Am J Dis Child*, vol. 140, pp. 543-6, Jun 1986.
- [29] R. L. Smyth and P. J. Openshaw, "Bronchiolitis," *Lancet*, vol. 368, pp. 312-22, Jul 22 2006.
- [30] F. W. Henderson, A. M. Collier, W. A. Clyde, Jr., and F. W. Denny, "Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children," *N Engl J Med*, vol. 300, pp. 530-4, Mar 8 1979.
- [31] T. Heikkinen, M. Thint, and T. Chonmaitree, "Prevalence of various respiratory viruses in the middle ear during acute otitis media," *N Engl J Med*, vol. 340, pp. 260-4, Jan 28 1999.
- [32] "Diagnosis and management of bronchiolitis," *Pediatrics*, vol. 118, pp. 1774-93, Oct 2006.
- [33] J. C. J. Murphy K, Travers P, Walport M, *Janeway's immunobiology*, 8th ed.: Garland Science publishing, 2012.
- [34] A. Iwasaki and R. Medzhitov, "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses," *Nat Immunol*, vol. 5, pp. 987-95, Oct 2004.
- [35] Q. Sha, A. Q. Truong-Tran, J. R. Plitt, L. A. Beck, and R. P. Schleimer, "Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 31, pp. 358-64, Sep 2004.
- [36] B. D. Rudd, E. Burstein, C. S. Duckett, X. Li, and N. W. Lukacs, "Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression," *J Virol*, vol. 79, pp. 3350-7, Mar 2005.
- [37] S. M. Bueno, P. A. Gonzalez, C. A. Riedel, L. J. Carreno, A. E. Vasquez, and A. M. Kalergis, "Local cytokine response upon respiratory syncytial virus infection," *Immunol Lett*, vol. 136, pp. 122-9, 2011 2011.
- [38] E. A. Kurt-Jones, L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, *et al.*, "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus," *Nat Immunol*, vol. 1, pp. 398-401, Nov 2000.
- [39] M. R. Murawski, G. N. Bowen, A. M. Cerny, L. J. Anderson, L. M. Haynes, R. A. Tripp, *et al.*, "Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2," *J Virol*, vol. 83, pp. 1492-500, Feb 2009.
- [40] M. L. Everard, A. Swarbrick, M. Wrightam, J. McIntyre, C. Dunkley, P. D. James, *et al.*, "Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with

- respiratory syncytial virus infection," *Arch Dis Child*, vol. 71, pp. 428-32, Nov 1994.
- [41] S. Z. Wang and K. D. Forsyth, "The interaction of neutrophils with respiratory epithelial cells in viral infection," *Respirology*, vol. 5, pp. 1-10, Mar 2000.
- [42] R. L. Smyth, K. J. Mobbs, U. O'Hea, D. Ashby, and C. A. Hart, "Respiratory syncytial virus bronchiolitis: disease severity, interleukin-8, and virus genotype," *Pediatr Pulmonol*, vol. 33, pp. 339-46, May 2002.
- [43] L. Bont, C. J. Heijnen, A. Kavelaars, W. M. van Aalderen, F. Brus, J. T. Draaisma, *et al.*, "Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncytial virus bronchiolitis," *Eur Respir J*, vol. 14, pp. 144-9, Jul 1999.
- [44] A. M. Harrison, C. A. Bonville, H. F. Rosenberg, and J. B. Domachowske, "Respiratory syncytial virus-induced chemokine expression in the lower airways: eosinophil recruitment and degranulation," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 159, pp. 1918-24, Jun 1999.
- [45] J. L. Kimpen, "Respiratory syncytial virus and asthma. The role of monocytes," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 163, pp. S7-9, Mar 2001.
- [46] S. Becker, J. Quay, and J. Soukup, "Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages," *J Immunol*, vol. 147, pp. 4307-12, Dec 15 1991.
- [47] J. D. Gibbs, D. M. Ornoff, H. A. Igo, J. Y. Zeng, and F. Imani, "Cell cycle arrest by transforming growth factor beta1 enhances replication of respiratory syncytial virus in lung epithelial cells," *J Virol*, vol. 83, pp. 12424-31, Dec 2009.
- [48] G. Huang, Y. Wang, and H. Chi, "Regulation of TH17 cell differentiation by innate immune signals," *Cell Mol Immunol*, vol. 9, pp. 287-95, Jul 2012.
- [49] G. Anderson, N. C. Moore, J. J. Owen, and E. J. Jenkinson, "Cellular interactions in thymocyte development," *Annu Rev Immunol*, vol. 14, pp. 73-99, 1996.
- [50] K. Jacobsen, J. Kravitz, P. W. Kincade, and D. G. Osmond, "Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice," *Blood*, vol. 87, pp. 73-82, Jan 1 1996.
- [51] K. Akashi, M. Kondo, S. Cheshier, J. Shizuru, K. Gandy, J. Domen, *et al.*, "Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors," *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, vol. 64, pp. 1-12, 1999.
- [52] J. Alberola-Ila, K. A. Hogquist, K. A. Swan, M. J. Bevan, and R. M. Perlmutter, "Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways," *J Exp Med*, vol. 184, pp. 9-18, Jul 1 1996.

- [53] M. J. Miller, A. S. Hejazi, S. H. Wei, M. D. Cahalan, and I. Parker, "T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 998-1003, Jan 27 2004.
- [54] S. K. Bromley, W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, *et al.*, "The immunological synapse," *Annu Rev Immunol*, vol. 19, pp. 375-96, 2001.
- [55] T. R. Mosmann and R. L. Coffman, "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties," *Annu Rev Immunol*, vol. 7, pp. 145-73, 1989.
- [56] H. Park, Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, *et al.*, "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17," *Nat Immunol*, vol. 6, pp. 1133-41, Nov 2005.
- [57] L. E. Harrington, R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, *et al.*, "Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages," *Nat Immunol*, vol. 6, pp. 1123-32, Nov 2005.
- [58] V. Lazarevic and L. H. Glimcher, "T-bet in disease," *Nat Immunol*, vol. 12, pp. 597-606, Jul 2011.
- [59] G. R. Lee, "Transcriptional regulation of T helper type 2 differentiation," *Immunology*, vol. 141, pp. 498-505, Apr 2014.
- [60] L. Yang, D. E. Anderson, C. Baecher-Allan, W. D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, *et al.*, "IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells," *Nature*, vol. 454, pp. 350-2, Jul 17 2008.
- [61] N. Manel, D. Unutmaz, and D. R. Littman, "The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma," *Nat Immunol*, vol. 9, pp. 641-9, Jun 2008.
- [62] X. O. Yang, B. P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H. S. Kang, Y. Chung, *et al.*, "T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma," *Immunity*, vol. 28, pp. 29-39, Jan 2008.
- [63] X. O. Yang, A. D. Panopoulos, R. Nurieva, S. H. Chang, D. Wang, S. S. Watowich, *et al.*, "STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells," *J Biol Chem*, vol. 282, pp. 9358-63, Mar 30 2007.
- [64] A. Brustle, S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, *et al.*, "The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4," *Nat Immunol*, vol. 8, pp. 958-66, Sep 2007.
- [65] F. Zhang, G. Meng, and W. Strober, "Interactions among the transcription factors Runx1, RORgamma and Foxp3 regulate the differentiation of

- interleukin 17-producing T cells," *Nat Immunol*, vol. 9, pp. 1297-306, Nov 2008.
- [66] W. Ouyang, J. K. Kolls, and Y. Zheng, "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation," *Immunity*, vol. 28, pp. 454-67, Apr 2008.
- [67] M. V. Lukens, D. Kruijsen, F. E. Coenjaerts, J. L. Kimpen, and G. M. van Bleek, "Respiratory syncytial virus-induced activation and migration of respiratory dendritic cells and subsequent antigen presentation in the lung-draining lymph node," *J Virol*, vol. 83, pp. 7235-43, Jul 2009.
- [68] J. E. Durbin, T. R. Johnson, R. K. Durbin, S. E. Mertz, R. A. Morotti, R. S. Peebles, *et al.*, "The role of IFN in respiratory syncytial virus pathogenesis," *J Immunol*, vol. 168, pp. 2944-52, Mar 15 2002.
- [69] B. S. Graham, L. A. Bunton, P. F. Wright, and D. T. Karzon, "Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice," *J Clin Invest*, vol. 88, pp. 1026-33, Sep 1991.
- [70] D. W. Hunt, H. I. Huppertz, H. J. Jiang, and R. E. Petty, "Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity," *Blood*, vol. 84, pp. 4333-43, Dec 15 1994.
- [71] N. W. Lukacs, J. J. Smit, S. Mukherjee, S. B. Morris, G. Nunez, and D. M. Lindell, "Respiratory virus-induced TLR7 activation controls IL-17-associated increased mucus via IL-23 regulation," *J Immunol*, vol. 185, pp. 2231-9, Aug 15 2010.
- [72] S. Mukherjee, D. M. Lindell, A. A. Berlin, S. B. Morris, T. P. Shanley, M. B. Hershenson, *et al.*, "IL-17-induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease," *Am J Pathol*, vol. 179, pp. 248-58, Jul 2011.
- [73] L. A. Abbas AK, Pillai S, *Inmunología celular y molecular*. España: Elsevier, 2012.
- [74] M. C. Carroll, "Complement and humoral immunity," *Vaccine*, vol. 26 Suppl 8, pp. 128-33, Dec 30 2008.
- [75] C. Pasare and R. Medzhitov, "Control of B-cell responses by Toll-like receptors," *Nature*, vol. 438, pp. 364-8, Nov 17 2005.
- [76] C. Pifferi, N. Berthet, and O. Renaudet, "Cyclopeptide scaffolds in carbohydrate-based synthetic vaccines," *Biomater Sci*, vol. 5, pp. 953-965, May 2 2017.
- [77] J. Jacob and G. Kelsoe, "In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers," *J Exp Med*, vol. 176, pp. 679-87, Sep 1 1992.

- [78] P. Garside, E. Ingulli, R. R. Merica, J. G. Johnson, R. J. Noelle, and M. K. Jenkins, "Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node," *Science*, vol. 281, pp. 96-9, Jul 3 1998.
- [79] K. A. Pape, V. Kouskoff, D. Nemazee, H. L. Tang, J. G. Cyster, L. E. Tze, *et al.*, "Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response," *J Exp Med*, vol. 197, pp. 1677-87, Jun 16 2003.
- [80] R. T. Stein, D. Sherrill, W. J. Morgan, C. J. Holberg, M. Halonen, L. M. Taussig, *et al.*, "Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years," *Lancet*, vol. 354, pp. 541-5, Aug 14 1999.
- [81] C. B. Hall, *Respiratory syncytial virus*. In: Feigin RD, Cherry JD. (eds) *Textbook of Pediatric Infectious Diseases* Philadelphia, PA: WB Saunders, 1998.
- [82] G. L. Toms, R. Quinn, and J. W. Robinson, "Undetectable IgE responses after respiratory syncytial virus infection," *Arch Dis Child*, vol. 74, pp. 126-30, Feb 1996.
- [83] N. D. Day, P. J. Branigan, C. Liu, L. L. Gutshall, J. Luo, J. A. Melero, *et al.*, "Contribution of cysteine residues in the extracellular domain of the F protein of human respiratory syncytial virus to its function," *Virology*, vol. 3, p. 34, 2006.
- [84] M. N. Teng and P. L. Collins, "The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo," *J Virol*, vol. 76, pp. 6164-71, Jun 2002.
- [85] F. L. Rock, G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, and J. F. Bazan, "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, pp. 588-93, Jan 20 1998.
- [86] T. Huyton, J. Rossjohn, and M. Wilce, "Toll-like receptors: structural pieces of a curve-shaped puzzle," *Immunol Cell Biol*, vol. 85, pp. 406-10, Aug-Sep 2007.
- [87] M. Hallman, M. Ramet, and R. A. Ezekowitz, "Toll-like receptors as sensors of pathogens," *Pediatr Res*, vol. 50, pp. 315-21, Sep 2001.
- [88] F. Sandor and M. Buc, "Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands," *Folia Biol (Praha)*, vol. 51, pp. 148-57, 2005.
- [89] R. Malley, P. Henneke, S. C. Morse, M. J. Cieslewicz, M. Lipsitch, C. M. Thompson, *et al.*, "Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 1966-71, Feb 18 2003.
- [90] A. Srivastava, P. Henneke, A. Visintin, S. C. Morse, V. Martin, C. Watkins, *et al.*, "The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4



- dependent and protects against pneumococcal disease," *Infect Immun*, vol. 73, pp. 6479-87, Oct 2005.
- [91] E. Lorenz, J. P. Mira, K. L. Frees, and D. A. Schwartz, "Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock," *Arch Intern Med*, vol. 162, pp. 1028-32, May 13 2002.
- [92] D. Jiang, J. Liang, J. Fan, S. Yu, S. Chen, Y. Luo, *et al.*, "Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan," *Nat Med*, vol. 11, pp. 1173-9, Nov 2005.
- [93] S. Jeyaseelan, H. W. Chu, S. K. Young, M. W. Freeman, and G. S. Worthen, "Distinct roles of pattern recognition receptors CD14 and Toll-like receptor 4 in acute lung injury," *Infect Immun*, vol. 73, pp. 1754-63, Mar 2005.
- [94] H. Ushio, A. Nakao, V. Supajatura, K. Miyake, K. Okumura, and H. Ogawa, "MD-2 is required for the full responsiveness of mast cells to LPS but not to PGN," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 323, pp. 491-8, Oct 15 2004.
- [95] E. A. Misch and T. R. Hawn, "Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease," *Clin Sci (Lond)*, vol. 114, pp. 347-60, Mar 2008.
- [96] C. Watts, "Location, location, location: identifying the neighborhoods of LPS signaling," *Nat Immunol*, vol. 9, pp. 343-5, Apr 2008.
- [97] P. Rallabhandi, J. Bell, M. S. Boukhvalova, A. Medvedev, E. Lorenz, M. Arditi, *et al.*, "Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling," *J Immunol*, vol. 177, pp. 322-32, Jul 1 2006.
- [98] J. Dupuis and C. J. O'Donnell, "Interpreting results of large-scale genetic association studies: separating gold from fool's gold," *Jama*, vol. 297, pp. 529-31, Feb 7 2007.
- [99] A. T. Hattersley and M. I. McCarthy, "What makes a good genetic association study?," *Lancet*, vol. 366, pp. 1315-23, Oct 8 2005.
- [100] D. J. Hunter and P. Kraft, "Drinking from the fire hose--statistical issues in genomewide association studies," *N Engl J Med*, vol. 357, pp. 436-9, Aug 2 2007.
- [101] N. C. Arbour, E. Lorenz, B. C. Schutte, J. Zabner, J. N. Kline, M. Jones, *et al.*, "TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans," *Nat Genet*, vol. 25, pp. 187-91, Jun 2000.
- [102] D. M. Agnese, J. E. Calvano, S. J. Hahm, S. M. Coyle, S. A. Corbett, S. E. Calvano, *et al.*, "Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections," *J Infect Dis*, vol. 186, pp. 1522-5, Nov 15 2002.
- [103] S. Kesh, N. Y. Mensah, P. Peterlongo, D. Jaffe, K. Hsu, V. D. B. M., *et al.*, "TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to

- invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1062, pp. 95-103, Dec 2005.
- [104] A. Allen, S. Obaro, K. Bojang, A. A. Awomoyi, B. M. Greenwood, H. Whittle, *et al.*, "Variation in Toll-like receptor 4 and susceptibility to group A meningococcal meningitis in Gambian children," *Pediatr Infect Dis J*, vol. 22, pp. 1018-9, Nov 2003.
- [105] N. J. Child, I. A. Yang, M. C. Pulletz, K. de Courcy-Golder, A. L. Andrews, V. J. Pappachan, *et al.*, "Polymorphisms in Toll-like receptor 4 and the systemic inflammatory response syndrome," *Biochem Soc Trans*, vol. 31, pp. 652-3, Jun 2003.
- [106] C. Feterowski, K. Emmanuilidis, T. Miethke, K. Gerauer, M. Rump, K. Ulm, *et al.*, "Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis," *Immunology*, vol. 109, pp. 426-31, Jul 2003.
- [107] A. Mandelberg, G. Tal, L. Naugolny, K. Cesar, A. Oron, S. Houry, *et al.*, "Lipopolysaccharide hyporesponsiveness as a risk factor for intensive care unit hospitalization in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis," *Clin Exp Immunol*, vol. 144, pp. 48-52, Apr 2006.
- [108] O. Michel, T. D. LeVan, D. Stern, M. Dentener, J. Thorn, D. Gnat, *et al.*, "Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 112, pp. 923-9, Nov 2003.
- [109] F. P. Mockenhaupt, J. P. Cramer, L. Hamann, M. S. Stegemann, J. Eckert, N. R. Oh, *et al.*, "Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, pp. 177-82, Jan 3 2006.
- [110] L. Moens, J. Verhaegen, M. Pierik, S. Vermeire, K. De Boeck, W. E. Peetermans, *et al.*, "Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms in invasive pneumococcal disease," *Microbes Infect*, vol. 9, pp. 15-20, Jan 2007.
- [111] S. A. Morre, L. S. Murillo, J. Spaargaren, H. S. Fennema, and A. S. Pena, "Role of the toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism in susceptibility to *Candida albicans* infection," *J Infect Dis*, vol. 186, pp. 1377-9; author reply 1379, Nov 1 2002.
- [112] S. M. Opal and C. E. Huber, "Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock," *Crit Care*, vol. 6, pp. 125-36, Apr 2002.
- [113] M. Rezazadeh, M. Hajilooi, A. Rafiei, M. Haidari, E. Nikoopour, F. Keramat, *et al.*, "TLR4 polymorphism in Iranian patients with brucellosis," *J Infect*, vol. 53, pp. 206-10, Sep 2006.
- [114] I. Smirnova, N. Mann, A. Dols, H. H. Derkx, M. L. Hibberd, M. Levin, *et al.*, "Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4

- mutations in meningococcal susceptibility," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 6075-80, May 13 2003.
- [115] B. Ferwerda, G. S. Kibiki, M. G. Netea, W. M. Dolmans, and A. J. van der Ven, "The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant and tuberculosis susceptibility in HIV-infected patients in Tanzania," *Aids*, vol. 21, pp. 1375-7, Jun 19 2007.
- [116] A. G. Hise, F. E. Hazlett, M. J. Bockarie, P. A. Zimmerman, D. J. Tisch, and J. W. Kazura, "Polymorphisms of innate immunity genes and susceptibility to lymphatic filariasis," *Genes Immun*, vol. 4, pp. 524-7, Oct 2003.
- [117] M. Fageras Bottcher, M. Hmani-Aifa, A. Lindstrom, M. C. Jenmalm, X. M. Mai, L. Nilsson, *et al.*, "A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 114, pp. 561-7, Sep 2004.
- [118] S. von Aulock, N. W. Schroder, K. Gueinzus, S. Traub, S. Hoffmann, K. Graf, *et al.*, "Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood," *J Infect Dis*, vol. 188, pp. 938-43, Sep 15 2003.
- [119] S. C. Paulus, A. F. Hirschfeld, R. E. Victor, J. Brunstein, E. Thomas, and S. E. Turvey, "Common human Toll-like receptor 4 polymorphisms--role in susceptibility to respiratory syncytial virus infection and functional immunological relevance," *Clin Immunol*, vol. 123, pp. 252-7, Jun 2007.
- [120] E. F. Schippers, C. van 't Veer, S. van Voorden, C. A. Martina, T. W. Huizinga, S. le Cessie, *et al.*, "IL-10 and toll-like receptor-4 polymorphisms and the in vivo and ex vivo response to endotoxin," *Cytokine*, vol. 29, pp. 215-28, Mar 7 2005.
- [121] C. Erridge, J. Stewart, and I. R. Poxton, "Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling," *J Exp Med*, vol. 197, pp. 1787-91, Jun 16 2003.
- [122] R. C. Barber, L. Y. Chang, B. D. Arnoldo, G. F. Purdue, J. L. Hunt, J. W. Horton, *et al.*, "Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury," *Clin Med Res*, vol. 4, pp. 250-5, Dec 2006.
- [123] T. R. Hawn, A. Verbon, M. Janer, L. P. Zhao, B. Beutler, and A. Aderem, "Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, pp. 2487-9, Feb 15 2005.
- [124] D. Jiang, J. Liang, Y. Li, and P. W. Noble, "The role of Toll-like receptors in non-infectious lung injury," *Cell Res*, vol. 16, pp. 693-701, Aug 2006.
- [125] F. Kim, M. Pham, I. Luttrell, D. D. Bannerman, J. Tupper, J. Thaler, *et al.*, "Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity," *Circ Res*, vol. 100, pp. 1589-96, Jun 8 2007.

- [126] I. D. Arnott, E. R. Nimmo, H. E. Drummond, J. Fennell, B. R. Smith, E. MacKinlay, *et al.*, "NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe?," *Genes Immun*, vol. 5, pp. 417-25, Aug 2004.
- [127] V. Supajatura, H. Ushio, A. Nakao, S. Akira, K. Okumura, C. Ra, *et al.*, "Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity," *J Clin Invest*, vol. 109, pp. 1351-9, May 2002.
- [128] L. M. Haynes, D. D. Moore, E. A. Kurt-Jones, R. W. Finberg, L. J. Anderson, and R. A. Tripp, "Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus," *J Virol*, vol. 75, pp. 10730-7, Nov 2001.
- [129] M. T. Caballero, M. E. Serra, P. L. Acosta, J. Marzec, L. Gibbons, M. Salim, *et al.*, "TLR4 genotype and environmental LPS mediate RSV bronchiolitis through Th2 polarization," *J Clin Invest*, vol. 125, pp. 571-82, Feb 2015.
- [130] S. J. Hoffman, F. R. Laham, and F. P. Polack, "Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response," *Microbes Infect*, vol. 6, pp. 767-72, Jul 2004.
- [131] R. A. Karron, P. F. Wright, R. B. Belshe, B. Thumar, R. Casey, F. Newman, *et al.*, "Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants," *J Infect Dis*, vol. 191, pp. 1093-104, Apr 1 2005.
- [132] J. Hull, A. Thomson, and D. Kwiatkowski, "Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families," *Thorax*, vol. 55, pp. 1023-7, Dec 2000.
- [133] P. J. Openshaw, "Immunity and immunopathology to respiratory syncytial virus. The mouse model," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 152, pp. S59-62, Oct 1995.
- [134] P. S. McNamara, B. F. Flanagan, L. M. Baldwin, P. Newland, C. A. Hart, and R. L. Smyth, "Interleukin 9 production in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis," *Lancet*, vol. 363, pp. 1031-7, Mar 27 2004.
- [135] B. Hoebee, E. Rietveld, L. Bont, M. Oosten, H. M. Hodemaekers, N. J. Nagelkerke, *et al.*, "Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms," *J Infect Dis*, vol. 187, pp. 2-11, Jan 1 2003.
- [136] J. P. Legg, I. R. Hussain, J. A. Warner, S. L. Johnston, and J. O. Warner, "Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 168, pp. 633-9, Sep 15 2003.
- [137] S. Choudhry, P. C. Avila, S. Nazario, N. Ung, J. Kho, J. R. Rodriguez-Santana, *et al.*, "CD14 tobacco gene-environment interaction modifies asthma severity and immunoglobulin E levels in Latinos with asthma," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 172, pp. 173-82, Jul 15 2005.

- [138] A. Simpson, S. L. John, F. Jury, R. Niven, A. Woodcock, W. E. Ollier, *et al.*, "Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease: an interaction between genes and the environment," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 174, pp. 386-92, Aug 15 2006.
- [139] D. Vercelli, "Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 113, pp. 381-6; quiz 387, Mar 2004.
- [140] A. Zambelli-Weiner, E. Ehrlich, M. L. Stockton, A. V. Grant, S. Zhang, P. N. Levett, *et al.*, "Evaluation of the CD14/-260 polymorphism and house dust endotoxin exposure in the Barbados Asthma Genetics Study," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 115, pp. 1203-9, Jun 2005.
- [141] J. M. Ciencewicky, X. Wang, J. Marzec, M. E. Serra, D. A. Bell, F. P. Polack, *et al.*, "A genetic model of differential susceptibility to human respiratory syncytial virus (RSV) infection," *FASEB J*, vol. 28, pp. 1947-56, Apr 2014.
- [142] J. Chin, R. L. Magoffin, L. A. Shearer, J. H. Schieble, and E. H. Lennette, "Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population," *Am J Epidemiol*, vol. 89, pp. 449-63, Apr 1969.
- [143] A. Z. Kapikian, R. H. Mitchell, R. M. Chanock, R. A. Shvedoff, and C. E. Stewart, "An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine," *Am J Epidemiol*, vol. 89, pp. 405-21, Apr 1969.
- [144] V. A. Fulginiti, J. J. Eller, O. F. Sieber, J. W. Joyner, M. Minamitani, and G. Meiklejohn, "Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine," *Am J Epidemiol*, vol. 89, pp. 435-48, Apr 1969.
- [145] M. Connors, N. A. Giese, A. B. Kulkarni, C. Y. Firestone, H. C. Morse, 3rd, and B. R. Murphy, "Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10," *J Virol*, vol. 68, pp. 5321-5, Aug 1994.
- [146] A. Moghaddam, W. Olszewska, B. Wang, J. S. Tregoning, R. Helson, Q. J. Sattentau, *et al.*, "A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines," *Nat Med*, vol. 12, pp. 905-7, Aug 2006.
- [147] A. Srikiatkachorn and T. J. Braciale, "Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection," *J Exp Med*, vol. 186, pp. 421-32, Aug 4 1997.

- [148] F. P. Polack, M. N. Teng, P. L. Collins, G. A. Prince, M. Exner, H. Regele, *et al.*, "A Role for Immune Complexes in Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 196, pp. 859-865, 2002.
- [149] M. F. Delgado, S. Coviello, A. C. Monsalvo, G. A. Melendi, J. Z. Hernandez, J. P. Batalle, *et al.*, "Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease," *Nat Med*, vol. 15, pp. 34-41, Jan 2009.
- [150] N. Marr and S. E. Turvey, "Role of human TLR4 in respiratory syncytial virus-induced NF-kappaB activation, viral entry and replication," *Innate Immun*, vol. 18, pp. 856-65, Dec 2012.
- [151] M. High, H. Y. Cho, J. Marzec, T. Wiltshire, K. C. Verhein, M. T. Caballero, *et al.*, "Determinants of host susceptibility to murine respiratory syncytial virus (RSV) disease identify a role for the innate immunity scavenger receptor MARCO gene in human infants," *EBioMedicine*, vol. 11, pp. 73-84, Sep 2016.
- [152] G. A. Prince, A. B. Jenson, R. L. Horswood, E. Camargo, and R. M. Chanock, "The pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in cotton rats," *Am J Pathol*, vol. 93, pp. 771-91, Dec 1978.
- [153] B. Ferwerda, M. B. McCall, S. Alonso, E. J. Giamarellos-Bourboulis, M. Mouktaroudi, N. Izagirre, *et al.*, "TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 16645-50, Oct 16 2007.
- [154] B. J. Coviello S, Delgado MF, Diaz L, Pontoriero A, Collins P, Savy V, Polack FP. , "TLR4 modulates the protective antibody responses against RSV through its interaction with the viral glycoprotein.," *RSV symposium*, vol. Florida ,USA, 2007.
- [155] A. A. Awomoyi, P. Rallabhandi, T. I. Pollin, E. Lorenz, M. B. Szein, M. S. Boukhvalova, *et al.*, "Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children," *J Immunol*, vol. 179, pp. 3171-7, Sep 1 2007.
- [156] L. Rodriguez, E. Olmedillas, V. Mas, M. Vazquez, O. Cano, M. C. Terron, *et al.*, "Generation of monoclonal antibodies specific of the postfusion conformation of the Pneumovirinae fusion (F) protein," *J Virol Methods*, vol. 224, pp. 1-8, Nov 2015.
- [157] C. Palomo, V. Mas, M. Thom, M. Vazquez, O. Cano, M. C. Terron, *et al.*, "Influence of Respiratory Syncytial Virus F Glycoprotein Conformation on Induction of Protective Immune Responses," *J Virol*, vol. 90, pp. 5485-5498, Jun 1 2016.
- [158] M. S. Gilman, C. A. Castellanos, M. Chen, J. O. Ngwuta, E. Goodwin, S. M. Moin, *et al.*, "Rapid profiling of RSV antibody repertoires from the memory B cells of naturally infected adult donors," *Sci Immunol*, vol. 1, Dec 16 2016.

- [159] F. M. Ferolla, D. R. Hijano, P. L. Acosta, A. Rodriguez, K. Duenas, A. Sancilio, *et al.*, "Macronutrients during pregnancy and life-threatening respiratory syncytial virus infections in children," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 187, pp. 983-90, May 1 2013.
- [160] F. D. Martinez, "Gene-environment interactions in asthma: with apologies to William of Ockham," *Proc Am Thorac Soc*, vol. 4, pp. 26-31, Jan 2007.
- [161] L. A. Smit, V. Siroux, E. Bouzigon, M. P. Oryszczyn, M. Lathrop, F. Demenais, *et al.*, "CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 179, pp. 363-8, Mar 1 2009.