



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Análisis funcional de las células T CD4+ en niños menores de 2 años: su impacto en la respuesta inmune frente a infecciones

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de
Buenos Aires
en el área de Química Biológica

Lic. Inés Sananez

Directora: Dra. Lourdes Arruvito

Consejero de estudios: Dr. Luis Scolaro

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA
(INBIRS), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires – CONICET.

Buenos Aires, 2022

Análisis funcional de las células T CD4+ en niños menores de 2 años: su impacto en la respuesta inmune frente a infecciones

La infección por el Virus Sincicial Respiratorio (VSR) representa mundialmente la principal causa de hospitalización en niños menores de 5 años. Mientras que la mayoría de los niños que padecen infección por VSR sufren una enfermedad leve, del 2 al 5 % de ellos padecen un cuadro severo. Al respecto, los factores que predicen la severidad de la enfermedad no se encuentran completamente esclarecidos. Previamente, nuestro grupo demostró que, durante la infección aguda y severa por VSR en niños menores de 2 años, el compartimento de células T CD4+ regulatorias (Tregs) de sangre periférica se encuentra depletado. Posteriormente, determinamos que las células T CD4+ son permisivas a la infección por VSR, lo que afecta su función.

El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar las consecuencias funcionales que impone la infección por VSR en el compartimento de células T en niños hospitalizados menores de 2 años. En primer lugar, evaluamos si la infección por VSR se asocia a una desregulación en la vía de señalización de la IL-2, citocina clave para el compartimento de las células T, en particular las Tregs. Observamos que las células T CD4+ de los niños hospitalizados por infección por VSR exhiben una menor producción de IL-2 en comparación con niños sanos, que correlacionó con la severidad de la enfermedad. El agregado de IL-2 exógena restauró parcialmente la proliferación de las células T CD4+ y la expresión de FOXP3 en niños sanos y niños con VSR. El hecho de que la vía de señalización de IL-2 y la fosforilación de STAT5 no se encontraran afectadas sugirió la presencia de otros mecanismos limitantes de IL-2. Los niños con VSR presentaron niveles elevados de CD25 soluble plasmático, un receptor secuestrador que disminuye la biodisponibilidad de IL-2. En segundo lugar, considerando que los niños menores de seis meses tienen elevados niveles de anticuerpos maternos circulantes, analizamos si los complejos inmunes que contienen IgG, a través de la unión al CD32, pueden promover la estimulación de las células T disminuyendo su umbral de activación y favoreciendo sus funciones efectoras. Inicialmente, establecimos una alta frecuencia de células T CD4+ y T CD8+ circulantes CD32+ en los niños con VSR. Estas células mostraron un predominio de la isoforma activadora del CD32 y un fenotipo compatible con células activadas relacionadas con los perfiles Th1, Tfh y Tregs. La estimulación de las células T a través de CD32 promovió la secreción de un amplio patrón de citocinas y la actividad citotóxica. Por último, la frecuencia de células T CD4+ y CD8+ CD32+ correlacionó negativamente con la severidad de la enfermedad. El desarrollo del presente trabajo de tesis permitió caracterizar, al menos parcialmente, dos mecanismos involucrados en la regulación de la respuesta mediada por las células T durante la infección por VSR en la población pediátrica. Estos hallazgos podrían impactar en diversas áreas del campo de la salud incluyendo infecciones, autoinmunidad y cáncer.

Palabras clave: VSR, pediatría, células T, citocinas, anticuerpos, receptores Fc de IgG.

Functional analysis of CD4+ T cells in children younger than 2 years-old: impact in immune responses against infections

Respiratory Syncytial Virus (RSV) infection is the leading cause of hospitalization in children under 5 years of age worldwide. While most children with RSV infection have a mild illness, 2-5 % of them develop a severe disease. In this regard, risk factors for severe disease have not been fully identified. Previously, our group demonstrated that circulating regulatory CD4+ T cell compartment (Tregs) is depleted during acute and severe RSV infection in children under 2 years of age. Afterward, we determined that CD4+ T cells are permissive to RSV infection which affects their function.

The main aim of this work was to characterize the functional consequences on the T cell compartment during RSV infection in hospitalized children under 2 years of age. Firstly, we evaluated whether RSV infection is associated with a dysregulation in the IL-2 signaling pathway, a key cytokine for the T cell compartment, particularly for Tregs. We observed that CD4+ T cells from children hospitalized with RSV infection exhibit lower IL-2 production compared to healthy children, which correlated with disease severity. The addition of exogenous IL-2 partially restored CD4+ T cell proliferation and FOXP3 expression in healthy and RSV children. Additionally, the fact that IL-2 signaling pathway and STAT5 phosphorylation were not affected suggested the presence of other limiting mechanisms of IL-2. Infants with RSV infection showed elevated levels of plasmatic soluble CD25, a scavenger receptor that decreases IL-2 bioavailability. Secondly, considering that children under six months of age have elevated levels of circulating maternal antibodies, we analyzed whether immune complexes containing IgG can promote the stimulation of T cells and their effector functions in T cells by decreasing their activation threshold through CD32 binding. Initially, we found a high frequency of circulating CD4+ T cells and CD32+ CD8+ T cells in RSV children. These cells showed a predominance of the activating isoform of CD32 and a phenotype compatible with activated cells related with Th1, Tfh and Tregs profiles. Moreover, T cells stimulation through CD32 promoted the secretion of a broad pattern of cytokines and cytotoxic activity. Finally, the frequency of CD4+ and CD8+ CD32+ T cells correlated negatively with disease severity.

This project allowed to characterize, at least partially, two mechanisms involved in the regulation of T cells-mediated immunity during RSV infection in pediatric population. These findings could have an impact in different health field areas including infections, autoimmunity, and cancer.

Key words: RSV, pediatric, T cells, cytokines, antibodies, Fc receptors for IgG.

Muchas personas estuvieron involucradas, directa o indirectamente, en esta extensa y sostenida trayectoria que hoy concluye con este manuscrito. Todas ellas han colaborado en múltiples aspectos, tanto en lo académico como en lo personal y afectivo, así que, con mucha gratitud, acá van mis agradecimientos:

A Lour, mi directora de Tesis, por estar presente en todo momento y confiar en mí para poder llevar a cabo este proyecto. Gracias por todas las enseñanzas, los consejos y el apoyo. A Jorge por sus ideas y por haber colaborado con este trabajo.

A todxs lxs niñxs que, siendo tan pequeñxs y sin conocimiento de causa, con el consentimiento de sus madres y/o padres constituyeron un gran aporte a la ciencia y, particularmente, al entendimiento de la enfermedad por VSR. La promisoría vacuna pronto llegará.

A Silvina y a todo el equipo de médicxs y enfermerxs del Hospital Pedro de Elizalde (ex Casa Cuna), que pese a todas las dificultades con las que se enfrentan día a día en el sistema de salud pública, contribuyeron siempre para poder reclutar y obtener las tan valiosas muestras de sangre de lxs niñxs.

A todxs lxs becarixs del INBIRS. Todxs ellxs (lxs que ya no están y los que siguen) hicieron que las cosas fueran más sencillas (experimentos, la vida dentro y fuera del labo...). Si de compañerismo habláramos, lxs pibes del INBIRS tienen mucho que hablar y dar. A sus asados de los viernes, con Anita de *party planner* y Alvarito con sus locros y chorizos a la pomarola. Afortunada por haberme encontrado con estas inmensas personas.

A todo el resto del personal del INBIRS. Directivos, personal de limpieza, investigadores, técnicxs, personal de apoyo, administrativxs. Siempre dispuestos a cooperar y dar lo mejor de unx, hicieron del Instituto un cálido lugar de trabajo.

A mis compañeras de grupo. Pía, Vane, Coni. No hubiera sido lo mismo sin este buen grupo de trabajo en equipo, donde siempre primó la colaboración, la empatía, la amistad, ¡y los budines!

A mis chamigxs de acá, de allá, de ahora y de siempre. A las pibas de Goya, y a las pibas de la facu, la Jessi, Luli, la Misio. Gracias por haber sido apoyo, oídos, salidas, viajes, cerveza, vermú o una pizza.

Al Dr. Mark Peeples y a todo el gran equipo de trabajo del *Nationwide Children's Hospital*, por recibirme en su laboratorio, hacerme sentir 'como en casa' y por todas sus enseñanzas.

A mi familia. A mi mamá, Juana *Banana* y a mi hermana, Ange, por todo su afecto, sostén, motivación, por haber colaborado a llegar a donde estoy. Gracias por estar en todo momento.

A Agustín, por haber sido un gran apoyo y escucharme siempre, por sus consejos, palabras de aliento y amor.

Y a todxs nosotrxs que estamos aquí, alcanzando el final del recorrido luego de haber sorteado diversos obstáculos y una pandemia, pero siempre encontrándonos unidxs en pos de nuestros derechos laborales.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS.....	8
ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 El Virus Sincicial Respiratorio	15
1.1.1 Características del virus.....	15
1.1.2 Ciclo de replicación.....	16
1.1.3 Infección por VSR en humanos.....	17
1.1.3.1 Epidemiología.....	18
1.1.3.2 Principales factores de riesgo en niños.....	18
1.1.4 Vacunas contra el VSR.....	19
1.2 Compartimento de células T	20
1.2.1 Células T <i>naïve</i>	20
1.2.2 Células T CD4+ efectoras y regulatorias	21
1.2.3 Células T CD8+ efectoras	24
1.2.4 Células T de memoria	25
1.2.5 Respuesta mediada por células T en la infección por VSR.....	26
1.3 Señalización a través del receptor de IL-2.....	28
1.3.1 Vía de señalización de IL-2 en la infección por VSR.....	29
1.4 Receptores para la porción Fc de la IgG.....	30
1.4.1 Receptor para la porción Fc de IgG de tipo II (CD32) en células T	32
1.4.2 Facilitación de la infección mediada por anticuerpos (ADE).....	33
1.4.3 Rol de los anticuerpos y receptores para la porción Fc de IgG en la infección por VSR.....	34
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1 Población de estudio	40
3.2 Medios de cultivo	41
3.3 Donantes de sangre.....	41
3.3.1 Muestras de sangre periférica de niños sanos y con VSR	41
3.3.2 Muestras de sangre periférica de adultos.....	42
3.4 Procesamiento de las muestras de sangre periférica	42
3.4.1 Obtención de plasma.....	42
3.4.2 Aislamiento de PBMCs	42
3.5 Purificación de subpoblaciones celulares	42
3.5.1 Purificación de células T CD8+ por selección negativa inmunomagnética	42

3.5.2	Purificación de células T CD4+ y monocitos por selección negativa por gradiente de inmunodensidad.....	43
3.5.3	Purificación de células por citometría de flujo o <i>Cell Sorting</i>	43
3.5.3.1	Purificación de células T CD4+ y CD8+ por selección positiva.....	44
3.5.3.2	Purificación de células T por selección negativa	45
3.6	Cultivos celulares.....	45
3.6.1	PBMCs de niños.....	46
3.6.1.1	Producción <i>de novo</i> de IL-2	46
3.6.1.2	Proliferación del compartimento de células T CD4+ y secreción de citocinas al medio extracelular.....	46
3.6.1.3	Estimulación con IL-2.....	46
3.6.1.4	Clivaje de CD25 por activación celular	46
3.6.1.5	Ensayo de unión de IgG agregada	47
3.6.2	Ensayo de supresión por células T CD4+ estimuladas con IL-2	47
3.6.3	Cultivo de PBMCs de donantes adultos en presencia de plasma de niños.....	48
3.6.4	Estimulación de células T mediante ligación del CD32	48
3.6.4.1	Evaluación de la producción de citocinas por las células T CD4+ estimuladas a través del CD32	49
3.6.4.2	Evaluación de la degranulación de las células T CD8+ estimuladas a través del CD32	49
3.7	Marcaciones celulares y análisis por citometría de flujo	50
3.7.1	Procedimiento general y reactivos utilizados	50
3.7.2	Evaluación de marcadores de superficie celular	51
3.7.2.1	Análisis de los perfiles funcionales de células T CD4+ y células T de memoria.....	52
3.7.2.2	Determinación de la unión de IgGa por las células T	53
3.7.3	Evaluación de la expresión de moléculas por tinción intracelular	53
3.7.3.1	Determinación de IL-2 intracitoplasmática	53
3.7.3.2	Determinación del antígeno nuclear Ki-67 para medir proliferación celular.....	53
3.7.3.3	Determinación del factor de transcripción FOXP3.....	54
3.7.3.4	Evaluación de la proliferación celular por el método de dilución de CFSE	54
3.7.3.5	Determinación del transductor de señal STAT5 fosforilado	55
3.7.3.6	Determinación del antígeno viral de VSR.....	55
3.8	Cuantificación de factores solubles.....	56
3.8.1	Ensayos multiplex de cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo por citometría de flujo.....	56
3.8.2	Cuantificación de niveles de sCD25 por ELISA.....	57
3.8.3	Cuantificación de IL-17 en sobrenadantes de cultivo por ELISA	58

3.9	Microscopía confocal	58
3.10	RT-PCR cuantitativa	58
3.11	Línea celular HEp-2	60
3.12	Preparación del stock viral de VSR	60
3.12.1	Cepa viral	60
3.12.2	Generación del stock viral	60
3.12.3	Purificación del stock viral	61
3.12.4	Titulación del stock viral	61
3.13	Ensayo de facilitación de la infección mediada por anticuerpos (ADE)	62
3.13.1	Puesta a punto del modelo de ADE de VSR.....	62
3.13.1.1	Determinación de la MOI	62
3.13.1.2	Formación del complejo inmune y determinación de la dosis subneutralizante de anticuerpos anti-VSR	63
3.13.2	Ensayo de ADE de la infección por VSR en células T de niños VSR+	65
3.14	Análisis estadístico	66
4.	RESULTADOS.....	67
4.1	Descripción de la población en estudio: pacientes con VSR	68
4.2	Evaluación de la capacidad de producir IL-2 y respuesta a esta citocina por parte del compartimento de células T CD4+ de los niños infectados con VSR. Su asociación con la severidad de la enfermedad	68
4.2.1	Las células T CD4+ de los niños VSR+ expresan menos IL-2 en comparación con los niños sanos	68
4.2.2	Las células T CD4+ de los niños VSR+ muestran una menor respuesta proliferativa en comparación con los niños sanos.....	70
4.2.3	El agregado de IL-2 restaura parcialmente la frecuencia y proliferación de Tregs en niños VSR+	71
4.2.4	Las células T CD4+ estimuladas con IL-2 muestran actividad supresora.....	73
4.2.5	La adición de IL-2 induce la fosforilación de STAT5 en células T CD4+ de ambos grupos de donantes en forma similar	74
4.2.6	Los niños VSR+ presentan mayores niveles de sCD25 en plasma que los niños sanos.	76
4.2.7	El plasma de niños VSR+ disminuye la frecuencia de Tregs de donantes sanos.....	76
4.2.8	El agregado de sCD25 recombinante disminuye la frecuencia de células T CD4+ pSTAT5+ y Tregs	78
4.2.9	Las células T CD4+ efectoras de niños VSR+ presentan una alta expresión de CD25 ...	80
4.2.10	Los niveles plasmáticos de sCD25 y la frecuencia de Tregs muestran una correlación negativa	82
4.2.11	La producción de IL-2 por las células T CD4+ de niños VSR+ correlaciona negativamente con la severidad de la enfermedad	82

4.2.12	Los niveles de sCD25 plasmáticos de los niños con VSR correlacionan positivamente con la edad pero no presenta asociación con la severidad de la enfermedad.....	83
4.3	Análisis de la expresión de receptores de la porción Fc de la IgG y de la función mediada por la unión de complejos inmunes en las células T de los niños VSR+	84
4.3.1	La frecuencia de células T CD4+ y CD8+ que expresan CD32 en sangre periférica se encuentra aumentada en niños VSR+	84
4.3.2	La isoforma predominante del CD32 en los niños sanos y VSR+ es la isoforma activadora	87
4.3.3	Las células T que expresan CD32 de niños VSR+ están enriquecidas en marcadores de activación linfocitaria y agotamiento celular	87
4.3.4	La expresión de CD32 en las células T de niños VSR+ está asociada a un fenotipo de memoria diferenciado	88
4.3.5	Las células T CD4+ T y CD8+ de niños VSR+ pueden unir IgG agregada como modelo de complejo inmune.....	90
4.3.6	La estimulación vía CD32 promueve la secreción de un amplio patrón de citocinas en las células T CD4+ y la degranulación en las células T CD8+ de niños VSR+.....	91
4.3.7	La expresión de CD32 en las células T de los niños VSR+ no potencia la infección por VSR facilitada por anticuerpos.....	94
4.3.8	La frecuencia de células T CD32+ CD4+ y CD32+ CD8+ de sangre periférica correlaciona inversamente con la severidad de la enfermedad por VSR	96
5.	DISCUSIÓN.....	98
6.	CONCLUSIONES	110
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8.	ANEXO	125

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

FIGURA 1: Esquema de la estructura de la partícula viral madura.

FIGURA 2: Mecanismo de entrada del VSR al interior de la célula huésped.

FIGURA 3: Receptor de IL-2.

FIGURA 4: Plasticidad en la respuesta de células T CD4+.

FIGURA 5: Mecanismos de supresión mediados por las Tregs.

FIGURA 6: Mecanismos efectores mediados por las células T CD8+.

FIGURA 7: Compartimento de células T de memoria.

FIGURA 8: Vía de señalización de IL-2.

FIGURA 9: Receptores de la porción Fc de IgG (RFcy) de tipo I, II y III.

FIGURA 10: Entrecruzamiento de RFcy por complejos inmunes.

FIGURA 11: Facilitación de la infección mediada por anticuerpos.

MATERIALES Y MÉTODOS

FIGURA 12: Porcentaje de células T CD4+ obtenidas luego de la purificación por selección negativa por inmunodensidad.

FIGURA 13: Esquema de aislamiento de células T CD4+ y CD8+ por selección positiva por *Cell Sorting*.

FIGURA 14: Esquema de aislamiento de células T CD4+ y CD8+ por selección negativa por *Cell Sorting*.

FIGURA 15: IgG agregada como ligando del CD32.

FIGURA 16: Ensayo de unión de IgG agregada por las células T.

FIGURA 17: Ensayo de supresión celular.

FIGURA 18: Activación del CD32 mediante entrecruzamiento con anticuerpo anti-CD32.

FIGURA 19: Estrategia utilizada en el análisis por citometría de flujo para definir los distintos perfiles funcionales y de memoria celular dentro de las células T CD32- y CD32+.

FIGURA 20: Análisis por citometría de flujo de PBMCs teñidos con CellTrace™ CFSE.

FIGURA 21: Cuantificación de citocinas mediante el kit LEGENDplex™ HU Th1/Th2 Panel.

FIGURA 22: Esquema de placa de cultivo para titular el stock viral.

FIGURA 23: Infección de células T CD4+ por VSR usando distintas MOI.

FIGURA 24: Puesta a punto en línea celular HEP-2 de la dosis subneutralizante de anticuerpos anti-VSR.

FIGURA 25: Ensayo de ADE de la infección por VSR en monocitos con distintas dosis subneutralizantes de anticuerpos anti-VSR.

FIGURA 26: Esquema de ensayo de ADE de la infección por VSR en células T de niños con VSR.

RESULTADOS

FIGURA 27: Las células T CD4+ de niños con VSR producen menos IL-2 que los niños sanos.

FIGURA 28: Los PBMCs de niños con VSR producen menores niveles de IL-2 e IL-10 que los niños sanos.

FIGURA 29: Las células T CD4+ de niños con VSR presentan una menor respuesta proliferativa que los niños sanos.

FIGURA 30: El agregado de IL-2 aumenta el porcentaje de Tregs en niños con VSR.

FIGURA 31: El agregado de IL-2 aumenta el porcentaje de las Tregs que expresan la ectonucleotidasa CD39 en niños con VSR.

FIGURA 32: Las células T CD4+ de donantes sanos estimuladas con IL-2 muestran actividad supresora.

FIGURA 33: Las células T CD4+ de niños con VSR poseen la vía de señalización de IL-2 preservada.

FIGURA 34: Los niños con VSR presentan elevados niveles plasmáticos de CD25 soluble.

FIGURA 35: El plasma de niños con VSR disminuye la frecuencia de Tregs de donantes sanos.

FIGURA 36: El CD25 soluble interfiere con la función de la IL-2 en las células T CD4+ de niños con VSR y niños sanos.

FIGURA 37: Expresión de la molécula CD25 en los compartimentos de células T, B y monocitos en niños con VSR.

FIGURA 38: Las células T CD4+ efectoras de los niños con VSR expresan altos niveles de CD25.

FIGURA 39: La activación celular de PBMCs aumenta los niveles de CD25 soluble en el sobrenadante de cultivo.

FIGURA 40: Los niveles de sCD25 plasmático correlacionan negativamente con la frecuencia de Tregs.

FIGURA 41: La producción de IL-2 por las células T CD4+ correlaciona negativamente con el *score* clínico de severidad de la enfermedad por VSR.

FIGURA 42: Los niveles de sCD25 plasmático correlacionan negativamente con la edad de los pacientes con VSR.

FIGURA 43: Los niños con VSR presentan un elevado porcentaje de células T que expresa CD32 en su superficie.

FIGURA 44: Análisis de la expresión de CD32 en células T de niños con VSR por microscopía confocal.

FIGURA 45: Expresión del receptor CD16 en células T CD4+ y CD8+ de niños sanos y con VSR.

FIGURA 46: Las células T de los niños sanos y con VSR muestran un predominio de la isoforma activadora del CD32.

FIGURA 47: Las células T CD4+ y CD8+ que expresan CD32 de niños con VSR están enriquecidas en marcadores de activación linfocitaria CD25 y HLA-DR y del receptor inhibitorio PD-1.

FIGURA 48: Las células T CD4+ y CD8+ CD32+ de niños con VSR muestran un fenotipo compatible con células de memoria.

FIGURA 49: Las células T CD4+ CD32+ de memoria de niños con VSR presentan un mayor porcentaje de los perfiles Th1, Tregs y T helper foliculares respecto a las CD32-.

FIGURA 50: Las células T de los niños con VSR unen IgG agregada a través del CD32.

FIGURA 51: La estimulación vía CD32 promueve la secreción de un amplio patrón de citocinas en las células T CD4+ de niños con VSR.

FIGURA 52: La estimulación vía CD32 promueve la degranulación de las células T CD8+ de niños con VSR.

FIGURA 53: La expresión de CD32 en las células T de los niños con VSR no potencia la infección facilitada por anticuerpos.

FIGURA 54: La frecuencia de células T CD4+ y CD8+ que expresan CD32 correlaciona negativamente con el score clínico de severidad de la enfermedad por VSR.

FIGURA 55: Modelo propuesto acerca de las consecuencias funcionales de la infección por VSR en el compartimento de las células T CD4 y T CD8+ de los niños.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1: Características demográficas y clínicas de las cohortes incluidas.

Tabla 2: Características de los anticuerpos monoclonales utilizados.

Tabla 3: Primers utilizados para amplificar el ADN copia de cada uno de los genes.

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo

ADCP: Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

ADE: Aumento mediado por anticuerpos (*antibody dependant enhancement*)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CDSS: *Score* clínico de severidad de la enfermedad (*clinical disease severity score*)

CFSE: Éster de succinimidil-carboxifluoresceína

CI: Complejo inmune

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

Ct: umbral del ciclo

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

ELISA: Técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas

EEM: Error estándar de la media

Fab: Fragmento de unión al antígeno (*fragment antigen binding*)

Fc: Fragmento cristalizante

Fig: Figura

FOXP3: Forkhead box P3

H: Hora

HRP: Peroxidasa de Rabanito

IFM: Intensidad de fluorescencia media

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

IRAB: Infecciones respiratorias agudas bajas

ITAM: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

ITIM: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*

IVIg: Inmunoglobulina humana endovenosa

Min: Minutos

MOI: Multiplicidad de infección

NK: Célula *Natural Killer* (Citotóxica Natural)

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*)

PBS: *Buffer* de sales de fosfato

PBS AA: PBS suplementado con seroalbúmina bovina y azida sódica

PHA: Fitohemaglutinina

pi: Post infección

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato

pSTAT5: STAT5 fosforilado

RFc: Receptor de la porción Fc de anticuerpos

RFc γ : Receptor de la porción Fc de anticuerpos IgG (Fc gamma)

RIL-2: Receptor de IL-2

Rpm: Revoluciones por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa

SFB: Suero fetal bovino

STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción.

TA: Temperatura ambiente

TCR: Receptor de célula T

T_{EMRA}: Células T de memoria efectora terminalmente diferenciada

Tfh: Células T helper foliculares

Th: Célula T helper

T_M: Células T de memoria

T_{MC}: Células T de memoria central

T_{ME}: Células T de memoria efectora

T_{MT}: Células T de memoria transicional

T_N: Células T *naïve*

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

Tregs: Células T regulatorias

UFP: Unidades formadoras de placa

UTI: Unidad de terapia intensiva

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VSR: Virus sincicial respiratorio

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Virus Sincicial Respiratorio

1.1.1 Características del virus

El virus sincicial respiratorio (VSR) pertenece al género Orthopneumovirus, de la familia Pneumoviridae. En términos de su morfología estructural, el virión consiste en una nucleocápside empaquetada en una envoltura lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula huésped. Los viriones producidos en cultivos celulares representan partículas esféricas de 150-250 nm de diámetro [1].

El genoma del VSR está compuesto por una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple no segmentada de sentido negativo, de aproximadamente 15,2 kb. Contiene 10 genes, los cuales codifican 11 proteínas diferentes, 9 estructurales y 2 no estructurales (**Fig. 1**).

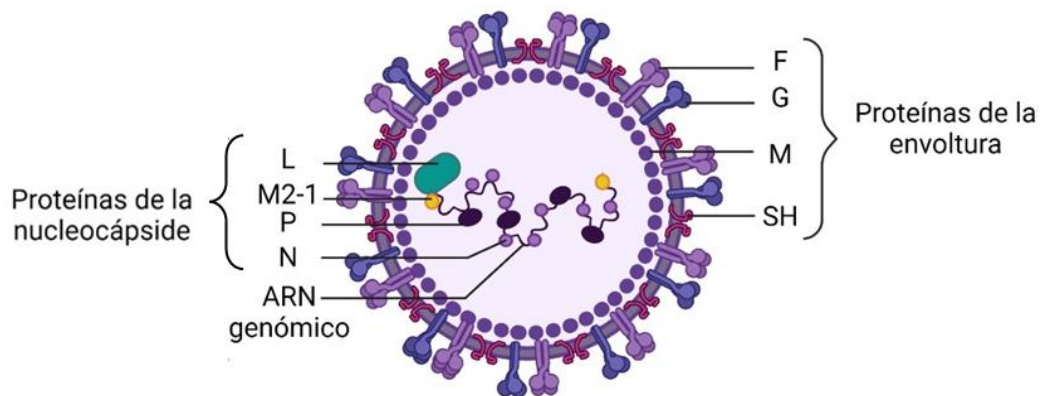


Figura 1. Esquema de la estructura de la partícula viral madura. Se indican las proteínas estructurales y el ARN genómico del Virus Sincicial Respiratorio. Figura creada con BioRender.com.

Dentro de las proteínas estructurales que integran la nucleocápside, se encuentran: la nucleoproteína N, la fosfoproteína P, la polimerasa L y la proteína M2-1 [2]. La nucleoproteína N es crítica para el ensamble del genoma viral y de la formación de las nucleocápsides helicoidales. También participa en mecanismos de evasión, uniéndose a factores que inhiben la síntesis de proteínas virales [3]. La fosfoproteína P es un importante cofactor de la polimerasa L y actúa como adaptador permitiendo la unión de los componentes de la nucleocápside y su ensamble. La proteína M2-1 es un factor involucrado en la procesividad de la transcripción del ARN viral.

La envoltura del virus contiene tres glicoproteínas de membrana: la glicoproteína G, la glicoproteína de fusión F, y la pequeña proteína hidrofóbica SH. La glicoproteína G media la adsorción viral conectando los viriones a la célula blanco, a través de la interacción con moléculas presentes en la superficie celular. Ésta no solo participa en la adsorción viral, sino también en la evasión de la respuesta inmune. Por un lado, contiene el motivo CX3C con lo cual imita a la quimiocina fractalquina (CX3CL1) y, en consecuencia, reduce el tráfico al pulmón de células del sistema inmune que expresan CX3CR1, entre las cuales se encuentran células T específicas del VSR [4]. Además, la glicoproteína G también es

producida en forma soluble, la cual contribuye al escape inmunológico del VSR [5]. Por otra parte, se encuentra la glicoproteína de fusión F que es sintetizada como un precursor (pre-F). Este, al ser clivado por proteasas de la célula huésped, da lugar a una proteína madura trimérica (post-F) que mediará la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular [6]. En este sentido, la expresión de la glicoproteína F en la superficie de las células infectadas también puede provocar la fusión de estas, particularmente *in vitro*, conduciendo a la formación de los conocidos sincicios multinucleados. Las glicoproteínas G y F poseen los antígenos que conducirán a la generación de anticuerpos (Ac) neutralizantes. Sin embargo, la glicoproteína F es la más utilizada como blanco terapéutico en el desarrollo de vacunas y Ac monoclonales por dos características relevantes: está muy conservada entre los subtipos y presenta sitios antigénicos que inducen la producción de Ac con gran actividad neutralizante [7]. Por último, la pequeña proteína hidrofóbica SH presente en la envoltura no presenta ninguna función conocida relacionada al ciclo de replicación viral.

Otro componente de la envoltura viral es la proteína no glicosilada de matriz M. Se encuentra en la cara interna de la envoltura y juega un rol importante en la estructura y morfogénesis del virión. La proteína M estaría relacionada con la inhibición de la transcripción del huésped y la formación de cuerpos de inclusión citoplasmáticos [8].

En cuanto a las proteínas no estructurales, se encuentran NS1 y NS2 que interfieren con la respuesta inmune innata, suprimiendo la secreción de los Interferones (INF) de tipo I α - β [9].

El VSR presenta un único serotipo y dos subtipos, A y B. Se han descrito múltiples genotipos dentro de cada grupo, donde las principales diferencias se encuentran en la glicoproteína G. Dentro de las cepas más utilizadas regularmente en los laboratorios, se encuentran la cepa Long y A2 para el subtipo A, y la cepa CH18537 para el subtipo B [10].

1.1.2 Ciclo de replicación

Aún no se ha identificado un receptor específico que explique el tropismo tisular del VSR. Tanto la glicoproteína G como F pueden interactuar con proteoglicanos de heparán sulfato y otros glucosaminoglicanos que están presentes en la superficie de la mayoría de las células inmortalizadas y permiten el ingreso del virus [11]. Sin embargo, se ha demostrado que células epiteliales bronquiales ciliadas primarias humanas carecen de heparán sulfato, y que la adsorción viral ocurre mediante unión de la glicoproteína G del virus a la molécula CX3CR1 de la célula huésped [12]. Esto se debe a la característica que posee la glicoproteína G de imitar a la fractalquina CX3CL1, ligando del receptor CX3CR1. Recientemente se ha reportado que el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (expresado en diversos tipos celulares, entre los cuales se encuentran las células epiteliales bronquiales ciliadas) es un probable receptor primario del VSR, ya que interactúa con alta afinidad con la glicoproteína F facilitando la fusión de membranas [13].

Como se mencionó anteriormente, la adsorción y entrada del virus a la célula son mediadas por las glicoproteínas G y F. Esto sucede por la fusión entre la envoltura viral y la membrana de la célula huésped como se muestra en la **Fig. 2**, aunque también hay evidencias de que puede ocurrir por endocitosis mediada por clatrina [14]. Posteriormente, la nucleocápside es liberada al interior celular.

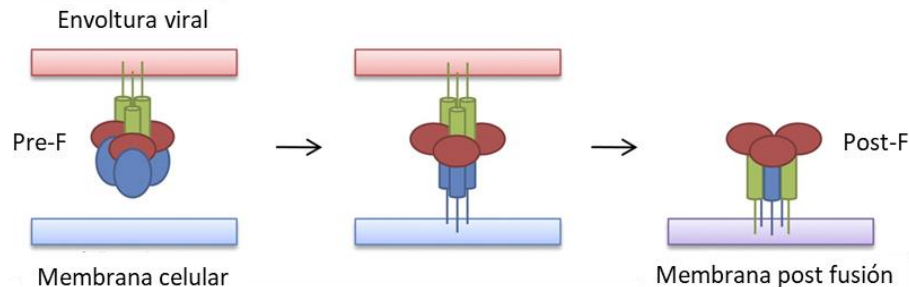


Figura 2. Mecanismo de entrada del VSR al interior de la célula huésped. La glicoproteína viral F media la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular. Figura tomada y modificada de McLellan y cols, 2011 [6].

La transcripción del genoma ocurre en el citoplasma mediante la polimerasa viral L preformada. A partir de ello, se sintetizan nuevas polimerasas L y nucleoproteínas N que promueven la replicación y producción de ARN genómico (-) y antigenómico (+) encapsulado. El ARN genómico de la progenie dará lugar a la transcripción secundaria y a nuevas rondas de replicación; el ARN mensajero (ARNm) y las proteínas virales pueden ser detectados luego de 4-6 h (hora) post infección (pi). Luego de un tiempo, ocurre una baja de la transcripción a fin de favorecer la producción de genoma necesario para el empaquetamiento y posterior liberación de la progenie.

1.1.3 Infección por VSR en humanos

En el año 1957, el VSR fue aislado por primera vez de infantes con infección severa en las vías respiratorias bajas [15]. El virus es principalmente transmitido por contacto estrecho con saliva o gotas nasales y la infección *in vivo* involucra principalmente a las células de la superficie del epitelio respiratorio. Luego de que el virus replica en las células epiteliales de la nasofaringe y tracto respiratorio superior, las partículas virales pueden ser transferidas a bronquiolos o alvéolos de la vía respiratoria inferior.

Además de infectar células del epitelio respiratorio, se ha reportado que el VSR también infecta células del sistema inmune, como células B, monocitos, macrófagos alveolares, células *Natural Killer* (NK), células dendríticas y mastocitos [16-18]. Asimismo, nuestro grupo de trabajo en el año 2017 descubrió por primera vez que las células T son permisivas a la infección por VSR [19].

La infección y replicación del VSR están muy restringidos a humanos. A pesar de que las cepas humanas pueden infectar animales como ratones, ratas, ovejas, estos huéspedes son semi-permisivos y la transmisión entre ellos no ocurre.

1.1.3.1 Epidemiología

El VSR es la principal causa de hospitalizaciones y la segunda causa de muerte por infecciones respiratorias agudas y severas en niños menores de 5 años a nivel global. Se estima que ~ 3,2 millones de niños son hospitalizados anualmente a causa de la infección por VSR en el mundo, de los cuales ~ 120,000 fallecen [20]. Más de la mitad de las hospitalizaciones y muertes por infecciones respiratorias agudas bajas (IRAB) por VSR ocurren en los menores de 6 meses. Por otro lado, más del 90 % de las muertes ocurren en los países que muestran menores índices de desarrollo [21, 22], donde el VSR es la segunda causa de mortalidad infantil [23]. En Argentina, el VSR contribuye al 80 % de las IRAB en los menores de 5 años, incluyendo bronquiolitis y neumonía y es la principal causa de mortalidad post-neonatal [21]. Las estadísticas locales confirman que este virus es el principal agente asociado a la infección respiratoria aguda en niños menores de un año, según estudios realizados en el Hospital de Niños “Ricardo Gutiérrez” [24, 25] y en el Hospital de Niños “Pedro de Elizalde” [26], de la Ciudad de Buenos Aires.

Más del 95 % de los niños alcanzan los 2 años habiendo sido infectados por VSR al menos una vez [20]. La infección no induce una respuesta inmune capaz de proveer protección en forma duradera, por lo tanto, las reinfecciones ocurren a lo largo de toda la vida [27].

La mayoría de los niños infectados padecerá una enfermedad leve. Sin embargo, del 2 al 5 % de estos niños experimentará una bronquiolitis severa que requerirá hospitalización y, posiblemente, internación en la unidad de terapia intensiva (UTI). La relevancia de la infección por VSR guarda relación no solo con el cuadro severo de la infección aguda, ya que una fracción importante de los niños que cursan una infección severa manifestará una mayor propensión al desarrollo de asma alérgico [28, 29].

Los brotes de infección son producidos por múltiples genotipos. Usualmente co-circulan los dos subtipos y el predominio de cada uno cambia usualmente cada dos años [10]. En Argentina, el subtipo A fue el predominante en 2019 y el B en 2021, mientras que en el 2020 no se registraron casos de niños hospitalizados por VSR en el contexto de la pandemia por SARS-CoV-2 [30].

1.1.3.2 Principales factores de riesgo en niños

Los datos epidemiológicos indican que la edad menor a 6 meses representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de la infección severa por VSR [31, 32]. En un estudio donde fueron enrolados ~ 5.000 niños menores de 5 años, se observó que la tasa estimada de visitas ambulatorias asociadas a la infección por VSR fue similar a la asociada con influenza para todos los niños menores de 5 años, pero fue significativamente mayor para los niños menores de 6 meses [33]. Este grupo etario presenta un sistema inmune inmaduro y en desarrollo que se asocia a una respuesta inmune frente a antígenos poco eficiente. En este sentido, los niveles de Ac IgG neutralizantes alcanzados durante la infección

natural por VSR en estos niños son bajos y decaen luego de 3 a 4 meses [34]. Por este motivo se resalta la importancia de la inmunización materna, ya que se ha visto que los mayores títulos de Ac dirigidos contra la forma pre-F en personas gestantes se asocia con un menor riesgo en los neonatos de padecer la enfermedad severa por VSR [35]. Asimismo, se observó que los niños menores de 6 meses que contienen altos niveles de Ac maternos específicos para el VSR presentan un menor riesgo de contraer la infección severa [36].

Además de la edad, otros factores de riesgo que predisponen a desarrollar enfermedad severa por VSR son: nacimiento prematuro (< 36 semanas de gestación), bajo peso al nacer (<2,5 kg), sexo masculino, enfermedades cardiopulmonares, enfermedades neurológicas, inmunodeficiencias, síndrome de Down y bajo nivel socioeconómico [21, 37]. Sin embargo, la mayoría de los niños con infección por VSR, tanto los que son hospitalizados y los que son tratados en forma ambulatoria, son niños cuyo único factor de riesgo es la edad menor de 2 años.

1.1.4 Vacunas contra el VSR

La identificación de una vacuna segura e inmunogénica contra el VSR continúa siendo un gran desafío en más de 60 años de estudio. Actualmente, se recurre a la inmunización pasiva con el Ac monoclonal humanizado IgG1 *Palivizumab* en los grupos de riesgo como prevención de la enfermedad severa [38]. Este Ac actúa dirigiéndose al epítipo del sitio antigénico II de la glicoproteína F del VSR, presente tanto en su conformación pre-F como post-F, con lo cual inhibe la entrada del virus a la célula previniendo la infección.

Entre las principales dificultades por las cuales aún no se dispone de una vacuna para el VSR, se encuentran: 1) la generación de una respuesta inmune natural no efectiva; 2) el legado de la vacuna de virus inactivado con formalina utilizada en la década del 60, con la cual los niños vacunados experimentaron una enfermedad severa de la infección natural por VSR, el 80 % fue hospitalizado y dos de ellos murieron [39] a causa de la inducción de Ac con baja capacidad neutralizante [40]; 3) la edad de la población blanco; los niños menores de 6 meses, pertenecientes al grupo de riesgo, presentan un sistema inmune inmaduro y en desarrollo; 4) la falta de una definición estandarizada de enfermedad severa y marcadores de severidad, relacionadas al limitado conocimiento sobre la respuesta inmune contra el VSR y cómo se relaciona con la severidad clínica; 5) la falta de correlación entre inmunidad y protección; aún no se ha definido un correlato inmunológico preciso ni un umbral de protección para los Ac neutralizantes [41]; y 6) la ausencia de un modelo animal adecuado para el estudio de la infección por VSR.

Al presente, múltiples vacunas se encuentran en desarrollo, alguna de ellas en la fase 3 de los ensayos clínicos [42, 43]. La tecnología utilizada depende de la población que se quiere inmunizar, centrándose en la seguridad y en las características del sistema inmune de ésta: en personas gestantes y adultos

mayores se basa principalmente en subunidades de la proteína F; en los niños menores de 6 meses inmunización pasiva mediante Ac monoclonales; y en niños mayores de 6 meses en inmunización activa con vacunas de virus atenuado.

1.2 Compartimento de células T

1.2.1 Células T *naïve*

Las células T CD4+ y CD8+, al igual que el resto de las células del sistema inmune, se originan en la médula ósea, para luego completar su desarrollo en el timo, su órgano linfático primario. Allí atraviesan distintas etapas madurativas y eventos de selección, en un proceso que culmina con la obtención de células T CD4+ y CD8+ *naïve* o vírgenes que poseen un amplio repertorio de receptores antigénicos (TCR) distribuidos clonalmente, lo que les permitirá enfrentar un universo microbiano que impone decenas de miles de potenciales antígenos [44].

Las células T *naïve* que emigran del timo circulan por la sangre en estado de reposo y recirculan continuamente entre los órganos linfáticos secundarios, a fin de encontrar a un antígeno específico. Expresan de forma constitutiva el receptor de migración a los órganos linfáticos CCR7 [45] y la isoforma de la molécula CD45 denominada RA, la cual participa en la transducción de señales del TCR [46]. Por otra parte, las células T *naïve* muestran un perfil de producción de citocinas muy restringido que consiste principalmente en CXCL8 (IL-8) [47] e IL-2, utilizada como factor de crecimiento autócrino y parácrino [48].

Las células T *naïve* expresan constitutivamente un receptor de afinidad intermedia para la citocina mitógena interleucina (IL) 2 (IL-2). Este receptor se compone de dos subunidades, β (CD122) y γ (CD132) [49]. La percepción de las dos señales, y por ende su activación, le permite a la célula T sintetizar y expresar en su superficie la cadena α (CD25) del receptor de IL-2 (RIL-2) y también producir IL-2. De este modo, el heterotrímero α , β y γ representa el RIL-2 de alta afinidad (**Fig. 3**), que hará aumentar la sensibilidad de la célula a esta citocina y permitirá a la célula T expandirse clonalmente.

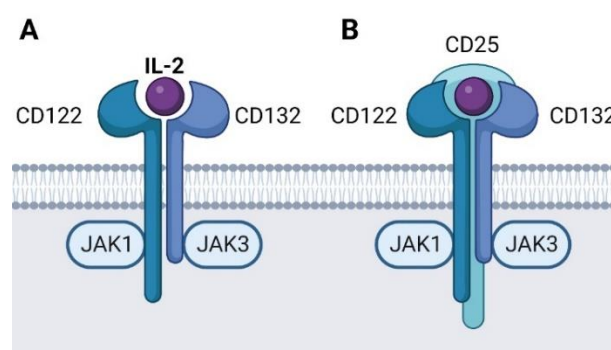


Figura 3. Receptor de IL-2. (A) Receptor dimérico de afinidad intermedia para IL-2 constituido por las cadenas β (CD122) y γ (CD132), y (B) receptor trimérico de alta afinidad constituido por las cadenas α (CD25), β y γ . Figura creada con BioRender.com.

Durante los primeros años de vida, el compartimento de células T está compuesto principalmente por células T *naïve*. En este sentido, estas células representan la población predominante de células T en sangre, aunque también están ampliamente distribuidas en tejido linfático y mucosa de pulmón [50-52]. El fenotipo y función de esta población celular difiere sustancialmente según la edad. En los niños menores de 2 años, la mayoría de las células T *naïve* circulantes emigraron recientemente del timo y presentan una menor respuesta proliferativa y producción de citocinas respecto a células T *naïve* presentes en la edad adulta [53].

En resumen, debido a las características del compartimento de células T en los primeros años de vida, los niños menores de 2 años son más vulnerables a infecciones que los niños mayores y los adultos, y son especialmente susceptibles a las infecciones por patógenos intracelulares (VSR, virus del herpes simple, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de la varicela-zóster, *Toxoplasma gondii*, entre otros) [54]. Durante la exposición a nuevos antígenos, las células T *naïve* jugarán un rol importante en el establecimiento de una respuesta inmune protectora a través de la diferenciación a células T efectoras, quienes mediarán la eliminación del patógeno, y el desarrollo de la respuesta de memoria.

1.2.2 Células T CD4+ efectoras y regulatorias

La activación de una célula T CD4+ *naïve* induce la señalización de diferentes vías que conducen a la proliferación y diferenciación en células T efectoras específicas. Esto dependerá principalmente de las citocinas presentes en el microambiente, secretadas por las células dendríticas en respuesta al proceso infeccioso. Las células T CD4+ efectoras constituyen una población heterogénea, puesto que cada subpoblación se caracteriza por su capacidad de detectar diferentes citocinas inductivas, expresar distintos factores de transcripción, y producir citocinas efectoras características (**Fig. 4**). Estas subpoblaciones se clasifican en los siguientes perfiles funcionales: T helper (Th) 1, Th2, Th17, T helper foliculares (Tfh) y T regulatorias inducibles (Tregs) [55, 56].

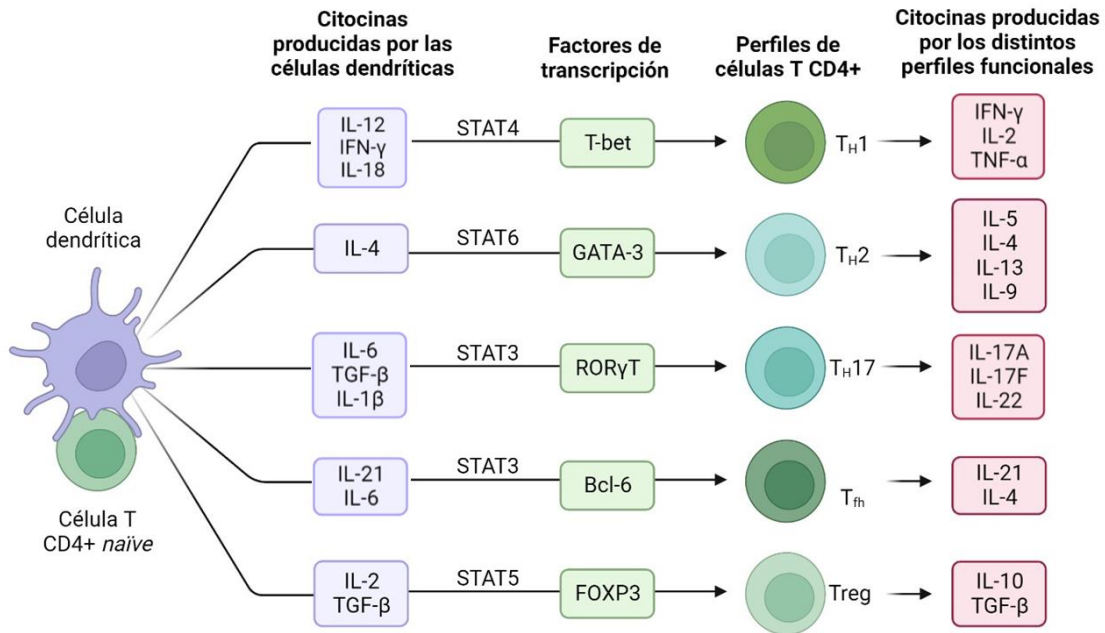


Figura 4. Plasticidad en la respuesta de células T CD4+. Se muestran las citocinas y los factores de transcripción que inducen la diferenciación en los distintos perfiles funcionales propios a las células T CD4+, y las principales citocinas producidas por cada uno de ellos. Figura adaptada de "Induction of 2nd Order Cytokines", por BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

Las células T CD4+ mediarán centralmente su actividad en los tejidos periféricos (células Th1, Th2, Th17), en los órganos linfáticos secundarios (Tfh) o en ambas localizaciones (Tregs) [57]. Cada una de las subpoblaciones de células T CD4+ participa en la defensa contra diversos tipos de patógenos.

Las células **Th1** son relevantes en la defensa contra patógenos intracelulares e inducen tanto la activación de macrófagos en tejidos periféricos, células NK y T CD8+, como el desarrollo de la memoria inmunitaria en el compartimento de células T CD8+. De esta manera, se establece una respuesta inmune antiviral eficaz [58]. Las células **Th2** son relevantes en la defensa contra parásitos extracelulares. Promueven la producción de Ac IgE por las células B, e inducen la movilización y activación de eosinófilos y mastocitos respectivamente, en las mucosas de los aparatos respiratorio y digestivo. Las células **Th17** participan en la defensa contra bacterias extracelulares y hongos, en superficie de mucosas de aparato digestivo y respiratorio, y piel. Promueven la infiltración de neutrófilos en el tejido afectado. En suma, los diferentes perfiles de células T CD4+ efectoras intervendrán no sólo en respuestas anti-microbianas sino también en respuestas patogénicas. Las células Th1 y Th17 participan en el desarrollo de patologías autoinmunes [59], mientras que las células Th2 cumplen un papel clave en el desarrollo de los fenómenos alérgicos.

Por otro lado, las células **Tfh**, son necesarias para la formación del centro germinal y la colaboración con las células B, permitiendo el *switch* o cambio de isotipo, la generación de Ac de alta afinidad y células B de memoria [60].

Además, las células T CD4+ podrán diferenciarse en **Tregs** inducibles en presencia de condiciones tolerogénicas en los órganos linfáticos secundarios. Estas Tregs inducibles son indistinguibles de las Tregs naturales que se originan en el timo, las cuales una vez que se activan muestran igual fenotipo y actividad supresora [61]. Las Tregs ejercen un efecto supresor sobre las diferentes células del sistema inmune, a fin de controlar la activación de clones de células T y B autorreactivos, y modulan la respuesta inmune antiinfecciosa [61, 62]. Asimismo, juegan un rol importante en la tolerancia materno-fetal. Por otro lado, se ha evidenciado que las Tregs dificultan la generación de una inmunidad antitumoral efectiva. Por este motivo, hoy en día se cuenta con estrategias para eliminarlas o inhibir su actividad supresora como terapia antitumoral [63]. La diferenciación y función de este perfil están reguladas por la expresión del factor de transcripción FOXP3. Presentan una expresión constitutiva y elevada de CD25, CTLA-4, una baja o nula expresión de CD127 (receptor de IL-7) y pueden presentar en su superficie la molécula CD39. También se han descrito células Tregs inducibles que no expresan FOXP3 como las Th3 y Tr1 [64].

Existen diferentes mecanismos por el cual las Tregs ejercen actividad supresora (**Fig. 5**). Por un lado, a través de la vía de CTLA-4, que al interactuar con moléculas co-estimuladoras presentes en la célula dendrítica, disminuye la expresión de estas moléculas y estimula la producción de factores inmunosupresores. Por otro lado, la molécula CD39 es una ectonucleotidasa que hidroliza ATP a adenosina, la cual mediará un potente efecto supresor en las células T. Otros mecanismos son mediados por factores solubles. En este sentido, el consumo de IL-2 debido a la alta expresión de CD25, limita la biodisponibilidad de la IL-2 en el entorno. De esta manera, suprimen la expansión clonal de las células T y su diferenciación a células efectoras. Las Tregs también secretan citocinas inmunosupresoras, como IL-10 y TFG- β .

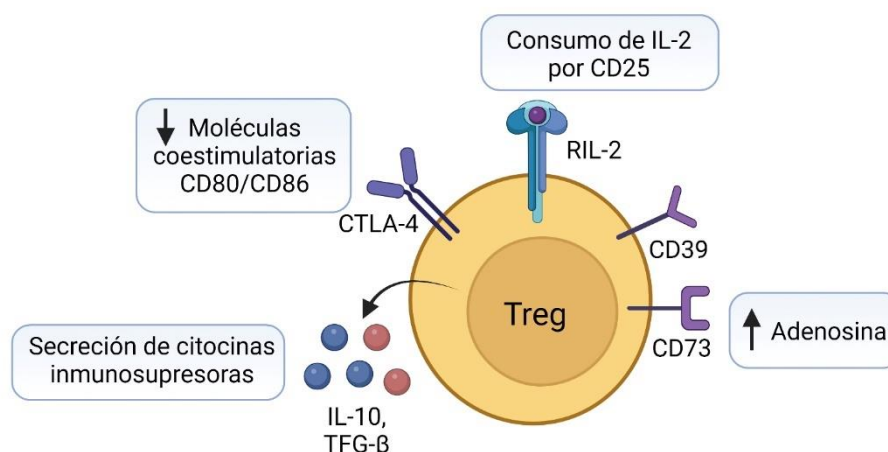


Figura 5. Mecanismos de supresión mediados por las Tregs. Las células Tregs ejercen múltiples mecanismos por los cuales suprimen la respuesta inmune. Figura creada con BioRender.com.

La diferenciación a perfiles funcionales es particularmente distinta en la primera etapa de la vida. En comparación con adultos, el compartimento de células T CD4+ de niños menores de 2 meses está

sesgado al desarrollo de células Th2 y de Tregs, debido a la presencia de un ambiente tolerogénico [65]. En esta etapa también se presenta una menor diferenciación a Th1, que dificulta la respuesta a patógenos intracelulares y antígenos vacunales [66]. En consecuencia, las funciones de las células T CD4+ efectoras en los primeros años de vida se caracterizan por una menor producción de IFN- γ , pero una mayor producción de citocinas del perfil Th2, como IL-13, explicado principalmente por la conformación epigenética de los loci de IFN- γ e IL-13. También son capaces de producir IL-2 y muestran una elevada producción de IL-8 en respuesta a la activación celular, quimiocina implicada en la inflamación y migración de neutrófilos [67].

Tanto el número absoluto como la frecuencia de Tregs son abundantes en la infancia, que luego comienzan a declinar entre los 5 a 8 años [68]. En este sentido, durante los primeros años de vida, las Tregs desempeñan un papel clave en el desarrollo de la tolerancia oral frente a antígenos inocuos procedentes de la dieta y de la microbiota. Este desbalance de células efectoras y Tregs es beneficioso en el desarrollo de la tolerancia a antígenos propios, pero aumenta la susceptibilidad a infecciones virales [69].

Otro aspecto de la inmunidad en la edad temprana, particularmente en neonatos, es que a diferencia de los adultos presentan una respuesta de células Tfh deficiente, la cual compromete la generación de Ac neutralizantes y células B de memoria [70, 71].

1.2.3 Células T CD8+ efectoras

Las células T CD8+ juegan un rol fundamental en la inmunidad antiviral y participan en la respuesta inmune generada contra ciertas bacterias y parásitos [72, 73]. Los mecanismos por los cuales las células T CD8+ ejercen su actividad se basan en la citotoxicidad, a través de la destrucción de células infectadas, y en la producción de citocinas inflamatorias, principalmente IFN- γ y TNF- α [74] (**Fig. 6**). La citotoxicidad e inducción de la apoptosis de la célula diana se puede establecer por dos mecanismos: 1) mediante la síntesis de granzimas y perforinas almacenadas en sus gránulos secretorios, que luego del reconocimiento antigénico por el TCR se produce la degranulación y liberación de estas, o 2) a través del sistema Fas/Fas-Ligando. Por otro lado, el IFN- γ cumple un papel crucial en la diferenciación de las células T CD4+ a un perfil Th1 y en la activación de macrófagos.

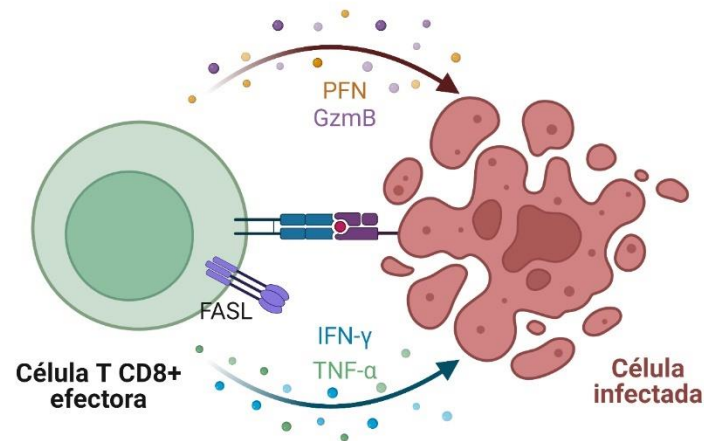


Figura 6. Mecanismos efectores mediados por las células T CD8+. Inducción de la muerte celular de una célula infectada mediante secreción de granzimas (GzmB), perforinas (PFN) y producción de citocinas inflamatorias IFN- γ y TNF- α . Figura adaptada de "T cell killing cancer cell", por BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

Las células T CD8+ efectoras de niños durante la infancia temprana muestran diferentes propiedades en comparación con adultos. En este sentido, presentan una menor función citotóxica y capacidad efectora en la protección frente a patógenos [70], que se refleja en una limitada producción de citocinas como IFN- γ [75] y de gránulos secretorios que contienen granzima B [76]. Este hecho puede explicar, en parte, la mayor susceptibilidad de los niños a contraer infecciones por patógenos intracelulares.

1.2.4 Células T de memoria

Las células T efectoras que sobreviven a la fase de contracción se diferenciarán en células T de memoria (T_M). En función de la expresión de la molécula CD45RA, el receptor de quimiocina CCR7 y la molécula co-estimuladora CD27, las células T_M pueden clasificarse en: 1) células T_M central (T_{MC}); 2) células T_M efectoras (T_{ME}); 3) células T_M transicional (T_{MT}) y 4) células T_M efectoras terminalmente diferenciadas (T_{TEMRA}) [52, 77] (**Fig. 7**). La diferenciación a células T_M se caracteriza por la pérdida de la expresión de CD45RA. Las células T_{MC} , a diferencia de las demás subpoblaciones, expresan CCR7 que le permitirán localizarse en ganglios linfáticos. La molécula CD27, miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), proporciona señales co-estimuladoras y está presente en todas las subpoblaciones de células T_M con excepción de las células T_{ME} [78]. Estas últimas migrarán a tejidos periféricos, donde activarán rápidamente funciones efectoras y secretarán diversas citocinas. Las T_{TEMRA} muestran un fenotipo de diferenciación terminal y re-expresan CD45RA. Se encuentran principalmente en el compartimento de células T CD8+, donde exhiben una gran capacidad de producción de IFN- γ [79].

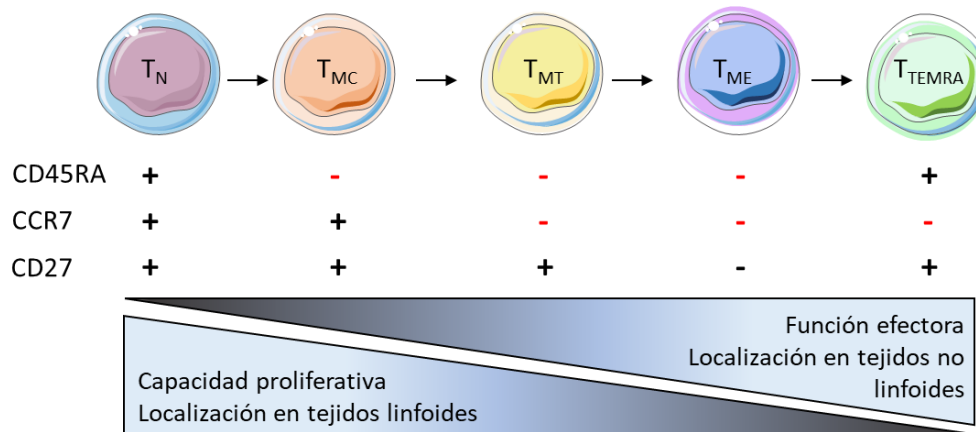


Figura 7. Compartimento de células T de memoria. Según la expresión de las moléculas CD45RA, CCR7 y CD27 se puede distinguir a las células T *naïve* (T_N , CD45RA+ CCR7+ CD27+) y a las subpoblaciones de células T de memoria (T_M). Estas se clasifican en células T_M central (T_{MC} , CD45RA- CCR7+ CD27+); células T_M transicional (T_{MT} , CD45RA- CCR7- CD27+), células T_M efectoras (T_{ME} , CD45RA- CCR7- CD27-); y células T_M efectoras terminalmente diferenciadas (T_{TEMRA} , CD45RA+ CCR7- CD27+).

Durante la niñez temprana, el compartimento de células T de estos individuos está compuesto por un escaso número de células T_M . En esta etapa, un gran número de antígenos microbianos son encontrados en la mucosa de pulmón e intestino, lo que resulta en un aumento de células T_{ME} antígeno-específicas en estos sitios [52]. Tanto en tejido linfoide como en circulación, se observa una baja proporción de células T_{MC} y T_{ME} , donde predominan las células T *naïve* [50].

Los niños menores de 2 años muestran un compromiso en la capacidad para desarrollar una sólida respuesta de células T CD8+ de memoria, en comparación con los adultos [80]. Por lo tanto, en respuesta a infecciones en el tracto respiratorio, la formación de células T_M es más limitada en la infancia [81]. Este hecho les confiere a los niños una inmunidad reducida frente a una reinfección.

1.2.5 Respuesta mediada por células T en la infección por VSR

Las células T cumplen un rol protector importante en la infección por VSR. Observaciones realizadas en un modelo murino mostraron que están implicadas en el control y resolución de la infección [82]. En línea con esto, se ha comprobado que los niños que padecen una inmunodeficiencia relativa al compartimento de células T presentan mayor severidad y mayor título viral durante la infección por VSR [83, 84].

Un estudio prospectivo que se llevó a cabo a partir del análisis transcriptómico de células de sangre entera, reveló una expresión diferencial disminuida de los genes que regulan las células T CD4+ y CD8+ y células B en niños con enfermedad severa por VSR, en comparación con niños que padecen enfermedad leve, infección por influenza o rinovirus [85]. Esta disminución en la expresión se mantiene al menos un mes luego del episodio agudo. Estos resultados proporcionan evidencias de una profunda desregulación sistémica de la inmunidad adaptativa inducida por la infección severa por VSR.

Los niños que presentan una enfermedad severa muestran un desbalance en el compartimento de células T CD4+ [86], con una menor respuesta Th1 en comparación con los que padecen una enfermedad leve. Por otro lado, la respuesta Th2 se encuentra exacerbada en la enfermedad severa, habiéndose demostrado elevados niveles de citocinas relativas a este perfil en sangre y en vías respiratorias [87]. También se ha propuesto la participación de las células Th17 en la patogénesis de la infección por VSR, relacionada al reclutamiento de neutrófilos en las vías respiratorias. En este sentido, se ha reportado un mayor recuento de células Th17 y niveles de IL-17A en sangre y en aspirado traqueal en niños con cuadro severo agudo por VSR [88, 89]. En cuanto a las células Tfh, no está completamente esclarecido su rol en la infección por VSR, aunque observaciones en un modelo murino indican que su diferenciación está afectada durante esta infección [90, 91].

Las células Tregs juegan un papel crítico en el control de la respuesta inmune [61, 92]. Observaciones realizadas en modelos murinos han demostrado que las células Tregs controlan la inflamación pulmonar en el curso de la infección por VSR [93]. Su eliminación ha evidenciado exacerbar la reacción inflamatoria y agravar el curso de la enfermedad [94]. Por otro lado, en ratones expuestos al VSR inactivado con formalina que luego presentaron enfermedad exacerbada se vio una disminución de Tregs circulantes [95]. En el año 2014, nuestro grupo ha demostrado que la infección aguda y severa por VSR en niños menores de dos años se acompaña de una depleción de Tregs circulantes. La recuperación de Tregs mostró ser lenta, detectándose niveles disminuidos aún 3 semanas luego del alta hospitalaria [96].

En relación con las células T CD8+, estudios previos demostraron que el VSR suprime la actividad efectora de células T CD8+ antígeno-específicas, ya que ocasiona en estas una menor producción de citocinas y actividad citolítica [97]. En línea con esto, se han observado menores niveles de IFN- γ en niños que cursan una enfermedad severa por VSR [98, 99]. Está reportado que las células T CD8+ antígeno-específicas se encuentran involucradas en la protección contra la forma severa de la enfermedad por VSR [100] y su inducción durante la infección es baja, de manera que no se genera protección suficiente para prevenir reinfecciones [101].

Finalmente, en un trabajo publicado por nuestro grupo, demostramos que las células T son permisivas a la infección por VSR, lo que afecta su función. En este sentido, las células T infectadas *in vitro* muestran una menor producción de IL-2 e IFN- γ en comparación con las no infectadas [19]. Asimismo, la frecuencia de células T CD4+ que presentan el antígeno viral correlacionan la severidad de la enfermedad.

A pesar de décadas de investigación, tanto los mecanismos responsables de la protección y la patogénesis, así como la identificación de factores que predigan la severidad de la infección, aún no han sido completamente clarificados.

1.3 Señalización a través del receptor de IL-2

La señalización mediada por la IL-2 promueve la activación y proliferación de células T luego del estímulo antigénico, diferenciación a una respuesta efectora y de memoria, y mantenimiento de las Tregs [102]. Por este motivo, es esencial en la generación de la respuesta inmune efectora, de memoria y tolerogénica. En particular, favorece el desarrollo de un perfil Th1 y Tregs e inhibe la diferenciación a un perfil Th17 [103].

Cuando la IL-2 se une al RIL-2 trimérico de alta afinidad, se activan una serie de cascadas de señalización a través de diferentes vías. Una de ellas es la vía de STAT5, donde se induce la activación mediante fosforilación y dimerización del STAT5 [104] (**Fig. 8**). Este factor luego transloca al núcleo para activar diversos genes, entre los cuales se encuentran *FoxP3* y *CD25*. De esta manera, a través de la unión de IL-2 a su receptor se induce la expresión del CD25 por retroalimentación positiva.

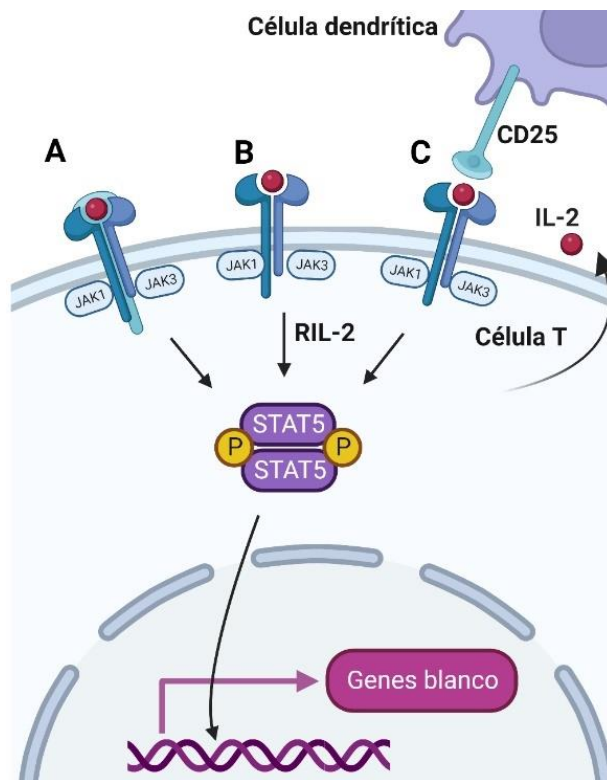


Figura 8. Vía de señalización de IL-2. (A) La IL-2 puede asociarse al RIL-2 trimérico de alta afinidad o (B) directamente al RIL-2 dimérico de afinidad intermedia presente en la célula T. (C) Por otro lado, la IL-2 puede ser trans-presentada por la célula dendrítica que expresa CD25 a una célula T efectora que presenta el RIL-2 dimérico. La señalización de la IL-2 ocurre a través de la vía de STAT5. Figura creada con BioRender.com.

Durante condiciones normales, la IL-2 es producida principalmente por las células T CD4⁺ efectoras, y en menor medida, por las células T CD8⁺. Por el contrario, las Tregs no producen IL-2, por lo cual dependen de la secretada por las células T CD4⁺ efectoras [61].

La función y disponibilidad de la IL-2 puede verse afectada por diversos factores. Uno de ellos es el consumo de IL-2 por las Tregs, como mecanismo de supresión. Otro factor que afecta su

biodisponibilidad es su unión a la forma soluble del CD25 (sCD25). Al respecto, la molécula CD25 puede ser escindida por proteasas de la superficie celular de células T efectoras y Tregs, liberando su dominio extracelular o sCD25 [105, 106]. Este puede unirse a la IL-2 con afinidad similar a la que une la forma monomérica presente en la superficie celular. Se ha reportado que los niveles plasmáticos de sCD25 correlacionan positivamente con la activación celular, y que aumentan en pacientes con infecciones, inflamación o autoinmunidad. Por este motivo, es utilizado como biomarcador predictivo o de diagnóstico de diversas patologías [107, 108]. Sin embargo, el rol que juega el sCD25 sobre la función de la IL-2 en la inmunidad y mantenimiento de tolerancia aún continúa siendo controvertido. Por un lado, está reportado que puede actuar como receptor señuelo, uniéndose a la IL-2 y reduciendo su biodisponibilidad [109]. Por el contrario, también se observó que puede unirse a la IL-2 y permitir su presentación en *trans* a células que expresan el RIL-2 dimérico de afinidad intermedia [110], de igual manera a la trans-presentación descrita entre la célula dendrítica y célula T (**Fig. 8C**). Este último mecanismo incrementaría la sensibilidad celular a esta citocina, exacerbando la respuesta inmune si actúa sobre células T efectoras o ejerciendo como mecanismo supresor si actúa sobre las Tregs.

1.3.1 Vía de señalización de IL-2 en la infección por VSR

Está descrito que, en ciertas infecciones y autoinmunidad, las células T CD4+ efectoras presentan una capacidad reducida para producir IL-2 y, en consecuencia, se observa una menor frecuencia de Tregs circulantes [111]. Observaciones realizadas en modelos experimentales de infecciones por *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* y virus vaccinia han demostrado que la fase de infección aguda está asociada con una producción limitada de IL-2 por las células T CD4+ efectoras, lo que resulta en una transitoria disminución de la frecuencia de Tregs y en un aumento de células T efectoras [112].

En lo que respecta a la infección por VSR, diversos trabajos demuestran una posible afectación en la producción de IL-2 por las células T. En este sentido, un estudio demostró que la exposición al VSR *in vitro* de células T provenientes de donantes adultos sanos ocasionó una reducción en la producción de IL-2 en comparación con las células que fueron expuestas al virus influenza [113], lo que indica que el virus tendría un efecto en la función de las células T. Además, en un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, observamos que las células T CD4+ que fueron desafiadas con el VSR *in vitro* produjeron menores cantidades de IL-2 en comparación con la condición control, a partir de cultivos realizados con células purificadas de adultos, niños sanos y de cordón umbilical [19]. Estos estudios, además, señalan que la exposición *in vitro* al VSR de las células T reduce la capacidad proliferativa de éstas, en concordancia con lo reportado por Salkind y cols [114].

Por otro lado, tal como mencionamos previamente, elevados niveles de sCD25 plasmáticos pueden afectar la biodisponibilidad y función de la IL-2. En relación con esto, durante la infección por VSR se han observado elevados niveles plasmáticos de sCD25 en niños en la fase aguda de la infección [115,

116]. No obstante, se desconoce si durante la infección por VSR el sCD25 actúa como receptor señuelo de la IL-2, disminuyendo su biodisponibilidad, o exagera su función mediante la trans-presentación a células que expresan el receptor dimérico de IL-2.

Interesantemente, un estudio realizado en un modelo murino de infección por VSR indicó que las células dendríticas infectadas por el virus no promueven eficientemente la activación de las células T, las cuales muestran una menor producción de IL-2 y menor capacidad proliferativa. De forma llamativa, esta afectación no es mediada por factores solubles secretados por la célula dendrítica, sino por una deficiente sinapsis inmunológica [117]. Además, se ha señalado, que, tanto la respuesta de células T CD8+ de memoria como de Ac, mejoraron con el tratamiento *in vivo* con IL-2 en ratones desafiados con VSR. Estos efectos se asociaron con una reducción de la enfermedad y de la pérdida de peso en los ratones desafiados con el virus y tratados con IL-2 [118]. Por el contrario, un estudio usando un modelo murino de infección por VSR indicó que los ratones neonatos presentan una mayor capacidad para fosforilar STAT5 en respuesta a IL-2 respecto a adultos, lo que afecta la generación de células Tfh y la generación de Ac. Finalmente, proponen que la neutralización de IL-2 en estos ratones neonatos mejora la colaboración entre células T y B y la respuesta de Ac durante la infección por VSR [91].

En resumen, una posible disfunción en la producción de IL-2 por las células T CD4+ y disponibilidad de esta citocina durante la infección por VSR, podría desencadenar el desbalance observado en el compartimento de células T CD4+, que conlleva a una reducción de Tregs circulantes, y una ineficiente respuesta de memoria celular. Hasta el momento, no hay datos acerca de la capacidad de producción de IL-2 por las células T CD4+ ni del rol del sCD25 en la biodisponibilidad y función de esta citocina en niños cursando la infección por VSR.

1.4 Receptores para la porción Fc de la IgG

Los receptores para la porción Fc de los Ac (RFc) constituyen una familia de receptores que reconocen motivos presentes en la porción del fragmento cristalizante (Fc) de los Ac IgG, IgE o IgA. Se expresan en la membrana celular de la mayoría de los leucocitos.

Particularmente, los RFc que reconocen la porción Fc de la IgG (RFc_γ) son muy heterogéneos y se conocen 6 tipos diferentes (**Fig. 9**). La estimulación de algunos conduce a la activación celular, mientras que otros median un efecto inhibitorio. Los RFc_γ activadores presentan motivos ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) intracitoplasmáticos, que reclutan cinasas y activan las consecuentes cascadas de fosforilación. Por el contrario, los RFc_γ inhibitorios contienen motivos ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) que reclutan fosfatasa e inhiben la activación celular. Los receptores activadores son el RFc_γ de tipo I (CD64), RFc_γ de tipo IIa (CD32a), RFc_γ de tipo

IIc (CD32c), RFcy de tipo IIIa (CD16a) y RFcy de tipo IIIb (CD16b), mientras que el receptor inhibitorio es el RFcy de tipo IIb (CD32b).

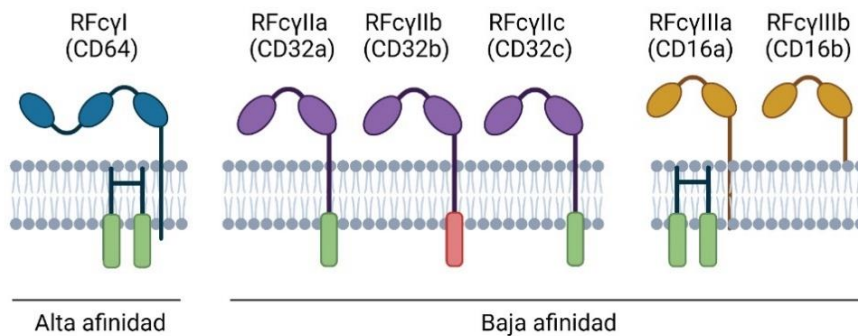


Figura 9. Receptores de la porción Fc de IgG (RFcy) de tipo I, II y III. Se muestran los diferentes tipos de receptores de la porción Fc de IgG (RFcy). Dominio intracelular: en verde motivos ITAM o activador, en rojo motivo ITIM o inhibitorio. Figura creada con Biorender.com.

El evento crítico en la activación de los RFcy es su microagregación o entrecruzamiento de receptores. Este fenómeno no es inducido por las IgG libres, sino por las que interactuaron con el antígeno y dieron lugar a la formación de asociaciones antígeno-Ac, denominadas complejos inmunes (CI) (**Fig. 10**). De esta manera, los Ac IgG contenidos en los CI son los ligandos fisiológicos de los RFcy. Los RFcy de tipo II y III presentan baja afinidad hacia los Ac que reconocen y, en consecuencia, solo pueden unir Ac que forman parte de CI. Por el contrario, el RFcyI presenta alta afinidad hacia los Ac IgG, lo que les permite unir Ac IgG libres. Además, la afinidad y especificidad de la unión de la porción Fc por los diferentes RFcy también están determinadas por la secuencia aminoacídica de las subclases de IgG (IgG1-IgG4) así como por la estructura y composición de glicanos asociados a la porción Fc de la IgG [119].

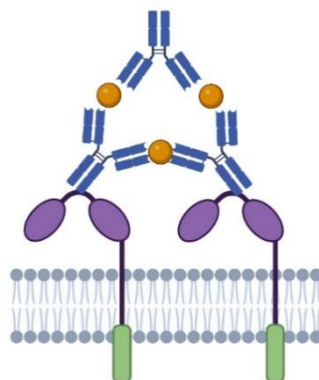


Figura 10. Entrecruzamiento de RFcy por complejos inmunes. Los complejos inmunes formados por anticuerpos IgG (azul) y antígeno (naranja) producen la microagregación y activación de los RFcy al unirse a estos. Figura creada con Biorender.com.

Diversos tipos celulares coexpresan en su superficie celular RFcy activadores e inhibitorios, como granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos. En estas células, la magnitud de la respuesta depende del balance entre los receptores activadores e inhibitorios. Las células B solo expresan RFcy inhibitorios, mientras que las células NK y plaquetas solo RFcy activadores. Por otro lado, la expresión de RFcy en células T sigue siendo controvertido. En los últimos años, numerosos

estudios -uno realizado por nuestro grupo de trabajo- han reportado que una pequeña proporción de células T CD4+ y CD8+ expresa el RFcy CD32, y también CD16 [120-128]. Estos hallazgos rompen el paradigma de que las células T no expresan RFcy [129, 130].

La activación de los RFcy culmina en la inducción de diversas funciones efectoras. Estas difieren sustancialmente dependiendo del tipo celular [131]. Entre las funciones efectoras activadas a través de los RFcy se encuentran: 1) fagocitosis de microorganismos opsonizados por Ac y reconocidos por RFcy de células fagocíticas (ADCP); 2) citotoxicidad celular dependiente de Ac (ADCC) [132]; y 3) degranulación celular y modulación de la respuesta inmune a través de la promoción de la secreción de citocinas y quimiocinas [133, 134].

Por otro lado, numerosos estudios han identificado a los RFcy como mediadores claves del fenómeno de la facilitación de la infección mediada por Ac (ADE, por sus siglas en inglés, *Antibody Dependent Enhancement*) [129], ya que permiten la internalización de los CI que contienen IgG unida al virus y la subsiguiente infección de la célula que porta el RFcy.

1.4.1 Receptor para la porción Fc de IgG de tipo II (CD32) en células T

El CD32 es codificado por 3 genes, FCGR2A, FCGR2B, y FCGR2C y presenta múltiples isoformas, altamente homólogas en sus dominios extracelular y transmembrana, pero que difieren en su dominio intracelular. Las más prevalentes son las isoformas CD32a y CD32b, que activan o inhiben funciones celulares respectivamente. La isoforma CD32a es expresada constitutivamente en plaquetas, monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos, mientras que la isoforma CD32b en casi todos los leucocitos a excepción de las células NK [135].

La expresión del CD32 en las células T continúa siendo un tema de discusión. Mientras que diversos trabajos sostienen que las células T no expresan CD32 [129, 130, 136], varios estudios afirman que un bajo porcentaje de células T en reposo expresan CD32 de su superficie [120, 121, 126, 128, 137]. Esto se pudo comprobar mediante la detección de la proteína por citometría de flujo y la determinación del ARNm del CD32 en esta subpoblación celular. Además, un importante porcentaje de las células T CD4+ en reposo presenta altas cantidades de CD32 almacenados en forma de *pool* citoplasmático [138, 139]. Notablemente, la expresión del CD32 en estas células aumenta frente a la activación celular *in vitro* [126, 140]. Particularmente, nuestro grupo de investigación ha contribuido con el estudio de la expresión y función del CD32 en las células T CD4+. En este sentido, observamos que, en condiciones basales, un ~2 % de las células T CD4+ purificadas de adultos sanos expresa CD32 en su superficie [120]. Además, el análisis en células permeabilizadas reveló que el ~9 % de las células T CD4+ almacenan un *pool* citoplasmático de CD32. El estudio del ARNm de las isoformas del CD32 en las células T CD4+ señaló un predominio de la isoforma activadora CD32a sobre la inhibidora CD32b, en una relación ~5:1. En cuanto a la función efectora del CD32 presente en estas células, encontramos

que el entrecruzamiento del CD32 en células T CD4+ previamente estimuladas provee una señal co-estimuladora, que resulta en la activación celular e inducción de la producción de citocinas.

En relación con la expresión de CD32 en células T en el contexto de infecciones, estudios en pacientes que conviven con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) revelan la expresión del CD32 en las células T CD4+, preferentemente en células T activadas [121, 124, 141]. Asimismo, estas células T CD4+ CD32+ muestran un fenotipo asociado a los perfiles Th2 y Th17 en comparación con su contraparte de células CD32- [121], el cual estaría asociado con una mayor persistencia viral, aunque esto último aún se encuentra en discusión [130, 142].

La expresión del CD32 en las células T CD8+ ha sido reportado por diversos estudios [126, 128, 139]. Sin embargo, a diferencia de las células T CD4+, aún no hay estudios que hayan caracterizado el fenotipo de las células T CD8+ que expresan CD32 ni las funciones efectoras que se desencadenan en estas células frente a la estimulación del CD32.

1.4.2 Facilitación de la infección mediada por anticuerpos (ADE)

Los niveles de Ac IgG neutralizantes específicos para el virus en suero representan un correlato de protección contra las infecciones, ya que la unión de Ac neutralizantes y RFcy activadores está asociada a funciones efectoras protectoras que permiten una rápida eliminación del virión opsonizado y de las células infectadas [143-145]. Sin embargo, cuando los Ac específicos para el virus se presentan en títulos subneutralizantes, se unen a la partícula viral sin llegar a neutralizarla. De esta manera, el CI formado por los Ac y la partícula viral se une a través de la porción Fc a RFcy expresados en leucocitos, y, en consecuencia, facilita la entrada del virus a la célula huésped [129, 146] a través del mecanismo conocido como ADE [129, 147] (**Fig. 11**). Por este motivo, todas aquellas células que expresan RFcy son susceptibles a la infección.

Hasta el momento, se ha demostrado el mecanismo de ADE en células de la inmunidad innata para diversas infecciones virales, que incluyen la infección por el virus del Dengue [148, 149], VIH [150], virus influenza A [151], VSR [152], Ébola [153] y el virus de Chikungunya [154]. Sin embargo, aún no hay ningún estudio que haya examinado ADE en células T permisivas a infecciones virales debido a que la expresión de RFcy en estas células sigue siendo controvertida.

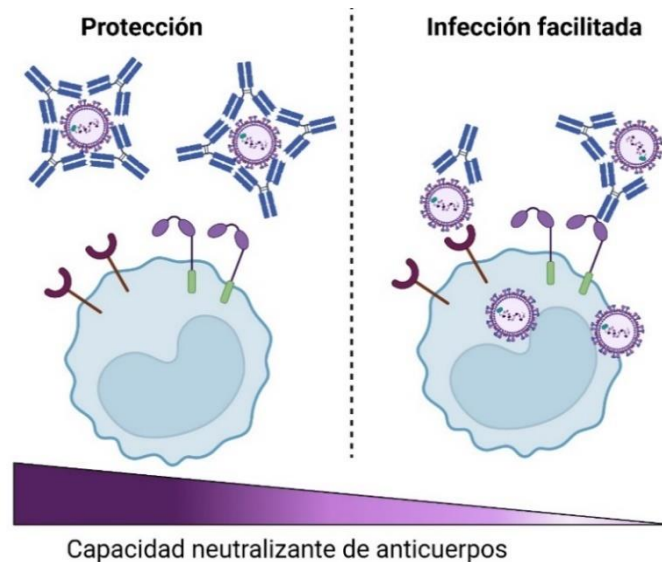


Figura 11. Facilitación de la infección mediada por anticuerpos. Los niveles elevados de anticuerpos neutralizan completamente la partícula viral (izquierda). Sin embargo, los niveles sub-neutralizantes de anticuerpos forman complejos inmunes con el virus que interactúan con receptores de la porción Fc de las IgG, lo que conduce a un aumento de la infección (derecha). Figura creada con Biorender.com.

1.4.3 Rol de los anticuerpos y receptores para la porción Fc de IgG en la infección por VSR

Al contrario de lo que sucede en otras infecciones, los niveles de Ac neutralizantes del VSR que se generan durante la infección parecen no correlacionar adecuadamente con la protección de la enfermedad [41]. Las causas de esto no están claramente dilucidadas, pero a pesar de presentar altos niveles de Ac maternos neutralizantes del VSR, los niños menores de 6 meses pueden padecer un cuadro de infección severa [155, 156]. Por lo tanto, aún quedan por determinar los mecanismos por los cuales los Ac pueden proteger o, por el contrario, contribuir a la patología.

La primera vacuna desarrollada contra el VSR se basó en el virus inactivado con formalina y ocasionó una respuesta más grave que la infección natural en los niños vacunados [157, 158], lo que demuestra la complejidad de inducir una respuesta inmune adecuada contra el VSR. Entre las explicaciones posibles de este resultado se encuentran la inducción de altos niveles de Ac con baja capacidad neutralizante, formación de CI y depósito de proteínas del complemento en pulmón, y la generación de una respuesta de células T patogénica [159, 160].

Los CI que contienen antígenos del VSR son detectables a partir del tercer día luego del inicio de los síntomas de la enfermedad hasta 36 días después [161]. Al respecto, las funciones efectoras asociadas a los CI y a la expresión de RFcy durante la infección por VSR han sido descritas principalmente en células de la inmunidad innata [134, 162, 163]. En primer lugar, los estudios *in vitro* señalan que neutrófilos y eosinófilos están involucrados en la fagocitosis mediada por Ac o ADCP de células infectadas con VSR [164]. Además, un estudio en modelo murino ha demostrado que los macrófagos confieren protección contra la infección a través de funciones mediadas por Ac, aunque resta definir

si es a través de la fagocitosis [165]. Otro mecanismo efector es la citotoxicidad mediada por Ac o ADCC. Observaciones realizadas en ensayos *in vitro* indican que las células NK, a través del CD16a, muestran actividad citotóxica mediada por ADCC sobre células infectadas con VSR [166]. No obstante, hay evidencias limitadas acerca del fenómeno de ADCC durante la infección por VSR *in vivo*.

Como se mencionó anteriormente, además de las funciones efectoras clásicas mediadas por Fc a través de los RFcy, los CI también pueden promover la maduración y activación de las células inmunes, lo que conduce a una amplia gama de actividades efectoras y a la producción de mediadores inmunomoduladores. Estudios realizados en neutrófilos de donantes sanos demostraron que los CI que contienen VSR, a través de la unión a los RFcy CD16 y CD32, promueven la activación celular y reclutamiento en pulmones [167]. También se ha observado en un estudio *in vitro* que los CI que contienen VSR inducen la secreción de diversas citocinas y quimiocinas en monocitos [168]. Por otro lado, observaciones realizadas en modelo murino indicaron que los CI pueden modular la función de las células dendríticas a través de la unión al CD16a presente en la superficie celular, lo que promueve la correcta activación de las células T CD4+. En cambio, las células dendríticas expuestas a CI que contienen Ac sub-neutralizantes inducen una menor activación de las células T CD4+ y una ineficiente respuesta de memoria celular [169]. En resumen, estos datos indican que los CI juegan un rol muy importante en la modulación de la respuesta inmune durante la infección por VSR.

El mecanismo de ADE durante la infección por VSR ha sido demostrado en ensayos *in vitro* empleando Ac monoclonales y suero de pacientes en células permisivas a la infección, como líneas monocíticas, células NK y células dendríticas [152]. No obstante, aún no se ha corroborado este mecanismo durante la infección *in vivo*. Recientemente, un estudio reveló que la incubación de células NK con el virus y dosis sub-neutralizantes de Ac específicos para el VSR ocasiona un aumento de la infección de estas células, y en consecuencia se afecta su funcionamiento [170]. Por otro lado, también se demostró el mecanismo de ADE en la línea celular monocítica THP-1 [171]. En este sentido, la incubación de estas células con plasma de cordón umbilical -que presenta Ac maternos específicos para el VSR- o de niños hospitalizados por VSR, induce ADE a través del CD32.

Sin embargo, hasta el momento no hay estudios acerca de la expresión del CD32 en las células T de los niños con infección por VSR ni el potencial efecto de la unión de los CI generados durante la infección. En este sentido, se desconoce si la presencia del CD32 puede modular la respuesta celular o facilitar la infección, a través del mecanismo de ADE, en estas células permisivas a la infección por VSR.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La infección por VSR es el agente causal más frecuente de la infección del tracto respiratorio inferior en el primer año de vida y la principal causa de muerte post-neonatal en países en desarrollo [21, 172]. Dado que esta infección no genera una respuesta inmune de memoria eficiente, las reinfecciones son recurrentes a lo largo de la vida [27]. Por otro lado, hasta el momento no se dispone de ninguna vacuna aprobada contra el VSR [173]. El único tratamiento disponible para la prevención de la forma severa es el uso del Ac monoclonal humanizado IgG1 *Palivizumab*. Sin embargo, está indicado únicamente en la población de riesgo [174].

La IL-2 es una citocina esencial en la homeostasis de las células T CD4+ y CD8+. Promueve la activación y proliferación de las células T e influye en la diferenciación de células T CD4+ efectoras. En este sentido, en ausencia de IL-2 el número de Tregs disminuye significativamente, ya que éstas dependen de la producción de IL-2 por otras células para su mantenimiento y función. Durante la infección por VSR en niños menores de 2 años, se ha reportado un desbalance en las células T CD4+ efectoras [86] y una disminución en la frecuencia de Tregs circulantes [96, 175]. No obstante, los mecanismos subyacentes asociados a estas alteraciones aún no se encuentran dilucidados. Por otro lado, la señalización de IL-2 a través de su receptor optimiza tanto la generación de células T CD8+ efectoras como su diferenciación a células de memoria. Al respecto, la infección por VSR no induce una respuesta de células T de memoria eficiente [176]. Ensayos de infección *in vitro* de células T CD4+ de donantes sanos mostraron que la infección por VSR disminuye la capacidad de producción de IL-2 en estas células [19, 113]. Sin embargo, se desconoce si las células T CD4+ de niños infectados con VSR presentan una disfunción en la secreción de IL-2.

Por otra parte, los Ac IgG pueden modular funciones efectoras celulares o facilitar la infección de la propia célula, a través de la unión de complejos inmunes a receptores para la porción Fc de las IgG presentes en la superficie celular [177, 178]. Adicionalmente, se ha encontrado que, en condiciones basales, un porcentaje de células T de donantes sanos expresa el receptor para la porción Fc de las IgG de tipo II, CD32, y esta expresión aumenta con la activación celular [120, 123, 125-128]. En el contexto de la infección por VSR, los complejos inmunes juegan un rol importante en la modulación de mecanismos efectoras en células que poseen Rfc [134], aunque su efecto en células T no está estudiado. En síntesis, estos factores señalados, sumados al hecho de que las células T CD4+ y CD8+ son permisivas a la infección por VSR [19], sugieren un rol potencial de los complejos inmunes circulantes que contienen IgG, generados durante el curso de esta infección, sobre las células T.

En base a todo lo expuesto anteriormente, la **hipótesis** del trabajo planteada establece que en niños hospitalizados por infección por VSR, el balance del compartimento de células T CD4+ se encuentra afectado por la limitada biodisponibilidad de IL-2. Esto no solo podría explicar la disminución de Tregs circulantes, sino también la diferenciación de las células T CD4+ a perfiles efectoras involucrados en el daño tisular que acompaña a la infección. Asimismo, la expresión de CD32 por parte de las células T,

al interactuar con sus ligandos naturales, los complejos inmunes, modula la función de las propias células T.

Por lo mencionado anteriormente, el **objetivo general** del proyecto consistió en caracterizar las consecuencias funcionales que impone la infección por VSR en el compartimento de células T en niños hospitalizados menores de dos años. Para llevarlo a cabo, nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar si una desregulación en la vía de señalización de IL-2 puede explicar el desbalance en el compartimento de células T CD4+ en los niños con VSR, en particular la depleción de Tregs. Para ello, empleamos muestras de sangre periférica de una cohorte de niños hospitalizados por VSR y niños sanos y analizamos:

- La capacidad de las células T CD4+ de producir IL-2.
- La respuesta de las células T CD4+ al agregado exógeno de IL-2.
- La presencia de factores solubles en el plasma de los niños VSR que puedan afectar la biodisponibilidad de IL-2 y el efecto de estos factores en la función de las células T CD4+.
- La asociación entre la afectación de la vía de señalización de la IL-2 y la severidad de la enfermedad.

2. Evaluar si los Ac IgG, a través de la unión de complejos inmunes al CD32 presente en las células T, pueden modular funciones efectoras y facilitar la infección por VSR en estas células. A partir de sangre periférica de una cohorte de niños hospitalizados por VSR y niños sanos, estudiamos:

- La expresión de CD32 en las células T CD4+ y CD8+, estableciendo su frecuencia en sangre periférica y predominancia de las isoformas activadora e inhibitoria.

En función de la expresión de CD32 observada en los niños VSR+, evaluamos:

- El fenotipo de las células T CD32+, a través del análisis de la expresión de marcadores de activación y subpoblaciones de células T de memoria.
- La capacidad de las células T de unir complejos inmunes por medio del CD32.
- La facilitación de la infección por VSR mediada por Ac en células T.
- La relación entre la expresión del CD32 en las células T y la severidad de la enfermedad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Población de estudio

Reclutamos 214 infantes menores de 2 años hospitalizados por un cuadro moderado o severo de infección respiratoria por VSR (niños VSR+), en el Hospital General de Niños ‘Pedro de Elizalde’ (ex Casa Cuna) durante las temporadas de circulación de este virus entre 2017 y 2019. La infección por VSR fue confirmada por inmunofluorescencia indirecta de secreciones nasofaríngeas. Fueron excluidos pacientes con historia de prematurez, inmunodeficiencias, cardiopatías congénitas o enfermedades crónicas, y aquellos que se encontraban bajo tratamiento con corticoides o inmunosupresores. Todos los pacientes incluidos requirieron hospitalización. La severidad fue determinada por los médicos tratantes mediante la aplicación del *score* clínico de severidad de la enfermedad (CDSS, *Clinical Disease Severity Score*). Este se basa en el *score* de Tal modificado y clasifica a los pacientes según tengan bronquiolitis por VSR leve (0-4), moderada (5-8) o severa (9-12) al momento de la toma de la muestra [179].

El grupo control consistió en 83 niños previamente sanos que fueron admitidos al Hospital General de Niños ‘Pedro de Elizalde’ por una cirugía programada o visitas de control, pareados por sexo y edad con los niños VSR+. Fueron excluidos aquellos que presentaron alguna infección respiratoria en las 4 semanas previas al estudio.

Las características clínicas de los niños y las niñas se pueden observar en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Características demográficas y clínicas de las cohortes incluidas.

	Pacientes VSR+ n=214	Niños sanos n=83	p
Características demográficas			
Edad, meses, mediana (rango)	7 (3-12)	6 (4-20)	NS
Sexo, femenino, n (%)	86 (40 %)	43 (52 %)	NS
Severidad de la enfermedad			
CDSS, n (%) *			
Leve (0-4)	0 (0 %)	N/A	
Moderado (5-8)	130 (61 %)	N/A	
Severo (9-12)	84 (39 %)	N/A	
Requerimiento de O ₂ , n (%)	214 (100 %)	N/A	
Permanencia en el hospital, días, media ± DE	7,3 ± 1,2	N/A	
Admisión a UTI, n (%)	13 (6,1 %)	N/A	
Neumonía	53 (25 %)	N/A	
Parámetros de laboratorio			
Leucocitos, recuento/mm ³ , media ± DE	10,559 ± 4,021	8,952 ± 1,250	NS
Linfocitos, %, media ± DE	39,4 ± 15,2	53,1 ± 4,0	<,001
Características de las poblaciones de linfocitos T			
CD4+, %, media ± DE #	28 ± 11	32,3 ± 5,7	NS

CD8+, %, media \pm DE #	12,4 \pm 6,8	20 \pm 7,5	<,01
---------------------------	----------------	--------------	------

DE: desvío estándar

Porcentajes de poblaciones celulares provienen del porcentaje total de linfocitos (n=20)

CDSS: Score clínico de severidad de la enfermedad, calculado a partir del score de Tal modificado

* Todos los pacientes admitidos mostraron un score CDSS igual o mayor a 7

UTI: unidad de terapia intensiva

Este trabajo contó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital General de Niños 'Pedro de Elizalde' y el Ministerio de Salud del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, protocolo n° 178/15. Todas las muestras de sangre fueron extraídas con el previo consentimiento informado del padre/madre o tutor/a del niño/a.

Para aquellos experimentos donde se requerían un elevado número de células de dadores sanos, utilizamos sangre de adultos sanos (n=13, edad promedio 34 años, rango 25-42 años), provenientes del Servicio de Hematología del Sanatorio Méndez. El protocolo n° 20190822 V2 fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Consideramos donante sano a toda persona que no haya presentado antecedentes de enfermedad maligna, hematológica, infección aguda o crónica y que no hayan recibido tratamiento con drogas inmunosupresoras o vacunas. Todas las personas prestaron su conformidad.

3.2 Medios de cultivo

El medio de cultivo completo utilizado para el crecimiento de PBMCs y células primarias purificadas fue RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*, GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Natocor) al 10 %, 2 mM L-glutamina (GIBCO), 100 U/ml penicilina (GIBCO), 100 μ g/ml estreptomina (GIBCO). El SFB fue previamente deplementado por 30 minutos (min) a 56 °C.

Los cultivos de la línea epitelial HEP-2 se llevaron a cabo usando medio de cultivo completo de crecimiento DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*, GIBCO) suplementado con SFB al 10 %, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomina.

Cuando las células fueron infectadas con VSR, utilizamos medio de cultivo de mantenimiento, RPMI o DMEM según corresponda suplementado con SFB al 2 %, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomina.

Para la determinación del título viral, empleamos medio de plaqueo semisólido que consiste en DMEM suplementado con SFB al 2 % y Metilcelulosa al 0,8 % (Sigma).

3.3 Donantes de sangre

3.3.1 Muestras de sangre periférica de niños sanos y con VSR

De cada niño participante en este estudio, se tomó una muestra de sangre periférica (SP) de 0,5 - 1 ml en tubos con EDTA, obtenida en el momento de la venopunción realizada para los exámenes de ingreso a la sala de internación o por estudios de rutina.

3.3.2 Muestras de sangre periférica de adultos

De cada donante adulto, se extrajeron entre 5 a 15 ml de SP en tubo con EDTA, que fue procesada el mismo día de la extracción.

3.4 Procesamiento de las muestras de sangre periférica

3.4.1 Obtención de plasma

En primer lugar, centrifugamos la muestra de SP a 1.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min. Separamos el plasma que fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

3.4.2 Aislamiento de PBMCs

Luego de separar el plasma, aislamos los PBMCs a partir de una centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) a 2.000 rpm por 20 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, lavamos los PBMCs con solución fisiológica y los resuspendimos en medio de cultivo RPMI completo. Por cada muestra de niño y adulto obtuvimos aproximadamente $1-2,5 \times 10^6$ y $7-25 \times 10^6$ de PBMCs respectivamente, que fueron empleados en los distintos ensayos inmediatamente luego de su obtención.

3.5 Purificación de subpoblaciones celulares

La purificación de las distintas subpoblaciones celulares fue realizada mediante 3 metodologías diferentes: por selección inmunomagnética (empleando partículas magnéticas), por gradiente de inmunodensidad (utilizando un cóctel de Ac que forman rosetas a partir del agregado de complejos de Ac tetraméricos, seguido de un gradiente de densidad) o por *Cell Sorting* por citometría de flujo. La elección del método de purificación dependió del número de células y pureza requeridas para cada ensayo, y también de la disponibilidad del citómetro de flujo, puesto que las células fueron procesadas en el día de la obtención de la muestra de sangre. En todos los casos, determinamos la pureza de las células obtenidas por citometría de flujo.

3.5.1 Purificación de células T CD8+ por selección negativa inmunomagnética

Las células T CD8+ fueron aisladas mediante el sistema de separación celular por selección negativa con partículas magnéticas. Empleamos el kit *Human CD8+ T Cell Isolation Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Brevemente, marcamos las células resuspendidas en *Buffer* de sales de fosfato (PBS) con SFB al 2 % con Ac biotinilados dirigidos contra antígenos de superficie presentes

en las células que no son de interés, seguido de *microbeads* o perlas magnéticas recubiertas de Ac anti-biotina. Luego, pasamos la suspensión celular a través de una columna (tamaño MS) colocada en el imán correspondiente (*MiniMACS™ Separator*). Las células marcadas por las partículas magnéticas (no deseadas) quedaron retenidas en la columna por el imán, mientras que las células no marcadas (T CD8+) eluyeron y fueron recolectadas (selección negativa). La pureza obtenida fue siempre mayor al 95 %. Por cada muestra obtuvimos aproximadamente $1-2 \times 10^6$ células T CD8+, que luego fueron resuspendidas en medio RPMI completo y cultivadas.

3.5.2 Purificación de células T CD4+ y monocitos por selección negativa por gradiente de inmunodensidad

Las células T CD4+ y monocitos fueron aislados por selección negativa mediante el kit *RosetteSep™* (STEMCELL Technologies). Esta técnica consiste en la formación de rosetas a partir del agregado de un cóctel de Ac tetaméricos que unen a todas las células que no son blanco de la purificación y a la glicoforina A presente en los glóbulos rojos. En primer lugar, incubamos la muestra de sangre con el cóctel de Ac. Luego, realizamos un gradiente de *Ficoll-Hypaque* a partir de la muestra diluida 1:2 en PBS con SFB al 2 % y del halo del gradiente recuperamos las células enriquecidas. La pureza fue siempre mayor al 95 % (**Fig. 12**). Por cada muestra de niño obtuvimos aproximadamente $0,5 - 1 \times 10^6$ células T CD4+ y por cada muestra de adulto 3×10^6 monocitos o $3-4 \times 10^6$ células T CD4+, que fueron resuspendidos en medio de cultivo RPMI completo hasta ser usados en los determinados experimentos.

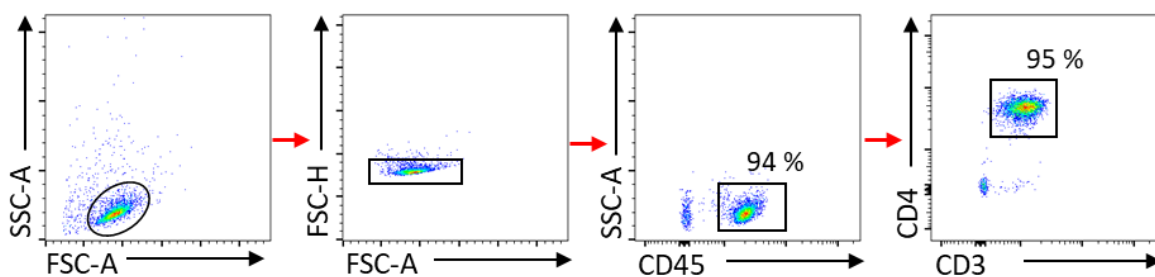


Figura 12. Porcentaje de células T CD4+ obtenidas luego de la purificación por selección negativa por inmunodensidad. Para evaluar la pureza celular, 5.000 células purificadas fueron marcadas con Ac específicos para CD45, CD3 y CD4. Se analizó el porcentaje correspondiente a las células T CD4+ por citometría de flujo. Se muestran *dot plots* representativos correspondientes a un niño VSR+.

3.5.3 Purificación de células por citometría de flujo o *Cell Sorting*

En algunos ensayos donde requeríamos purificar más de una población celular a partir de una única muestra, utilizamos el citómetro *FACSaria Fusion Cell Sorter* (BD Biosciences) para purificar células mediante la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia o *Fluorescence-Activated Cell Sorting*. Esta técnica consiste en la separación física de células en base a la expresión diferencial

de uno o varios parámetros o marcadores. En todos los casos, los tubos de recolección de las células de interés contenían medio de cultivo RPMI suplementado con SFB al 20 %. Cuando las células fueron requeridas para cultivo, el equipo fue previamente lavado en condiciones asépticas. Usamos distintas estrategias de separación celular según los experimentos a realizarse:

3.5.3.1 Purificación de células T CD4+ y CD8+ por selección positiva

Debido a que el análisis de la expresión de las isoformas del CD32 en las células T de los niños por PCR cuantitativa requería de un alto grado de pureza celular, sumado al hecho de que la técnica de rosetas solo permite purificar una única población, para este caso decidimos aislar las células T CD4+ y T CD8+ por *Cell Sorting* por selección positiva. En primer lugar, realizamos una marcación de superficie de los PBMCs con Ac específicos para CD45, CD3, CD4, CD8, a partir del cóctel *BD Multitest™* (BD Biosciences). Luego del lavado, resuspendimos las células en medio de cultivo RPMI completo y procedimos a la separación por *Cell Sorting* empleando la estrategia de selección de poblaciones que se muestra en la **Fig. 13**. Brevemente, diseñamos las ventanas para seleccionar la población correspondiente a los linfocitos y discriminar los dobletes. Luego, delimitamos la población positiva para CD45, marcador leucocitario. Finalmente, seleccionamos las poblaciones CD4+CD3+ (células T CD4+) y CD8+CD3+ (células T CD8+).

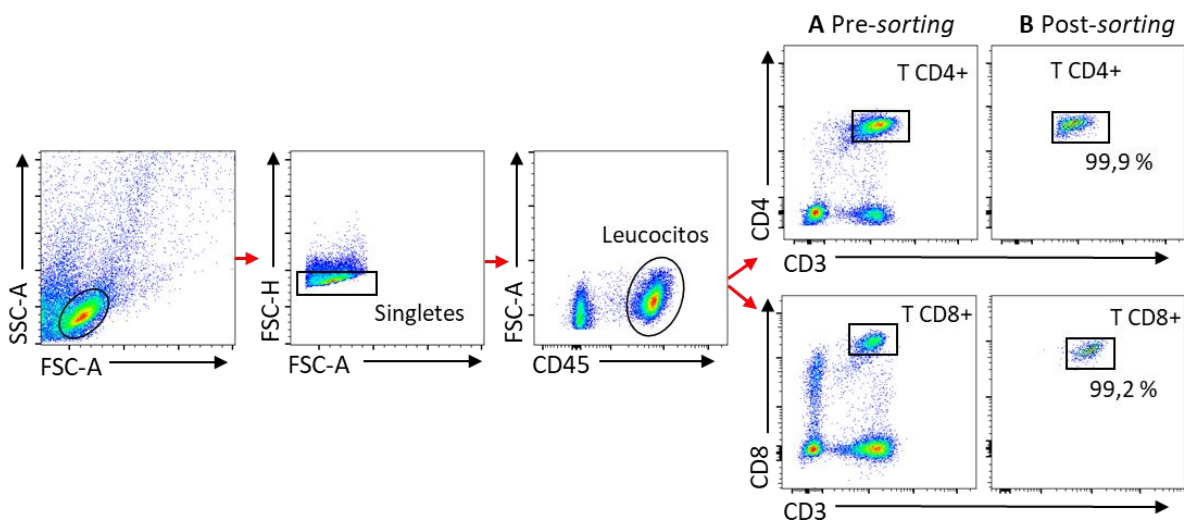


Figura 13. Esquema de aislamiento de células T CD4+ y CD8+ por selección positiva por Cell Sorting. Los PBMCs de niños sanos y VSR+ fueron marcados con Ac específicos para CD45, CD3, CD4 y CD8. Luego se procedió a la separación de células T CD4+ y CD8+ por *Cell Sorting* por citometría de flujo (A, pre-sorting). Posteriormente, se evaluó la pureza analizando el porcentaje correspondiente a las células T CD4+ y CD8+ (B, post-sorting). Se muestran los *dot plots* representativos de un niño VSR+.

En todos los casos, la pureza fue mayor al 98 %. Por cada muestra, obtuvimos aproximadamente 0,1 - 0,8 x10⁶ células T CD4+ o CD8+. Resuspendimos las células en solución de lisis (Invitrogen) y las almacenamos a -80 °C hasta la purificación del ARN, a fin de evaluar la expresión de los genes del CD32 (*FCGR2A* y *FCGR2B*) en las células T de los niños por PCR cuantitativa (sección 3.10).

3.5.3.2 Purificación de células T por selección negativa

En determinados experimentos, las marcaciones de superficie con los Ac conjugados con fluorocromos para seleccionar las células T por *Cell Sorting* por selección positiva interferían con las marcaciones con Ac a realizarse posteriormente. Tal es el caso donde usamos las células T para estudiar la degranulación de las células T CD8+ por citometría de flujo (sección 3.6.4.2), para analizar la expresión del CD32 por microscopía confocal (sección 3.9) y para evaluar el porcentaje de infección luego del ensayo de ADE por citometría de flujo (sección 3.13.2). Por este motivo, purificamos las células T de niños VSR+ por selección negativa por *Cell Sorting* y en condiciones asépticas si luego las células eran requeridas para cultivo. Para ello, primero realizamos una marcación de superficie de los PBMCs con Ac específicos para CD14, CD19 y CD56 (BD Biosciences), con el fin de delimitar y excluir las poblaciones de monocitos, células B y NK de nuestra población de interés (células T). Luego del lavado, resuspendimos las células en medio de cultivo RPMI completo y procedimos a la separación de células T por *Cell Sorting*. Las ventanas fueron diseñadas para seleccionar las células CD14- CD19- CD56- (células T, **Fig. 14**).

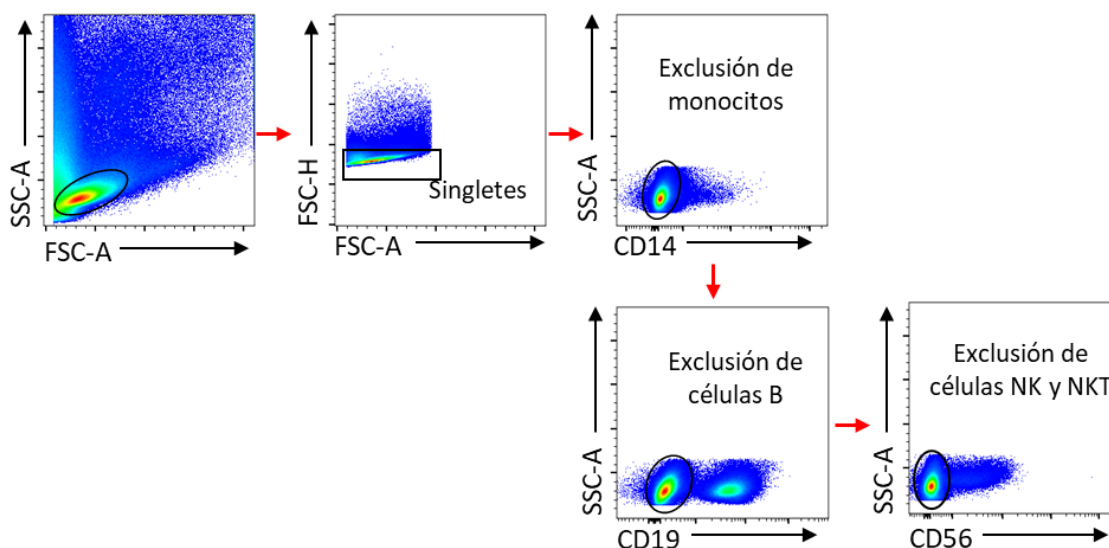


Figura 14. Esquema de aislamiento de células T CD4+ y CD8+ por selección negativa por *Cell Sorting*. Los PBMCs de niños VSR+ fueron marcados con anticuerpos específicos para CD14, CD19 y CD56, para delimitar y excluir las poblaciones de monocitos, células B y NK respectivamente. Luego se procedió a la separación de células T por selección negativa mediante *Cell Sorting*.

La pureza fue siempre mayor al 98 %. Por cada muestra obtuvimos aproximadamente $0,5-1,2 \times 10^6$ células T totales, que fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI completo y utilizadas en el ensayo correspondiente.

3.6 Cultivos celulares

Todos los cultivos celulares fueron llevados a cabo a partir de células frescas inmediatamente luego de ser aisladas. En todos los casos, las condiciones de cultivo iniciales consistieron en sembrar las células

a una concentración de 1×10^6 células/ml en placa de 48 pocillos en medio de cultivo RPMI completo, a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5 %, salvo que se especifique lo contrario.

3.6.1 PBMCs de niños

3.6.1.1 Producción *de novo* de IL-2

Para evaluar la producción *de novo* de IL-2 por parte de las células T CD4+ de los niños VSR+ y sanos, los PBMCs fueron estimulados con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 50 ng/ml; Sigma) e Ionomicina (1 µg/ml; Sigma) por 1 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, agregamos Monensina (2 µM; *BD Golgi Stop*; BD Biosciences). Luego de 5 h totales de cultivo, recolectamos las células y realizamos la marcación intracitoplasmática para la detección de IL-2 (sección 3.7.3.1).

3.6.1.2 Proliferación del compartimento de células T CD4+ y secreción de citocinas al medio extracelular

Con el objetivo de analizar la proliferación del compartimento de células T CD4+, particularmente de las Tregs, en presencia de IL-2 exógena, realizamos cultivos a partir de PBMCs de niños sanos y VSR+. Para ello, sembramos los PBMCs y estimulamos con fitohemaglutinina (PHA-P, 4 µg/ml, Sigma-Aldrich) en presencia o ausencia de IL-2 (20 ng/ml, Peprotech Inc.) por 3 días a 37 °C. Posteriormente, las células fueron levantadas del cultivo y marcadas para la determinación del antígeno nuclear Ki-67 y el factor de transcripción FOXP3 (sección 3.7.3.2). Asimismo, para evaluar los niveles de citocinas secretados al medio extracelular, almacenamos el sobrenadante de la condición sin el agregado de IL-2 a -80 °C hasta su uso (sección 3.8.1).

3.6.1.3 Estimulación con IL-2

Para evaluar la frecuencia de Tregs en niños VSR+, cultivamos PBMCs en ausencia o presencia de IL-2 (20 ng/ml) por 24 h a 37 °C. En algunos casos, para examinar el efecto del agregado de sCD25 recombinante en la expansión de Tregs, estimulamos las células con IL-2 en presencia o ausencia de sCD25 (200 ng/ml, PeptoTech Inc). Finalmente, levantamos las células y realizamos la marcación intranuclear para determinar la frecuencia de Tregs FOXP3+ (sección 3.7.3.3).

3.6.1.4 Clivaje de CD25 por activación celular

Con el fin de confirmar si la activación de PBMCs induce el clivaje de la molécula CD25 y la consecuente liberación de la forma soluble (sCD25), sembramos PBMCs de niños sanos y VSR+ y los cultivamos en presencia o ausencia de PMA (50 ng/ml) e Ionomicina (1 µg/ml), por 18 h a 37 °C. Posteriormente, centrifugamos las células y cosechamos el sobrenadante de cultivo, que fue almacenado a -80 °C hasta la cuantificación de sCD25 (sección 3.8.2).

3.6.1.5 Ensayo de unión de IgG agregada

Uno de los objetivos consistió en evaluar la capacidad de las células T de niños VSR+ de unir IgG a través del CD32, usando IgG agregada por calor (IgGa) como modelo de CI (**Fig. 15**). Inicialmente, la IgG humana (Sigma) fue agregada por calor durante 12 min a 63 °C. Luego, centrifugamos la solución a 10.000 g por 5 min y descartamos el precipitado, ya que la IgGa permaneció en el sobrenadante.

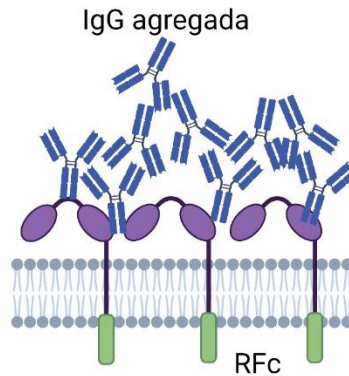


Figura 15. IgG agregada como ligando del CD32. IgG humana agregada *in vitro* por calor se une al CD32 e induce su activación. Figura creada con Biorender.com.

Posteriormente, incubamos los PBMCs de niños VSR+ con IgGa (400 µg/ml) a una concentración de 1×10^6 células/100 µl en medio de cultivo RPMI sin SFB, durante 2 h a 37 °C (**Fig. 16**). Esta concentración de la IgGa utilizada se basó en resultados previos de nuestro grupo de trabajo [120]. Para evaluar la especificidad de la unión, en algunos ensayos la muestra fue incubada previamente con un Ac bloqueante anti-CD32 (clon IV.3, 30 µg/ml, Stem Cell) por 1 h a 4 °C, el cual en forma monomérica inhibe la interacción del receptor a su ligando. Analizamos la unión de IgGa por las células T por citometría de flujo (sección 3.7.2.2).

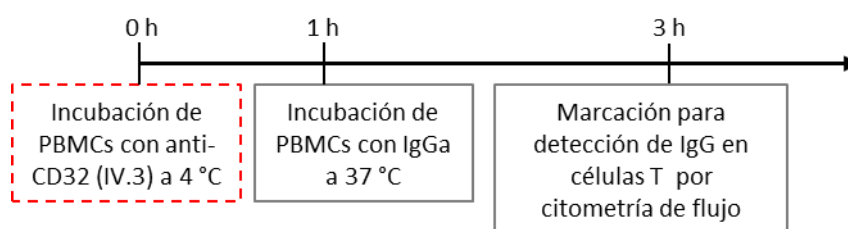


Figura 16. Ensayo de unión de IgG agregada por las células T. Línea de tiempo donde se muestra el flujo de trabajo desarrollado en este ensayo utilizando PBMCs de niños VSR+. La línea punteada roja indica el tratamiento que se realizó en una de las condiciones previo al ensayo general.

3.6.2 Ensayo de supresión por células T CD4+ estimuladas con IL-2

Con el fin de evaluar la capacidad supresora de células T CD4+ estimuladas con IL-2 sobre células T CD8+ purificadas del mismo donante (autólogas), realizamos el ensayo de supresión que se describe a continuación. En primer lugar, sembramos las células T CD4+ purificadas en placa de 48 pocillos previamente recubiertos con Ac anti-CD3 (10 µg/ml, Beckman Coulter), para inducir su activación.

Estimulamos con IL-2 (20 ng/ml) e incubamos durante 48 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, a fin de generar un cultivo de células autólogas, purificamos células T CD8+ del mismo donante y las marcamos con el colorante CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína). Co-cultivamos las células T CD4+ con las células T CD8+ previamente marcadas con CFSE, en una relación CD8:CD4 1:0, 1:1, 2:1 y en presencia de PHA-P (4 µg/ml) por 4 días a 37 °C. Como control negativo del ensayo, una porción de las células T CD8+ fueron tratadas con mitomicina C (50 µg/ml, Sigma) que arresta su ciclo celular. Finalmente, evaluamos la proliferación de las células T CD8+ por citometría de flujo en las distintas condiciones ensayadas (sección 3.7.3.4). En la **Fig. 17**, se muestra la línea de tiempo correspondiente a este ensayo.

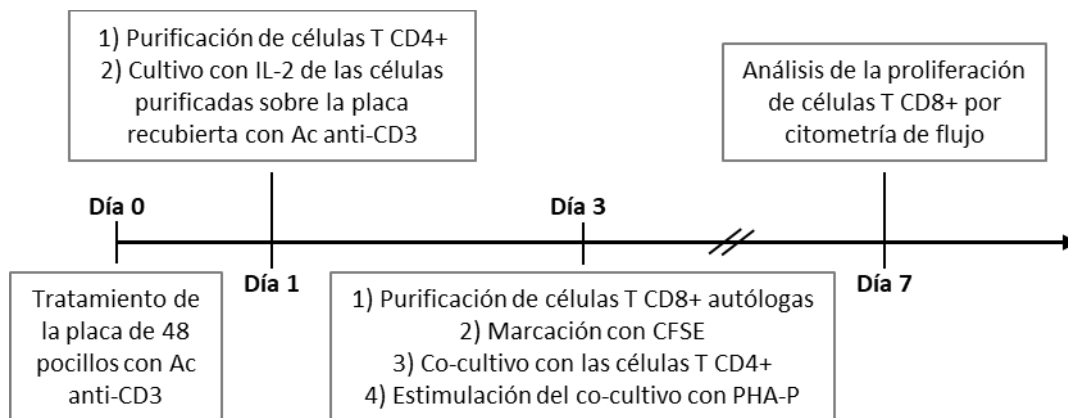


Figura 17. Ensayo de supresión celular. Línea de tiempo donde se muestra el flujo de trabajo desarrollado en este ensayo.

3.6.3 Cultivo de PBMCs de donantes adultos en presencia de plasma de niños

Para estudiar el efecto del agregado de plasmas de niños sanos y VSR+ sobre las Tregs, empleamos PBMCs de donantes adultos sanos. Esta decisión se basó en la necesidad de contar con al menos 10×10^6 células a fin de poder realizar un análisis pareado. Para ello, sembramos los PBMCs y los incubamos en presencia o ausencia de plasma al 10 % de niños sanos o VSR+ previamente deplegado, y con el agregado o no de IL-2 (20 ng/ml) durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, cosechamos las células y realizamos la tinción correspondiente para analizar el porcentaje de Tregs por citometría de flujo (sección 3.7.3.3).

3.6.4 Estimulación de células T mediante ligación del CD32

En determinados ensayos, evaluamos si la activación a través del CD32 influía en la función de las células T CD4 y CD8+, como la producción de citocinas o la actividad citotóxica.

Para estimular directamente el CD32 mediante el entrecruzamiento del receptor, las células T CD4+ o T CD8+ purificadas fueron incubadas con un Ac monoclonal anti-CD32 fabricado en ratón (clon IV.3, 30 µg/ml, STEMCELL Technologies) a una concentración de 1×10^6 células/100 µl de medio de cultivo RPMI

sin suero, durante 1 h a 4 °C. Luego de lavar, agregamos el fragmento F(ab')₂ de un Ac secundario de cabra anti-IgG de ratón (50 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) e incubamos durante 30 min a 4 °C. De esta manera se indujo la microagregación o *clustering* del CD32 por entrecruzamiento, que produce su activación [180] (Fig. 18). Después de los lavados, incubamos las células en placa de cultivo para realizar los ensayos respectivos.

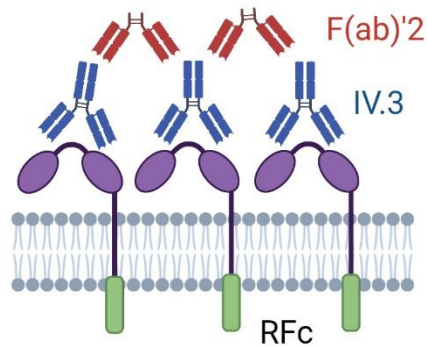


Figura 18. Activación del CD32 mediante entrecruzamiento con anticuerpo anti-CD32. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD32 humano (clon IV.3) induce la microagregación del CD32 presente en la superficie celular a través del entrecruzamiento con el fragmento Fab'2 de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón. Figura creada con Biorender.com.

3.6.4.1 Evaluación de la producción de citocinas por las células T CD4+ estimuladas a través del CD32

Las células T CD4+ purificadas por la técnica de rosetas fueron estimuladas o no a través del CD32 para inducir su ligación, y, posteriormente cultivadas en presencia de PHA-P (4 µg/ml) durante 3 días a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, recolectamos el sobrenadante de cultivo que fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

3.6.4.2 Evaluación de la degranulación de las células T CD8+ estimuladas a través del CD32

Para estudiar la degranulación de las células T CD8+ al ser estimuladas a través del CD32, analizamos el antígeno CD107a (proteína de membrana asociada a lisosomas) en la superficie de las células, el cual ha sido descrito como marcador de citotoxicidad de las células T CD8+ [181]. Para ello, las células T de los niños VSR+, purificadas por *Cell Sorting* por selección negativa, fueron estimuladas o no a través del CD32 para inducir su ligación. Luego, sembramos y cultivamos las células por 18 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, incubamos las células con Ac específico para CD107a por 20 min, y estimulamos con PMA (50 ng/ml) e Ionomicina (1 µg/ml). Luego de 1 h de incubación a 37 °C, agregamos Monensina (2 µM; BD GolgiStop) por 2 h más, para evitar la internalización del CD107a. Posteriormente, recolectamos las células y realizamos la detección de CD107a en las células T CD8+ por citometría de flujo.

3.7 Marcaciones celulares y análisis por citometría de flujo

3.7.1 Procedimiento general y reactivos utilizados

Para el análisis multiparamétrico de distintos marcadores de fenotipo y función celular, empleamos la citometría de flujo. Esta técnica nos da información sobre el tamaño y complejidad celular, a través de los parámetros FSC y SSC respectivamente, y también de la fluorescencia emitida por cada fluorocromo conjugado a Ac luego de la excitación con láseres correspondientes. Realizamos todas las mediciones en un citómetro de flujo FACS Canto (BD, Biosciences). Para el análisis de los datos, utilizamos el software *FlowJo* versión 10 (Tree Star Inc.). Los resultados fueron expresados como porcentaje de células positivas para cierto marcador y/o intensidad de fluorescencia media (IFM) geométrica de las células, según se indica en cada figura. La IFM específica se definió como el índice entre la IFM geométrica producida por cada Ac específico dividido la IFM geométrica de la población negativa establecida en esa marcación. Se emplearon controles de isotipo para definir el valor de corte.

En la **Tabla 2**, se muestra el panel de Ac utilizados en las marcaciones de superficie e intracelulares. En todas las marcaciones, al finalizar cada una de las incubaciones, las células fueron lavadas con PBS suplementado con 0,2 % v/v de una solución de azida sódica (Biopack) 10 % m/v, y 0,1 % m/v de seroalbúmina bovina (GIBCO) (PBS AA) para evitar uniones inespecíficas de los Ac. Finalmente, las células fueron resuspendidas en la misma solución para su lectura.

Tabla 2: Características de los anticuerpos monoclonales utilizados.

Características	Anticuerpo específico para:	Marca	Fluorocromo	Descripción de la molécula blanco
Superficie celular	BD Multitest™	BD	CD4 APC, CD8 PE, CD45 PerCp, CD3 FITC	Permite definir las subpoblaciones de células T CD4+ y T CD8+.
	CCR4	Biolegend	Brilliant Violet™ 510	Receptor de quimiocinas CCL17 y CCL22. Se expresa predominantemente en células Th2.
	CCR6	BD	PE	Receptor de quimiocina CCL20. Las células Th17 sobreexpresan este receptor.
	CCR7	BD	FITC	Receptor de quimiocinas CCL19 y CCL21. Recluta células a ganglio linfático, presente en células T <i>naïve</i> y de memoria central.
	CD107a	BD	FITC	Proteína de membrana asociada a lisosomas.
	CD127	Biolegend	PE	Cadena α del receptor de la IL-7.
	CD14	Biolegend	Brilliant Violet™ 421	Receptor de lipopolisacárido. Se expresa en monocitos, macrófagos y células dendríticas.
		BD	PE	
	CD16	Biolegend	FITC	Receptor de baja afinidad de fragmento Fc γ tipo III. Se expresa en monocitos, macrófagos, NK y neutrófilos.
	CD19	BD	APC	Correceptor de células B.
CD25	Biolegend	PE-Cy7, PE	Cadena α (CD25) del receptor de IL-2.	

	CD27	BD	PE	Receptor de CD70, importante en crecimiento y diferenciación de células T y B.
	CD3	Biolegend	APC-Cy7	Transductor de señal de activación del TCR. Se expresa en células T.
	CD32	Biolegend	PE-Cy7	Receptor de baja afinidad de fragmento Fc γ tipo II. Se expresa en células B, monocitos, macrófagos, granulocitos, plaquetas.
	CD39	BD	APC	Enzima inmunosupresora que convierte ATP en ADP. Se expresa particularmente en las Tregs.
	CD45RA	BD	APC-H7, FITC	Isoforma del CD45 expresada en células T <i>naïve</i> y ausente en células T de memoria.
	CD56	Biolegend	PerCP	Molécula de adhesión celular neural presente en células NK.
	CD4	BD	APC, FITC	Molécula correceptora asociada al TCR. Caracteriza al compartimento de células T CD4+.
		Biolegend	PerCP	
	CD8	Biolegend	PE	Molécula correceptora asociada al TCR. Caracteriza al compartimento de células T CD8+.
		BD	PerCP	
	CXCR3	Biolegend	Alexa Fluor 647	Receptor de quimiocinas inflamatorias CXCL9, CXCL10 y CXCL11 producidas en tejido afectado. Se expresa en células Th1.
	CXCR5	BD	Alexa Fluor 647	Receptor de quimiocina CXCL13 producida en los folículos linfoides. Marcador de las células Tfh.
	HLA-DR	Biolegend	APC	Molécula de clase II del CMH. Marcador de activación tardío de células T.
IgG	BD	Biotina	Inmunoglobulina G humana.	
PD-1	Biolegend	PE	Receptor de muerte celular programada 1. Está asociado a células T exhaustas.	
Intracelular	FOXP3	BD	Alexa Fluor 488, PE	Gen maestro controlador del desarrollo y función de las Tregs.
	IL-2	Biolegend	PE-Cy7	Citocina inmunoreguladora. Factor de crecimiento y proliferación de células T.
	Ki-67	BD	FITC	Proteína nuclear asociada a la proliferación celular.
	STAT5 (pY694)	BD	Alexa Fluor 647	Proteína STAT5 fosforilada. Forma parte de la vía de señalización mediados por la IL-2.
	VSR	EMD Millipore	-	Antígeno del VSR.
Secundario	IgG-M	Dako	PE	Anticuerpo Fab'2 dirigido contra Inmunoglobulina G y M humanas.

3.7.2 Evaluación de marcadores de superficie celular

Empleamos entre 0,4 - 1,5 x10⁶ células por tubo, previamente lavadas con PBS AA. Incubamos el botón celular en una relación de 1 μ g de proteína conjugada/ 10⁶ células durante 20-30 min a TA en oscuridad. Luego lavamos dos veces y resuspendimos las células en PBS AA para realizar la lectura en el citómetro de flujo.

3.7.2.1 Análisis de los perfiles funcionales de células T CD4+ y células T de memoria

Con el objetivo de caracterizar fenotípica y funcionalmente las células T de los niños VSR+ que expresan CD32, por un lado, decidimos analizar los perfiles funcionales de las células T CD4+, y, por otro lado, caracterizar la presencia de marcadores compatibles con memoria celular a partir de los PBMCs.

Las ventanas fueron diseñadas para definir los distintos perfiles funcionales en relación con la expresión de receptores de quimiocinas dentro del compartimento de células T CD4+ CD45RA- CD32+ y células T CD4+ CD45RA- CD32-. Las células Th1 se definieron como CXCR3+ CCR4- CCR6-; las Th2 como CXCR3- CCR4+ CCR6-; las Th17 como CXCR3- CCR4- CCR6+; las Tregs como CD127^{low/-} CD25+, y las Tfh como CXCR5+ PD-1+.

Caracterizamos el fenotipo de células T de memoria dentro de las subpoblaciones de células T CD4+ CD32+, CD4+ CD32-, CD8+ CD32+, CD8+ CD32-, de la siguiente manera: células T *naïve* CD45RA+ CD27+ CCR7+; células T de memoria central (T_{MC}) CD45RA- CD27+ CCR7+; células de memoria efectora (T_{ME}) CD45RA- CD27- CCR7-; células de memoria transicional (T_{MT}) CD45RA- CD27+ CCR7-; células T de memoria efectora terminalmente diferenciadas (T_{TEMRA}) CD45RA+ CD27- CCR7-. El valor reportado se expresa como porcentaje de cada subpoblación dentro del compartimento de células T CD4+ o CD8+ que expresan o no CD32.

Las estrategias de selección de poblaciones se muestran en la **Fig. 19**, la cual representa el análisis dentro del compartimento de células T CD4+.

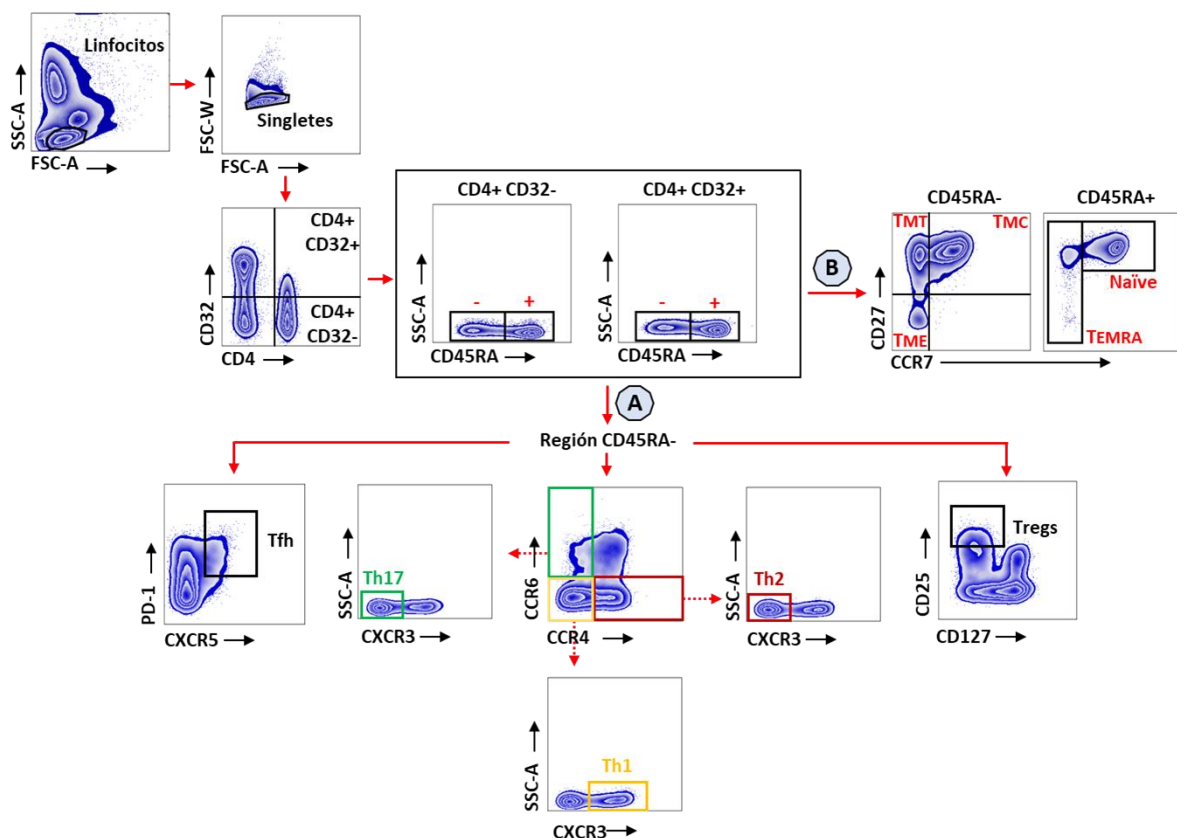


Figura 19. Estrategia utilizada en el análisis por citometría de flujo para definir los distintos perfiles funcionales y de memoria celular dentro de las células T CD32- y CD32+. Se realizaron distintas marcaciones de superficies a partir de PBMCs de niños VSR+. **(A)** Se definieron los perfiles funcionales de células Th1, Th2, Th17, Tregs y Tfh dentro de la población de células T CD4+ CD45RA- que expresaban o no CD32. **(B)** Se definieron las subpoblaciones de células T *naïve* (T_N); las células T de memoria central (T_{MC}), células de memoria efectora (T_{ME}), células de memoria transicional (T_{MT}); células de memoria efectora terminalmente diferenciadas (T_{TEMRA}), dentro de las células T CD4+ o CD8+ que expresaban o no CD32.

3.7.2.2 Determinación de la unión de IgG por las células T

Analizamos por citometría de flujo la unión de IgG por las células T a partir de los PBMCs que fueron incubados con IgG en presencia o ausencia del Ac bloqueante del CD32. Para ello, lavamos con PBS AA las células previamente tratadas y realizamos la marcación con Ac anti-IgG humana conjugada a biotina por 30 min a 4 °C. Luego agregamos Estreptavidina conjugada a PerCp por 20 min a 4 °C. Finalmente, realizamos la marcación de superficie con Ac específicos para CD4 y CD8. Evaluamos el porcentaje de IgG+ dentro de las células T CD4+ y CD8+, en ausencia o presencia del Ac bloqueante del CD32.

3.7.3 Evaluación de la expresión de moléculas por tinción intracelular

Para la detección intracitoplasmática o nuclear de proteínas, luego de la marcación de superficie, tratamos a las células con una determinada solución de fijación y permeabilización, según las instrucciones del fabricante. Luego realizamos la marcación intracelular utilizando el Ac específico o su control de isotipo por 30 min a TA y en la oscuridad. Finalmente, lavamos las células y las resuspendimos en PBS AA para proceder con la lectura en el citómetro de flujo.

3.7.3.1 Determinación de IL-2 intracitoplasmática

Con el objetivo de examinar si había una expresión diferencial de IL-2 por las células T CD4+ de niños VSR+, evaluamos la producción *de novo* de IL-2 por tinción intracitoplasmática en células permeabilizadas. Para ello, estimulamos PBMCs de niños sanos o VSR+ en cultivo con PMA e Ionomicina y Monensina como se describió en la sección 3.6.1.1. Posteriormente, recolectamos las células y realizamos la marcación de superficie con Ac específicos para CD4 y CD3. A continuación, tratamos las células con una solución de fijación/permeabilización apta para la tinción de citocinas (*Cytofix/Cytoperm*, BD Biosciences), según indicaciones del fabricante. Finalmente realizamos la marcación intracitoplasmática con el Ac específico para IL-2 durante 30 min a 4 °C. Analizamos la frecuencia e IFM específica de las células que produjeron IL-2 dentro de la región de células T CD4+.

3.7.3.2 Determinación del antígeno nuclear Ki-67 para medir proliferación celular

La proteína nuclear Ki-67 está presente en todas las fases activas del ciclo celular, pero no en la fase G0. Por este motivo es considerado un marcador de proliferación. Para analizar la proliferación celular

de las células T CD4⁺ de niños sanos y VSR⁺, cultivamos los PBMCs como se describió en la sección 3.6.1.2. Posteriormente, realizamos la marcación de superficie de los PBMCs con Ac específicos para CD3, CD4 y CD25, y luego tratamos las células con una solución tamponada de fijación-permeabilización siguiendo las instrucciones del fabricante (*Human FoxP3 Buffer Set*, BD Biosciences). A continuación, realizamos la marcación intracelular con el Ac específico para Ki-67 durante 30 min a TA y en oscuridad. En ciertos experimentos, también realizamos la marcación simultánea de FOXP3 y Ki-67 para determinar la frecuencia de Tregs proliferantes.

3.7.3.3 Determinación del factor de transcripción FOXP3

Para definir la frecuencia de Tregs en los PBMCs de los niños, analizamos la expresión del factor de transcripción FOXP3 por tinción intranuclear de las células. Brevemente, recolectamos los PBMCs en cultivo y realizamos la marcación de superficie con Ac específicos correspondientes. Posteriormente, tratamos las células con una solución tamponada de fijación-permeabilización siguiendo las instrucciones del fabricante (*Human FoxP3 Buffer Set*, BD Biosciences). A continuación, realizamos la marcación intracelular con el Ac específico anti-FOXP3 o con su correspondiente control de isotipo, durante 30 min a TA y en la oscuridad. Finalmente, analizamos el porcentaje de Tregs determinando la subpoblación FOXP3⁺ CD25⁺ dentro de las células T CD4⁺.

3.7.3.4 Evaluación de la proliferación celular por el método de dilución de CFSE

Para evaluar la respuesta proliferativa de las células T CD8⁺ en el ensayo de supresión, teñimos las células con el colorante lipofílico fluorescente CFSE de acuerdo con las indicaciones del proveedor (*CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit*, Invitrogen). Esta molécula fluorescente atraviesa con facilidad las membranas celulares, formando en el interior celular complejos covalentes con grupos amino de las proteínas u otras moléculas. Así, tras cada división celular, la fluorescencia de las células hijas es aproximadamente la mitad de la que poseía la célula parental. Brevemente, marcamos las células resuspendidas en PBS seroalbúminabovina al 0,1 % con CFSE 20 μ M, durante 10 min a 37 °C. Detuvimos la reacción incubando por 5 min en hielo. Luego lavamos las células y las cultivamos según lo indicado en la sección 3.6.2. Una vez terminada la incubación, centrifugamos las células para proceder con la marcación de superficie con Ac específicos para CD4 y CD8. Analizamos el porcentaje de las sucesivas generaciones que proliferaron dentro de las células T CD8⁺, al determinar la intensidad de fluorescencia de CFSE menor que la de la población parental (**Fig. 20**).

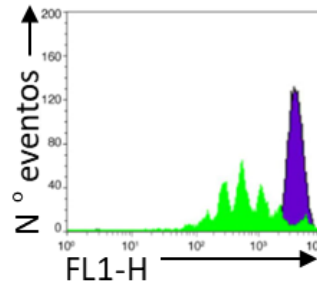


Figura 20. Análisis por citometría de flujo de PBMCs teñidos con CellTrace™ CFSE. Los PBMCs fueron marcados con CFSE al día 0. Una porción de las células fue tratada con mitomicina C para arrear su ciclo celular (pico violeta muestra población parental). El resto fue estimulado con PHA-P por 5 días (picos verdes representan sucesivas generaciones). Figura tomada y adaptada del catálogo del producto.

3.7.3.5 Determinación del transductor de señal STAT5 fosforilado

La respuesta funcional de las células T CD4+ al agregado de IL-2 fue evaluada mediante la determinación de la fosforilación del factor STAT5, evento temprano de la cascada de señalización de la IL-2. Para ello, incubamos los PBMCs de niños sanos o VSR+ en medio de cultivo RPMI solo (para no inducir la vía de la IL-2) por 1 h a 37 °C. Luego estimulamos o no con IL-2 (0,2-20 ng/ml, según corresponda) durante 15 min a 37 °C. En algunos casos, previo al estímulo con IL-2 incubamos con sCD25 (200 ng/ml), Ac bloqueante anti-IL-2 (1 µg/ml, PeproTech Inc.) o anti-CD25 (5 µg/ml, eBioscience™), durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, fijamos las células y las permeabilizamos utilizando soluciones comerciales adecuadas para esta marcación (*Cytofix™ Fixation Buffer* y *Phosflow Perm Buffer III*, BD Biosciences). Luego realizamos la marcación intracelular con Ac específico para STAT5 (pY694) durante 40 min a TA y en oscuridad. En último lugar, realizamos la marcación de superficie con Ac específico para CD4, luego de bloquear las células con suero normal de ratón (Sigma) para evitar uniones inespecíficas. Esta secuencia de marcación se debió a que los Ac de superficie se ven afectados por la solución de permeabilización para proteína fosforilada. Finalmente, analizamos el porcentaje de pSTAT5+ dentro de las células T CD4+.

3.7.3.6 Determinación del antígeno viral de VSR

Para evaluar el porcentaje de infección *in vitro* por VSR, tanto en células primarias como en la línea celular HEp-2, analizamos la presencia del antígeno del virus por marcación intracelular. Empleamos células no infectadas como control negativo del ensayo. Para esto utilizamos un Ac monoclonal de ratón anti-VSR humano (anti-VSR, EMD Millipore). Está dirigido contra epitopes antigénicos presentes en los subtipos A y B del VSR. En primer lugar, tratamos las células con buffer de fijación y permeabilización comerciales (*Human FoxP3 Buffer Set*, BD Biosciences), siguiendo el protocolo propuesto por el comerciante. A continuación, realizamos la marcación intracitoplasmática con el Ac anti-VSR (dilución 1/10), durante 40 min a TA y en oscuridad. Revelamos la marcación usando un Ac

de cabra F(ab')₂ policlonal dirigido contra las IgG-M de ratón (dilución 1/200), que fue incubado por 30 min a TA y en oscuridad. Considerando que el Ac secundario utilizado estaba dirigido contra Ac IgG-M de ratón, realizamos la marcación de superficie en forma posterior luego de bloquear las uniones inespecíficas. Finalmente, analizamos el porcentaje de infección por VSR dentro de las células T CD4+ y CD8+, monocitos o células HEp-2, según corresponda.

3.8 Cuantificación de factores solubles

3.8.1 Ensayos multiplex de cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo por citometría de flujo

Para la cuantificación de múltiples citocinas en el sobrenadante de cultivo, realizamos ensayos multiplex por citometría de flujo basados en perlas o *beads* que identifican cada una de las citocinas como una población determinada. La identidad de las citocinas se define por su intensidad de fluorescencia en el canal de APC, y la intensidad de fluorescencia en el canal de PE es proporcional a la cantidad de citocina presente en la muestra. Para la determinación de la concentración de cada citocina, realizamos una curva estándar que cubre un rango determinado dependiendo del kit utilizado. En la **Fig. 21** se muestra un ejemplo de una muestra cuantificada por este método.

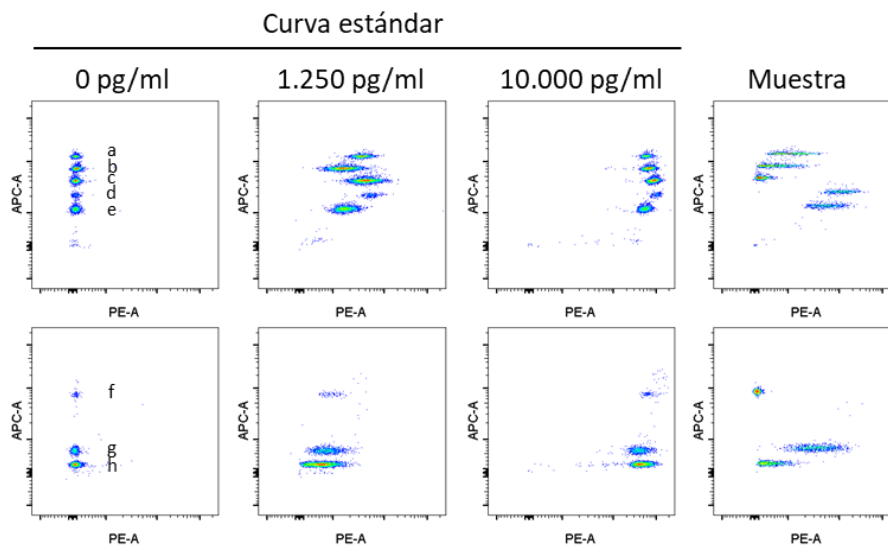


Figura 21. Cuantificación de citocinas mediante el kit LEGENDplex™ HU Th1/Th2 Panel. Este kit cuantifica las citocinas IL-10 (a), IL-6 (b), IL-2 (c), IL-13 (d), IL-5 (e), IL-4 (f), TNF-α (g) e IFN-γ (h). La identidad de las citocinas se define por su intensidad de fluorescencia en el canal de APC, y la intensidad de fluorescencia en el canal de PE es proporcional a la cantidad de citocina. Se realizó una curva estándar que cubre un rango de 0 a 10.000 pg/ml. En el panel derecho se muestra un ejemplo representativo de una muestra cuantificada por este método.

Utilizamos el kit *Th1/Th2/Th17 de BD™ Cytometric Bead Array (CBA)* para cuantificar las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e IL-17A en el sobrenadante de cultivos de PBMCs de niños sanos y VSR+ estimulados con PHA-P (sección 3.6.1.2). El estándar utilizado permitió realizar una curva que cubre el rango de concentración 20 – 5.000 pg/ml.

Por otro lado, empleamos el kit *LEGENDplex™ HU Th1/Th2 Panel* debido a que fue el kit que dispusimos para evaluar los niveles de citocinas el sobrenadante de cultivo de células T CD4+ de niños VSR+ que fueron estimuladas o no a través del CD32 (sección 3.6.4.1). Este kit determina las citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-5, IL-13 e IL-10. El estándar utilizado permitió realizar una curva que cubre el rango de concentración 156 – 10.000 pg/ml.

Brevemente, en una placa de 96 pocillos *low-binding* o de baja unión con fondo en V (Biolegend) incubamos la mezcla de las perlas con los estándares correspondientes o las muestras de sobrenadantes de cultivos, durante 2 h a TA. Luego de lavar, agregamos la mezcla de Ac de detección conjugados a biotina específicos para las citocinas que determina el kit, e incubamos por 1 h a TA. Sin lavado previo, agregamos Estreptavidina-PE por 30 min a TA. Todas las incubaciones fueron realizadas en un agitador orbital. Finalmente, lavamos y resuspendimos las perlas en solución de lavado para su lectura en el citómetro de flujo, donde adquirimos al menos 300 eventos por población de citocina.

En todos los casos, sembramos las muestras sin dilución previa y seguimos las indicaciones provistas por los fabricantes. Realizamos la adquisición de datos en el citómetro de flujo (FACS Canto, BD). Analizamos los resultados a partir de los paquetes *BD™ CBA Software* y *LEGENDplex™ Data Analysis Software* para cada kit respectivamente.

3.8.2 Cuantificación de niveles de sCD25 por ELISA

Determinamos los niveles de sCD25 tanto en plasmas como en sobrenadante de cultivos de PBMCs (sección 3.6.1.4) de niños sanos y VSR+ por la técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de captura tipo sándwich. Para ello, empleamos el kit de ELISA *soluble human sRIL-2/CD25* (Thermo Scientific) siguiendo las especificaciones del fabricante, que incluyó todos los reactivos a utilizar en el ensayo. La placa suministrada por el kit se encontraba recubierta por el Ac de captura específico para sCD25. El primer paso del ensayo consistió en incubar el estándar correspondiente (curva de 203,1 – 6.500 U/ml) o la muestra sin dilución previa en cada pocillo, en forma conjunta con el Ac de detección anti-sCD25 conjugado a la enzima peroxidasa de rabanito (HRP), durante 2 h a TA en un agitador a 150 rpm. Luego de los lavados, agregamos el sustrato de la enzima, TMB, e incubamos durante 30 min a TA. Detuvimos la reacción por el agregado de solución que contiene ácido sulfúrico 0,16 M. La densidad óptica fue leída a 450 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific). Las absorbancias de las muestras fueron interpoladas en la curva de calibración graficada para obtener sus respectivas concentraciones de sCD25 (U/ml). El estándar de este ELISA estaba calibrado a una preparación de referencia interna de sCD25, a partir de sobrenadante de una línea celular transfectada que secreta sCD25 recombinante. Se definieron 1.000 unidades como la cantidad de sCD25 presente en 1 ml de la preparación de referencia interna.

3.8.3 Cuantificación de IL-17 en sobrenadantes de cultivo por ELISA

Como el kit *LEGENDplex™ HU Th1/Th2* que disponíamos no nos permitía determinar los niveles de IL-17A en los sobrenadantes de cultivo de células T CD4+ que fueron estimuladas a través del CD32 (sección 3.6.4.1), esta citocina fue cuantificada por la técnica de ELISA de captura tipo sándwich. Seguimos las especificaciones del fabricante (ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-17A, BioLegend), utilizando placas de 96 pocillos *High Binding* o de alta unión (COSTAR). En primer lugar, empleamos un Ac de captura anti-IL-17A humana hecho en conejo, que fue incubado en la placa durante toda la noche a 4 °C. A continuación, bloqueamos con PBS suplementado con SFB al 1 %. Luego sembramos los estándares correspondientes (curva de 3,9 a 250 pg/ml) y las muestras de sobrenadantes de cultivos sin dilución previa. Después de la incubación, agregamos el Ac de detección anti-IL-17A conjugado a biotina. Posteriormente, agregamos la enzima HRP conjugada a Estreptavidina. Los lavados entre los diferentes pasos fueron realizados PBS conteniendo 0,05 % v/v de Tween 20 (Sigma). Revelamos con TMB (sustrato de la enzima, BD) y detuvimos la reacción con ácido sulfúrico 2 N. La densidad óptica fue leída a 450 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop). Las absorbancias de las muestras fueron interpoladas en la curva de calibración graficada para obtener sus respectivas concentraciones de IL-17A (pg/ml).

3.9 Microscopía confocal

Analizamos la expresión del CD32 en las células T de niños VSR+ a través de un microscopio confocal. Brevemente, marcamos 300.000 células T purificadas por *Cell Sorting* (sección 3.5.3.2) con Ac específicos para CD4 Alexa Fluor 488, CD8 PE y CD32 Alexa Fluor 647 o su correspondiente control de isotipo (dilución 1/50, todos de Biolegend). Luego, lavamos las células y las colocamos en cubreobjetos previamente tratados con polilisina (Poly-Lysine Sigma) para permitir su adherencia. Posteriormente, fijamos las células con paraformaldehído al 4 % en PBS por 12 min a 4 °C, lavamos dos veces y tratamos con glicina 10 mM por 10 min a TA. Montamos los cubreobjetos con líquido de montaje con DAPI (DAPI Fluoroshield®, Sigma-Aldrich), el cual que permite visualizar los núcleos. Observamos los preparados en un microscopio confocal (ZEISS LSM 800). Las imágenes fueron analizadas en el software ImageJ.

3.10 RT-PCR cuantitativa

Determinamos los niveles de expresión del ARN mensajero (ARNm) de los genes *FCGR2A* y *FCGR2B* en las células T CD4+ y CD8+ purificadas de niños sanos y VSR+ por PCR cuantitativa con transcriptasa reversa (RT-qPCR).

Inicialmente, purificamos las células por *Cell Sorting* (sección 3.5.3.1) y las almacenamos en solución de lisis a - 80 °C hasta la extracción del ARN. Esto fue realizado mediante columnas de centrifugación de sílice, a partir del kit PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este kit emplea isotiocianato de guanidina suplementado con β -mercaptoetanol como solución de lisis celular.

Posteriormente, cuantificamos el ARN obtenido en un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific). La relación de absorbancias 260/280 (indicador de contaminación por proteínas) fue en todos los casos mayor a 1,7. Tomamos 1000-1500 ng para el tratamiento con *DNAse I* (Promega) a fin de eliminar el ácido desoxirribonucleico (ADN) contaminante de las muestras. Luego lo convertimos a ADN copia (ADNc) mediante tratamiento con transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y oligonucleótidos de secuencia al azar (*random primers*, Invitrogen™), siguiendo instrucciones del comerciante. Las muestras de ADNc fueron reservadas en freezer a -20 °C hasta su uso.

Realizamos las reacciones de RT-qPCR utilizando la solución EvaGreen qPCR Mastermix (ABM) que contiene a la Taq ADN polimerasa, junto con los *primers* específicos para cada gen (concentración final 250 nM), agua y la muestra de ADNc por triplicado. El protocolo de amplificación consistió en un ciclo inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 seg, hibridación de *primers* a 56 °C por 15 seg y extensión a 72 °C por 1 min. En todos los experimentos se corrieron los controles negativos (reacciones con agua en lugar de muestra) para comprobar la ausencia de contaminaciones. Comprobamos la especificidad de los productos por medición de la temperatura de fusión o *melting*. El equipo utilizado fue StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los *primers* empleados se detallan a continuación en la **Tabla 3**:

Tabla 3: Primers utilizados para amplificar el ADN copia de cada uno de los genes.

Primer	Secuencia (5' – 3')	Gen
<i>CD32a F</i>	ATCATTGTGGCTGTGGTCATTGC	FCGR2A
<i>CD32a R</i>	TCAGGTAGATGTTTTATCATCG	
<i>CD32b F</i>	GGGATCATTGTGGCTGTG	FCGR2B
<i>CD32b R</i>	ATTAGTGGGATTGGCTG	
<i>GAPDH F</i>	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GAPDH
<i>GAPDH R</i>	TTGATTTGGAGGGATCTCG	

Para realizar la cuantificación relativa de la expresión de los genes, se requiere la selección de un control interno, que permite normalizar la cantidad de gen de interés al total de ARN que se extrajo. Por ello empleamos GAPDH, un gen endógeno de expresión constitutiva. Además, todas las muestras fueron normalizadas a un calibrador de referencia. Para ello, como fuente de ADNc utilizamos monocitos purificados debido a su alta expresión de las isoformas CD32a y CD32b. Realizamos las curvas estándar y la cuantificación relativa según lo publicado previamente [182]. Brevemente, empleamos los valores del umbral del ciclo (Ct) para calcular y graficar una curva de regresión lineal para evaluar la calidad de la curva estándar. Utilizamos la pendiente de la recta para determinar la

eficiencia de la reacción (E). A partir de los Ct de las muestras y la E obtenida, calculamos los valores normalizados con la siguiente fórmula:

$$\frac{ET^{CpT(C)-CpT(S)}}{ER^{CpR(C)-CpR(S)}}$$

donde ET es la eficiencia de la PCR del gen de interés o *target* (CD32a o CD32b); ER, la eficiencia de la PCR del gen de referencia (GAPDH); CpT(C), el Ct medido del gen *target* determinado para el calibrador (monocitos); CpT(S), el Ct medido del gen *target* determinado en la muestra (niño VSR+); CpR(C), el Ct medido del gen de referencia (GAPDH) determinado para el calibrador (monocitos); CpR(S), el Ct medido del gen de referencia (GAPDH) determinado en la muestra (niño VSR+).

3.11 Línea celular HEp-2

Para la generación y titulación del stock de VSR (sección 3.12), así como para la puesta a punto del modelo de ADE (sección 3.13.1), empleamos la línea celular HEp-2 procedente de un carcinoma epitelial respiratorio humano, cultivada según recomendaciones de la ATCC (*American Type Culture Collection*). Para su mantenimiento, las células fueron sembradas con una confluencia del 10 % en frasco para cultivo de 75 cm² y en medio de cultivo DMEM completo. Al alcanzar una confluencia del 90 %, realizamos un pasaje celular utilizando en primer lugar solución fisiológica para lavar el medio de cultivo, seguido de un tratamiento con Tripsina 0,025 % m/v (Sigma) durante 1 min a 37 °C para romper las uniones intercelulares. Las células fueron lavadas y sembradas nuevamente en medio DMEM completo. Realizamos todas las incubaciones en estufa a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5 %.

3.12 Preparación del stock viral de VSR

3.12.1 Cepa viral

En este trabajo empleamos la cepa Long subtipo A del VSR, cedido por el Servicio de Virus Respiratorios del Instituto Malbrán (Ciudad de Buenos Aires, Argentina), una de las cepas prototipos más utilizadas en el laboratorio.

3.12.2 Generación del stock viral

En primer lugar, inoculamos un cultivo de células HEp-2, crecidas en frasco para cultivo de 75 cm² con una confluencia del 70-80 %, con las partículas virales de VSR a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5, durante 1 h a 37 °C para permitir la adsorción del virus. Luego, agregamos medio de cultivo DMEM de mantenimiento e incubamos por 3 días a 37 °C. Finalmente, reservamos el sobrenadante de cultivo (fuente de partículas virales extracelulares) y luego disgregamos la capa celular adherida con un cepillo esterilizado. Sometimos la suspensión celular recolectada a 3 ciclos de congelado-

descongelado (-80 °C a 4 °C), a fin de romper las células y obtener las partículas virales intracelulares. Finalmente, juntamos ambas suspensiones y centrifugamos a 2.000 rpm durante 10 min a 4 °C, a fin de clarificar la suspensión y permitir que sedimenten los restos celulares acompañantes. A partir del stock obtenido, volvimos a realizar múltiples ciclos de infección, hasta obtener 200 ml de stock viral que fue almacenado en freezer a -80 °C.

3.12.3 Purificación del stock viral

Sembramos 10 ml del stock viral clarificado de VSR sobre 10 ml de un colchón de sacarosa (Sigma) al 20 % en PBS estéril en tubos de ultracentrífuga (Beckman Coulter). Luego de sellar los tubos, ultracentrifugamos a 16.000 rpm, a 4 °C durante 2 h con rotor 70 Ti de ángulo fijo (Beckman Coulter). Finalizado esto, retiramos el sobrenadante de tal manera de mantener el pellet en un volumen de 300 µl, que fue almacenado por 18 h a 4 °C para permitir su disgregación. Luego, resuspendimos el pellet y agregamos medio de cultivo DMEM hasta un volumen final de 1,5 ml. Alicuotamos el stock purificado y lo guardamos a -80 °C hasta su titulación y utilización.

3.12.4 Titulación del stock viral

Determinamos el título viral con la técnica de unidades formadoras de placas (UFP) por inmunotinción. Brevemente, sembramos 25.000 células HEp-2 por pocillo en una placa de 24 pocillos, durante 24 h hasta una confluencia del 70-80 %. Realizamos diluciones seriadas al décimo del stock viral preparado, que fueron inoculadas por duplicado sobre la monocapa de HEp-2 junto con el control positivo (stock viral sin diluir) y negativo (medio de cultivo) del ensayo (**Fig. 22**). Luego de 1 h de adsorción, eliminamos el inóculo y agregamos medio de plaqueo semisólido.

+	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	-
+	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	-

Figura 22. Esquema de placa de cultivo para titular el stock viral. Cultivo de células HEp-2 infectado con las diluciones seriadas al décimo del stock por duplicado. Se indican las diluciones empleadas en cada pocillo. Control positivo (+): stock sin diluir; control negativo (-): células sin infectar.

Al día 3 pi, separamos el medio de cultivo, y fijamos las células con acetona/metanol 50:50, por 1 h a 4 °C. Posteriormente, lavamos con PBS e incubamos con un Ac de ratón anti-VSR no conjugado (dilución 1/4.000) en PBS 5 % leche (US Biological), por 1 h a 37 °C. Luego de realizar los lavados, incubamos con Ac secundario anti-IgG de ratón (dilución 1/1.000, KPL) conjugado con la enzima HRP en PBS 5 % leche, por 1 h a 37 °C. A continuación, lavamos e incubamos con el sustrato DAB (diaminobencidina, Sigma) por 15 min a TA. Finalizado este tiempo, removimos el sustrato y detuvimos la reacción con agua destilada. Los focos de infección fueron observados como puntos de color marrón sobre la monocapa celular, producto de la actividad de la HRP. Por último, realizamos el recuento de

número de placas en la dilución apropiada, es decir la que contuvo aproximadamente entre 30 y 100 placas. Contamos las unidades infecciosas por pocillo que equivalen a las unidades formadoras de placas (UFP) y calculamos la cantidad por ml. De esta manera, determinamos el título (UFP/ml) a partir del factor de dilución del stock viral, el número promedio de placas contadas en esa dilución y el volumen de inóculo utilizado de la siguiente manera:

$$\text{UFP/ml} = \frac{\text{Número promedio de placas de lisis} \times \text{factor de dilución}}{\text{Volumen del inóculo}}$$

Donde el volumen del inóculo fue de 0,2 ml, el número promedio de placas de lisis contadas fue de 79 y el factor de dilución 10^{-4} . El título obtenido por este método fue de $3,95 \times 10^6$ UFP/ml.

3.13 Ensayo de facilitación de la infección mediada por anticuerpos (ADE)

Los Ac, cuando se encuentran en concentraciones subneutralizantes, se unen a los epitopes virales que permiten la adsorción y entrada a la célula huésped, pero sin alcanzar a neutralizar la partícula viral. De este modo, pueden facilitar la entrada del virus a la célula conduciendo a una mayor infectividad, a través del mecanismo conocido como ADE o facilitación de la infección mediada por Ac. Para evaluar si el CD32 presente en las células T de los niños VSR+ puede unir CI que contienen VSR y facilitar la infección, en primer lugar, realizamos la puesta a punto del modelo como se explica a continuación:

3.13.1 Puesta a punto del modelo de ADE de VSR

3.13.1.1 Determinación de la MOI

La MOI indica la relación entre la cantidad de UFP y el número de células a infectar. Debido a que nuestro caso trabajamos con células T primarias que son permisivas a la infección y exhiben una mayor mortalidad celular, determinamos la MOI a utilizar con el fin de lograr un balance entre el porcentaje de infección y la mortalidad celular.

Para ello, sembramos células T CD4+ purificadas de donantes adultos a una concentración de 1×10^6 células/ml en placa de 48 pocillos, y las estimulamos con PHA-P ($4 \mu\text{g/ml}$) por 24 h a 37°C . Esto permitió activar las células y disminuir mortalidad producida por la infección. Posteriormente, expusimos las células o no al VSR empleando distintas MOI (0,05 – 0,1 – 0,2 – 0,5) por 1 h a 37°C , las cultivamos por 2 días en medio de cultivo RPMI de mantenimiento. Observamos que las MOI más altas produjeron un elevado porcentaje de mortalidad celular (**Fig. 23**), al evaluar los parámetros FSC vs SSC. Debido a esto, seleccionamos la MOI de 0,1 para los ensayos siguientes, con la cual se vio $\sim 2\%$ de células infectadas.

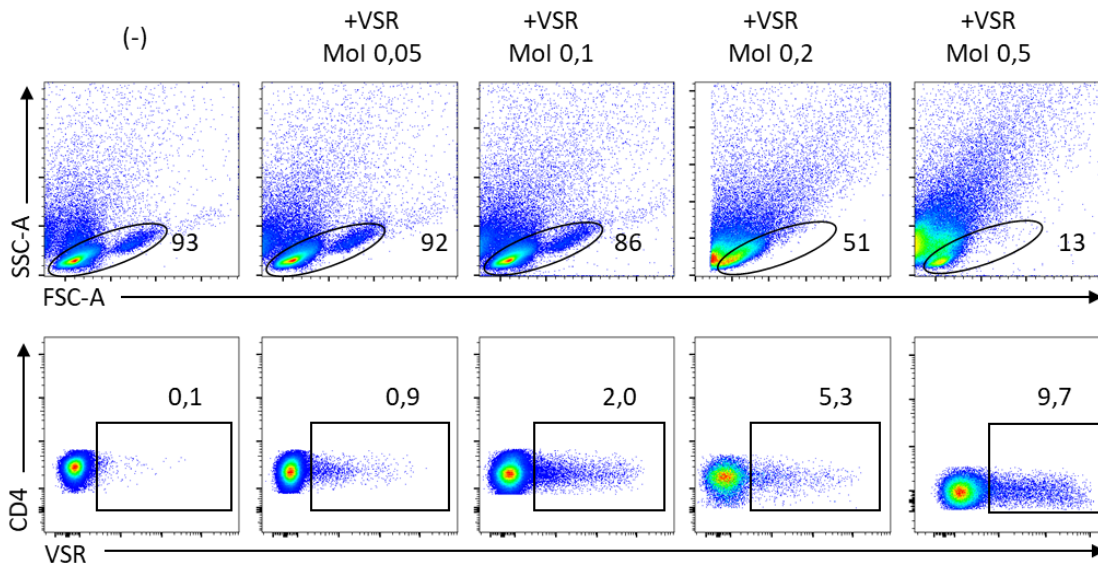


Figura 23. Infección de células T CD4+ por VSR usando distintas MOI. Las células T CD4+ purificadas de donantes adultos fueron estimuladas por 24 h con PHA-P 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y luego desafiadas con el VSR utilizando MOI de 0,05, 0,1, 0,2 y 0,5 durante 2 días. Se muestran *dot plots* representativos.

3.13.1.2 Formación del complejo inmune y determinación de la dosis subneutralizante de anticuerpos anti-VSR

Para la generación de los CI con las partículas virales (**CI-VSR**), usamos inmunoglobulina endovenosa (IVIg) provista por la Universidad Nacional de Córdoba. Esta es un preparado de Ig policlonales altamente purificadas (de las cuales al menos un 95 % son IgG) extraídas de un depósito de plasma humano, por lo tanto, contiene Ac naturales contra el VSR. En todos los casos, el CI-VSR fue preparado mediante incubación del inóculo viral y la IVIg a la dosis correspondiente durante 1 h a 37 °C.

Para determinar la dosis neutralizante y subneutralizante de Ac dirigidos contra el VSR presentes en la IVIg, utilizamos la línea celular HEP-2 ya que no expresa RfC y es altamente permisiva a la infección por este virus. Para ello, sembramos 50.000 células HEP-2/pocillo en placa de 48 pocillos, en forma de monocapa con medio de cultivo DMEM completo por 24 h a 37 °C. Luego retiramos el medio e inoculamos con el VSR o con el CI-VSR (MOI= 0,1) formado con distintas concentraciones de IVIg (0, 2, 20, 200, 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), por 1 h a 37 °C. También realizamos la condición sin infectar como control negativo. Al cabo de 2 días pi, evaluamos la infección de las HEP-2 a través de la medición intracelular del antígeno viral por citometría de flujo y observamos que, con la dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IVIg hubo neutralización total. Sin embargo, con la dosis de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no hubo disminución del porcentaje de la infección (**Fig. 24**), indicando que esta dosis de IVIg se encuentra por debajo del umbral de neutralización del VSR.

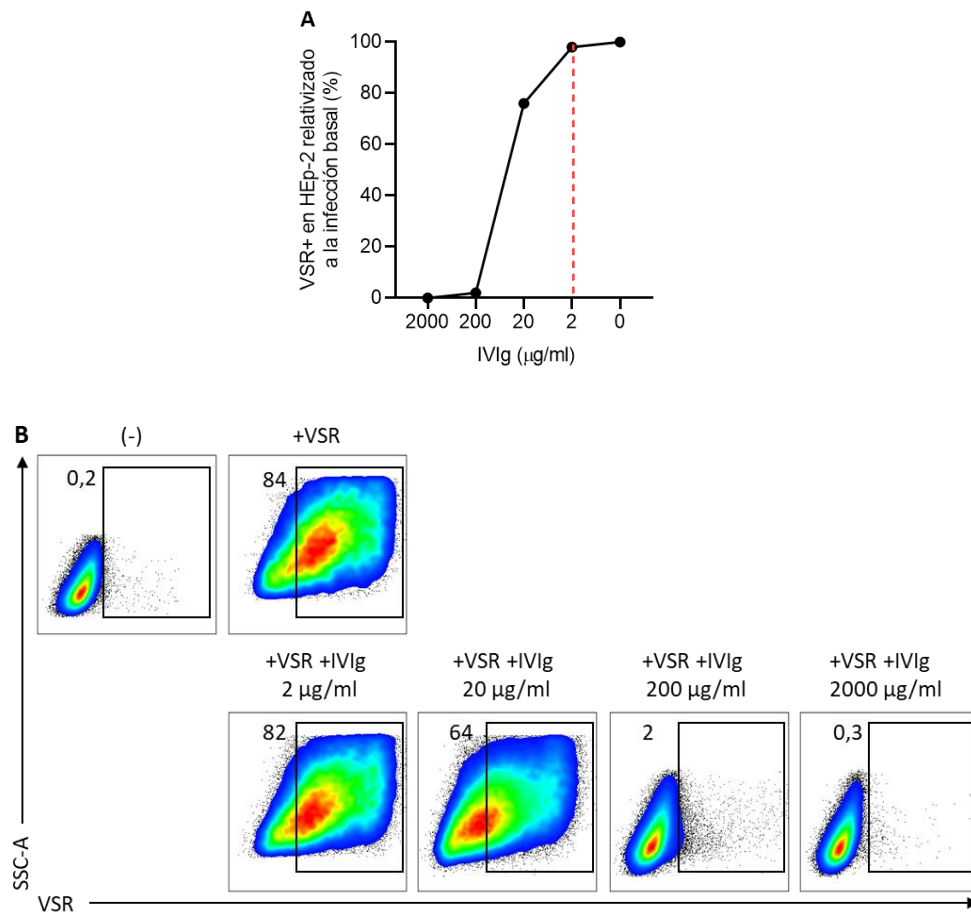


Figura 24. Puesta a punto en línea celular HEp-2 de la dosis subneutralizante de anticuerpos anti-VSR. Células HEp-2 fueron sembradas en placa de 48 pocillos y luego desafiadas o no con stock de VSR (MOI 0,1), previamente incubado con dosis decrecientes de IVIg (2000, 200, 20, 2, 0 µg/ml) para permitir la formación de los complejos inmunes. Luego de 2 días, se realizó la marcación intracelular del antígeno viral. El porcentaje de infección se evaluó por citometría de flujo. Se muestran porcentajes de infección obtenidos con dosis decrecientes de IVIg, los cuales fueron relativizados al porcentaje obtenido en la condición de células infectadas en ausencia de IVIg (**A**) y los dot plots respectivos (**B**). La línea punteada roja señala la dosis en la cual la IVIg deja de neutralizar el VSR.

Seguidamente, evaluamos si la formación de los CI-VSR subneutralizantes con las condiciones determinadas inducían ADE en monocitos. Elegimos estas células ya que presentan altos niveles de CD32 en su superficie y en las que se encuentra reportada la facilitación de la infección por VSR mediada por Ac [171]. Para lo cual, infectamos 1×10^6 monocitos purificados de donantes adultos con VSR o CI-VSR (MOI= 0,1) empleando 1 y 2 µg/ml de IVIg por 1h a 37 °C, o permanecieron sin infectar. Utilizamos estas dosis de IVIg para comprobar que efectivamente se trataban de dosis subneutralizantes que facilitan la infección por VSR en células CD32+. Luego de la adsorción, sembramos los monocitos a una concentración de 1×10^6 células/ml en placa de 48 pocillos con medio de cultivo RPMI de mantenimiento. Al cabo de 24 h pi, evaluamos el porcentaje de infección por citometría de flujo. Observamos que ambas dosis de IVIg empleadas facilitaron la infección por VSR, aunque la máxima respuesta se vio con 2 µg/ml (**Fig. 25**). En resumen, de este ensayo concluimos que

la dosis de IVIg a utilizar sea de 2 $\mu\text{g/ml}$ para acomplejarse de forma subneutralizante con las partículas de VSR y facilitar la infección en células que expresan receptores de fragmento Fc.

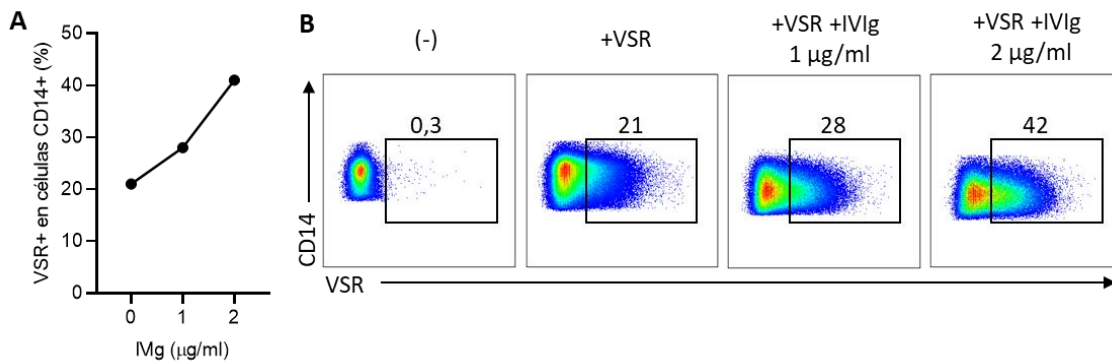


Figura 25. Ensayo de ADE de la infección por VSR en monocitos con distintas dosis subneutralizantes de anticuerpos anti-VSR. Monocitos purificados de donante adulto fueron expuestos a VSR (MOI 0,1) preincubado o no con distintas dosis subneutralizantes de inmunoglobulina humana endovenosa (IVIg; 1, 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$) o permanecieron sin infectar (control negativo de la infección). Luego de 24 h de cultivo, se realizó la marcación intracelular del antígeno viral en los monocitos. El porcentaje de infección de VSR en los monocitos fue determinado por citometría de flujo dentro de la población CD14+. Se muestra curva del porcentaje de infección por VSR de monocitos frente a las distintas dosis de IVIg (A) y dot plots respectivos (B).

3.13.2 Ensayo de ADE de la infección por VSR en células T de niños VSR+

Finalmente, para el ensayo de ADE en células T CD4+ y CD8+ de niños VSR+ usamos células T purificadas por selección negativa por *Cell Sorting* (sección 3.5.3.2). Para ello, sembramos las células purificadas a una concentración de 1×10^6 células/ml en placa de 48 pocillos, y las estimulamos con PHA-P (4 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h a 37 °C. Posteriormente, removimos el medio de cultivo por centrifugación y expusimos las células o no al VSR o CI-VSR subneutralizante (MOI= 0,1; dosis IVIg 2 $\mu\text{g/ml}$), por 1 h a 37 °C para permitir la adsorción viral. Luego fueron lavadas y cultivadas en medio de cultivo RPMI de mantenimiento, durante 2 días a 37 °C. Finalmente, realizamos la marcación del antígeno viral para evaluar el porcentaje de infección por citometría de flujo dentro de las células T CD4+ y CD8+ (Fig. 26).

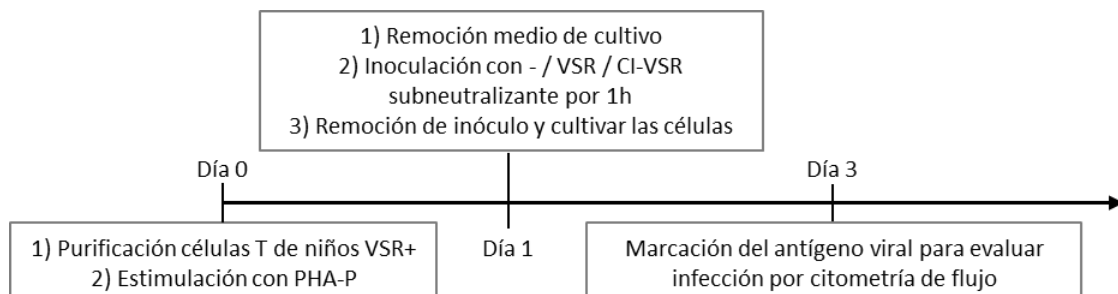


Figura 26. Esquema de ensayo de ADE de la infección por VSR en células T de niños con VSR. Línea de tiempo donde se muestra el flujo de trabajo desarrollado en este ensayo.

3.14 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico utilizamos el *software* GraphPad Prism® versión 8. Como no pudimos garantizar la normalidad de los datos, empleamos test no paramétricos. Para comparar dos grupos utilizamos el test de Mann-Whitney o el test Wilcoxon para muestras pareadas o no pareadas respectivamente. Para comparar más de dos grupos utilizamos el test de Friedman o el test de Kruskal-Wallis para muestras pareadas o no pareadas según sea apropiado. Las comparaciones múltiples fueron realizadas utilizando la prueba de Dunn. Las correlaciones fueron llevadas a cabo utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. La media \pm EEM (error estándar de la media) de las distintas variables fue utilizada como medida representativa. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Descripción de la población en estudio: pacientes con VSR

Desde mayo de 2017 hasta diciembre 2019, 214 pacientes hospitalizados con infección por VSR y 83 niños sanos fueron enrolados en el Hospital de Pediatría Pedro de Elizalde, ex Casa Cuna, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Las características clínicas de todos los donantes se muestran en la **Tabla 1** (sección 3.1 de Materiales y Métodos). Todos los pacientes admitidos por VSR presentaron un CDSS igual o mayor a 7, que se corresponde con un cuadro moderado o severo de la enfermedad. Debido a que en Argentina los niños con formas leves de infección por VSR no son hospitalizados, no pudimos incluir a esta cohorte en nuestro trabajo. Cincuenta y tres pacientes (25 %) tuvieron neumonía agregada. Dos pacientes (0,9 %) presentaron coinfección con adenovirus. Todos los niños requirieron oxigenoterapia con máscara o cánula de alto flujo. Los 13 niños (6,1 %) admitidos a la UTI requirieron ventilación mecánica por 4,5 días (rango 3,6 – 5,9 días). Sesenta pacientes (28 %) recibieron corticoterapia. Es importante resaltar que las muestras de sangre periférica se tomaron al momento de la admisión. Para poder llevar a cabo los análisis, la cohorte de pacientes VSR+ se encuentra pareada con los dadores sanos por sexo [sexo femenino (n, %): 86 (40 %) pacientes VSR+ y 43 (52 %) dadores sanos] y por edad [mediana y rango intercuartílico: 7 meses (3-12) para pacientes VSR+ y 6 meses (4-20) para dadores sanos].

4.2 Evaluación de la capacidad de producir IL-2 y respuesta a esta citocina por parte del compartimento de células T CD4+ de los niños infectados con VSR. Su asociación con la severidad de la enfermedad

4.2.1 Las células T CD4+ de los niños VSR+ expresan menos IL-2 en comparación con los niños sanos

Con el objetivo de estudiar si existe un defecto en la vía de señalización de IL-2 que explique el desbalance dentro del compartimento de células T CD4+ -particularmente la depleción de Tregs circulantes- durante la infección por VSR, en primera instancia nos propusimos evaluar la producción *de novo* de IL-2 por las células T CD4+ provenientes de niños sanos y VSR+, debido a que son las principales productoras de esta citocina [102]. Para ello, estimulamos PBMCs obtenidos de niños sanos y VSR+ con PMA e Ionomicina seguido del inhibidor del transporte intracelular de proteínas, de manera de inducir la producción de citocinas y que permanezcan retenidas en el interior celular. Al analizar el porcentaje de células T CD4+ productoras de IL-2 por citometría de flujo, observamos valores similares en niños sanos y VSR+ (**Fig. 27 A**; p NS, n sanos=8, n VSR=20). Posteriormente, en estos experimentos analizamos la IFM específica de la IL-2 de las células T CD4+, parámetro que nos permite estimar el número promedio de moléculas -en este caso de IL-2- que se expresa en cada célula. Llamativamente, encontramos que la IFM específica de la IL-2 en las células T CD4+ fue significativamente menor en los

pacientes VSR+ en contraste con los sanos (**Fig. 27 B**, $p=0,0008$). De este modo, podemos concluir que, analizando la producción de *novo*, las células T CD4+ de los niños VSR+ producen menores niveles de IL-2 en comparación con los sanos.

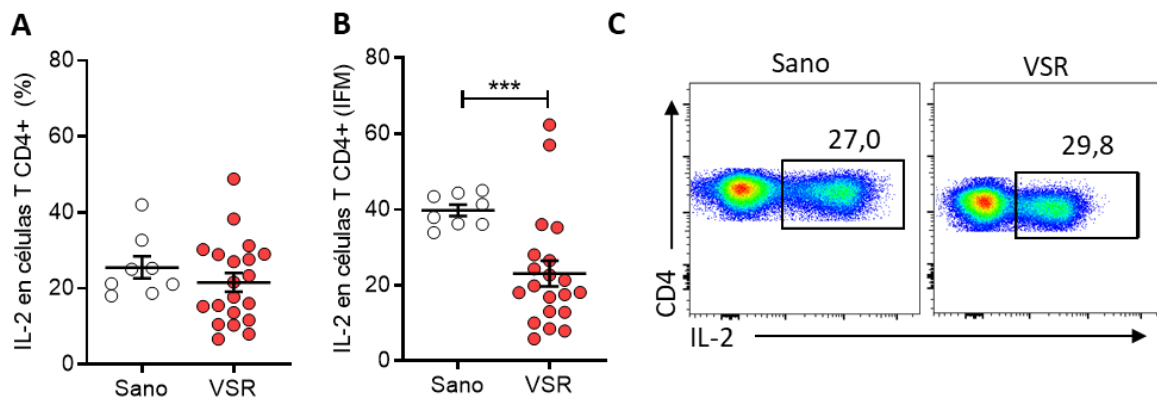


Figura 27. Las células T CD4+ de niños con VSR producen menos IL-2 que los niños sanos. Los PBMCs de niños sanos ($n=8$) y VSR+ ($n=20$) fueron estimulados con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 50 ng/ml) e Ionomicina (1 $\mu\text{g/ml}$) e incubados a 37 °C por 5 h, en presencia del inhibidor del transporte intracelular de proteínas, Monensina (2 μM). **(A)** Porcentaje de células T CD4+ IL-2+ e **(B)** Intensidad de fluorescencia de la media (IFM) específica de IL-2 (calculada como el cociente entre la IFM geométrica de la población IL-2 positiva sobre la IFM geométrica de la población negativa) en células T CD4+ de niños sanos y VSR+ analizada por citometría de flujo. **(C)** Dot plots representativos de A y B (%). Se muestra la media \pm EEM en A y B. Se empleó el Test de Mann-Whitney en cada análisis, *** $p<0,001$.

Seguidamente, evaluamos la producción de IL-2 por las células T CD4+ cuantificando los niveles de IL-2 liberada al medio extracelular. Considerando las limitaciones que impone el tamaño de la muestra de SP para purificar células T, decidimos llevar a cabo este ensayo a partir de cultivos de PBMCs de niños sanos y VSR+ en presencia o ausencia del mitógeno inespecífico PHA-P para activar las células, durante 3 días. Luego, cuantificamos la IL-2 y otras citocinas correspondientes a los perfiles funcionales Th1/Th2/Th17 en el sobrenadante de cultivo, mediante un ensayo multiplex por citometría de flujo. Finalmente, confirmamos que los niveles de IL-2 secretada fueron menores en los cultivos de PBMCs de niños VSR+ en comparación con los sanos [**Fig. 28 A**, $p=0,045$ niños sanos ($n=12$) vs VSR+ ($n=12$)]. En relación con los niveles de las otras citocinas analizadas, observamos una menor secreción de IL-10 por PBMCs de los niños VSR+ en comparación con los sanos (**Fig. 28 B**, $p<0,0001$). Esta es una citocina antiinflamatoria e inmunosupresora que es producida en parte por las Tregs y ejerce un rol importante en la modulación de la respuesta inmune contra el VSR [183]. No obstante, no observamos diferencias significativas en los niveles de IL-4, IL-6, IL-17A, TNF- α e IFN- γ entre ambos grupos (datos no mostrados). En resumen, estos resultados demuestran por primera vez que las células T CD4+ de los niños VSR+ producen menos IL-2 que los niños sanos.

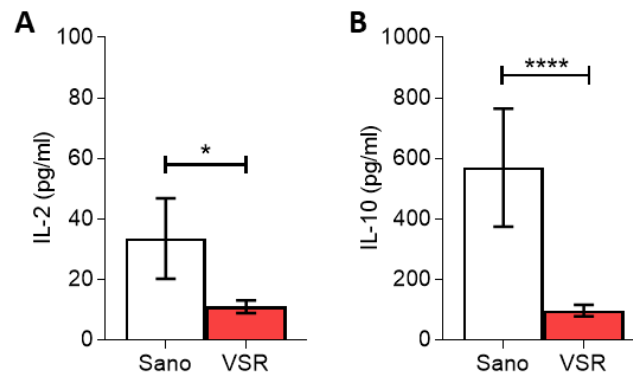


Figura 28. Los PBMCs de niños con VSR producen menores niveles de IL-2 e IL-10 que los niños sanos. Niveles de citocinas IL-2 (A) e IL-10 (B) en sobrenadante de cultivo de PBMCs de niños sanos y VSR+ (n=12 en cada grupo) activados con PHA-P (4 µg/ml) durante 3 días. La cuantificación se realizó mediante ensayo multiplex por citometría de flujo (CBA, BD Biosciences). Se muestra la media ± EEM en A y B. Se empleó el Test de Mann-Whitney en cada análisis, *p<0,05, ****p<0,0001.

4.2.2 Las células T CD4+ de los niños VSR+ muestran una menor respuesta proliferativa en comparación con los niños sanos

Teniendo en cuenta que la IL-2 induce la activación y expansión de las células T a través de la unión al RIL-2 trimérico presente en la membrana celular, nos preguntamos si la menor producción de IL-2 por las células T CD4+ observada en los pacientes con VSR podría afectar la proliferación celular. Para ello, cultivamos PBMCs de niños sanos y VSR+ estimulados con PHA-P, en presencia o ausencia de IL-2 durante 3 días. Luego evaluamos por citometría de flujo la expresión del antígeno Ki-67 como marcador de células proliferantes, dentro del compartimento de células T CD4+. Teniendo en cuenta la dependencia de IL-2 por las células T CD4+, observamos que, como era de esperar, la respuesta proliferativa fue significativamente menor en los pacientes VSR+ comparada con los niños sanos en la condición sin IL-2 [Fig. 29, p=0,004 niños sanos (n=12) vs VSR+ (n=12)]. Asimismo, la adición de IL-2 al cultivo aumentó la proliferación en ambos grupos de donantes (p=0,0024 y p=0,0005 para la condición sin vs con IL-2, en el grupo de niños sanos y VSR+ respectivamente). Sin embargo, la respuesta proliferativa en los niños VSR+ fue menor que en los sanos aun en presencia de IL-2 (p=0,007 para la condición con IL-2 entre niños sanos y VSR+). Estos resultados sugieren la presencia de otro factor que esté comprometiendo la expansión de las células T CD4+ en el contexto de la infección por VSR.

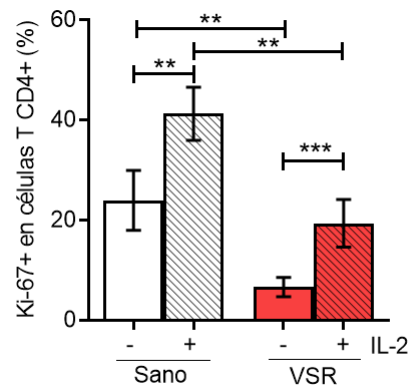


Figura 29. Las células T CD4+ de niños con VSR presentan una menor respuesta proliferativa que los niños sanos. PBMCs de niños sanos (n=12) y VSR+ (n=12) fueron estimulados con fitohematoglutina (PHA-P, 4 µg/ml) y cultivados por 3 días, en ausencia o presencia de IL-2 (20 ng/ml). Luego se analizó el porcentaje de células T CD4+ que expresan Ki-67 por citometría de flujo. Los resultados expresan la media ± EEM. Se empleó el test de Wilcoxon para el análisis dentro de cada grupo y el test de Kruskal-Wallis para el análisis entre grupos de donantes, **p<0,01, ***p<0,001.

4.2.3 El agregado de IL-2 restaura parcialmente la frecuencia y proliferación de Tregs en niños VSR+

Para determinar si la disminución de Tregs circulantes observada en niños VSR+ está vinculada a una menor presencia de IL-2 en el microambiente, evaluamos el efecto del agregado de IL-2 sobre las Tregs en estos pacientes. En este sentido, cultivamos PBMCs de niños sanos y VSR+ en ausencia o presencia de IL-2 por 24 h y luego determinamos el porcentaje de Tregs por citometría de flujo. En primer lugar, al analizar la condición en ausencia de IL-2, confirmamos la depleción de Tregs reportada en niños VSR+ [Fig. 30 A, p<0,0001 para la condición sin IL-2 entre niños sanos (n=8) y VSR+ (n=41)]. Luego, al evaluar el tratamiento con IL-2 encontramos que, si bien en ambos grupos el porcentaje de Tregs aumenta respecto a su control sin IL-2 (p=0,0078 y p<0,0001 para la condición sin vs con IL-2, en el grupo de niños sanos y VSR+ respectivamente), en los niños VSR+ este porcentaje fue significativamente menor que en los niños sanos (p=0,001 para la condición con IL-2 entre niños sanos y VSR+). Esto sugiere una respuesta deficiente de las células T CD4+ de niños VSR+ a la IL-2 exógena. Seguidamente, evaluamos la proliferación frente al agregado de IL-2 pero ahora analizando las subpoblaciones de células T CD4+. Esto realizamos cultivando PBMCs de donantes sanos y VSR+ estimulados con PHA-P en presencia o ausencia de IL-2. La proliferación celular fue determinada por citometría de flujo midiendo la expresión de Ki-67 dentro de las células T CD4+ al cabo de 3 días. En primera instancia, analizamos el porcentaje Tregs proliferantes en ausencia de IL-2 y notamos que fue menor en los niños VSR+ que en los sanos [Fig. 30 C, p=0,0003 para la condición sin IL-2 en niños sanos (n=12) vs VSR+ (n=12)]. Ante el agregado de IL-2, los niños VSR+ presentaron un mayor porcentaje de Tregs proliferantes respecto a la condición sin IL-2 (p=0,0005 para la condición sin vs con IL-2 en niños

VSR+), pero los valores se encontraron por debajo de los alcanzados por los sanos ($p= 0,004$ para la condición sin vs con IL-2 en niños sanos).

En cuanto a la proliferación de las células T CD4+ efectoras FOXP3-, encontramos que el agregado de IL-2 no ejerce ningún efecto en los niños sanos (**Fig. 30 D**, p NS para la condición sin vs con IL-2). En cambio, en los niños VSR+, la IL-2 aumentó la proliferación celular respecto a su condición control ($p=0,006$ para la condición sin vs con IL-2), y en este caso también mostró diferencias estadísticas al comparar con la respuesta de los sanos frente a la IL-2 ($p= 0,04$ para la condición con IL-2 entre niños sanos y VSR+).

Estos datos en su conjunto señalan que las células T CD4+ de los niños VSR+, tanto las FOXP3+ como las FOXP3-, son capaces de responder a la IL-2 aunque la frecuencia de estas subpoblaciones y su respuesta proliferativa no se restauran completamente frente al agregado de esta citocina.

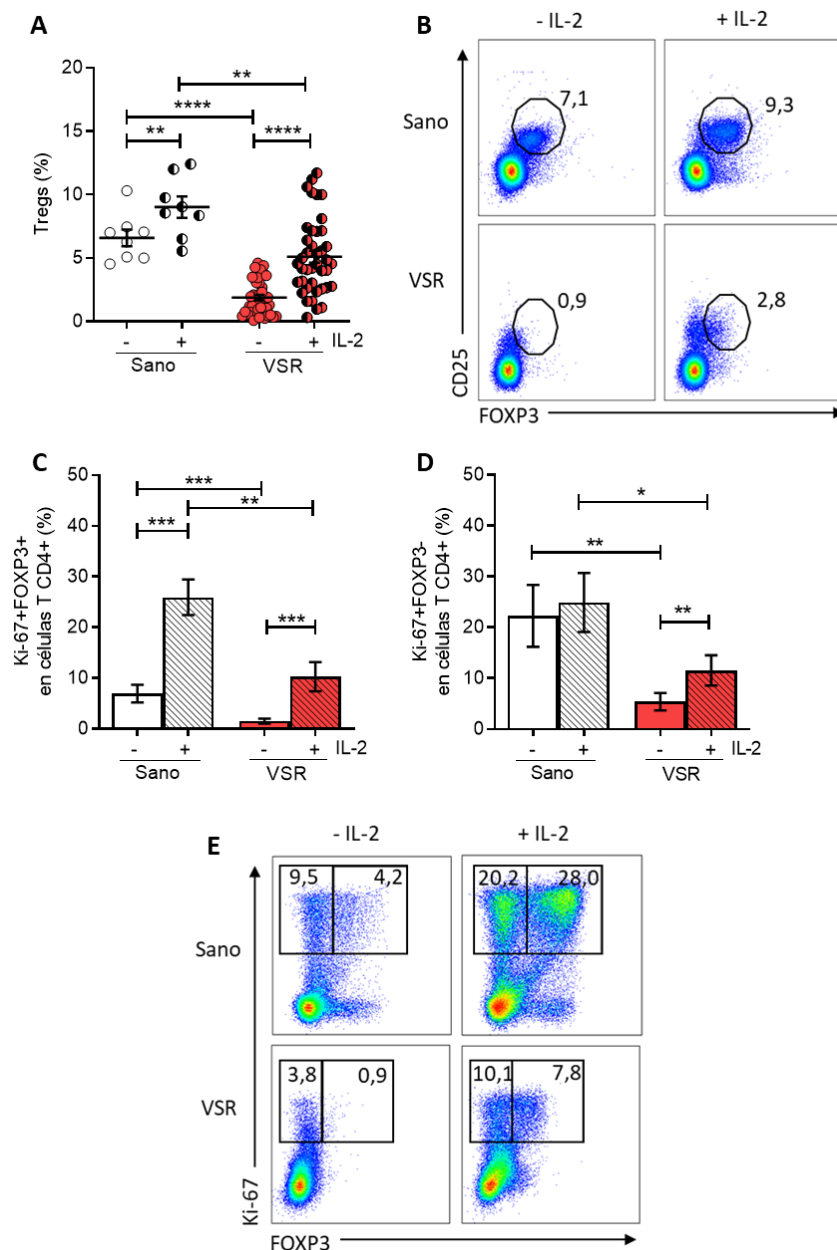


Figura 30. El agregado de IL-2 aumenta el porcentaje de Tregs en niños con VSR. (A) Los PBMCs de dadores sanos (n=8) y de niños VSR+ (n=41) fueron estimulados o no con IL-2 (20 ng/mL) por 24 h. El porcentaje de Tregs, definidas como las células T CD4+ FOXP3+ CD25+, fue analizado por citometría de flujo. (B) *Dot plots* representativos de A (%). (C-D) Los PBMCs de niños sanos (n=12) y VSR+ (n=12) fueron activados con fitohematoglutina (PHA-P, 4 µg/mL) y cultivados en ausencia o presencia de IL-2 por 3 días. El porcentaje de células T CD4+ FOXP3+ Ki-67+ (C) y FOXP3- Ki-67+ (D) se evaluó por citometría de flujo. (E) *Dot plots* representativos de C y D (%). Se muestra la media ± EEM en A, C y D. Se empleó el test de Wilcoxon para el análisis dentro de cada grupo y el test de Kruskal-Wallis para el análisis entre grupos de donantes, en A, C y D, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

4.2.4 Las células T CD4+ estimuladas con IL-2 muestran actividad supresora

Para examinar si las células Tregs que se expanden frente al agregado de IL-2 tienen actividad inmunosupresora, en primer lugar, evaluamos la expresión de la enzima ectonucleotidasa CD39 en PBMCs de niños VSR+ cultivados en ausencia o presencia de IL-2 por 24 h. El CD39 participa en la hidrólisis del ATP extracelular a la molécula inmunosupresora adenosina y es una molécula por la cual las Tregs ejercen actividad supresora [184, 185] (Fig. 31 A). Encontramos que, en los cultivos de PBMCs de niños VSR+, la expresión de CD39 en las Tregs aumentó en presencia de IL-2 (Fig. 31 B), indicando que las células T CD4+ FOXP3+ expandidas expresan una marca característica de las Tregs.

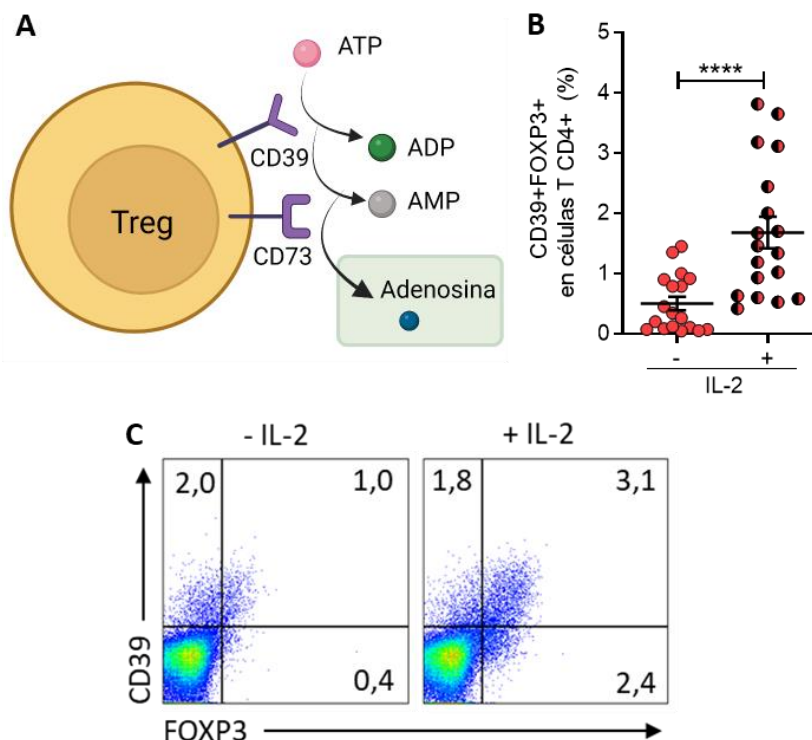


Figura 31. El agregado de IL-2 aumenta el porcentaje de las Tregs que expresan la ectonucleotidasa CD39 en niños con VSR. (A) Catálisis de ATP a AMP por la enzima CD39 expresada por las Tregs, como mecanismo para suprimir la respuesta inflamatoria. Figura creada con Biorender.com. (B) Los PBMCs de niños VSR+ (n=18) fueron estimulados o no con IL-2 (20 ng/mL) por 24 h. El porcentaje de FOXP3+ CD39+ en las células T CD4+ fue analizado por citometría de flujo. (C) *Dot plots* representativos de B (%). Se muestra la media ± EEM en B. Se empleó el test de Wilcoxon, ****p<0,0001.

En segundo lugar, procedimos a realizar un ensayo de supresión con el objetivo de evaluar si las Tregs inducidas por IL-2 mostraban actividad supresora, en este caso sobre células T CD8+ autólogas. Como este experimento requería de un número considerable de células, no pudimos realizarlo con PBMCs de niños, por lo tanto, utilizamos PBMCs de donantes adultos sanos. Este ensayo consistió en estimular con IL-2 células T CD4+, previamente purificadas y sembradas en una placa recubierta de Ac anti-CD3 para inducir la activación celular, durante 2 días. Posteriormente, estas células estimuladas fueron incubadas por 4 días más con un número determinado de células T CD8+ del mismo donante, empleando distintos índices de células T CD8+:CD4+ (ver esquema de trabajo en **Fig. 32 A**). Para evaluar la supresión de las células T CD4+ estimuladas con IL-2 sobre las T CD8+, estas últimas fueron marcadas con el colorante CFSE, el cual permite estudiar la proliferación celular ya que, tras cada división celular, la fluorescencia de las células hijas es aproximadamente la mitad de la que poseía la célula parental. A partir de ensayos realizados, observamos que a mayor concentración de células T CD4+ previamente incubadas con IL-2, menor respuesta proliferativa de las células T CD8+ (**Fig. 32 B**). De esta manera, concluimos que las células T CD4+ expandidas en presencia de IL-2 muestran actividad supresora.

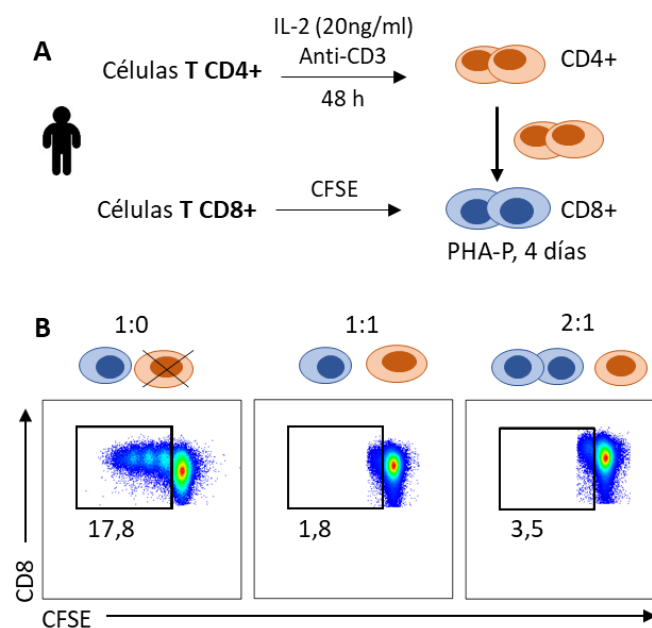


Figura 32. Las células T CD4+ de donantes sanos estimuladas con IL-2 muestran actividad supresora. Células T CD4+ purificadas de adultos sanos (n=2) fueron cultivadas con IL-2 recombinante (20 ng/ml) en placa recubierta con anti-CD3 (10 µg/ml) por 48 h. Luego se co-cultivaron con células T CD8+ autólogas -previamente purificadas y marcadas con CFSE- en una relación CD8:CD4 1:0, 1:1, 2:1 y en presencia de Fitohemaglutinina (PHA-P, 4 µg/ml) por 4 días. Se evaluó la proliferación de las células T CD8+ por citometría de flujo, analizando el porcentaje de CFSE con intensidad de fluorescencia menor a la población parental. **(A)** Esquema de trabajo. **(B)** Dot plots representativos (%) obtenidos del análisis de un ensayo representativo.

4.2.5 La adición de IL-2 induce la fosforilación de STAT5 en células T CD4+ de ambos grupos de donantes en forma similar

Dado que la IL-2 no logró restaurar completamente los porcentajes reducidos de Tregs ni la proliferación de las células T CD4+ de los niños VSR+ en comparación con los sanos, nos preguntamos si la vía de señalización de la IL-2 se encontraba afectada en esta patología. Para ello, analizamos uno de los eventos tempranos de esta vía que es la activación del factor de transcripción STAT5 a través de su fosforilación (pSTAT5, **Fig. 33 A**), el cual transloca al núcleo para regular la transcripción de genes blanco, incluido el gen que codifica la cadena α del RIL-2, CD25.

En primer lugar, estimulamos PBMCs de niños sanos y VSR+ en ausencia o presencia de IL-2 (20 ng/ml) para inducir la fosforilación de STAT5 que fue evaluada por citometría de flujo. Al comparar los porcentajes de células T CD4+ pSTAT5+ después del estímulo con IL-2 en niños sanos y VSR+, nos encontramos con un patrón de expresión similar de pSTAT5 en las células T CD4+ de ambos grupos [**Fig. 33 B**, p NS para la condición con IL-2 entre niños sanos (n=10) y VSR+ (n=10)].

Posteriormente, en vista de que en los ensayos previos empleamos una concentración de IL-2 estándar que es utilizada como factor de crecimiento de células T CD4+ [186], quisimos evaluar si estas células también respondían a concentraciones decrecientes de IL-2. Para ello, analizamos la respuesta de PBMCs de 3 niños VSR+ frente a dosis decrecientes de IL-2 (10; 2; 0,2; 0 ng/ml). Observamos en todos ellos un efecto dosis-respuesta, donde se puede notar que las células T CD4+ respondieron aun a bajas concentraciones de IL-2, y que 2 de los 3 pacientes alcanzaron su máxima respuesta con 2 ng/ml de IL-2 (**Fig. 33 C**).

Estos hallazgos podrían indicar que la vía de señalización de IL-2 en las células T CD4+ no se encuentra afectada en la infección por VSR, lo que sugiere la presencia de otro factor que podría interferir con la respuesta biológica de esta citocina.

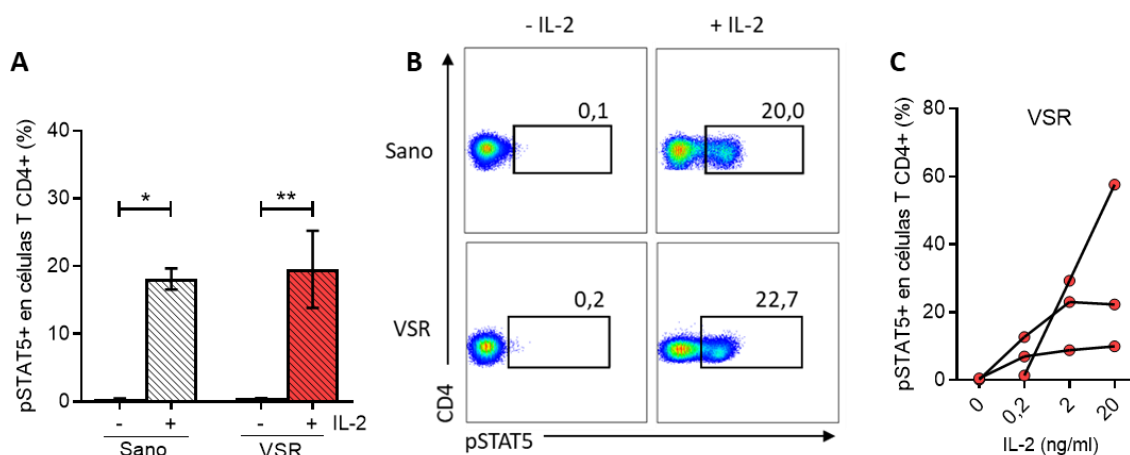


Figura 33. Las células T CD4+ de niños con VSR poseen la vía de señalización de IL-2 preservada. (A) PBMCs de niños sanos (n=10) y VSR (n=10) fueron incubados por 30 min a 37 °C en ausencia o presencia de IL-2 (20 ng/ml). (B) Dot plots representativos de B (%). (C) PBMCs de niños VSR+ (n=3) estimulados con distintas dosis de IL-2 recombinante (0; 0,2; 2; 20 ng/ml) por 30 min a 37 °C. Se muestran los porcentajes de células T CD4+ pSTAT5+, analizados por citometría de flujo. Los datos en A representan la media \pm EEM. Se empleó el test de Wilcoxon

para el análisis dentro de cada grupo y el test de Kruskal-Wallis para el análisis entre grupos de donantes en el panel A, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.2.6 Los niños VSR+ presentan mayores niveles de sCD25 en plasma que los niños sanos

Al interrogar sobre factores que podrían estar afectando la función de la IL-2 en el curso de la infección por VSR, decidimos estudiar si la forma soluble del CD25 o sCD25 podía estar involucrada. Esta es generada principalmente como resultado del clivaje proteolítico del CD25 desde la superficie de células T activadas [106] (**Fig. 34 A**), con lo cual sus niveles en plasma son utilizados como marcador de activación del sistema inmune y están asociados a la progresión de enfermedades y daño tisular [187, 188]. Se han reportados altos niveles plasmáticos de sCD25 en diversas patologías autoinmunes, cáncer y condiciones inflamatorias [106, 189]. Asimismo, un estudio previo indicó que niños con hipoxia en la fase aguda de la infección por VSR presentan elevados niveles de sCD25 plasmático [115]. Por consiguiente, cuantificamos el sCD25 en el plasma de los niños sanos y VSR+ por ELISA y encontramos que estos últimos tienen una mayor concentración de sCD25 plasmática en comparación con los sanos [**Fig. 34 B**, $p = 0,0009$ plasma de niños sanos ($n = 21$) vs VSR+ ($n = 24$)].

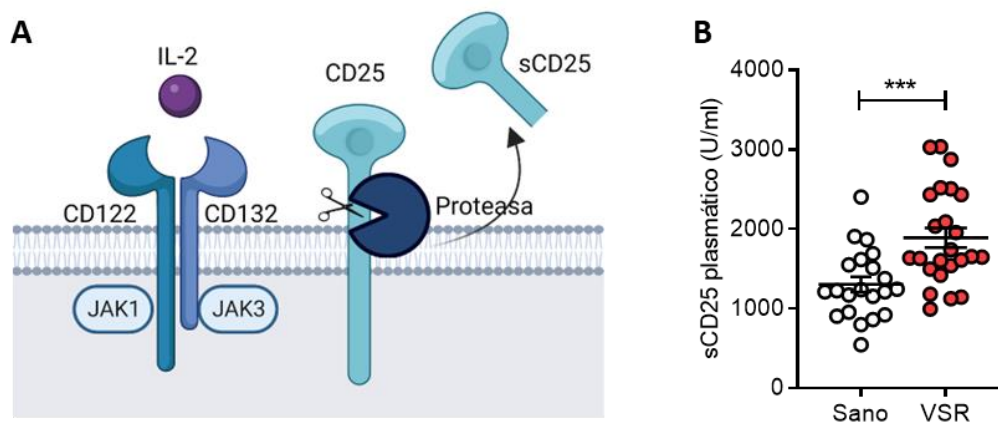


Figura 34. Los niños con VSR presentan elevados niveles plasmáticos de CD25 soluble. (A) La cadena RIL-2 α (CD25) presente en la membrana celular puede ser clivada por proteasas liberando el factor soluble (sCD25). Figura creada con Biorender.com **(B)** Niveles de sCD25 en plasma de niños sanos ($n = 21$) y VSR+ ($n = 24$) cuantificado por ELISA. Los datos en B representan la media \pm EEM. Se empleó el test de Mann-Whitney, *** $p < 0,001$.

4.2.7 El plasma de niños VSR+ disminuye la frecuencia de Tregs de donantes sanos

En base a la observación previa de que los niños VSR+ poseen elevados niveles plasmáticos de sCD25, nos preguntamos cuál sería el efecto del plasma de los niños VSR+ sobre las células T CD4+. Es importante destacar que la capacidad del sCD25 para modular la IL-2 es dual, ya que no solo puede actuar como bloqueante reduciendo su biodisponibilidad, sino que también puede exacerbar su actividad, a través de la formación de un complejo con esta citocina que favorece la unión al receptor dimérico presente en la superficie celular [105].

En primer lugar, realizamos un ensayo empleando PBMCs de donantes adultos sanos -debido al alto número de células requerido- y los expusimos a plasmas provenientes de niños sanos y VSR+. Al cabo de 24 h, evaluamos la frecuencia de Tregs para cada condición por citometría de flujo. Como resultado de estos experimentos, notamos que el plasma de los niños VSR+ redujo significativamente el porcentaje de Tregs en los cultivos de PBMCs en comparación con la condición en ausencia de plasma [Fig. 35 A, $p=0,0005$ para la condición con plasma niños VSR+ ($n=9$) vs sin plasma]. Por el contrario, el agregado del plasma de niños sanos no redujo el porcentaje de Tregs [p NS para la condición con plasma niños sanos ($n=9$) vs sin plasma].

En paralelo, también cultivamos PBMCs de donantes adultos con los plasmas de ambos grupos de niños, pero agregando IL-2 al medio de cultivo. Llamativamente, encontramos que, incluso en presencia de IL-2, el porcentaje de Tregs disminuyó frente al plasma de niños VSR+ [Fig. 35 B, $p=0,011$ para la condición con plasma niños VSR+ e IL-2 ($n=9$) vs IL-2]. No obstante, el plasma de niños sanos no ejerció efecto alguno [p NS para la condición con plasma niños sanos e IL-2 ($n=9$) vs IL-2].

Seguidamente, calculamos la tasa de disminución del porcentaje de Tregs luego del agregado de plasma VSR+, a partir del cociente entre el porcentaje de Tregs en presencia de plasma VSR+ y en ausencia de este. Luego estudiamos si existía alguna asociación entre esta variable y los niveles plasmáticos de sCD25, y, llamativamente, encontramos una correlación positiva (Fig. 35 D, $r=0,61$, $p=0,033$). En resumen, observamos que cuanto mayor fue el nivel de sCD25 en plasma de niño VSR+, mayor fue la tasa de disminución del porcentaje de Tregs de PBMCs cultivados en presencia del plasma. Estos resultados en su conjunto podrían sugerir, de manera indirecta, que los niveles elevados de sCD25 podrían limitar la biodisponibilidad de la IL-2 en el medio y no exacerbar su actividad biológica.

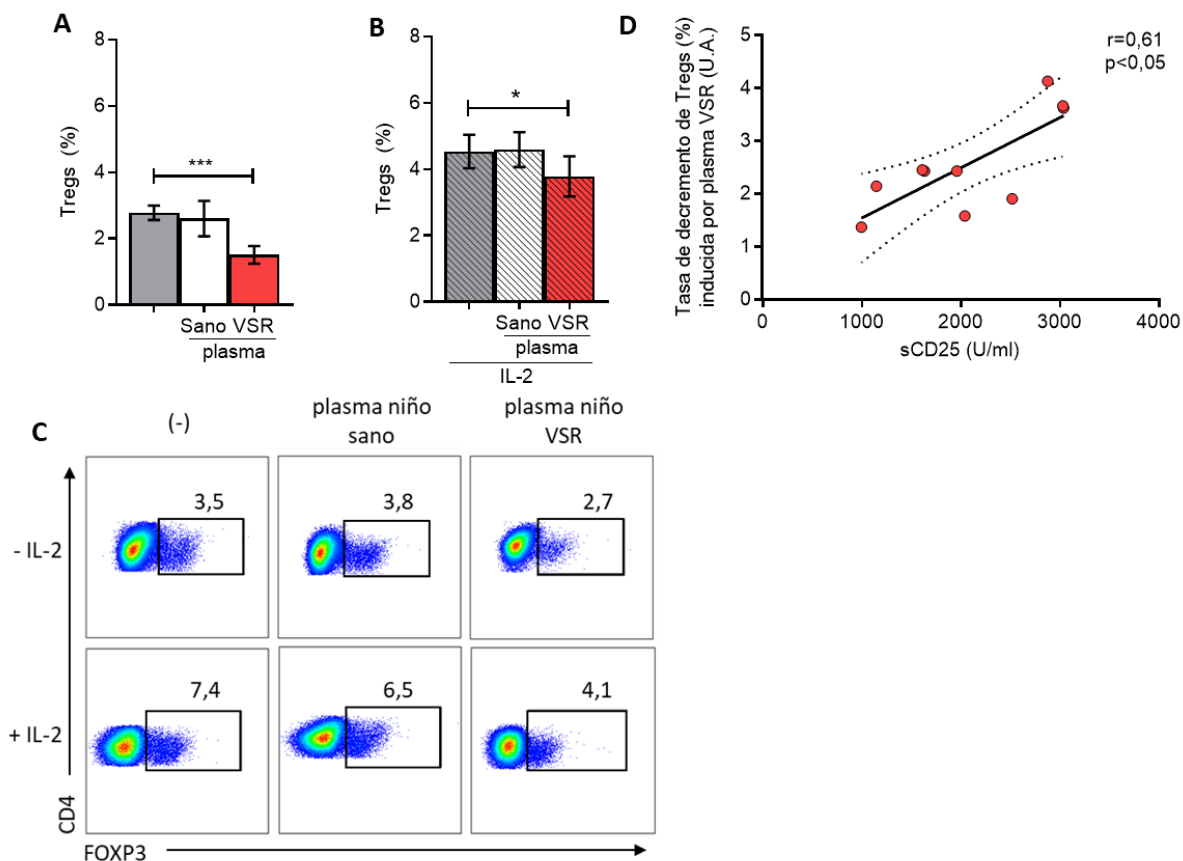


Figura 35. El plasma de niños con VSR disminuye la frecuencia de Tregs de donantes sanos. (A-B) PBMCs de donantes adultos sanos (n=3) fueron incubados por 24 h en ausencia o presencia de plasma de niños sanos (n=9) o de niños VSR+ (n=10), en una dilución de 1:10, sin (A) o con (B) el agregado de IL-2 (20 ng/ml). El porcentaje de células Tregs fue analizado por citometría de flujo. (C) Dot plots representativos de A y B (%). (D) Correlación entre la tasa de disminución del porcentaje de Tregs luego del cultivo con plasma de niños VSR+ y el nivel de sCD25 plasmático (n=10). Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r) y el p valor en D. Los datos en A y B muestran la media \pm EEM. Se empleó el test de Friedman en A y B, *p<0,5, ***p<0,001.

4.2.8 El agregado de sCD25 recombinante disminuye la frecuencia de células T CD4+ pSTAT5+ y Tregs

Para determinar si durante la infección por VSR el sCD25 limita la actividad biológica de IL-2, realizamos ensayos *in vitro* con sCD25 recombinante para evaluar su efecto sobre las células T CD4+ de los niños VSR+.

En primera instancia, analizamos la vía de señalización de la IL-2 a través de la medición de pSTAT5 en células T CD4+ expuestas a sCD25. La puesta a punto de este ensayo la llevamos a cabo en PBMCs de donantes sanos adultos. Para esto, estimulamos PBMCs con sCD25 en forma conjunta con IL-2, y notamos una disminución del porcentaje de células T CD4+ pSTAT5+ respecto a la condición donde se incubó solo con IL-2 (p=0,03 para la condición con IL-2 vs sCD25+IL-2, n=6), lo que sugiere que este factor sería capaz de reducir la actividad de la IL-2. Asimismo, utilizamos Ac bloqueantes de IL-2 (anti-IL-2) y de CD25 (anti-CD25) como control del ensayo, esperando observar un bloqueo parcial de la vía

de señalización de la IL-2. En este sentido, encontramos que el bloqueo por los Ac anti-CD25 y anti-IL-2 fue efectivo ya que, en presencia de estos, hubo una disminución en la fosforilación de STAT5 en las células T CD4+ (**Fig. 36 A**; $p=0,0002$ y $p=0,03$ para la condición con IL-2 vs con IL-2 más anti-CD25 o anti-IL-2 respectivamente, $n=6$).

Posteriormente, decidimos analizar el efecto del sCD25 sobre la actividad biológica de la IL-2 en niños sanos y VSR+. En primer lugar, analizamos el porcentaje de pSTAT5 en células T CD4+ de PBMCs estimulados con IL-2 o en conjunto con el sCD25, en ambos grupos de donantes. Los resultados mostraron que, tanto en los niños sanos como en los VSR+, el sCD25 redujo la frecuencia de pSTAT5 en las células T CD4+ [**Fig. 36 B**, $p=0,002$ y $p=0,001$ para la condición con IL-2 vs sCD25+IL-2 entre niños sanos ($n=12$) y VSR+ ($n=11$) respectivamente], aunque sin diferencias entre ambos grupos (p NS para la condición con sCD25+IL-2 entre niños sanos y VSR+). En segundo lugar, estudiamos el efecto del sCD25 sobre la subpoblación de Tregs. Para ello, determinamos el porcentaje de Tregs a partir de PBMCs de niños VSR+ previamente estimulados con IL-2 o en conjunto con el sCD25 por 24 h. En este caso, notamos que el sCD25 redujo el porcentaje de Tregs de PBMCs de niños VSR+ (**Fig. 36 D**, $p=0,0156$ para la condición con IL-2 vs sCD25+IL-2 en niños VSR+, $n=7$). En resumen, estos hallazgos sugieren que el sCD25 podría disminuir la actividad biológica de la IL-2 sobre las células T CD4+ de los niños.

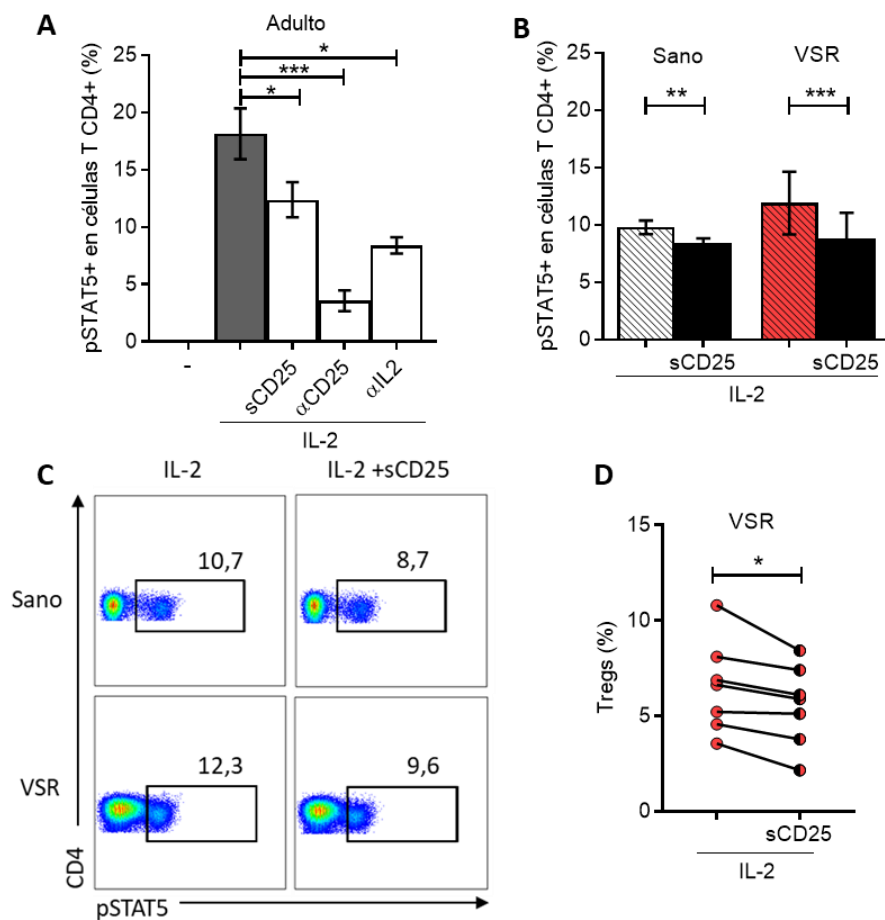


Figura 36. El CD25 soluble interfiere con la función de la IL-2 en las células T CD4+ de niños con VSR y niños sanos. (A) PBMCs de adultos sanos (n=6) incubados en ausencia o presencia de IL-2 (2 ng/ml); IL-2 + CD25 soluble (sCD25, 200 ng/ml); IL-2 + anticuerpo anti-CD25 (α CD25, 5 μ g/ml), IL-2 + anticuerpo anti-IL-2 (α IL-2, 1 μ g/ml) por 30 min a 37 °C. Se evaluó la fosforilación de STAT5 por citometría de flujo. **(B)** PBMCs de niños sanos (n=12) y VSR+ (n=11) estimulados con IL-2 o IL-2+sCD25 por 30 min a 37 °C. Se muestran los porcentajes de células T CD4+pSTAT5+ analizados por citometría de flujo en figuras A y B. **(C)** Dot plots representativos de B (%). **(D)** PBMCs de niños VSR+ estimulados con IL-2 (2 ng/ml) o IL-2 + sCD25 (200 ng/ml) por 24h. Luego se evaluó el porcentaje de Tregs (CD4+ FOXP3+ CD25+) por citometría de flujo. Los datos en A y B muestran la media \pm EEM. Se empleó el test de Friedman en A y el test de Wilcoxon en B y D, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.2.9 Las células T CD4+ efectoras de niños VSR+ presentan una alta expresión de CD25

Como se mencionó anteriormente, la molécula de sCD25 es generada principalmente como resultado del clivaje proteolítico del CD25 desde la superficie de células T activadas, aunque no se sabe exactamente si también hay otros tipos celulares involucrados [105]. Para establecer qué tipo celular es la fuente más importante de sCD25 plasmática durante la infección por VSR, primeramente, estudiamos cómo es la expresión de CD25 en células T CD4+, CD8+, B y monocitos en estos pacientes. Encontramos una despreciable expresión en estos últimos 3 compartimentos (**Fig. 37**), por lo que concluimos que la principal fuente de sCD25 en plasma son células T CD4+.

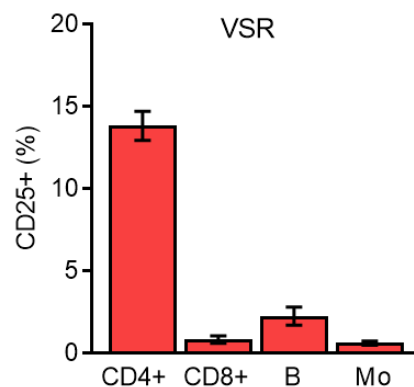


Figura 37. Expresión de la molécula CD25 en los compartimentos de células T, B y monocitos en niños con VSR. Se muestran los porcentajes de las poblaciones de células T CD4+ y CD8+, células B (CD19+) y monocitos (Mo, CD14+) que expresan CD25, analizados en PBMCs de niños VSR+ (n=10) por citometría de flujo. Se muestra la media \pm EEM.

Debido a que las células T CD4+ efectoras activadas y las Tregs presentan una alta expresión de CD25 [102], y que estas últimas se encuentran disminuidas en la infección por VSR [96], pensamos que las células T CD4+ efectoras serían el principal recurso de sCD25 plasmático durante el curso de la infección. Para corroborarlo, analizamos la expresión de CD25 en las células T CD4+ efectoras tanto de niños sanos como de niños VSR+. Observamos que efectivamente las células T CD4+ FOXP3- efectoras de los niños VSR+ presentaron una mayor expresión de CD25 en su superficie en comparación con los sanos, tanto por su elevado porcentaje (**Fig. 38 A**, p=0,002 sanos vs VSR+) como por la mayor IFM específica del CD25 (**Fig. 38 B**, p<0,0001 sanos vs VSR+) en este compartimento celular.

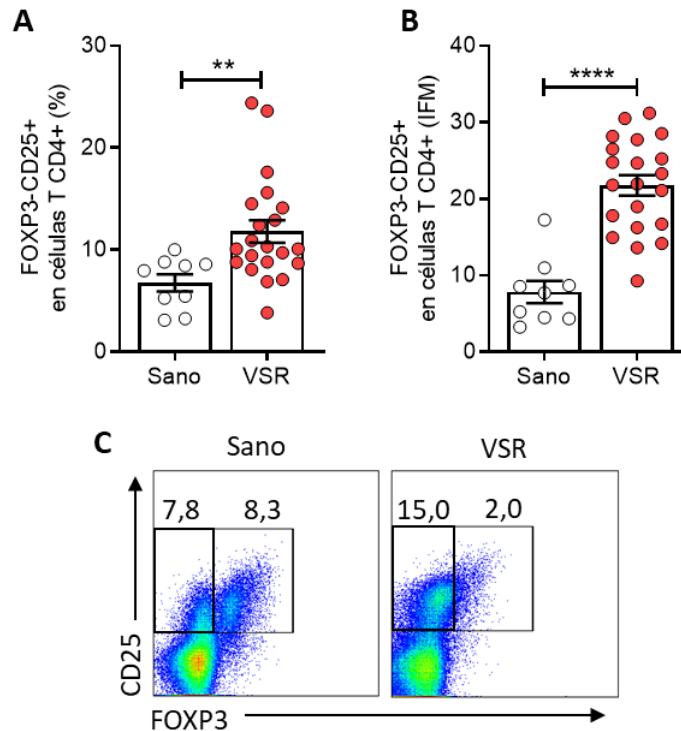


Figura 38. Las células T CD4+ efectoras de los niños con VSR expresan altos niveles de CD25. (A-B) Porcentaje de células T CD4+ FOXP3- CD25+ (**A**) e intensidad de fluorescencia media (IFM) específica de CD25 (**B**) en esta subpoblación celular, evaluado por citometría de flujo en niños sanos (n=9) y VSR+ (n=21). (**C**) *Dot plots* representativos de A y B. Se muestra la media \pm EEM en A y B. Se empleó el test de Mann-Whitney en cada caso, ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Por último, quisimos confirmar si la activación celular de PBMCs de los niños induce la liberación de sCD25. Para ello, estimulamos PBMCs de niños sanos y VSR+ con PMA e Ionomicina durante 18 h y cuantificamos los niveles de sCD25 en el sobrenadante de cultivo por ELISA. Observamos que los niveles de sCD25 aumentaron con el estímulo en los dos grupos de niños. De esta manera, confirmamos que la activación celular *in vitro* de PBMCs de los niños indujo la generación de sCD25 (**Fig. 39**), aunque no observamos diferencias estadísticas.

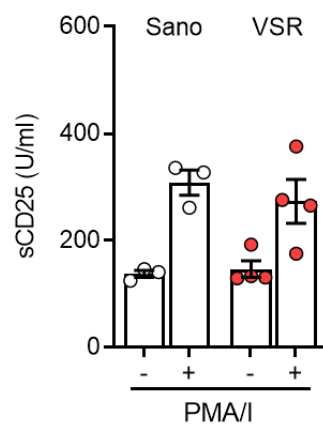


Figura 39. La activación celular de PBMCs aumenta los niveles de CD25 soluble en el sobrenadante de cultivo. PBMCs de niños sanos (n=3) y VSR+ (n=4) estimulados con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 50 ng/ml) e

lonomicina (1 µg/ml) por 18 h. Se midió la concentración de CD25 soluble (sCD25) en el sobrenadante de cultivo por ELISA. Se muestra la media ± EEM.

4.2.10 Los niveles plasmáticos de sCD25 y la frecuencia de Tregs muestran una correlación negativa

A continuación, analizamos la presencia de alguna asociación entre los niveles de sCD25 plasmáticos de los niños sanos y VSR+ y el porcentaje de Tregs de esos pacientes (valores tomados de la condición sin estimular reportados en la **Fig. 30 A**). Llamativamente, encontramos una correlación inversa entre la frecuencia de Tregs y los niveles de sCD25 plasmáticos cuando se analizaron colectivamente los niños sanos y VSR+ [**Fig. 40**, $p=0,022$, $r=-0,52$, niños sanos ($n=10$) y VSR+ ($n=9$)]. Estos resultados concuerdan con la idea de que el sCD25 se une a la IL-2 afectando su biodisponibilidad, y, en consecuencia, provoca una disminución de Tregs, ya que estas dependen de la IL-2 para su crecimiento y función celular.

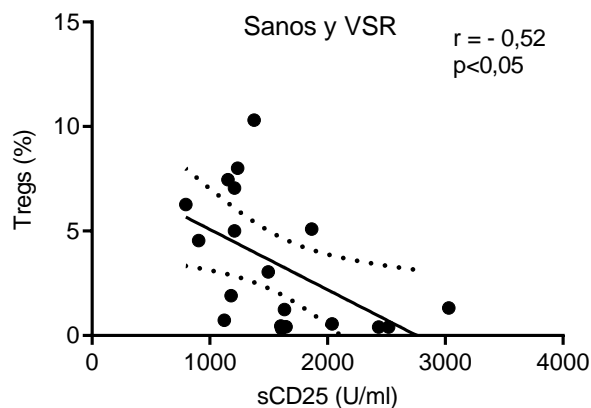


Figura 40. Los niveles de sCD25 plasmático correlacionan negativamente con la frecuencia de Tregs. Correlación entre el nivel de sCD25 plasmático y el porcentaje de Tregs (niños sanos $n=10$, y VSR+ $n=9$). Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r) y el p valor.

4.2.11 La producción de IL-2 por las células T CD4+ de niños VSR+ correlaciona negativamente con la severidad de la enfermedad

Seguidamente, nos propusimos estudiar si la disminución en la producción de IL-2 por las células T CD4+ en la infección por VSR presentaba alguna asociación con la edad de los pacientes o la severidad de la enfermedad, teniendo en cuenta que los menores de 6 meses son quienes presentan cuadros más severos de bronquiolitis [33]. Utilizamos la IFM específica de IL-2 como medida de producción de IL-2 por las células T CD4+ de los niños VSR+ ya que estos pacientes no presentaron diferencias en la frecuencia de células T CD4+ IL-2+ en comparación con los niños sanos. En este aspecto, no observamos correlación entre la IFM de la IL-2 en las células T CD4+ de los niños VSR+ y la edad de los pacientes (**Fig. 41 A**, p NS, $r=0,19$, niños VSR+, $n=20$).

Seguidamente, realizamos una correlación entre la IFM de IL-2 en las células T CD4+ de niños VSR+ y la severidad de la enfermedad, empleando el score de Tal modificado como parámetro de la severidad

de la bronquiolitis por VSR. Este score consiste en una escala clínica que clasifica a los pacientes según tengan una enfermedad leve (0-4), moderada (5-8) o severa (9-12) de bronquiolitis por VSR, al momento de toma de la muestra [179]. Sorpresivamente, observamos una correlación negativa (**Fig. 41 B**, $p=0,0085$, $r= -0,53$, niños VSR+ ($n=20$), lo que indica que a menor producción de IL-2 por las células T CD4+, mayor severidad de la enfermedad. Este hallazgo sugiere que los bajos niveles de IL-2 podrían estar asociados a un cuadro más severo de bronquiolitis.

Por último, dado que los varones tienen más predisposición que las mujeres a padecer un cuadro severo [27], también analizamos si existía alguna diferencia en la producción de IL-2 por las células T CD4+ de los niños VSR+ según el sexo. En este sentido, no se mostraron diferencias significativas para este parámetro según el sexo [**Fig. 41 C**, p NS para niñas VSR+ ($n=6$) vs niños VSR+ ($n=14$)].

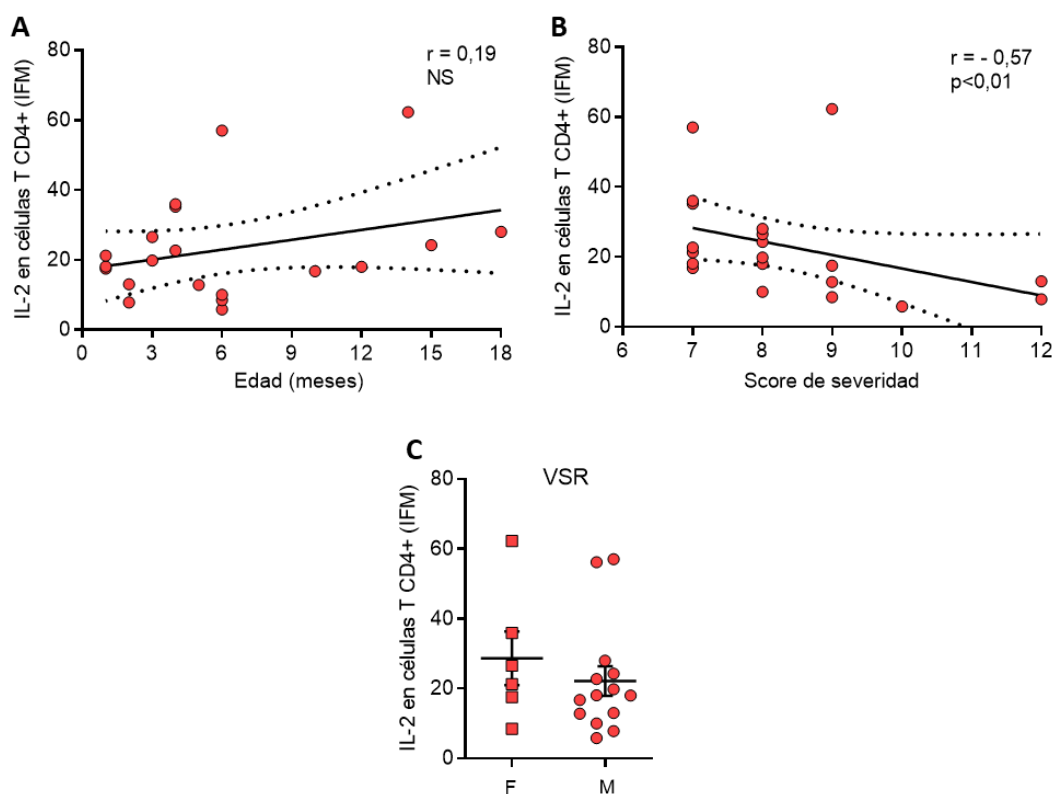


Figura 41. La producción de IL-2 por las células T CD4+ correlaciona negativamente con el score clínico de severidad de la enfermedad por VSR. (A-B) Correlación entre la intensidad de fluorescencia media (IFM) específica de IL-2 en las células T CD4+ ($n=20$) y la edad (A) o severidad de la enfermedad (B). (C) IFM de IL-2 en las células T CD4+ de niños VSR+ divididos según sexo femenino (F, $n=6$) y masculino (M, $n=14$). Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r) y el p valor en A y B. Se muestra la media \pm EEM en C. Se empleó el test de Mann-Whitney para el análisis estadístico en C.

4.2.12 Los niveles de sCD25 plasmáticos de los niños con VSR correlacionan positivamente con la edad pero no presenta asociación con la severidad de la enfermedad

Finalmente, analizamos si existía alguna asociación entre los niveles de sCD25 plasmáticos y datos clínicos como la edad, severidad y sexo de los pacientes VSR+. En primer lugar, observamos una correlación negativa entre la edad de los niños VSR+ y el nivel de sCD25 en plasma (**Fig. 42 A**, $p=0,0001$,

$r = -0,69$, niños VSR+, $n=24$), lo cual indica que, a menor edad de los niños VSR+, mayores niveles de sCD25 en circulación. Por otro lado, no observamos correlación entre los niveles de sCD25 en plasma y el score clínico de severidad de la enfermedad (**Fig. 42 B**, p NS, $r=0,25$, niños VSR+, $n=24$). Finalmente, tampoco encontramos diferencias significativas en los niveles de sCD25 entre mujeres y varones [**Fig. 42 C**, p NS para niñas VSR+ ($n=11$) vs niños VSR+ ($n=13$)].

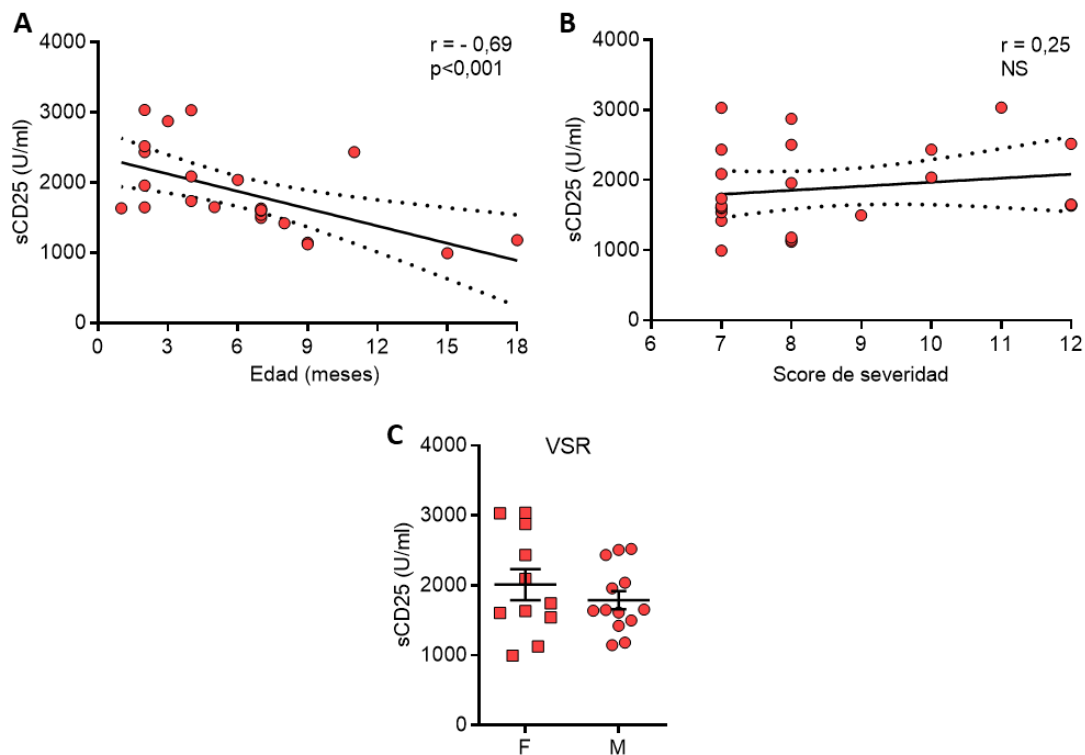


Figura 42. Los niveles de sCD25 plasmático correlacionan negativamente con la edad de los pacientes con VSR. Correlación entre los niveles de CD25 soluble (sCD25) en plasma de niños VSR+ ($n=24$) y la edad (**A**) o severidad de la enfermedad, según el score de Tal (**B**). (**C**) Niveles de sCD25 plasmáticos de niños VSR+ divididos según sexo femenino (F, $n=11$) y masculino (M, $n=13$). Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r) y el p valor en A y B. Se muestra la media \pm EEM en C. Se empleó el test de Mann-Whitney para el análisis estadístico en C.

4.3 Análisis de la expresión de receptores de la porción Fc de la IgG y de la función mediada por la unión de complejos inmunes en las células T de los niños VSR+

4.3.1 La frecuencia de células T CD4+ y CD8+ que expresan CD32 en sangre periférica se encuentra aumentada en niños VSR+

La expresión en células T de los RFcy en general, y del CD32 en particular, es un tema controvertido. Algunos autores sostienen que las células T no expresan este receptor [129, 130, 136]. Sin embargo, varios trabajos han demostrado que un pequeño porcentaje de células T CD4+ expresa CD32, que aumenta con la activación celular [120, 124, 126, 128]. Sin embargo, pocos trabajos han evaluado la

expresión del CD32 en las células T CD8+ [126, 128]. Hasta el momento no se ha estudiado la expresión y función de este receptor en las células T CD4+ y CD8+ en el curso de la infección por VSR. Por estos motivos, el objetivo de esta segunda parte del trabajo consistió en estudiar la expresión y funcionalidad del CD32 en las células T CD4+ y CD8+ durante la infección por VSR.

En primer lugar, evaluamos la expresión del CD32 en la superficie de las células T por citometría de flujo en el contexto de esta infección. Observamos una mayor frecuencia de células T CD4+ CD32+ y T CD8+ CD32+ circulantes en niños VSR+ en comparación con niños sanos (**Fig. 43 A y B**, $p < 0,0001$ niños sanos (n=29) vs VSR+ (n=50) tanto para células T CD4+ y T CD8+).

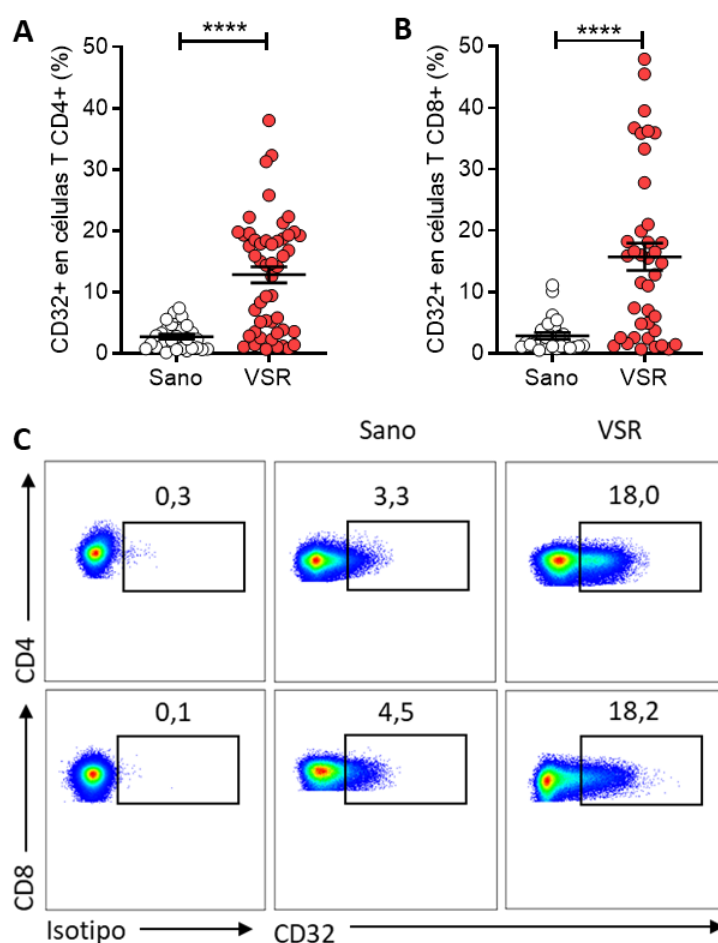


Figura 43. Los niños con VSR presentan un elevado porcentaje de células T que expresa CD32 en su superficie. (A-B) Porcentaje de células T CD4+CD32+ (**A**) y T CD8+CD32+ (**B**) en PBMCs de niños sanos (n=29) y niños VSR+ (n=39 para CD8+ y n=50 para CD4+), analizado por citometría de flujo utilizando anticuerpo anti-CD32 humano (clon FUN-2) y su control de isotipo. (**C**) *Dot plots* representativos de A y B (%). Los datos en A y B muestran la media \pm EEM. Se empleó el Test de Mann-Whitney en cada análisis, **** $p < 0,0001$.

Para corroborar este hallazgo, evaluamos la expresión del CD32 en las células T de niños VSR+ por microscopía confocal. Para esto, aislamos células T por *Cell Sorting* y realizamos una tinción con Ac conjugados específicos para CD32 y células T. El análisis de las imágenes obtenidas a través de un microscopio confocal de dos pacientes VSR+ confirmó la presencia de CD32 tanto en las células T CD4+ como en las T CD8+ (**Fig. 44**).

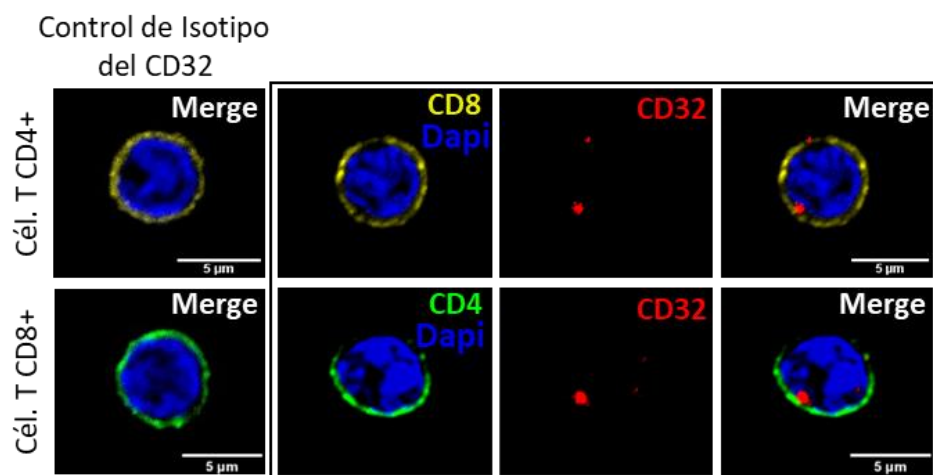


Figura 44. Análisis de la expresión de CD32 en células T de niños con VSR por microscopía confocal. Células T de niños VSR+ (n=2) fueron aisladas por separación celular por *Cell Sorting* por selección negativa (definidas como CD19- CD56- CD14-). Posteriormente las células fueron marcadas con anticuerpos conjugados específicos para CD4 (Alexa Fluor 488, verde), CD8 (PE, amarillo), y CD32, clon Fun-2 (Alexa Fluor 647, rojo) o su control de isotipo. En todos los casos, los núcleos fueron teñidos con DAPI y los preparados analizados en un microscopio confocal. Se muestran las imágenes correspondientes a un niño VSR+.

Considerando que está descrito que un pequeño porcentaje de células T CD4+ y CD8+ presentan el RFcy de tipo III de baja afinidad, CD16, en su superficie [190, 191], decidimos evaluar también la expresión de superficie del CD16 en las células T CD4+ y CD8+ de los niños VSR+ y sanos. A partir del análisis de los PBMCs por citometría de flujo, pudimos confirmar una casi nula expresión basal de CD16 en las células T CD4+ (**Fig. 45 A**) y una baja expresión en las células T CD8+ (**Fig. 45 B**), sin observar diferencias significativas entre grupos de donantes.

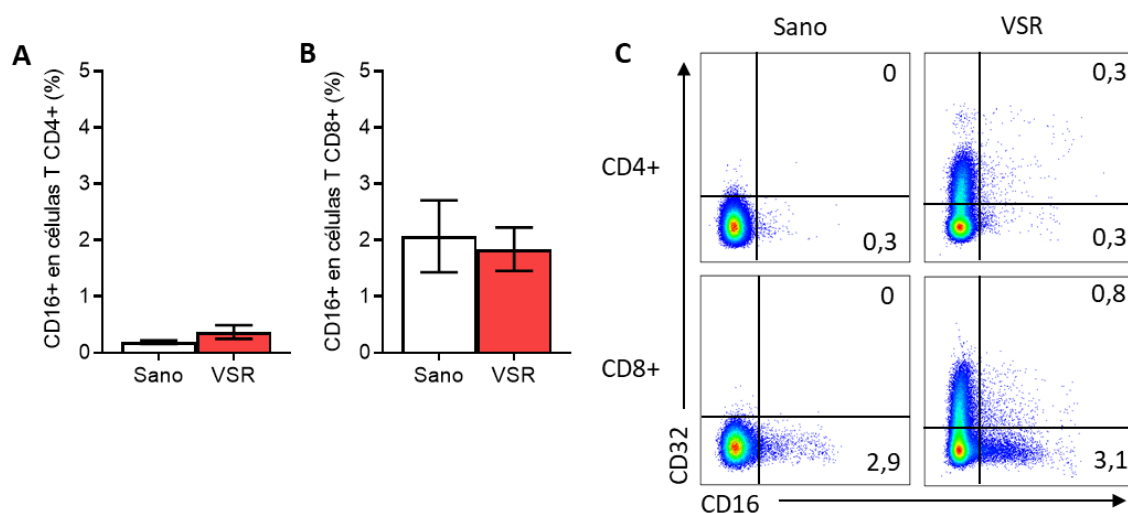


Figura 45. Expresión del receptor CD16 en células T CD4+ y CD8+ de niños sanos y con VSR. (A-B) PBMCs basales de niños sanos (n=11) y VSR+ (n=15) fueron marcadas con anticuerpos específicos para CD16, CD32, CD4, CD3 y CD8. Se analizó el porcentaje de CD16+ dentro de las células T CD4+ (**A**) y CD8+ (**B**). (**C**) *Dot plots* representativos de A y B (%). Los resultados en A y B muestran la media \pm EEM. Se empleó el test de Mann-Whitney para cada análisis estadístico.

4.3.2 La isoforma predominante del CD32 en los niños sanos y VSR+ es la isoforma activadora

El CD32 presenta múltiples isoformas. Las más prevalentes son las correspondientes a las isoformas CD32a y CD32b, que activan o inhiben funciones celulares respectivamente [135]. El dominio extracelular está muy conservado por lo que no se disponen de Ac comerciales disponibles capaces de distinguirlas por esta porción. No obstante, las isoformas pueden ser diferenciadas por PCR a través de sus dominios intracitoplasmáticos, los motivos ITAM e ITIM [135, 177].

Para estudiar cuál es la isoforma del CD32 predominante en los niños sanos y VSR+, en primera medida, purificamos células T CD4+ y CD8+ de ambos donantes por *Cell Sorting*, extrajimos el ARN y evaluamos la expresión relativa del ARNm de las isoformas CD32a y CD32b por RT-qPCR, utilizando *primers* específicos. Detectamos que los niveles de ARNm de CD32a fueron notablemente más altos que los de CD32b en las células T CD4+ en ambos grupos de donantes [Fig. 46 A, $p < 0,0001$ CD32a vs CD32b tanto para niños sanos ($n=14$) como VSR+ ($n=19$)]. Asimismo, observamos similar tendencia en las células T CD8+ (Fig. 46 B, $p=0,04$ y $p=0,0002$ CD32a vs CD32b para niños sanos y VSR+ respectivamente). No encontramos diferencias en los niveles de ARNm de CD32a ni CD32b entre ambos grupos.

Estos resultados reflejan que en las células T de los niños, tanto de los sanos como de los VSR+, hay un predominio de la isoforma activadora CD32a.

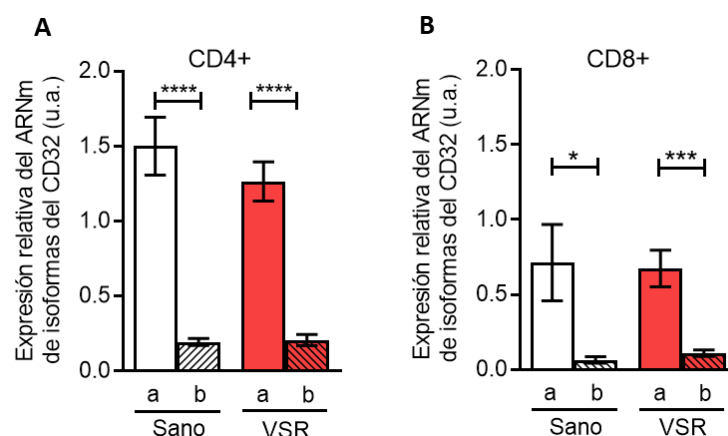


Figura 46. Las células T de los niños sanos y con VSR muestran un predominio de la isoforma activadora del CD32. (A-B) Expresión relativa de ARNm de las isoformas CD32a y CD32b en células T CD4+ (A) y T CD8+ (B) purificadas por *Cell Sorting* de niños sanos ($n=14$) y VSR+ ($n=19$), y cuantificadas por RT-qPCR. Los resultados se encuentran relativizados a un calibrador de referencia (monocitos) empleado en cada corrida, como se describió previamente [182]. Se utilizó GAPDH como gen de control interno. Se muestra la media \pm EEM. Se empleó el test de Wilcoxon para el análisis entre isoformas de cada paciente y el test de Kruskal-Wallis para el análisis entre grupos, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.3.3 Las células T que expresan CD32 de niños VSR+ están enriquecidas en marcadores de activación linfocitaria y agotamiento celular

Estudios previos han demostrado que el CD32 es expresado mayoritariamente en células T activadas [126, 140]. Por esto, está asociado a la expresión de receptores de activación y proliferación celular [120, 121, 124]. Teniendo en cuenta el predominio de la isoforma activadora CD32a observado en las

células T de los niños VSR+, indagamos si la expresión de este receptor también está asociada a una mayor activación celular.

Para responder esta pregunta, analizamos la expresión de CD25 y de HLA-DR, marcadores de activación intermedio y tardío respectivamente, en las células T CD32+ y CD32- a partir de PBMCs de niños VSR+. También evaluamos la expresión de PD-1, receptor inhibitorio asociado a un fenotipo de células T exhaustas, que regula su función celular y es inducido luego de la activación [192]. El análisis demostró una mayor expresión tanto de los marcadores de activación CD25 y de HLA-DR como de PD-1 en las células T CD4+ CD32+ (**Fig. 47 A**, $p < 0,0001$ para la subpoblación CD32- vs CD32+ que expresa CD25, HLA-DR y PD-1). Estas diferencias también se observaron en las células T CD8+ (**Fig. 47 B**, $p < 0,0001$ para la subpoblación CD32+ vs CD32- que expresa HLA-DR y PD-1; $p = 0,001$ para la subpoblación CD32- vs CD32+ que expresa CD25). En resumen, estos hallazgos indican que la subpoblación CD32+ de células T posee un fenotipo compatible con células activadas.

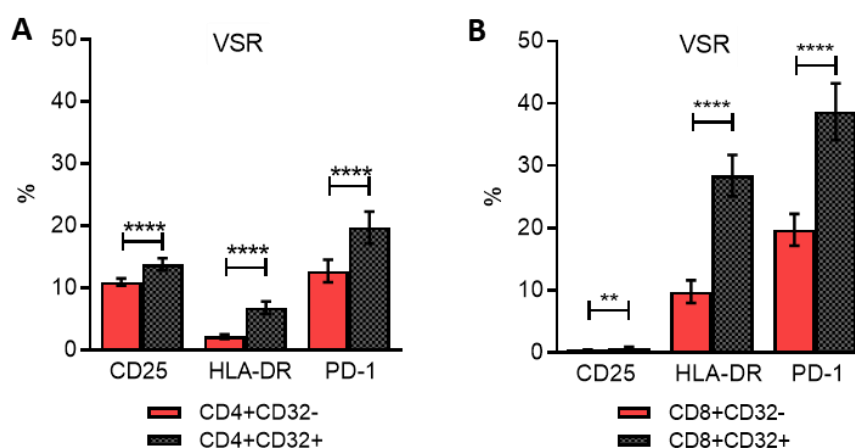


Figura 47. Las células T CD4+ y CD8+ que expresan CD32 de niños con VSR están enriquecidas en marcadores de activación linfocitaria CD25 y HLA-DR y del receptor inhibitorio PD-1. (A-B) Porcentaje de células que expresan los marcadores CD25, HLA-DR y PD-1 dentro las subpoblaciones CD32- y CD32+ de células T CD4+ (**A**) y CD8+ (**B**) analizado por citometría de flujo en PBMCs de niños VSR+ ($n=32$). Los resultados muestran la media \pm EEM. Se empleó el test de Wilcoxon para el análisis estadístico de cada marcador, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

4.3.4 La expresión de CD32 en las células T de niños VSR+ está asociada a un fenotipo de memoria diferenciado

Visto que las células T CD4+ CD32+ mostraron un fenotipo de activación celular, a continuación, nos preguntamos si las subpoblaciones de células T de memoria expresaban CD32 en forma diferencial.

Al analizar la composición de estas subpoblaciones en las células T CD4+ y CD8+ CD32- y CD32+ en PBMCs de niños VSR+, encontramos que las células CD32+ mostraron una mayor frecuencia de las subpoblaciones de T_{MT} , T_{ME} y T_{TEMRA} , en comparación con su contraparte CD32- en las células T CD4+ ($p=0,0002$, $p=0,0002$ y $p=0,0001$ para las T_{MT} , T_{ME} y T_{TEMRA} respectivamente, dentro la subpoblación de células T CD4+ CD32- vs CD32+), y una mayor frecuencia de T_{MT} y T_{ME} en las células T CD8+ CD32+

($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$ para las T_{MT} y T_{ME} respectivamente, dentro la subpoblación de células T $CD8^+ CD32^-$ vs $CD32^+$). En consistencia con esto, la frecuencia de células T_N se encontró disminuida en las células T $CD32^+$, tanto en las $CD4^+$ (**Fig. 48 A**, $p = 0,0004$ para las T_N dentro de la subpoblación de células T $CD4^+ CD32^-$ vs $CD32^+$) como $CD8^+$ (**Fig. 48 B**, $p < 0,0001$ para las T_N dentro de la subpoblación de células T $CD8^+ CD32^-$ vs $CD32^+$). Estos datos indican que las células T $CD32^+$ de niños VSR+ están en su mayoría enriquecidas en subpoblaciones de memoria celular.

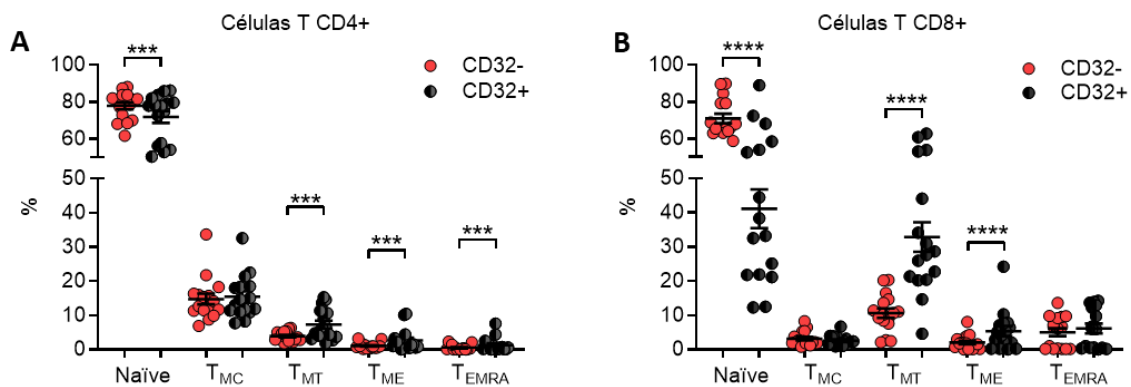


Figura 48. Las células T $CD4^+$ y $CD8^+ CD32^+$ de niños con VSR muestran un fenotipo compatible con células de memoria. (A-B) Distribución de las diferentes subpoblaciones *naïve* y de memoria dentro de las células T $CD4^+$ (A) y $CD8^+$ (B) que expresan o no CD32, de niños VSR+ ($n = 16$). La caracterización de células T como *naïve* ($CD45RA^+ CD27^+ CCR7^+$; T_N), memoria central ($CD45RA^- CCR7^+ CD27^+$; T_{MC}), memoria transicional ($CD45RA^- CD27^+ CCR7^-$; T_{MT}), memoria efectora ($CD45RA^- CD27^- CCR7^-$; T_{ME}), y memoria efectora terminalmente diferenciada ($CD45RA^+ CD27^- CCR7^-$; T_{EMRA}) fue realizada según lo descrito previamente por Abdel-Mohsen y cols, 2018 [121]. Se muestra la media \pm EEM en A y B. Se empleó el test de Wilcoxon para cada análisis estadístico, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Posteriormente, nos resultó relevante estudiar si las células T $CD4^+$ de memoria que expresan CD32 presentan un perfil funcional característico de respuesta T efectora a diferencia de su contraparte $CD32^-$. Para ello, determinamos los perfiles de células T $CD4^+$ efectoras, definiéndolas según la expresión de receptores de quimiocinas característicos dentro de las células T $CD4^+$ de memoria (ver estrategia de *gating* en Materiales y Métodos sección 3.7.2.1), tal como se describió en Abdel-Mohsen y cols, 2018 [121].

Al analizar los perfiles de células T $CD4^+$ efectoras de memoria dentro de las $CD32^+$ y $CD32^-$ en PBMCs de niños VSR+ por citometría de flujo, encontramos un aumento en las frecuencias de los perfiles Th1, T_{fh} y Tregs en las $CD32^+$ en comparación con las $CD32^-$ (**Fig. 49**). Asimismo, el porcentaje de células T $CD4^+$ de memoria que no se corresponde a ningún perfil funcional está disminuido en el compartimento $CD32^+$. Cabe destacar el aumento de Tregs en la subpoblación $CD32^+$, en un contexto en el cual este compartimento se encuentra afectado. En resumen, estos resultados en conjunto muestran un fenotipo de memoria diferenciado en aquellas células T $CD32^+$.

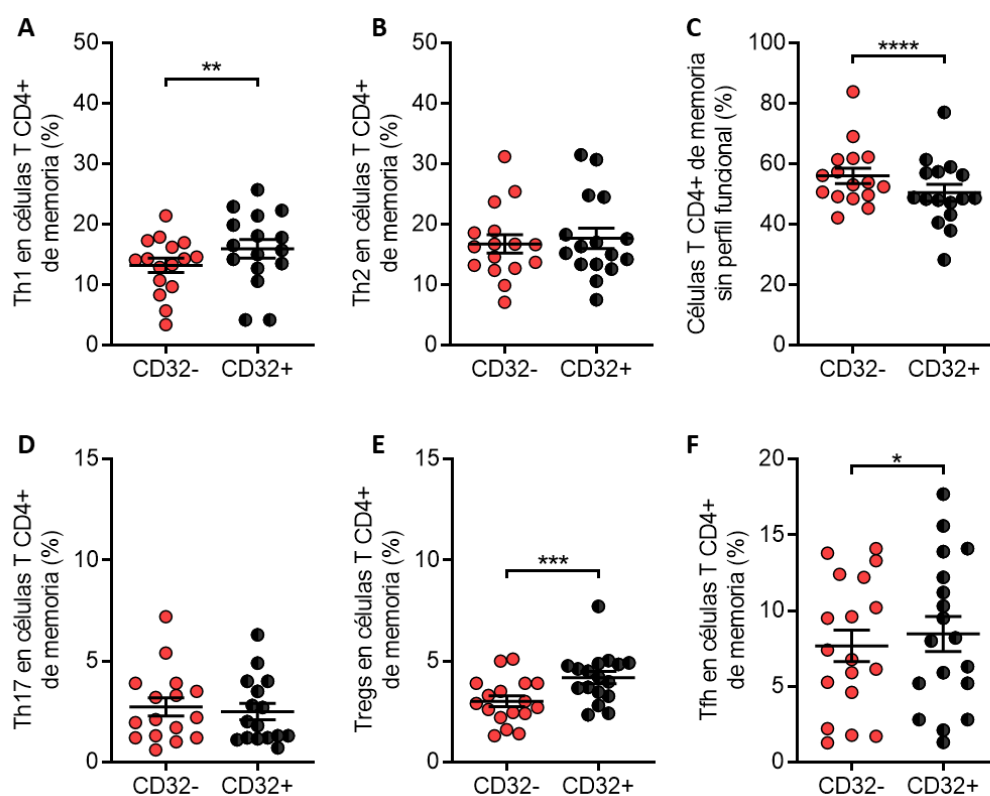


Figura 49. Las células T CD4+ CD32+ de memoria de niños con VSR presentan un mayor porcentaje de los perfiles Th1, Tregs y T helper foliculares respecto a las CD32-. Porcentajes de los perfiles T helper dentro de las células T CD4+ de memoria (CD45RA-) CD32+ y CD32-, en niños VSR+ (n=16), analizado por citometría de flujo multiparamétrica. Las células Th1 (A) fueron definidas como CXCR3+CCR4-CCR6-, Th2 (B) como CXCR3-CCR4+CCR6-, Th17 (D) como CXCR3-CCR4-CCR6+, T regulatorias (Tregs, E) como CD127low/- CD25+, y T helper foliculares (Tfh, F) como CXCR5+ PD-1+. (C) Porcentaje de células que no se correspondieron a ningún perfil funcional. Se muestra la media \pm EEM en todos los paneles. Se empleó el test de Wilcoxon para cada análisis estadístico, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

4.3.5 Las células T CD4+ T y CD8+ de niños VSR+ pueden unir IgG agregada como modelo de complejo inmune

El CD32, como RF γ de baja afinidad, une débilmente la porción Fc de IgG en su forma monomérica, sin embargo, puede unir CI y agregados de IgG con alta afinidad [193].

A continuación, nos preguntamos si el CD32 presente en las células T de los niños era capaz de unir a su ligando. A tal efecto, utilizamos IgG agregada por calor como modelo de CI. Debido a la baja frecuencia del CD32 en las células T de los niños sanos, decidimos realizar este ensayo a partir de células de niños VSR+. Para ello, incubamos PBMCs de niños VSR+ con IgGa por 2 h a 37 °C, y marcamos las células con un Ac específico para la porción Fc de IgG humana. Seguidamente, evaluamos el porcentaje de células T CD4+ y CD8+ que unieron IgGa por citometría de flujo. Encontramos que, tanto las células T CD4+ (Fig. 50 A, p<0,0001 para la condición sin IgGa vs con IgGa, n=14) como CD8+ (Fig. 50 B, p<0,0001 para la condición sin IgGa vs con IgGa, n=11) fueron capaces de unir IgGa.

Por otra parte, para evaluar la especificidad de la unión, incubamos previamente los PBMCs con un Ac monoclonal bloqueante del CD32, IV.3. Observamos que la incubación previa de las células T con el Ac bloqueante del CD32 disminuyó la unión de IgGa, aunque no hubo diferencia estadística para las células T CD4+ (**Fig. 50 A**, $p=0,12$ para la condición con IgGa vs con IgGa y Ac bloqueante del CD32, $n=14$) a diferencia de las células T CD8+ (**Fig. 50 B**, $p=0,002$ para la condición con IgGa vs con IgGa y Ac bloqueante del CD32, $n=11$). De esta manera, los resultados sugieren que las células T unieron IgGa a través del CD32 de forma específica, al menos parcialmente.

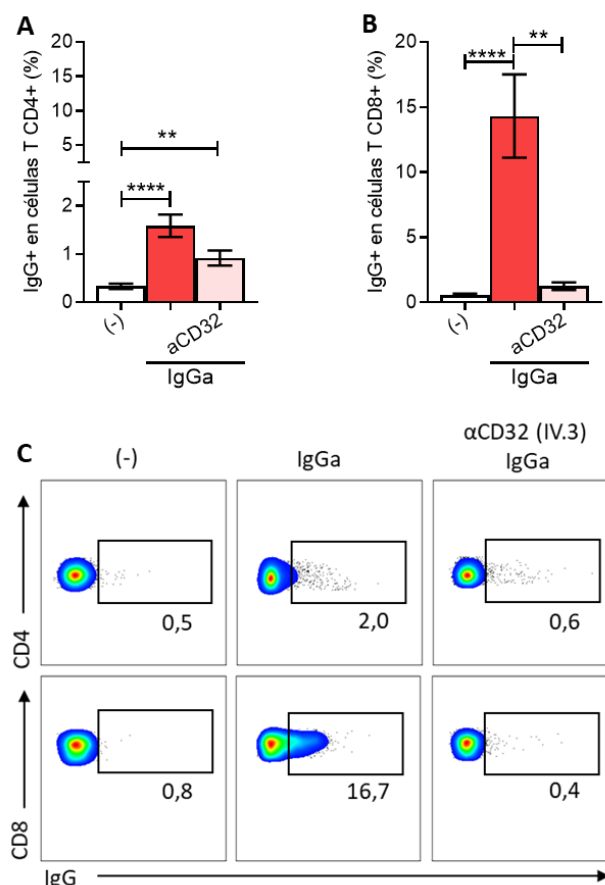


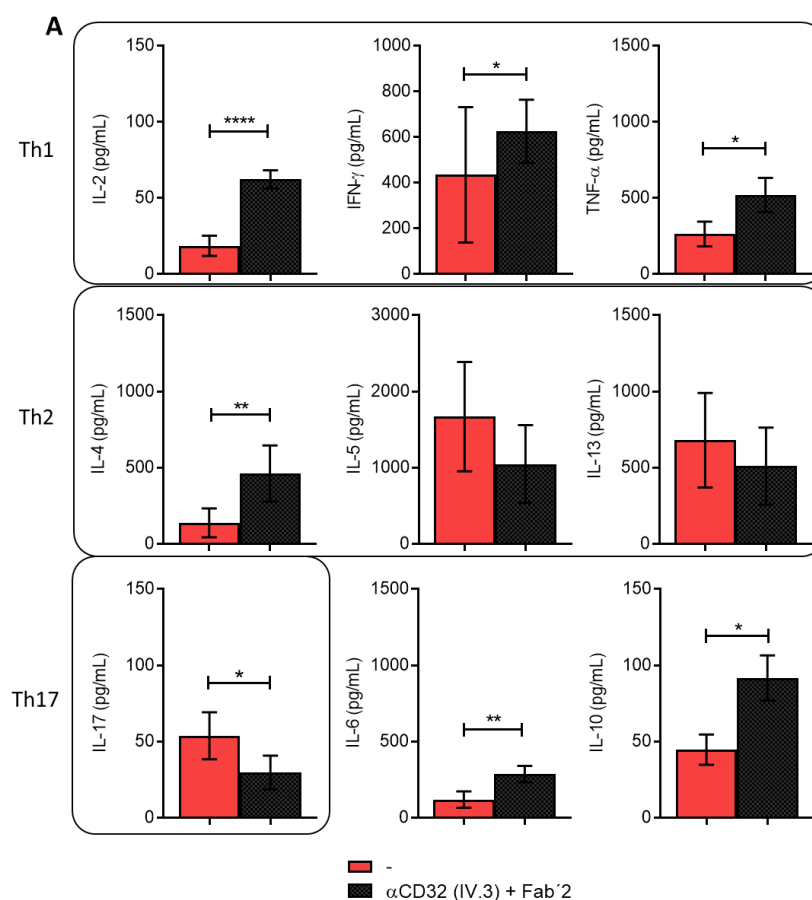
Figura 50. Las células T de los niños con VSR unen IgG agregada a través del CD32. (A-B) PBMCs basales de niños VSR+ fueron tratados o no con anticuerpo bloqueante α -CD32 (clon IV.3, 30 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h y luego incubados con IgG agregada por calor (IgGa, 400 $\mu\text{g/ml}$) o con medio de cultivo libre de suero por 2 h. Luego, se analizó el porcentaje de células T CD4+ (**A**, $n=14$) y CD8+ (**B**, $n=11$) que unieron IgG por citometría de flujo. (**C**) *Dot plots* representativos de A y B (%). Los resultados en A y B muestran la media \pm EEM. Se empleó el test de Kruskal-Wallis para cada análisis estadístico, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$.

4.3.6 La estimulación vía CD32 promueve la secreción de un amplio patrón de citocinas en las células T CD4+ y la degranulación en las células T CD8+ de niños VSR+

Seguidamente, nos preguntamos cuál es el efecto funcional de la estimulación del CD32 en las células T de los niños VSR+. Para ello, utilizamos un modelo de cultivo celular donde se induce la activación del CD32 a través del entrecruzamiento o microagregación de este receptor. Esto se logró mediante la

ligación del CD32 con un Ac monoclonal específico del receptor (clon IV.3) seguido del entrecruzamiento con el fragmento F(ab)'2 de un Ac secundario, donde se indujo la microagregación o *clustering* del CD32 y posterior estimulación de este mediante activación de cascadas de transducción de señales [23].

En primera instancia, indujimos o no el entrecruzamiento del CD32 presente en las células T CD4+ purificadas, que luego fueron cultivadas por 3 días con PHA-P. Posteriormente, cuantificamos la producción de citocinas correspondientes a los perfiles Th1, Th2 y Th17 en el sobrenadante de cultivo mediante ensayo multiplex por citometría de flujo (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-5, IL-13 e IL-10) y ELISA (IL-17A). Interesantemente, observamos que la estimulación del CD32 aumentó significativamente la producción de IL-2 ($p < 0,0001$), IFN- γ ($p = 0,013$), TNF- α ($p = 0,034$), IL-4 ($p = 0,042$), IL-6 ($p = 0,092$) e IL-10 ($p = 0,013$) por las células T CD4+, en comparación con la condición sin estimular (**Fig. 51**). Sin embargo, el estímulo del CD32 disminuyó la producción de IL-17 ($p = 0,013$). De este modo, la estimulación del CD32 en las células T CD4+ aumenta la expresión de un diverso patrón de citocinas. En consistencia con lo observado previamente en el análisis de los perfiles funcionales (ver **Fig. 49**), donde hubo un aumento de Th1 en las CD32+, varias de las citocinas cuyos niveles incrementaron se corresponden con un perfil Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α).



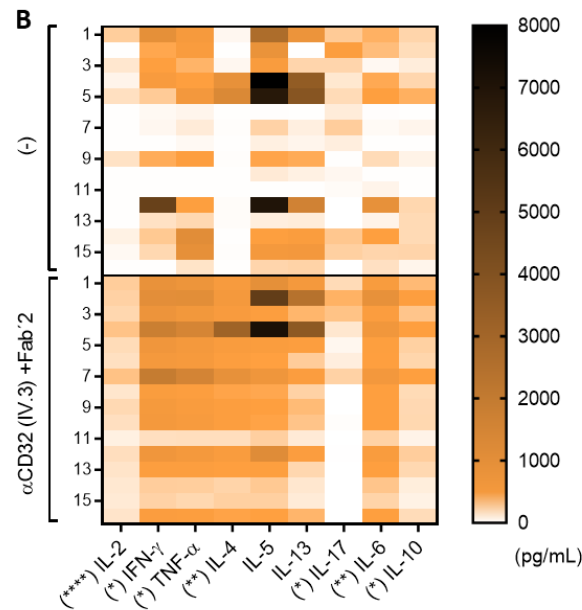


Figura 51. La estimulación vía CD32 promueve la secreción de un amplio patrón de citocinas en las células T CD4+ de niños con VSR. (A-B) Las células T CD4+ de niños VSR+ (n=16) purificadas fueron tratadas con anticuerpo monoclonal anti-CD32 (30 mg/ml), y el entrecruzamiento del CD32 fue inducido por el agregado de un Fab'2 de cabra anti-IgG de ratón (50 mg/ml). Luego, las células fueron incubadas con PHA-P (4 μ g/ml) por 3 días y la concentración de citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-5, IL-13 e IL-10 fue cuantificada por ensayo multiplex de citocinas por citometría de flujo (Legend Plex), mientras que los niveles de IL-17A fueron cuantificados por ELISA. (A) Niveles de citocinas producidas por las células T CD4+ purificadas en presencia o ausencia del estímulo del CD32. (B) Mapa de calor o *heat map* que muestra todos los pacientes agrupados según la condición sin o con el estímulo del CD32 (panel superior e inferior respectivamente). Se muestra la media \pm EEM en A. Se empleó el test de Wilcoxon para cada análisis, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

En segundo lugar, evaluamos el efecto de la estimulación del CD32 sobre la función de las células T CD8+ de niños VSR+, y nos enfocamos en su capacidad funcional citotóxica.

Las células T CD8+ pueden eliminar a las células blanco mediante dos mecanismos principales, la dependiente de gránulos (perforina y granzimas) y la independiente de gránulos (Fas-Fas ligando). La vía dependiente de gránulos no requiere la síntesis *de novo* de las proteínas efectoras, ya que éstas se encuentran almacenadas en gránulos líticos localizados en el citoplasma. Estos son lisosomas complejos que expresan en su membrana algunas glicoproteínas como CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) y CD63 (LAMP-3), que no se expresan normalmente en la superficie de las células T CD8+. Sin embargo, pueden identificarse cuando son estimulados con Ionomicina. Una vez que la célula T CD8+ se activa y los gránulos líticos alcanzan la membrana plasmática para fusionarse con ella y liberar su contenido, puede medirse transitoriamente la expresión de CD107a y b [181, 194].

Para llevar a cabo el ensayo de degranulación, las células T de niños VSR+ fueron purificadas por *Cell Sorting* por selección negativa y luego del entrecruzamiento del CD32, fueron cultivadas y estimuladas por un breve periodo con PMA e Ionomicina para inducir la activación, seguido de Monensina. Posteriormente, evaluamos la expresión de CD107a en la membrana celular de las células T CD8+ por

citometría de flujo. Finalmente, los resultados mostraron que el estímulo del CD32 aumentó la degranulación de las células T CD8+ en comparación con el control sin estimular, tanto por el mayor porcentaje de expresión de CD107a (**Fig. 52 A**) como por la IFM específica de esta molécula (**Fig. 52 B**, $p=0,0039$ y $p=0,0137$ para la condición con el estímulo del CD32 vs sin el estímulo según análisis de porcentaje e IFM del CD107a respectivamente, dentro de las células T CD8+, $n=9$).

En conjunto, todos estos datos indican que el estímulo del CD32 en las células T influye en la funcionalidad de estas induciendo su activación, tanto en las células T CD4+ como T CD8+.

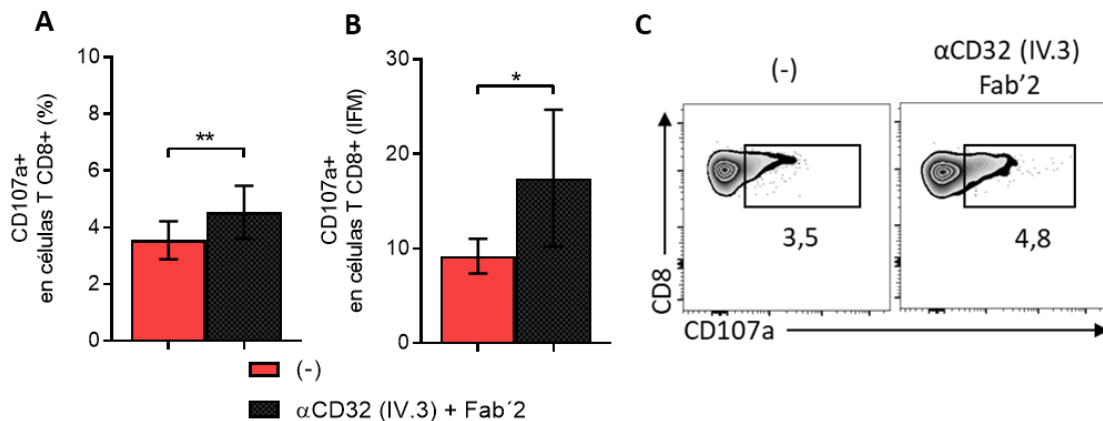


Figura 52. La estimulación vía CD32 promueve la degranulación de las células T CD8+ de niños con VSR. (A-B) Las células T de niños VSR+ ($n=9$) purificadas por *Cell Sorting*, fueron tratadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD32, IV.3 (30 $\mu\text{g/ml}$), y el entrecruzamiento del CD32 fue inducido mediante el agregado de un Fab'2 de cabra anti-IgG de ratón (50 mg/ml). Luego, las células fueron cultivadas por 18 h, e incubadas con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 50 ng/ml) e Ionomicina (1 $\mu\text{g/ml}$) por 1 h, seguido de Monensina por 2 h. Posteriormente, se midió la degranulación de las células T CD8+ por citometría de flujo a través de frecuencia de expresión de CD107a en su membrana (**A**) e intensidad de fluorescencia media (IFM) específica del CD107a (**B**). (**C**) *Dot plots* representativos. Los resultados en A y B muestran la media \pm EEM. Se empleó el test de Wilcoxon para cada análisis, $*p<0,05$, $**p<0,01$.

4.3.7 La expresión de CD32 en las células T de los niños VSR+ no potencia la infección por VSR facilitada por anticuerpos

Considerando que las células T son permisivas a la infección por VSR [19] y que describimos que una alta frecuencia de estas células expresa CD32 en su superficie, a continuación, analizamos si la presencia de este receptor podía permitir que los Ac IgG faciliten la infección por VSR en células T. El mecanismo por el cual ocurre esto es conocido como ADE (*Antibody Dependent Enhancement*) o facilitación de la infección mediada por Ac, fenómeno descrito por primera vez en la infección por dengue virus y caracterizado en diversas infecciones virales [129, 195]. Esto sucede cuando los Ac se encuentran en concentraciones subneutralizantes, las cuales no llegan a neutralizar completamente la partícula viral pero los Ac pueden unirse a esta formando un CI que, al interactuar con los RFc γ , facilitan la entrada del virus a la célula [129].

En primera medida, para llevar a cabo estos ensayos, empleamos IVIg provista por la Universidad Nacional de Córdoba, que contiene Ac naturales contra el VSR. A partir de ensayos realizados en la línea celular HEP-2 (células que no expresan RfC) y en monocitos (células que expresan altos niveles de CD32 y en las que está reportado ADE de la infección por VSR), determinamos que la dosis de IVIg para acomplejarse de forma subneutralizante con las partículas de VSR y facilitar la infección es de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ver materiales y Métodos sección 3.13.1).

Dada la baja expresión de CD32 en las células T de los donantes sanos, decidimos realizar el ensayo de ADE con células T de niños con VSR. Para ello, purificamos células T de niños VSR+ por *Cell Sorting* por selección negativa, y luego las estimulamos por 24 h con PHA-P. Transcurrido ese tiempo, infectamos las células T con VSR (MOI= 0,1) o con el CI-VSR (dosis IVIg 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y fueron cultivadas por 48 h más. También cultivamos células T sin infectar como control negativo del ensayo. Luego evaluamos por citometría de flujo el porcentaje de infección de las células T, realizando la marcación intracelular del antígeno viral. Como se muestra en la **Fig. 53**, el CI-VSR no logró aumentar la infección en las células T CD4+ (**Fig. 53 A**) ni en las células T CD8+ (**Fig. 53 B**) de estos niños, ya que no se presentaron diferencias estadísticas entre las condiciones de infección con VSR y con CI-VSR. Sin embargo, observamos una gran variabilidad en los porcentajes de infección. En este sentido, aunque algunos pacientes no mostraron cambios entre la condición con VSR y con CI-VSR, otros presentaron una mayor o menor infección en presencia del CI-VSR. Como conclusión, no hay evidencias de que ocurra ADE de la infección por VSR en las células T de los niños VSR+ analizados, bajo las condiciones antes mencionadas.

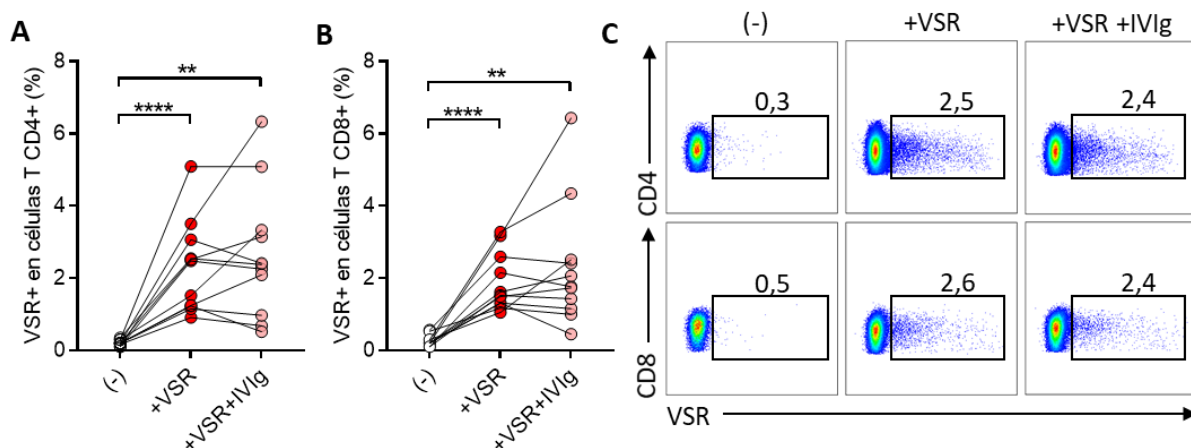


Figura 53. La expresión de CD32 en las células T de los niños con VSR no potencia la infección facilitada por anticuerpos. (A-B) Las células T de niños VSR+ (n=11) fueron purificadas por *Cell Sorting*, y estimuladas con PHA-P (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 24 h. Luego, las células fueron desafiadas con VSR purificado, preincubado o no con una dosis subneutralizante de IVIg (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), o permanecieron sin infectar (control negativo de la infección). Luego de 2 días de cultivo, se realizó la marcación intracelular del antígeno viral en las células T. Los resultados muestran los porcentajes de infección por VSR en las células T CD4+ (**A**) y CD8+ (**B**) determinados por citometría de flujo. (**C**)

Dot plots representativos de A y B. Se empleó el test de Friedman para cada análisis estadístico, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

4.3.8 La frecuencia de células T CD32+ CD4+ y CD32+ CD8+ de sangre periférica correlaciona inversamente con la severidad de la enfermedad por VSR

Finalmente, debido a que los pacientes VSR+ mostraron una gran variación interindividual respecto a la frecuencia de células T circulantes que expresan CD32, analizamos si esta variación en la expresión estaba relacionada con la edad de los pacientes o con el curso clínico de la infección.

En este sentido, evaluamos en primer lugar la asociación entre la frecuencia de las células T CD4+ y CD8+ que expresan CD32 y la edad de los niños VSR+, considerando que los menores de 6 meses son quienes presentan cuadros más severos de bronquiolitis [33]. No encontramos ninguna asociación entre estas dos variables, tanto para las células T CD4+ CD32+ (**Fig. 54 A**, p NS, $r=0,09$, niños VSR+, $n=50$) como CD8+ (**Fig. 54 B**, p NS, $r=0,21$, niños VSR+, $n=39$).

En segundo lugar, analizamos la asociación entre la frecuencia de las células T CD4+ y CD8+ que expresan CD32 y la severidad de la enfermedad por VSR, empleando el score de Tal modificado. Llamativamente, encontramos una correlación negativa entre estas dos variables, tanto para las células T CD4+ CD32+ (**Fig. 54 C** $p=0,016$, $r= -0,34$, niños VSR+, $n=50$) como CD8+ CD32+ (**Fig. 54 D** $p=0,007$, $r= -0,42$, niños VSR+, $n=39$). Estos resultados indican que la menor severidad se asocia a una mayor frecuencia de células T que expresan CD32, por lo cual estas células podrían contribuir a la resolución adecuada de la infección por VSR.

Por último, debido a que los varones tienen más predisposición que las mujeres a contraer un cuadro severo de infección por VSR [27], analizamos si existía alguna diferencia entre la frecuencia de células T CD32+ en niños VSR+ según el sexo. No encontramos diferencias entre la frecuencia de células T CD4+ que expresan CD32 entre mujeres y varones [**Fig. 54 E**, p NS para niñas VSR+ ($n=24$) vs niños VSR+ ($n=26$)]. De manera similar, tampoco hubo diferencias entre la frecuencia de células T CD8+ que expresan CD32 y el sexo de los pacientes [**Fig. 54 F**, p NS para niñas VSR+ ($n=16$) vs niños VSR+ ($n=23$)].

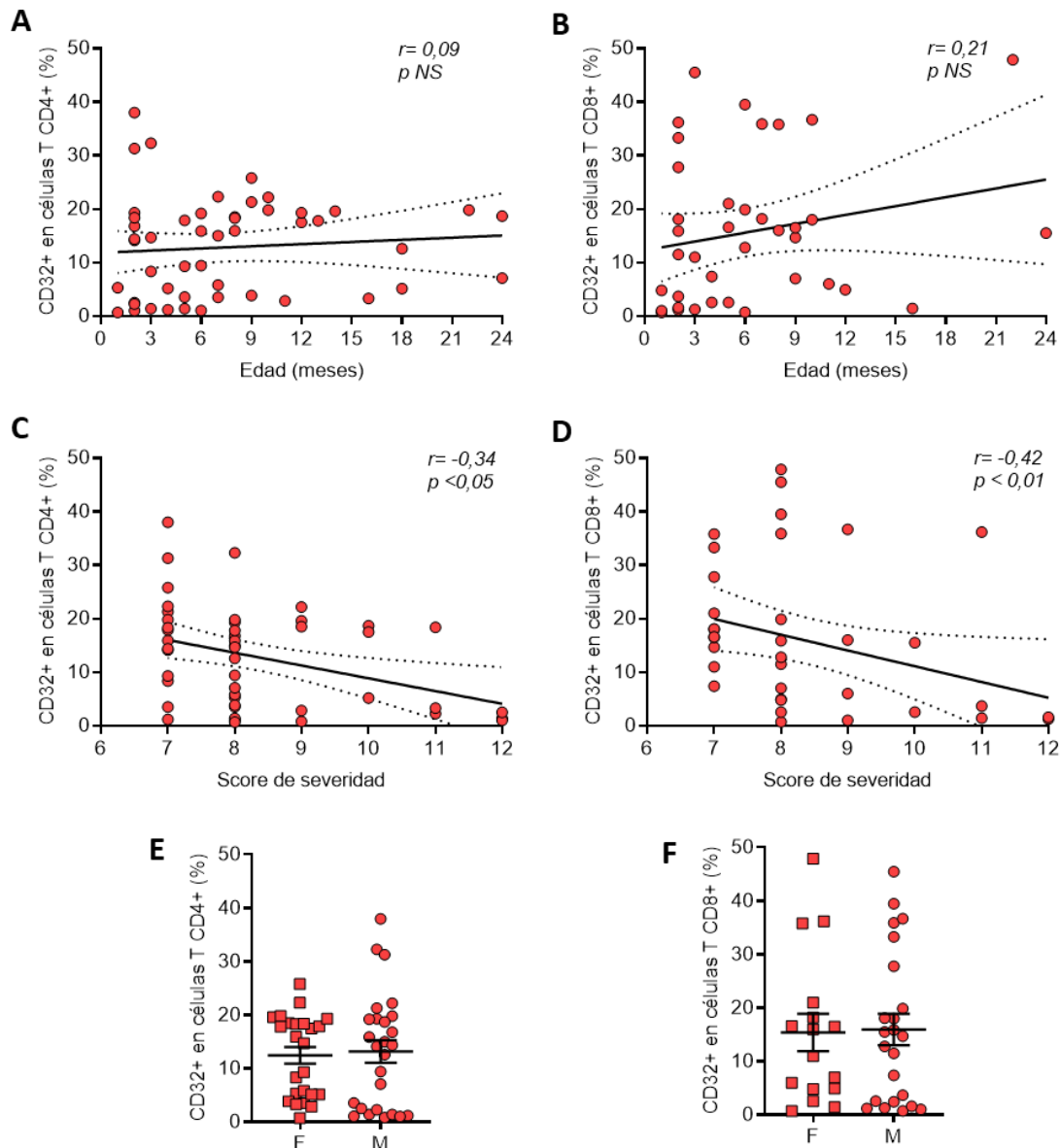


Figura 54. La frecuencia de células T CD4+ y CD8+ que expresan CD32 correlaciona negativamente con el score clínico de severidad de la enfermedad por VSR. (A-D) Correlación entre el porcentaje de células T CD4+ (n=50) y CD8+ (n=39) que expresan CD32 y la edad de los pacientes (A y B) o el score clínico de severidad (C y D) en niños VSR+. **(E-F)** Análisis de la expresión del CD32 en las células T CD4+ (E) y CD8+ (F) de niños VSR+ en función del sexo femenino (F, n=24 para CD4+ y n=16 para CD8+) y masculino (M, n=26 para CD4+ y n=23 para CD8+). Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r) y el p valor en A-D, y la media \pm EEM en E-F. Se empleó el test de Mann-Whitney para los análisis estadísticos en E-F.

5. DISCUSIÓN

Los niños que padecen una inmunodeficiencia relativa al compartimento de células T presentan mayor severidad y mayor título viral durante la infección por VSR, lo que indica que las células T están implicadas en la resolución de la infección [83, 84]. Asimismo, estudios realizados en niños menores de 2 años sugieren que las células T CD8+ participan en la resolución de la infección [196, 197]. Por el contrario, el papel de las células T CD4+ y sus diferentes perfiles funcionales no ha sido convenientemente establecido [86]. En línea con esto, se encuentra reportado que los niños con infección por VSR presentan un desbalance en el compartimento de células T CD4+ [86]. Particularmente, observaciones iniciales de nuestro grupo demostraron que la frecuencia de Tregs circulantes se encuentra disminuida en el transcurso de la infección aguda y severa por VSR en niños menores de 2 años [96]. Estas células juegan un papel crítico en el control de la respuesta anti-infecciosa con el fin de minimizar la inducción de lesiones tisulares [198]. En cuanto a la infección por VSR, análisis realizados en modelos murinos han evidenciado que las Tregs controlan la inflamación pulmonar [93]. Además, la eliminación de esta subpoblación celular ha mostrado exacerbar la respuesta inflamatoria y agravar el curso de la enfermedad [93, 94, 199].

En el presente trabajo nuestro interés se centró en la citocina IL-2, cuyos efectos son mediados a través de la unión al RIL-2 trimérico de alta afinidad, constituido por la cadena α (CD25), las cadenas β y γ . Esta citocina cumple un rol fundamental en el mantenimiento y función de las Tregs, las cuales expresan el complejo RIL-2 de alta afinidad de forma constitutiva [200]. Además, las Tregs no producen IL-2, con lo cual dependen de la secretada por otras células. Diversos estudios han determinado que la ausencia de IL-2 concluye en la pérdida del número y funcionalidad de las Tregs, desregulación del sistema inmune y desarrollo de autoinmunidad [201]. Al respecto, la diabetes tipo 1, la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico se asocian con una afectación en la producción de IL-2 por las células T CD4+ [202-206]. Este defecto parece explicar la disminución de Tregs, favoreciendo la expansión de las células T autorreactivas. Por otro lado, varios trabajos han reportado el rol protagónico de Tregs durante infecciones agudas. Observaciones realizadas en modelos experimentales de infecciones por *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* y virus vaccinia han demostrado que la fase de infección aguda está asociada con una producción limitada de IL-2, lo que resulta en una disminución de la frecuencia de Tregs [112, 207]. Al respecto, nuestro grupo de investigación en el año 2017 observó que la infección *in vitro* por VSR de células T CD4+ -provenientes de niños sanos, adultos y de cordón umbilical- afecta su función celular, provocando una disminución en la secreción de citocinas, entre ellas IL-2 [19]. En la misma línea, Fleming y cols en el 2018 demostraron que la exposición al VSR *in vitro* de células T provenientes de donantes adultos sanos ocasiona una reducción en la producción de IL-2 en comparación con las células que fueron expuestas al virus influenza [113]. Sin embargo, hasta el momento no había sido explorado aún el impacto que

podría tener una desregulación en el sistema IL-2/RIL-2 sobre el desbalance en el compartimento de células T CD4+ en los niños hospitalizados por VSR, en particular la depleción de Tregs. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican, por primera vez, que los niños hospitalizados por infección por VSR presentan una disfunción en la producción de IL-2 por las células T CD4+. Además, observamos que el agregado de IL-2 en forma exógena no pudo restaurar completamente las funciones dependientes de IL-2, como la proliferación de las células T CD4+ y la expansión de Tregs, lo que sugiere la presencia de otros mecanismos que contribuyen a limitar la función de IL-2.

En primer lugar, al analizar la producción intracelular de IL-2 *de novo*, encontramos que las células T CD4+ de los niños hospitalizados por infección por VSR presentan una menor capacidad productora de IL-2 en comparación con los niños sanos. Estos hallazgos fueron confirmados al cuantificar los niveles de IL-2 secretados por PBMCs de niños sanos y con VSR en los sobrenadantes de cultivo. Si bien estos cultivos fueron realizados con PBMCs y no con células T CD4+ purificadas debido a las limitaciones en el tamaño de la muestra, las principales células secretoras de IL-2 son las células T CD4+ activadas [208]. De este modo, la afectación en la producción de IL-2 por las células T CD4+ de los niños con VSR podría explicar, al menos parcialmente, la reducción en la frecuencia de Tregs circulantes y el desbalance en el compartimento de células T CD4+. Finalmente, resta definir si esta afectación se restituye una vez finalizada la etapa aguda de la infección, durante el periodo de convalecencia.

Como se mencionó anteriormente, la IL-2 está implicada en la expansión y supervivencia de las células T activadas, por lo que la afectación en la producción de IL-2 podría estar vinculada a una menor sobrevivencia de estas células. De hecho, está ampliamente reportado que los niños con infección por VSR presentan una linfopenia asociada a una mayor apoptosis de células T CD4+ y CD8+ que correlaciona con la severidad de la enfermedad [209, 210]. En línea con esto, en el estudio realizado por nuestro grupo en el año 2017, observamos que las células T CD4+ expuestas al virus, además de presentar una menor producción de IL-2, también exhiben una mayor susceptibilidad a la apoptosis celular [19]. Además, los menores niveles de IL-2 también pueden afectar la proliferación celular. Al respecto, datos previos indicaron que la proliferación inducida por un mitógeno en células mononucleares de cordón umbilical es inhibida luego del contacto con células infectadas *in vitro* con VSR o que expresen la glicoproteína F en su membrana plasmática [114, 211]. Por otro lado, Fleming y cols observaron que la exposición al VSR *in vitro* resulta en una reducción de la proliferación de células T que no se debió a la apoptosis celular, en comparación con la exposición al virus influenza [113]. En línea con lo reportado, en el presente trabajo observamos que las células T CD4+ de los niños hospitalizados por infección por VSR muestran una menor capacidad proliferativa en comparación con los sanos. Interesantemente, encontramos que la IL-2 exógena logra aumentar la respuesta proliferativa y también la frecuencia de Tregs de los niños con VSR. Sin embargo, el hecho de que el agregado de IL-

2 en forma exógena no sea capaz de restaurar completamente estas funciones dependientes de IL-2, sugiere la presencia de otros mecanismos limitantes de la función de IL-2 en la enfermedad por VSR.

Con el fin de confirmar si las Tregs expandidas *in vitro* por tratamiento con IL-2 a partir de PBMCs de niños con VSR presentaban actividad supresora, analizamos la expresión de CD39. Esta molécula es una ectonucleotidasa presente en la superficie celular de las Tregs cuya función es hidrolizar el ATP proinflamatorio presente en el microambiente a la molécula intermediaria AMP, que luego será hidrolizada a adenosina por CD73, uno de los mecanismos por el cual las Tregs mediarán un efecto supresor en las células T [184, 185]. Nuestros resultados demuestran que la mayoría de las Tregs expandidas *in vitro* en presencia de IL-2 expresan CD39 compatible con un fenotipo supresor, que además fue corroborado mediante la realización de ensayos de supresión usando células T CD8+ (células respondedoras) y células T CD4+ autólogas tratadas previamente con IL-2 (células supresoras). Esto concuerda con estudios previos que señalan que la IL-2 es capaz de inducir la activación y expansión Tregs con capacidad supresora *in vitro* [212]. En conclusión, demostramos que el tratamiento con IL-2 es capaz de inducir y expandir Tregs *ex vivo* con actividad supresora a partir de PBMCs de niños hospitalizados por infección por VSR.

Una posible afectación en la vía de señalización de IL-2 también podría contribuir a la baja frecuencia de Tregs reportada en los niños VSR+. Al respecto, uno de los elementos centrales en la vía de señalización del receptor de IL-2 es la activación del factor de transcripción STAT5 a su forma fosforilada, pSTAT5. La desregulación en la señalización de este factor ha sido reportada en diversas patologías como cáncer y autoinmunidad, donde las Tregs tienen un rol preponderante [213]. En este sentido, pacientes con enfermedades autoinmunes que presentan una deficiencia en STAT5 muestran un menor número de Tregs circulantes [214]. Interesantemente, nuestros resultados sugieren que la vía de señalización de IL-2 se encuentra preservada en los niños VSR+, ya que observamos un patrón similar de pSTAT5 frente al estímulo con distintas dosis de IL-2 en las células T CD4+ tanto de niños sanos como de los niños con VSR. Finalmente, resta determinar la fosforilación de STAT5 en las Tregs, ya que debido a las limitaciones técnicas que impone la marcación de proteínas fosforiladas no fue posible evaluar esto en aquellas células Tregs definidas además por su factor de transcripción FOXP3.

La disponibilidad de IL-2 puede verse limitada no solo por la reducida producción por las células T CD4+, sino también por los altos niveles sistémicos de la forma soluble del CD25 o sCD25. Esta molécula proviene de la escisión por proteasas de la porción extracelular del CD25 presente en la superficie celular [105]. Está descrito que los niveles de sCD25 plasmáticos se encuentran aumentados en diversas patologías y es un marcador de inflamación [215, 216]. Los resultados expuestos en este trabajo demuestran que los niños hospitalizados por VSR presentan significativamente mayores niveles de sCD25 plasmático que los sanos. Esto concuerda con observaciones previas, donde

analizaron este factor soluble en plasma de niños con distintos grados de severidad por infección por VSR [115, 217] y durante el periodo de convalecencia [116]. Por otro lado, la escisión del sCD25 presenta un correlato con la activación de las células T, y no solo involucra a las células T efectoras, sino también a las Tregs [109], ya que ambos tipos celulares pueden liberar la forma soluble del CD25. Si bien las Tregs presentan una alta expresión de CD25, dada la depleción de esta subpoblación en niños con infección por VSR, estas células no serían la principal fuente de sCD25. En relación con este punto, demostramos una elevada expresión de CD25 en células T CD4+ efectoras de los niños infectados por VSR en comparación con una despreciable fracción de células CD8+, células B y monocitos que expresan esta molécula. Existen evidencias *in vitro* que las células T CD4+ producen grandes cantidades de sCD25 tras la estimulación con mitógenos [218, 219]. En línea con esto, encontramos que la activación *in vitro* con PMA e Ionomicina de PBMCs de niños sanos y con VSR aumenta la escisión del CD25, puesto que pudimos detectar mayores niveles de sCD25 en el sobrenadante de cultivo. Sin embargo, no encontramos diferencias estadísticas entre niños sanos y VSR+ en los niveles de sCD25 secretados. Esto podría deberse a que posiblemente sea un mecanismo esperable ante la activación celular.

La consecuencia de la unión de la IL-2 con el sCD25 es aún motivo de controversia. Mientras algunos postulan al sCD25 como un receptor señuelo o secuestrador que inhibe las funciones mediadas por la IL-2 [220], otros proponen una función colaborativa de esta molécula que potencia la actividad biológica de IL-2, al formar un complejo que permite su presentación en *trans* a células que expresan el RIL-2 dimérico de afinidad intermedia [110]. Hasta el momento no se había determinado el significado biológico del sCD25 elevado en plasma de niños con infección por VSR. Llamativamente, nuestras observaciones realizadas a partir de ensayos *in vitro* empleando IL-2 y sCD25 recombinantes indican que el sCD25 inhibe parcialmente dos de las funciones más relevantes de la IL-2: la inducción de la fosforilación de STAT5 y la expresión de FOXP3 en las células T CD4+ de niños con VSR. Además, encontramos una correlación inversa entre el porcentaje de Tregs y los niveles plasmáticos de sCD25 en los niños. De esta manera, planteamos que el sCD25 actúa como receptor señuelo para IL-2 durante la enfermedad severa por VSR, y, por consiguiente, disminuye la biodisponibilidad de esta citocina afectando las funciones celulares relacionadas, como el mantenimiento de Tregs. Asimismo, los ensayos realizados a partir de PBMCs de donadores sanos que fueron cultivados con el plasma de niños sanos y VSR+ guardan relación con esta premisa. En este sentido, al comparar con la condición control y con plasma de niños sanos, el porcentaje de Tregs se ve reducido frente al tratamiento con el plasma de niños con VSR. Además, el agregado de IL-2 no logra revertir este efecto, lo cual podría estar asociado con el hecho de que los altos niveles de sCD25 presente en el plasma de los niños reducen la biodisponibilidad de IL-2 en el entorno y, en consecuencia, el porcentaje de Tregs. Finalmente, la

correlación positiva entre la tasa de decremento de Tregs en presencia del plasma de niños VSR+ y los niveles de sCD25 presentes en el plasma se corresponde con el rol propuesto para este factor soluble durante la infección por VSR. Es importante resaltar que dosis elevadas de sCD25 pueden disminuir pero no bloquear en su totalidad las funciones celulares mediadas por la IL-2, considerando que esta citocina también puede unirse al receptor dimérico de afinidad intermedia, constituido por las cadenas β y γ .

La edad menor de 6 meses representa el principal factor de riesgo de contraer la enfermedad severa por VSR [32]. Todos los pacientes incluidos en este trabajo fueron niños menores de 2 años hospitalizados por enfermedad moderada o severa. Debido a que los niños con enfermedad leve no son hospitalizados según los protocolos de internación vigentes en nuestro país, no nos fue posible contar con muestras de sangre de estos pacientes. Seguidamente, estudiamos si la afectación en la producción de IL-2 por las células T CD4+ o los niveles plasmáticos de sCD25 en la infección por VSR guarda alguna asociación con la edad de los pacientes o la severidad de la enfermedad. Nuestros datos indican que la producción de IL-2 por las células T CD4+ correlaciona negativamente con la severidad de la enfermedad, lo que sugiere que los pacientes con una mayor severidad muestran una mayor afectación en la producción de IL-2. Por otro lado, no encontramos asociación entre la producción de IL-2 por las células T CD4+ y la edad o sexo de los pacientes. En línea con lo reportado por Smyth y cols, donde observaron que los elevados niveles plasmáticos de sCD25 no correlacionan con la severidad de la enfermedad por VSR en niños con cuadros leves, moderados o severos [217], nuestros datos tampoco mostraron relación entre estos dos parámetros. Por el contrario, Alonso Fernández y cols informaron que la cohorte estudiada de niños con VSR con hipoxia y hospitalizados presentó niveles más elevados de sCD25 que aquellos niños sin hipoxia que no fueron hospitalizados [115]. Como mencionamos previamente, todos los pacientes VSR+ incluidos en nuestra cohorte fueron hospitalizados y requirieron oxígeno suplementario, pero no se incluyeron pacientes con cuadros leves lo que podría explicar la ausencia de correlación entre los niveles de sCD25 plasmáticos y la severidad de la infección. Finalmente, detectamos una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de sCD25 y la edad de los pacientes. Con respecto a esto, observaciones realizadas en una cohorte de niños sanos de 0 a 17 años indicaron que los valores de sCD25 plasmáticos disminuyen con la edad, donde los niveles más elevados, aunque variables, se presentan entre 1 y 20 meses de edad [221]. Es importante señalar que nuestras cohortes de niños VSR+ y sanos están pareados por edad y corresponden a niños de \sim 6 meses de edad. Asimismo, se deben tener en cuenta las múltiples variables involucradas en el resultado final o evolución de la enfermedad por VSR.

Dado que se requiere IL-2 para la generación y mantenimiento de las células T de memoria, la afectación en su producción durante la infección por VSR podría contribuir no solo a la explicación de

la disminución de la frecuencia de Tregs circulantes, sino también a la generación de una ineficiente respuesta inmune de memoria. Cabe señalar que durante la infección por VSR se induce una inadecuada respuesta de células T CD8+ de memoria VSR-específicas, que no generan protección suficiente para prevenir reinfecciones [176]. Además, la IL-2 también promueve la diferenciación al perfil Th1 y desfavorece la diferenciación al perfil Th17 [103, 222]. En consecuencia, la menor producción de IL-2 reportada en este trabajo podría explicar además que los niños que padecen una infección severa por VSR presentan una menor respuesta Th1 [98], así como también un mayor recuento de células Th17 en comparación con los que padecen una enfermedad leve [89]. Llamativamente, observaciones realizadas en modelos experimentales de infección por VSR han demostrado que la administración de IL-2 mejora el resultado de la enfermedad en ratones desafiados con VSR. Por un lado, se reportó que la inducción de IL-2 mediante un vector de expresión aumenta el desarrollo de células T CD8+ de memoria y disminuye la pérdida de peso en ratones infectados, lo que sugiere que la IL-2 podría prevenir la patogénesis inducida por el VSR [223]. En concordancia con esto, otro trabajo reportó que la expresión de IL-2 a través de un VSR recombinante atenúa la infección *in vivo* y aumenta la respuesta de células Th1 y Th2. Asimismo, un estudio reciente en modelo murino de infección por VSR indicó que la neutralización de IL-2 en ratones neonatos mejora la respuesta dependiente de Ac, al bloquear la acción de esta citocina sobre las células Tfh [91]. Es importante señalar que en la actualidad diversos ensayos clínicos han comprobado que la administración de bajas dosis de IL-2 resulta eficaz como terapia para la autoinmunidad y el cáncer [224]. En conclusión, el tratamiento con IL-2 podría representar una herramienta terapéutica útil en la infección severa por VSR debido a la capacidad moduladora de esta citocina sobre la plasticidad del compartimento de células T CD4+.

Los niños menores de 6 meses de edad presentan altos niveles de Ac maternos [36, 225]. Sin embargo, a pesar de ello, pueden padecer un cuadro de infección severa [155, 156]. Aunque se ha sugerido que los Ac maternos específicos para el VSR transferidos a los niños presentarían un correlato con una menor severidad de la enfermedad [36], aún queda por determinar el umbral de protección, como también las funciones efectoras medidas por los Ac que podrían ser protectoras o, por el contrario, contribuir a la patología. Al respecto, los Ac IgG pueden modular funciones efectoras celulares o facilitar la infección de la propia célula, a través de la unión de complejos inmunes a receptores para la porción Fc de las IgG presentes en la superficie celular [177, 178]. Por este motivo, en la segunda parte de este trabajo de tesis analizamos si los CI que contienen Ac IgG, a través de la unión a CD32, pueden modular funciones efectoras en las células T y facilitar la infección por VSR de la célula T.

La expresión de CD32 se encuentra caracterizada principalmente en células de la inmunidad innata y células B. Sin embargo, en los últimos años su expresión en las células T ha sido estudiada y reportada

por numerosos trabajos [120, 121, 126, 128, 141], aunque continúa siendo cuestionada por diversos autores [130, 133, 142, 178]. Hasta el momento aún no había sido explorado la expresión ni el rol de CD32 en las células T durante la infección por VSR. Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que un alto porcentaje de células T CD4+ y CD8+ expresa CD32 en los niños hospitalizados con infección por VSR en comparación con los niños sanos. En contraposición con lo descrito en las células B que solo expresan la isoforma inhibidora del CD32, el análisis de del ARNm de las isoformas del CD32 en las células T CD4+ y CD8+ purificadas reveló la presencia de las isoformas CD32a activadora y CD32b inhibidora en ambas subpoblaciones, con un significativo predominio del CD32a, tanto en los niños con VSR como en los sanos.

Los estudios que confirman la expresión del CD32 en células T indican que una pequeña fracción de células T CD4+ y CD8+ en reposo presentan CD32 en su superficie [120, 126, 128, 141]. Asimismo, observaron que este receptor se encuentra almacenado internamente en forma de un *pool* citoplasmático hasta en un 80 % de las células T, que luego de la activación celular *in vitro* es expresado en la superficie [126, 138]. En relación con la expresión de otros RFcy en células T, se ha descrito que una baja fracción de células T CD4+ y CD8+ de adultos expresa en su superficie el RFcy de baja afinidad de tipo III, CD16 [127, 226, 227]. En línea con estos trabajos, el análisis de PBMCs de niños sanos y con VSR confirmó la presencia de CD16 en las células T CD4+ y CD8+, aunque en una muy baja frecuencia. En cuanto a las isoformas del CD32, y en concordancia con lo reportado por Holgado y cols [120], el predominio de la isoforma activadora CD32a sobre la inhibidora CD32b hallado en este trabajo sugiere un rol activador de este receptor en las células T CD4 y CD8+ de los niños VSR+ y sanos. Con respecto a la expresión de CD32 durante infecciones, son realmente escasos los trabajos en el área. Hasta el momento, se ha estudiado la relevancia de la expresión del CD32 en las células T CD4+ en pacientes que conviven con VIH. En línea con esto, un estudio indicó que los pacientes con viremia detectable presentan una mayor frecuencia de células T CD4+ CD32+ circulantes [137]. Asimismo, se ha señalado que este receptor podría ser marcador de células latentemente infectadas [121, 125, 141]. Recientemente, en un modelo de primates no humanos se ha demostrado la acumulación de células T CD4+ CD32+ en tejidos con replicación viral activa [123]. Por otro lado, un modelo murino de infección por *Listeria monocytogenes* ha mostrado que las células T CD8+ de memoria antígeno-específicas aumentan la expresión de CD32b [228]. En función de lo anterior, la expresión y el balance entre las isoformas CD32a y CD32b podría depender del estímulo inducido durante cada infección, sin embargo, los mecanismos involucrados no se encuentran dilucidados. Finalmente, sería interesante determinar si la expresión del CD32 en las células T circulantes de los niños con VSR se asocia con la infección viral de estas células.

La mayoría de las células T de los niños menores de 2 años son *naïve*, las cuales luego de su activación, proliferan y se diferencian en células T efectoras y de memoria. Se ha descrito que el CD32 se expresa principalmente en células T activadas [120, 126, 137], y que estaría fuertemente asociado a marcadores de activación celular como HLA-DR y/o CD69 [124]. Similarmente, un estudio en donde se analizó la expresión de CD32 en pacientes que conviven con VIH, determinó que la mayoría de las células T CD4+ CD32+ expresan marcadores de activación clásicos, como CD25, HLA-DR, CD38 y Ki-67 [121]. En línea con esto, las células T CD32+ de los niños hospitalizados por VSR exhibieron un fenotipo de activación en contraste con su contraparte de células T CD32-, según el análisis de marcadores de activación CD25 y HLA-DR. También presentaron mayor expresión del receptor inhibitorio PD-1 asociado a un fenotipo de células exhaustas [192], en concordancia con lo reportado [120, 141]. De esta manera, demostramos que en la infección por VSR, las células T que expresan CD32 estarían vinculadas con un estado de activación del sistema inmune.

Al profundizar en el análisis del fenotipo de las células T CD32+, encontramos que este compartimento presenta una mayor frecuencia de células de memoria T_{MT} , T_{ME} y T_{EMRA} y una menor frecuencia de células T *naïve*, particularmente en las células T CD8+. Esto indica que las células T CD32+ presentan un fenotipo de mayor activación y diferenciación celular en comparación con las células T CD32-, en línea con lo reportado [137, 141]. En base a estos resultados, dado que en la infección por VSR no se genera una eficiente respuesta de células T CD8+ de memoria [101], sería interesante determinar la especificidad antigénica de estas células y considerar la estimulación de la molécula CD32 como una posibilidad para potenciar la respuesta de memoria, y así prevenir reinfecciones.

A diferencia de lo hallado en un estudio donde observaron que las células T CD4+ CD32+ de sangre periférica de pacientes que conviven con VIH se asocian a un fenotipo Th2 y Th17 [121], las células T CD4+ CD32+ de memoria de los niños VSR+ están enriquecidas en células correspondientes a los perfiles Th1, Tfh y Treg, fenotipos asociados a una respuesta antiviral efectiva, a la inducción de la respuesta de células B de memoria y a la limitación de la inmunopatología respectivamente. Dada la presunta afectación en las células Tfh reportada durante la infección por VSR en modelo murino [90, 91], se podría proponer al CD32 como potencial blanco para inducir una mejor respuesta de células Tfh, y, en consecuencia, una más efectiva producción de Ac con capacidad neutralizante. En conclusión, el enriquecimiento de perfiles de células T CD4+ que se encuentran disminuidos durante esta infección, como Tregs, Th1 y Tfh [90, 175, 229], podría sugerir que el compartimento de células T CD32+ estaría asociado a una respuesta inmune antiviral e inmunorreguladora.

Desde el punto de vista funcional, observamos que definitivamente las células T de los niños VSR+ pueden unir a su ligando, al utilizar IgGa como modelo de CI. A pesar de que la capacidad de unir CI por parte de las células T CD4+ y CD8+ observada en los niños VSR+ fue relativamente baja,

particularmente en las células T CD4+, pudimos demostrar la especificidad de esta unión mediante el uso de un Ac bloqueante del CD32 que logró inhibirla parcialmente. Es importante destacar que el nivel de expresión del CD32 en la superficie celular de las células T CD4+ y CD8+ es mucho menor en comparación con otros tipos celulares, como monocitos [120]. Además, debemos señalar la gran variabilidad observada en la expresión de CD32 a nivel de las células T entre los pacientes con VSR, lo que podría explicar en parte estos hallazgos. No obstante, no fue posible analizar la frecuencia de células T CD32+ en estos pacientes debido a que el tamaño de la muestra no permitió realizar ambos ensayos en forma paralela. Finalmente, resta determinar la capacidad de las células T de los niños con VSR de unir CI formados por la proteína viral a través del CD32 y establecer la relevancia *in vivo*.

Los Ac pueden mediar otras funciones efectoras además de la neutralización de la partícula viral. Durante la infección por VSR, se encuentran caracterizadas algunas funciones efectoras mediadas por Ac en células de la inmunidad innata [134]. Los niños menores de 6 meses, quienes forman parte del grupo con mayor riesgo de contraer la enfermedad severa por VSR, presentan elevados niveles de Ac IgG maternos [156] que pueden formar CI. Al respecto, hay evidencias que indican que estos Ac preexistentes interfieren con la generación de la respuesta inmune humoral, a través de la interacción de los CI con el CD32b inhibitorio presente en las células B [230]. Los resultados expuestos en el presente trabajo demuestran, por primera vez, que la estimulación y entrecruzamiento del CD32 expresado en las células T CD4+ de niños VSR+ genera un aumento en la secreción de un amplio patrón de citocinas. Entre los mediadores cuyos niveles aumentan frente al estímulo del CD32, se encuentran IL-2, IFN- γ y TNF- α correspondientes al perfil Th1, IL-4 correspondiente al perfil Th2, e IL-10, citocina inmunosupresora secretada por las Tregs. Esto se condice, al menos parcialmente, con la preponderancia de los perfiles efectoras Th1 y Tregs dentro de las células T_M CD4+ CD32+ observado en los resultados previos. Además, hubo una disminución en la secreción de IL-17A ante el estímulo del CD32. Estas observaciones toman particular relevancia ya que, a través del estímulo de este receptor en las células T CD4+, se inducen citocinas relacionadas a la respuesta antiviral Th1 -las cuales se encuentran disminuidas durante la infección por VSR [229]- y disminuye la secreción de IL-17A -cuyos niveles están elevados en esta enfermedad [89, 231]-, aunque también aumentan citocinas correspondientes al perfil Th2. Es importante señalar el incremento en la secreción de IL-2, debido a que, como se describió en la primera parte de este trabajo, la producción de IL-2 por células T CD4+ se encuentra afectada durante la infección por VSR. Por lo tanto, la ligación del CD32 en estas células podría implicar una estrategia interesante para revertir esta afectación. Diversos trabajos propusieron a los RFcy como moléculas co-estimuladoras de la activación de las células T [120, 226, 232]. Uno de ellos ha sugerido que las células T CD4+ efectoras pueden activarse a través de un complejo de señalización TCR-CD3 alternativo, en donde el CD32 reemplaza a una de las cadenas del CD3 y ayudaría a mantener estable el complejo para una óptima activación celular [232]. En un segundo estudio, se

ha reportado que los CI aislados de pacientes con lupus eritematoso sistémico interactúan con el CD16 presente en células T CD4+ e inducen la señalización a través del complejo TCR-CD3 [226]. En resumen, los datos expuestos en el presente trabajo sugieren que la activación del CD32 provee una señal co-estimuladora a las células T de niños VSR+ y, por consiguiente, los CI circulantes podrían contribuir a la activación y modulación de estas a través del CD32, promoviendo la diferenciación celular a perfiles efectoros [120, 127].

Interesantemente, la estimulación del CD32 en las células T CD8+ de los niños VSR+ aumentó su actividad citotóxica medida como la degranulación celular, en un contexto donde la actividad efectora de células T CD8+ antígeno-específicas se encuentra suprimida por la infección [97]. En conclusión, es necesario continuar investigando en este campo para definir un rol co-estimulador del CD32 y considerar la modulación de la respuesta de las células T por los CI circulantes, tanto en esta patología como en otras enfermedades.

Los Ac en concentraciones subneutralizantes pueden facilitar la infección a través de la unión a RFcy de los CI que contienen la partícula viral, mediante el mecanismo de ADE. En este sentido, la potenciación de la infección por VSR mediada por Ac ha sido demostrada *in vitro* en monocitos y células NK a partir de Ac maternos y plasma que contiene Ac contra el virus [152, 170, 171]. Previamente demostramos que las células T CD4+ y CD8+ son permisivas a la infección por VSR [19]. Considerando el alto porcentaje de estas células que expresan CD32, nos preguntamos si la presencia de este receptor podría facilitar la infección de las propias células T. Al respecto, no observamos diferencias entre el porcentaje de infección obtenido a partir de la infección con VSR solo o con el VSR acompañado con Ac en dosis subneutralizante (CI-VSR). Es importante destacar la variabilidad observada entre los pacientes en su porcentaje de infección, entre los cuales dos de ellos mostraron un pequeño aumento en la infección en presencia de CI-VSR. Por esta razón, hubiera sido interesante analizar la expresión del CD32 de superficie en las células T utilizadas en estos ensayos, para determinar si esta variación se debió principalmente al porcentaje de células T CD32+. Lamentablemente, no pudimos realizar este análisis debido a la incompatibilidad técnica de los Ac usados y el tamaño de la muestra. Es importante destacar que hasta el momento no hay ningún trabajo que haya reportado ADE en células T, debido a las contradicciones respecto a la expresión de RFcy en estas células. Por este motivo, resta definir si ocurre ADE durante infecciones virales que tienen como blanco a las células T. En este sentido, sería interesante investigar si ocurre ADE de VIH en células T CD4+, que son blanco del virus y en las cuales la expresión del CD32 fue caracterizada en numerosos trabajos [121, 124, 125, 137, 141]. En conclusión, el hecho de que la expresión de CD32 en las células T no contribuye al mecanismo de ADE de la infección por VSR, pero sí promueve la activación y función de las células T a través de la unión a los CI, debe ser tomado en cuenta en las investigaciones concernientes al desarrollo de vacunas.

Como se mencionó previamente, la edad menor a 6 meses es el factor de riesgo más importante de contraer enfermedad severa por VSR. En este caso, no encontramos una asociación entre el porcentaje de células T CD32+ y la edad de los pacientes. Tampoco observamos una asociación con la expresión de CD32 cuando los pacientes fueron segregados según el sexo. Sin embargo, encontramos que el mayor porcentaje de células T CD4+ y CD8+ que expresan CD32, relacionado con una mayor respuesta efectora, se asocia con una menor gravedad de la enfermedad. De esta forma, el CD32 podría ser potencialmente utilizado como marcador de severidad de la enfermedad y podría confirmar un rol beneficioso cuando las células T son estimuladas a través de este.

El papel protector de los Ac específicos para el VSR se evidencia con el uso del *Palivizumab*. Este es un Ac monoclonal IgG1 neutralizante profiláctico que reduce la tasa de hospitalización en grupos de riesgo e infantes prematuros [38, 233], y pertenece al grupo de Ac monoclonales terapéuticos que median una baja función efectora a través de su porción Fc [234]. Sin embargo, un estudio realizado en modelo murino demostró que el *Palivizumab* es capaz de unirse a los RFcy, incluido al CD32 [235]. Además, estos autores observaron que una modificación en la glicosilación de su porción Fc aumenta la unión a los RFcy y reduce el título viral en pulmón en comparación con el compuesto original, sin afectar la capacidad neutralizante [235]. Estos datos en su conjunto sugieren que la protección *in vivo* del *Palivizumab* también depende las funciones efectoras mediadas por la porción Fc, no solo de su capacidad neutralizante. En conclusión, tanto los candidatos vacunales como los Ac monoclonales profilácticos en desarrollo deberían considerar las características de la porción Fc que impactan en la afinidad de los Ac a los RFcy y las funciones efectoras asociadas, con el fin de generar una adecuada respuesta inmune de células T a través de la unión al CD32.

6. CONCLUSIONES

Este trabajo pretendió aportar en la comprensión de las características del compartimento de células T en etapas tempranas de la vida, y en particular, las consecuencias funcionales que impone la infección por VSR sobre las mismas en niños hospitalizados menores de 2 años.

Esta tesis exploró aspectos novedosos y de suma relevancia:

- 1) la funcionalidad de la vía de señalización de IL-2, las consecuencias derivadas de su afectación y su asociación con la severidad de la infección por VSR,
- 2) la capacidad de los complejos inmune que contienen IgG de modular el compartimento de células T, en particular sus funciones efectoras, y su asociación con la severidad de la infección por VSR.

En este trabajo describimos por primera vez que los niños hospitalizados por infección por VSR presentan una afectación en la producción de IL-2 por las células T CD4+, la cual se asocia con la severidad de la enfermedad. Además, la biodisponibilidad de esta citocina se encuentra disminuida debida a las altas concentraciones plasmáticas del factor soluble CD25. Ambos factores impactan en la función del compartimento de células T CD4+, particularmente en su capacidad proliferativa y en la inducción de Tregs. De esta manera, el tratamiento con IL-2 podría ser considerado como estrategia terapéutica durante las formas severas de la infección por VSR. Esto podría permitir reestablecer el balance en el compartimento de células T, promoviendo la generación de una respuesta inmune protectora y de memoria. Aún resta por determinar los mecanismos involucrados en la deficiencia observada a nivel de la producción de IL-2 y si esta afectación se restaura una vez resuelta la infección.

Además, nuestros resultados demuestran por primera vez que las células T que expresan CD32, cuya frecuencia se encuentra elevada en sangre periférica de los niños con VSR, exhiben una firma fenotípica y funcional distintiva, que les permite a través de la unión de IgG, ejercer funciones efectoras. Por otro lado, estos hallazgos sugieren que los CI podrían contribuir a la potenciación de la respuesta inmune en virtud de su capacidad para interactuar directamente con las células T CD4+ a través del CD32a, el cual provee una señal co-estimuladora y promueve la activación de estas células en diferentes perfiles efectoras. Además, el hecho de que la frecuencia de células T que expresa CD32 correlacione negativamente con la severidad de la enfermedad, podría proponer al CD32 como un potencial marcador de la gravedad de la enfermedad clínica. En este contexto, es relevante la profundización en este campo, considerando la modulación de la respuesta de las células T por los CI circulantes, tanto en esta patología como en otras enfermedades. Finalmente, las estrategias terapéuticas como por ejemplo la vacunación, deben tener en cuenta esta nueva subpoblación de células T CD32+ efectoras.

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se propone el siguiente modelo (Fig. 55):

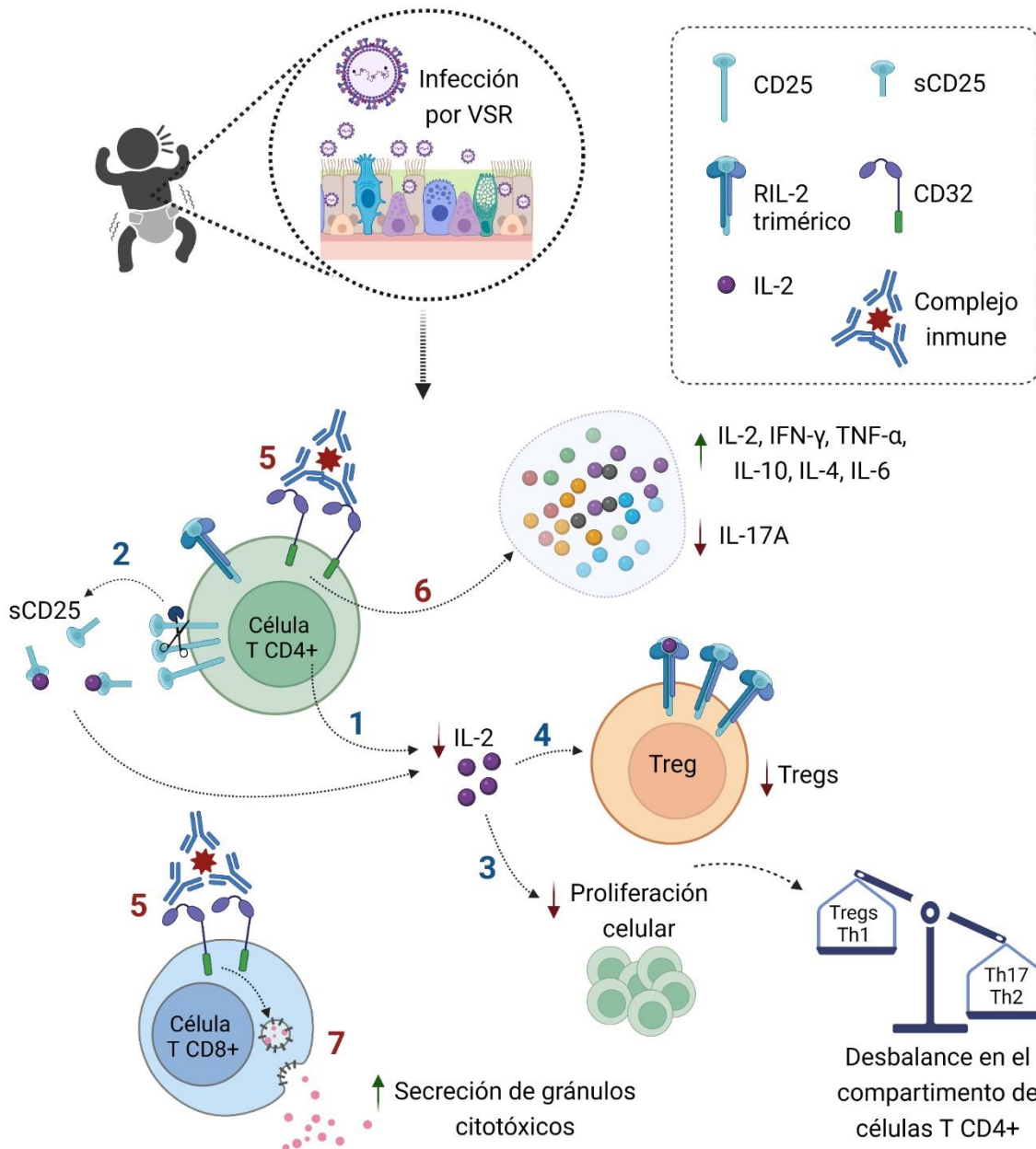


Figura 55. Modelo propuesto acerca de las consecuencias funcionales de la infección por VSR en el compartimento de las células T CD4 y T CD8+ de los niños. Los niños hospitalizados por infección por VSR presentan una afectación en la producción de IL-2 por las células T CD4+ (1). A su vez, los elevados niveles plasmáticos de sCD25 limitan aún más la biodisponibilidad de la IL-2 (2). Como consecuencia de esto, disminuye la proliferación de las células T CD4+ (3) y se genera un desbalance en el compartimento de células T CD4+, particularmente una disminución de la frecuencia de Tregs circulantes (4). Por otro lado, durante la infección se generan complejos inmunes formados por antígenos virales y anticuerpos IgG. Además, estos pacientes presentan una elevada frecuencia de células T CD4+ y CD8+ que expresan CD32. La estimulación de las células T a través del CD32 por los complejos inmunes (5) resulta en la activación celular e inducción de funciones efectoras. En las células T CD4+ se promueve la secreción de un amplio patrón de citocinas (6). Por otro lado, las células T CD8+ incrementan su actividad citotóxica medida como la degranulación celular frente al estímulo del CD32 (7). Figura creada con Biorender.com.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ke, Z., et al., *The Morphology and Assembly of Respiratory Syncytial Virus Revealed by Cryo-Electron Tomography*. *Viruses*, 2018. **10**(8).
2. Collins, P.L., R. Fearn, and B.S. Graham, *Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013. **372**: p. 3-38.
3. Groskreutz, D.J., et al., *Respiratory syncytial virus limits alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2alpha) phosphorylation to maintain translation and viral replication*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(31): p. 24023-31.
4. Tripp, R.A., et al., *CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(8): p. 732-8.
5. Wertz, G.W., et al., *Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(12): p. 4075-9.
6. McLellan, J.S., et al., *Structure of respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in the postfusion conformation reveals preservation of neutralizing epitopes*. *J Virol*, 2011. **85**(15): p. 7788-96.
7. Shang, Z., S. Tan, and D. Ma, *Respiratory syncytial virus: from pathogenesis to potential therapeutic strategies*. *Int J Biol Sci*, 2021. **17**(14): p. 4073-4091.
8. Ghildyal, R., A. Ho, and D.A. Jans, *Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection*. *FEMS Microbiol Rev*, 2006. **30**(5): p. 692-705.
9. Chatterjee, S., et al., *Structural basis for human respiratory syncytial virus NS1-mediated modulation of host responses*. *Nat Microbiol*, 2017. **2**: p. 17101.
10. Pandya, M.C., et al., *A Contemporary View of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Biology and Strain-Specific Differences*. *Pathogens*, 2019. **8**(2).
11. San-Juan-Vergara, H., et al., *Cholesterol-rich microdomains as docking platforms for respiratory syncytial virus in normal human bronchial epithelial cells*. *J Virol*, 2012. **86**(3): p. 1832-43.
12. Johnson, S.M., et al., *Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(12): p. e1005318.
13. Griffiths, C.D., et al., *IGF1R is an entry receptor for respiratory syncytial virus*. *Nature*, 2020. **583**(7817): p. 615-619.
14. Kolokoltsov, A.A., et al., *Small interfering RNA profiling reveals key role of clathrin-mediated endocytosis and early endosome formation for infection by respiratory syncytial virus*. *J Virol*, 2007. **81**(14): p. 7786-800.
15. Chanock, R., B. Roizman, and R. Myers, *Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization*. *Am J Hyg*, 1957. **66**(3): p. 281-90.
16. Zhivaki, D., et al., *Respiratory Syncytial Virus Infects Regulatory B Cells in Human Neonates via Chemokine Receptor CX3CR1 and Promotes Lung Disease Severity*. *Immunity*, 2017. **46**(2): p. 301-314.
17. Panuska, J.R., et al., *Productive infection of isolated human alveolar macrophages by respiratory syncytial virus*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(1): p. 113-9.
18. de Graaff, P.M., et al., *Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells*. *J Immunol*, 2005. **175**(9): p. 5904-11.
19. Raiden, S., et al., *Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infects CD4+ T Cells: Frequency of Circulating CD4+ RSV+ T Cells as a Marker of Disease Severity in Young Children*. *J Infect Dis*, 2017. **215**(7): p. 1049-1058.
20. Shi, T., et al., *Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study*. *Lancet*, 2017. **390**(10098): p. 946-958.
21. Geoghegan, S., et al., *Mortality due to Respiratory Syncytial Virus. Burden and Risk Factors*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017. **195**(1): p. 96-103.

22. Scheltema, N.M., et al., *Global respiratory syncytial virus-associated mortality in young children (RSV GOLD): a retrospective case series*. Lancet Glob Health, 2017. **5**(10): p. e984-e991.
23. Lozano, R., et al., *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2095-128.
24. Ferolla, F.M., et al., *Clinical and epidemiological impact of respiratory syncytial virus and identification of risk factors for severe disease in children hospitalized due to acute respiratory tract infection*. Arch Argent Pediatr, 2019. **117**(4): p. 216-223.
25. Gentile, A., et al., *Burden of Respiratory Syncytial Virus Disease and Mortality Risk Factors in Argentina: 18 Years of Active Surveillance in a Children's Hospital*. Pediatr Infect Dis J, 2019. **38**(6): p. 589-594.
26. Misirlilian, A., et al, *Epidemiología de las Infecciones Respiratorias Agudas Bajas. Hospital General de Niños "Dr. Pedro de Elizalde" 2008*. Revista Pediátrica "Pedro de Elizalde", 2010. **1**: p. 77-82.
27. Glezen, W.P., et al., *Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus*. Am J Dis Child, 1986. **140**(6): p. 543-6.
28. Raita, Y., et al., *Integrated omics endotyping of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis and risk of childhood asthma*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 3601.
29. Sigurs, N., et al., *Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1501-7.
30. Dolores, A., et al., *RSV reemergence in Argentina since the SARS-CoV-2 pandemic*. J Clin Virol, 2022. **149**: p. 105126.
31. Hall, C.B., et al., *Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among children less than 24 months of age*. Pediatrics, 2013. **132**(2): p. e341-8.
32. Simoes, E.A., *Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease*. J Pediatr, 2003. **143**(5 Suppl): p. S118-26.
33. Hall, C.B., et al., *The burden of respiratory syncytial virus infection in young children*. N Engl J Med, 2009. **360**(6): p. 588-98.
34. Sande, C.J., P.A. Cane, and D.J. Nokes, *The association between age and the development of respiratory syncytial virus neutralising antibody responses following natural infection in infants*. Vaccine, 2014. **32**(37): p. 4726-9.
35. Koivisto, K., et al., *Respiratory Syncytial Virus (RSV)-Specific Antibodies in Pregnant Women and Subsequent Risk of RSV Hospitalization in Young Infants*. J Infect Dis, 2022. **225**(7): p. 1189-1196.
36. Capella, C., et al., *Pre-fusion F, Postfusion F, G Antibodies, and Disease Severity in Infants and Young Children With Acute Respiratory Syncytial Virus Infection*. J Infect Dis, 2017. **216**(11): p. 1398-1406.
37. Tahamtan, A., et al., *Respiratory syncytial virus infection: why does disease severity vary among individuals?* Expert Rev Respir Med, 2020. **14**(4): p. 415-423.
38. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious, D. and C. American Academy of Pediatrics Bronchiolitis Guidelines, *Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection*. Pediatrics, 2014. **134**(2): p. e620-38.
39. Kapikian, A.Z., et al., *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, 1969. **89**(4): p. 405-21.
40. Killikelly, A.M., M. Kanekiyo, and B.S. Graham, *Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34108.
41. Habibi, M.S., et al., *Impaired Antibody-mediated Protection and Defective IgA B-Cell Memory in Experimental Infection of Adults with Respiratory Syncytial Virus*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **191**(9): p. 1040-9.

42. Mazur, N.I., et al., *Respiratory syncytial virus prevention within reach: the vaccine and monoclonal antibody landscape*. Lancet Infect Dis, 2022.
43. Mosscrop, L.G., T.C. Williams, and J.S. Tregoning, *Respiratory syncytial virus after the SARS-CoV-2 pandemic - what next?* Nat Rev Immunol, 2022.
44. Fainboim, L., Geffner, J., *Introducción a la Inmunología Humana*. 6ª ed, ed. Panamericana. 2011.
45. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
46. Trowbridge, I.S. and M.L. Thomas, *CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 85-116.
47. Crespo, J., et al., *Human Naive T Cells Express Functional CXCL8 and Promote Tumorigenesis*. J Immunol, 2018. **201**(2): p. 814-820.
48. Seder, R.A. and W.E. Paul, *Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 635-73.
49. Minami, Y., et al., *The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 245-68.
50. Kumar, B.V., T.J. Connors, and D.L. Farber, *Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life*. Immunity, 2018. **48**(2): p. 202-213.
51. Thome, J.J., et al., *Early-life compartmentalization of human T cell differentiation and regulatory function in mucosal and lymphoid tissues*. Nat Med, 2016. **22**(1): p. 72-7.
52. Farber, D.L., N.A. Yudanin, and N.P. Restifo, *Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(1): p. 24-35.
53. van den Broek, T., J.A.M. Borghans, and F. van Wijk, *The full spectrum of human naive T cells*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(6): p. 363-373.
54. Christensen, K.L., et al., *Infectious disease hospitalizations in the United States*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(7): p. 1025-35.
55. Saravia, J., N.M. Chapman, and H. Chi, *Helper T cell differentiation*. Cell Mol Immunol, 2019. **16**(7): p. 634-643.
56. Luckheeram, R.V., et al., *CD4(+)T cells: differentiation and functions*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 925135.
57. Taniuchi, I., *CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation*. Annu Rev Immunol, 2018. **36**: p. 579-601.
58. Sallusto, F., *Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes*. Annu Rev Immunol, 2016. **34**: p. 317-34.
59. Dardalhon, V., et al., *Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity*. J Autoimmun, 2008. **31**(3): p. 252-6.
60. Crotty, S., *T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases*. Immunity, 2019. **50**(5): p. 1132-1148.
61. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T Cells and Human Disease*. Annu Rev Immunol, 2020. **38**: p. 541-566.
62. Shevlyrev, D. and V. Tereshchenko, *Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis*. 2020. **10**.
63. Tanaka, A. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in cancer immunotherapy*. Cell Res, 2017. **27**(1): p. 109-118.
64. Cottrez, F. and H. Groux, *Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells*. Transplantation, 2004. **77**(1 Suppl): p. S12-5.
65. Adkins, B., C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke, *Neonatal adaptive immunity comes of age*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 553-64.
66. PrabhuDas, M., et al., *Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 189-94.
67. Gibbons, D., et al., *Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants*. Nat Med, 2014. **20**(10): p. 1206-10.

68. Huenecke, S., et al., *Percentiles of Lymphocyte Subsets in Preterm Infants According to Gestational Age Compared to Children and Adolescents*. Scand J Immunol, 2016. **84**(5): p. 291-298.
69. Restori, K.H., et al., *Neonatal Immunity, Respiratory Virus Infections, and the Development of Asthma*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1249.
70. Eddens, T., O.B. Parks, and J.V. Williams, *Neonatal Immune Responses to Respiratory Viruses*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 863149.
71. Dowling, D.J. and O. Levy, *Ontogeny of early life immunity*. Trends Immunol, 2014. **35**(7): p. 299-310.
72. Schmidt, M.E. and S.M. Varga, *The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 678.
73. Zhang, N. and M.J. Bevan, *CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system*. Immunity, 2011. **35**(2): p. 161-8.
74. Verdon, D.J., M. Mulazzani, and M.R. Jenkins, *Cellular and Molecular Mechanisms of CD8(+) T Cell Differentiation, Dysfunction and Exhaustion*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(19).
75. Galindo-Albarran, A.O., et al., *CD8(+) T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response*. Cell Rep, 2016. **17**(8): p. 2151-2160.
76. Saghafian-Hedengren, S., E. Sverremark-Ekstrom, and A. Nilsson, *T Cell Subsets During Early Life and Their Implication in the Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 582539.
77. Mahnke, Y.D., et al., *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets*. Eur J Immunol, 2013. **43**(11): p. 2797-809.
78. Camerini, D., et al., *The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family*. J Immunol, 1991. **147**(9): p. 3165-9.
79. Larbi, A. and T. Fulop, *From "truly naive" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality*. Cytometry A, 2014. **85**(1): p. 25-35.
80. Levy, O., S. Goriely, and T.R. Kollmann, *Immune response to vaccine adjuvants during the first year of life*. Vaccine, 2013. **31**(21): p. 2500-5.
81. Connors, T.J., et al., *Developmental Regulation of Effector and Resident Memory T Cell Generation during Pediatric Viral Respiratory Tract Infection*. J Immunol, 2018. **201**(2): p. 432-439.
82. Openshaw, P.J. and C. Chiu, *Protective and dysregulated T cell immunity in RSV infection*. Curr Opin Virol, 2013. **3**(4): p. 468-74.
83. Hall, C.B., et al., *Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function*. N Engl J Med, 1986. **315**(2): p. 77-81.
84. Fishaut, M., D. Tubergen, and K. McIntosh, *Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity*. J Pediatr, 1980. **96**(2): p. 179-86.
85. Mejias, A., et al., *Whole blood gene expression profiles to assess pathogenesis and disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection*. PLoS Med, 2013. **10**(11): p. e1001549.
86. Christiaansen, A.F., et al., *The CD4 T cell response to respiratory syncytial virus infection*. Immunol Res, 2014. **59**(1-3): p. 109-17.
87. Legg, J.P., et al., *Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(6): p. 633-9.
88. Stoppelenburg, A.J., et al., *Local IL-17A potentiates early neutrophil recruitment to the respiratory tract during severe RSV infection*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e78461.
89. Stoppelenburg, A.J., et al., *Elevated Th17 response in infants undergoing respiratory viral infection*. Am J Pathol, 2014. **184**(5): p. 1274-9.
90. Gassen, R.B., et al., *IL-21 treatment recovers follicular helper T cells and neutralizing antibody production in respiratory syncytial virus infection*. Immunol Cell Biol, 2021. **99**(3): p. 309-322.

91. Pyle, C.J., et al., *Enhanced IL-2 in early life limits the development of TFH and protective antiviral immunity*. J Exp Med, 2021. **218**(12).
92. Belkaid, Y., *Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(11): p. 875-88.
93. Loebbermann, J., et al., *Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection*. Mucosal Immunol, 2012. **5**(2): p. 161-72.
94. Lee, D.C., et al., *CD25+ natural regulatory T cells are critical in limiting innate and adaptive immunity and resolving disease following respiratory syncytial virus infection*. J Virol, 2010. **84**(17): p. 8790-8.
95. Loebbermann, J., et al., *Defective immunoregulation in RSV vaccine-augmented viral lung disease restored by selective chemoattraction of regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(8): p. 2987-92.
96. Raiden, S., et al., *Depletion of circulating regulatory T cells during severe respiratory syncytial virus infection in young children*. Am J Respir Crit Care Med, 2014. **189**(7): p. 865-8.
97. Chang, J. and T.J. Braciale, *Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+ T-cell effector activity and peripheral CD8+ T-cell memory in the respiratory tract*. Nat Med, 2002. **8**(1): p. 54-60.
98. Thwaites, R.S., et al., *Reduced Nasal Viral Load and IFN Responses in Infants with Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis and Respiratory Failure*. Am J Respir Crit Care Med, 2018. **198**(8): p. 1074-1084.
99. Ostler, T., W. Davidson, and S. Ehl, *Virus clearance and immunopathology by CD8(+) T cells during infection with respiratory syncytial virus are mediated by IFN-gamma*. Eur J Immunol, 2002. **32**(8): p. 2117-23.
100. Jozwik, A., et al., *RSV-specific airway resident memory CD8+ T cells and differential disease severity after experimental human infection*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 10224.
101. Bont, L., et al., *Natural reinfection with respiratory syncytial virus does not boost virus-specific T-cell immunity*. Pediatr Res, 2002. **52**(3): p. 363-7.
102. Boyman, O. and J. Sprent, *The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 180-90.
103. Liao, W., et al., *Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 551-9.
104. Gotthardt, D., et al., *JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2590.
105. Damoiseaux, J., *The IL-2 - IL-2 receptor pathway in health and disease: The role of the soluble IL-2 receptor*. Clin Immunol, 2020. **218**: p. 108515.
106. Rubin, L.A. and D.L. Nelson, *The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application*. Ann Intern Med, 1990. **113**(8): p. 619-27.
107. Schimmelpennink, M.C., et al., *Value of serum soluble interleukin-2 receptor as a diagnostic and predictive biomarker in sarcoidosis*. Expert Rev Respir Med, 2020. **14**(7): p. 749-756.
108. Cabrera, R., et al., *Hepatocellular carcinoma immunopathogenesis: clinical evidence for global T cell defects and an immunomodulatory role for soluble CD25 (sCD25)*. Dig Dis Sci, 2010. **55**(2): p. 484-95.
109. Lindqvist, C.A., et al., *T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies*. Immunology, 2010. **131**(3): p. 371-6.
110. Yang, Z.Z., et al., *Soluble IL-2Ralpha facilitates IL-2-mediated immune responses and predicts reduced survival in follicular B-cell non-Hodgkin lymphoma*. Blood, 2011. **118**(10): p. 2809-20.
111. Klatzmann, D. and A.K. Abbas, *The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(5): p. 283-94.
112. Benson, A., et al., *Microbial infection-induced expansion of effector T cells overcomes the suppressive effects of regulatory T cells via an IL-2 deprivation mechanism*. J Immunol, 2012. **188**(2): p. 800-10.

113. Fleming, E.H., et al., *Reduced activation and proliferation of human lymphocytes exposed to respiratory syncytial virus compared to cells exposed to influenza virus*. J Med Virol, 2018. **90**(1): p. 26-33.
114. Salkind, A.R., et al., *Interleukin-1-inhibitor activity induced by respiratory syncytial virus: abrogation of virus-specific and alternate human lymphocyte proliferative responses*. J Infect Dis, 1991. **163**(1): p. 71-7.
115. Alonso Fernandez, J., et al., *Soluble interleukin-2 receptor (sCD25) and interleukin-10 plasma concentrations are associated with severity of primary respiratory syncytial virus (RSV) infection*. Eur Cytokine Netw, 2005. **16**(1): p. 81-90.
116. Smyth, R.L., et al., *Respiratory syncytial virus and wheeze*. Lancet, 1999. **354**(9194): p. 1997-8.
117. Gonzalez, P.A., et al., *Respiratory syncytial virus impairs T cell activation by preventing synapse assembly with dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 14999-5004.
118. Chang, J., et al., *Improved effector activity and memory CD8 T cell development by IL-2 expression during experimental respiratory syncytial virus infection*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 503-8.
119. Sondermann, P., et al., *General mechanism for modulating immunoglobulin effector function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(24): p. 9868-72.
120. Holgado, M.P., et al., *CD32 Ligand Promotes the Activation of CD4(+) T Cells*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2814.
121. Abdel-Mohsen, M., et al., *CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells*. Sci Transl Med, 2018. **10**(437).
122. Chauhan, A.K. and T.L. Moore, *T cell activation by terminal complex of complement and immune complexes*. J Biol Chem, 2011. **286**(44): p. 38627-38637.
123. Huot, N., et al., *CD32(+)CD4(+) T Cells Sharing B Cell Properties Increase With Simian Immunodeficiency Virus Replication in Lymphoid Tissues*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 695148.
124. Badia, R., et al., *CD32 expression is associated to T-cell activation and is not a marker of the HIV-1 reservoir*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2739.
125. Descours, B., et al., *CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses*. Nature, 2017. **543**(7646): p. 564-567.
126. Engelhardt, W., J. Matzke, and R.E. Schmidt, *Activation-dependent expression of low affinity IgG receptors Fc gamma RII(CD32) and Fc gamma RIII(CD16) in subpopulations of human T lymphocytes*. Immunobiology, 1995. **192**(5): p. 297-320.
127. Chauhan, A.K., *Human CD4(+) T-Cells: A Role for Low-Affinity Fc Receptors*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 215.
128. Mantzioris, B.X., et al., *Expression of the Fc receptor for IgG (Fc gamma RII/CDw32) by human circulating T and B lymphocytes*. J Immunol, 1993. **150**(11): p. 5175-84.
129. Bournazos, S., A. Gupta, and J.V. Ravetch, *The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(10): p. 633-643.
130. Osuna, C.E., et al., *Evidence that CD32a does not mark the HIV-1 latent reservoir*. Nature, 2018. **561**(7723): p. E20-E28.
131. Bournazos, S., et al., *Signaling by Antibodies: Recent Progress*. Annu Rev Immunol, 2017. **35**: p. 285-311.
132. Smyth, M.J., et al., *Activation of NK cell cytotoxicity*. Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 501-10.
133. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fc gamma receptors as regulators of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 34-47.
134. van Erp, E.A., et al., *Fc-Mediated Antibody Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 548.
135. Amigorena, S., et al., *Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes*. Science, 1992. **256**(5065): p. 1808-12.
136. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 275-90.

137. Wittner, M., et al., *CD32 Expression of Different Memory T Cell Subpopulations in the Blood and Lymph Nodal Tissue of HIV Patients and Healthy Controls Correlates With Immune Activation*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2018. **77**(4): p. 345-349.
138. Sandilands, G.P., et al., *Occult expression of CD32 (Fc gamma RII) in normal human peripheral blood mononuclear cells*. *Immunology*, 1995. **86**(4): p. 525-32.
139. Sandilands, G.P., et al., *Demonstration of cytoplasmic CD32 (Fc gamma RII) within human lymphocytes following microwave treatment*. *Immunology*, 1997. **90**(3): p. 427-34.
140. Sandilands, G.P., et al., *Differential expression of CD32 isoforms following alloactivation of human T cells*. *Immunology*, 1997. **91**(2): p. 204-11.
141. Martin, G.E., et al., *CD32-Expressing CD4 T Cells Are Phenotypically Diverse and Can Contain Proviral HIV DNA*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 928.
142. Perez, L., et al., *Conflicting evidence for HIV enrichment in CD32(+) CD4 T cells*. *Nature*, 2018. **561**(7723): p. E9-E16.
143. Bournazos, S., D.J. DiLillo, and J.V. Ravetch, *The role of Fc-FcγR interactions in IgG-mediated microbial neutralization*. *J Exp Med*, 2015. **212**(9): p. 1361-9.
144. Bournazos, S., et al., *Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies require Fc effector functions for in vivo activity*. *Cell*, 2014. **158**(6): p. 1243-1253.
145. DiLillo, D.J., et al., *Broadly neutralizing anti-influenza antibodies require Fc receptor engagement for in vivo protection*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(2): p. 605-10.
146. Taylor, A., et al., *Fc receptors in antibody-dependent enhancement of viral infections*. *Immunol Rev*, 2015. **268**(1): p. 340-64.
147. Halstead, S.B., *Immune enhancement of viral infection*. *Prog Allergy*, 1982. **31**: p. 301-64.
148. Halstead, S.B., J.S. Chow, and N.J. Marchette, *Immunological enhancement of dengue virus replication*. *Nat New Biol*, 1973. **243**(122): p. 24-6.
149. Halstead, S.B. and E.J. O'Rourke, *Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody*. *J Exp Med*, 1977. **146**(1): p. 201-17.
150. Laurence, J., et al., *Human immunodeficiency virus infection of monocytes: relationship to Fc-gamma receptors and antibody-dependent viral enhancement*. *Immunology*, 1990. **70**(3): p. 338-43.
151. Gotoff, R., et al., *Primary influenza A virus infection induces cross-reactive antibodies that enhance uptake of virus into Fc receptor-bearing cells*. *J Infect Dis*, 1994. **169**(1): p. 200-3.
152. Osioy, C., D. Horne, and R. Anderson, *Antibody-dependent enhancement of respiratory syncytial virus infection by sera from young infants*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1994. **1**(6): p. 670-7.
153. Kuzmina, N.A., et al., *Antibody-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection by Human Antibodies Isolated from Survivors*. *Cell Rep*, 2018. **24**(7): p. 1802-1815 e5.
154. Lum, F.M., et al., *Antibody-mediated enhancement aggravates chikungunya virus infection and disease severity*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 1860.
155. Chu, H.Y., et al., *Respiratory syncytial virus transplacental antibody transfer and kinetics in mother-infant pairs in Bangladesh*. *J Infect Dis*, 2014. **210**(10): p. 1582-9.
156. Taleb, S.A., et al., *Level of maternal respiratory syncytial virus (RSV) F antibodies in hospitalized children and correlates of protection*. *Int J Infect Dis*, 2021. **109**: p. 56-62.
157. Polack, F.P., et al., *Fatal enhanced respiratory syncytial virus disease in toddlers*. *Sci Transl Med*, 2021. **13**(616): p. eabj7843.
158. Muralidharan, A., et al., *Immunopathogenesis associated with formaldehyde-inactivated RSV vaccine in preclinical and clinical studies*. *Expert Rev Vaccines*, 2017. **16**(4): p. 351-360.
159. Polack, F.P., et al., *A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease*. *J Exp Med*, 2002. **196**(6): p. 859-65.
160. Mejias, A., et al., *The journey to a respiratory syncytial virus vaccine*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2020. **125**(1): p. 36-46.

161. Kaul, T.N., et al., *The development of respiratory syncytial virus-specific immune complexes in nasopharyngeal secretions following natural infection*. J Clin Lab Immunol, 1984. **15**(4): p. 187-90.
162. Acevedo, O.A., et al., *Contribution of Fcγ Receptor-Mediated Immunity to the Pathogenesis Caused by the Human Respiratory Syncytial Virus*. Front Cell Infect Microbiol, 2019. **9**: p. 75.
163. Jans, J., et al., *Fc γ receptors in respiratory syncytial virus infections: implications for innate immunity*. Rev Med Virol, 2014. **24**(1): p. 55-70.
164. Cortjens, B., et al., *Broadly Reactive Anti-Respiratory Syncytial Virus G Antibodies from Exposed Individuals Effectively Inhibit Infection of Primary Airway Epithelial Cells*. J Virol, 2017. **91**(10).
165. Bukreyev, A., L. Yang, and P.L. Collins, *The secreted G protein of human respiratory syncytial virus antagonizes antibody-mediated restriction of replication involving macrophages and complement*. J Virol, 2012. **86**(19): p. 10880-4.
166. Scott, R., et al., *Human antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against target cells infected with respiratory syncytial virus*. Clin Exp Immunol, 1977. **28**(1): p. 19-26.
167. Arnold, R., et al., *Effect of respiratory syncytial virus-antibody complexes on cytokine (IL-8, IL-6, TNF-α) release and respiratory burst in human granulocytes*. Immunology, 1994. **82**(2): p. 184-91.
168. Vissers, M., et al., *Antibodies enhance CXCL10 production during RSV infection of infant and adult immune cells*. Cytokine, 2015. **76**(2): p. 458-464.
169. Gomez, R.S., et al., *Contribution of Fcγ receptors to human respiratory syncytial virus pathogenesis and the impairment of T-cell activation by dendritic cells*. Immunology, 2016. **147**(1): p. 55-72.
170. van Erp, E.A., et al., *Respiratory Syncytial Virus Infects Primary Neonatal and Adult Natural Killer Cells and Affects Their Antiviral Effector Function*. J Infect Dis, 2019. **219**(5): p. 723-733.
171. van Erp, E.A., et al., *In Vitro Enhancement of Respiratory Syncytial Virus Infection by Maternal Antibodies Does Not Explain Disease Severity in Infants*. J Virol, 2017. **91**(21).
172. Srikantiah, P., P. Vora, and K.P. Klugman, *Assessing the Full Burden of Respiratory Syncytial Virus in Young Infants in Low- and Middle-Income Countries: The Importance of Community Mortality Studies*. Clin Infect Dis, 2021. **73**(Suppl_3): p. S177-S179.
173. Noor, A. and L.R. Krilov, *Respiratory syncytial virus vaccine: where are we now and what comes next?* Expert Opin Biol Ther, 2018. **18**(12): p. 1247-1256.
174. Aranda, S.S. and F.P. Polack, *Prevention of Pediatric Respiratory Syncytial Virus Lower Respiratory Tract Illness: Perspectives for the Next Decade*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1006.
175. Christiaansen, A.F., et al., *Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants*. Pediatr Res, 2016. **80**(5): p. 702-709.
176. Hall, C.B., et al., *Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus*. J Infect Dis, 1991. **163**(4): p. 693-8.
177. Pincetic, A., et al., *Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity*. Nat Immunol, 2014. **15**(8): p. 707-16.
178. Bournazos, S. and J.V. Ravetch, *Fcγ Receptor Function and the Design of Vaccination Strategies*. Immunity, 2017. **47**(2): p. 224-233.
179. Mella, C., et al., *Innate immune dysfunction is associated with enhanced disease severity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis*. J Infect Dis, 2013. **207**(4): p. 564-73.
180. Arman, M. and K. Krauel, *Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis*. J Thromb Haemost, 2015. **13**(6): p. 893-908.
181. Betts, M.R., et al., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation*. J Immunol Methods, 2003. **281**(1-2): p. 65-78.

182. van Mirre, E., et al., *Neutrophil responsiveness to IgG, as determined by fixed ratios of mRNA levels for activating and inhibitory FcγRII (CD32), is stable over time and unaffected by cytokines*. *Blood*, 2006. **108**(2): p. 584-90.
183. Weiss, K.A., et al., *Multiple CD4+ T cell subsets produce immunomodulatory IL-10 during respiratory syncytial virus infection*. *J Immunol*, 2011. **187**(6): p. 3145-54.
184. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. *J Exp Med*, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
185. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?* *Int Immunol*, 2009. **21**(10): p. 1105-11.
186. Cornish, G.H., L.V. Sinclair, and D.A. Cantrell, *Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15*. *Blood*, 2006. **108**(2): p. 600-8.
187. Sawayama, Y., et al., *Serum soluble interleukin-2 receptor levels before and during interferon treatment in patients with chronic hepatitis B virus infection*. *Dig Dis Sci*, 1999. **44**(1): p. 163-9.
188. Libraty, D.H., et al., *Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections*. *J Infect Dis*, 2002. **185**(9): p. 1213-21.
189. Xie, M., et al., *High levels of soluble CD25 in COVID-19 severity suggest a divergence between anti-viral and pro-inflammatory T-cell responses*. *Clin Transl Immunology*, 2021. **10**(2): p. e1251.
190. Sandor, M. and R.G. Lynch, *Lymphocyte Fc receptors: the special case of T cells*. *Immunol Today*, 1993. **14**(5): p. 227-31.
191. Bjorkstrom, N.K., et al., *Elevated numbers of FcγRIIIA+ (CD16+) effector CD8 T cells with NK cell-like function in chronic hepatitis C virus infection*. *J Immunol*, 2008. **181**(6): p. 4219-28.
192. Agata, Y., et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. *Int Immunol*, 1996. **8**(5): p. 765-72.
193. Bruhns, P., et al., *Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses*. *Blood*, 2009. **113**(16): p. 3716-25.
194. Kannan, K., et al., *Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium*. *Cell Immunol*, 1996. **171**(1): p. 10-9.
195. Halstead, S.B., *Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses*. *Adv Virus Res*, 2003. **60**: p. 421-67.
196. Heidema, J., et al., *CD8+ T cell responses in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells of infants with severe primary respiratory syncytial virus infections*. *J Immunol*, 2007. **179**(12): p. 8410-7.
197. Lukens, M.V., et al., *A systemic neutrophil response precedes robust CD8(+) T-cell activation during natural respiratory syncytial virus infection in infants*. *J Virol*, 2010. **84**(5): p. 2374-83.
198. Veiga-Parga, T., S. Sehrawat, and B.T. Rouse, *Role of regulatory T cells during virus infection*. *Immunol Rev*, 2013. **255**(1): p. 182-96.
199. Krishnamoorthy, N., et al., *Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell function and increases susceptibility to allergic asthma*. *Nat Med*, 2012. **18**(10): p. 1525-30.
200. Chinen, T., et al., *An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function*. *Nat Immunol*, 2016. **17**(11): p. 1322-1333.
201. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
202. Long, S.A., J.H. Buckner, and C.J. Greenbaum, *IL-2 therapy in type 1 diabetes: "Trials" and tribulations*. *Clin Immunol*, 2013. **149**(3): p. 324-31.
203. Humrich, J.Y., et al., *Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(1): p. 204-9.

204. Kammer, G.M., *Altered regulation of IL-2 production in systemic lupus erythematosus: an evolving paradigm*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 836-40.
205. Zier, K.S., et al., *Decreased synthesis of interleukin-2 (IL-2) in insulin-dependent diabetes mellitus*. Diabetes, 1984. **33**(6): p. 552-5.
206. Kitas, G.D., et al., *Deficient interleukin 2 production in rheumatoid arthritis: association with active disease and systemic complications*. Clin Exp Immunol, 1988. **73**(2): p. 242-9.
207. Oldenhove, G., et al., *Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 772-86.
208. Malek, T.R., *The biology of interleukin-2*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 453-79.
209. Roe, M.F., et al., *Lymphocyte apoptosis in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis*. Clin Exp Immunol, 2004. **137**(1): p. 139-45.
210. Matera, L., et al., *Low lymphocyte count: A clinical severity marker in infants with bronchiolitis*. Pediatr Pulmonol, 2022. **57**(7): p. 1770-1775.
211. Schlender, J., et al., *Respiratory syncytial virus fusion protein mediates inhibition of mitogen-induced T-cell proliferation by contact*. J Virol, 2002. **76**(3): p. 1163-70.
212. Godfrey, W.R., et al., *In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures*. Blood, 2004. **104**(2): p. 453-61.
213. Logotheti, S. and B.M. Putzer, *STAT3 and STAT5 Targeting for Simultaneous Management of Melanoma and Autoimmune Diseases*. Cancers (Basel), 2019. **11**(10).
214. Kanai, T., J. Jenks, and K.C. Nadeau, *The STAT5b Pathway Defect and Autoimmunity*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 234.
215. Mostafa, G.A., et al., *Up-regulated serum levels of soluble CD25 and soluble CD163 in pediatric patients with SARS-CoV-2*. Eur J Pediatr, 2022. **181**(6): p. 2299-2309.
216. Downes, K., et al., *Plasma concentrations of soluble IL-2 receptor alpha (CD25) are increased in type 1 diabetes and associated with reduced C-peptide levels in young patients*. Diabetologia, 2014. **57**(2): p. 366-72.
217. Smyth, R.L., et al., *Immunological responses to respiratory syncytial virus infection in infancy*. Arch Dis Child, 1997. **76**(3): p. 210-4.
218. Rubin, L.A., et al., *Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro*. J Immunol, 1985. **135**(5): p. 3172-7.
219. Pedersen, A.E. and J.P. Lauritsen, *CD25 shedding by human natural occurring CD4+CD25+ regulatory T cells does not inhibit the action of IL-2*. Scand J Immunol, 2009. **70**(1): p. 40-3.
220. Russell, S.E., et al., *Soluble IL-2Ralpha (sCD25) exacerbates autoimmunity and enhances the development of Th17 responses in mice*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47748.
221. Komp, D.M., E. Shapiro, and J. McNamara, *Soluble interleukin-2 receptor in childhood non-Hodgkin's lymphoma*. Blood, 1988. **71**(4): p. 1172-4.
222. Laurence, A., et al., *Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation*. Immunity, 2007. **26**(3): p. 371-81.
223. Bukreyev, A., et al., *Effect of coexpression of interleukin-2 by recombinant respiratory syncytial virus on virus replication, immunogenicity, and production of other cytokines*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 7151-7.
224. Hernandez, R., et al., *Engineering IL-2 for immunotherapy of autoimmunity and cancer*. Nat Rev Immunol, 2022.
225. Ochola, R., et al., *The level and duration of RSV-specific maternal IgG in infants in Kilifi Kenya*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8088.
226. Chauhan, A.K., et al., *FcgammaRIIIa-Syk Co-signal Modulates CD4+ T-cell Response and Up-regulates Toll-like Receptor (TLR) Expression*. J Biol Chem, 2016. **291**(3): p. 1368-86.
227. Lanier, L.L., T.J. Kipps, and J.H. Phillips, *Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen)*. J Exp Med, 1985. **162**(6): p. 2089-106.

228. Starbeck-Miller, G.R., et al., *Cutting edge: Expression of FcγRIIB tempers memory CD8 T cell function in vivo*. J Immunol, 2014. **192**(1): p. 35-9.
229. Pinto, R.A., et al., *T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol*. Pediatrics, 2006. **117**(5): p. e878-86.
230. Murphy, B.R., et al., *Effect of age and preexisting antibody on serum antibody response of infants and children to the F and G glycoproteins during respiratory syncytial virus infection*. J Clin Microbiol, 1986. **24**(5): p. 894-8.
231. Faber, T.E., et al., *Specific increase in local IL-17 production during recovery from primary RSV bronchiolitis*. J Med Virol, 2012. **84**(7): p. 1084-8.
232. Krishnan, S., et al., *The FcγR gamma subunit and Syk kinase replace the CD3 zeta-chain and ZAP-70 kinase in the TCR signaling complex of human effector CD4 T cells*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4189-95.
233. Huang, K., et al., *Respiratory syncytial virus-neutralizing monoclonal antibodies motavizumab and palivizumab inhibit fusion*. J Virol, 2010. **84**(16): p. 8132-40.
234. Jiang, X.R., et al., *Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(2): p. 101-11.
235. Hiatt, A., et al., *Glycan variants of a respiratory syncytial virus antibody with enhanced effector function and in vivo efficacy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(16): p. 5992-7.

8. ANEXO

Los resultados presentados en este trabajo de tesis han formado parte de las siguientes publicaciones:

1. Upregulation of CD32 in T Cells from Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus Disease: A New Costimulatory Pathway?

Inés Sananez, Silvina Raiden, Pía Holgado, Vanesa Seery, Leonardo De Lillo, Carolina Davenport, Fernando Ferrero, Mark E. Peeples, Jorge Geffner, Lourdes Arruvito.

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2020. 63(1):133-136. Doi: 10.1165/rcmb.2020-0025LE.

2. Dampening of IL-2 function in infants with severe Respiratory Syncytial Virus disease.

Inés Sananez, Silvina Raiden, Fernando Erra-Díaz, Leonardo De Lillo, María Pía Holgado, Jorge Geffner, Lourdes Arruvito.

The Journal of Infectious Diseases, 2018. 218(1):75-83. Doi: 10.1093/infdis/jiy180.

Otras publicaciones:

1. Antibody response against SARS-CoV-2 variants of concern in children infected with pre-Omicron variants: An observational cohort study.

Vanesa Seery, Silvina Raiden, Constanza Russo, Mauricio Borda, Larión Herrera, Macarena Uranga, Augusto Varese, María Marcó del Pont, Carina Chirino, Constanza Erramuspe, Laura Silvana Álvarez, Melisa Lenoir, Laura Daniela Morales, Carolina Davenport, Alexsa Alarcón Flores, Soledad Huespe Auchter, Yanina Ruiz, Liliana Monsalvo, Laura Sastoque, Magalí Gavazzi, Ignacio Mazzitelli, Facundo Di Diego, Yesica Longueira, Bianca Mazzitelli, **Inés Sananez**, Norberto De Carli, Mirna Marcela Biglione, Juan Martín Gómez Penedo, Ana Ceballos, Natalia Laufer, Fernando Ferrero, Jorge Geffner, Lourdes Arruvito.

EBioMedicine, 2022. 83:104230. Doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104230.

2. Extracellular ATP and imbalance of CD4+ T cell compartment in pediatric COVID-19.

Constanza Russo, Silvina Raiden, Silvia Algieri, Norberto De Carli, Carolina Davenport, Mariam Sarli, Marí José Bruera, Vanesa Seery, **Inés Sananez**, Nancy Simaz, Carola Bayle, Valeria Nivelá, Fernando Ferrero, Jorge Geffner, Lourdes Arruvito.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12:893044. Doi: 10.3389/fcimb.2022.893044.

3. A poor and delayed anti-SARS-CoV-2 IgG response is associated to severe COVID-19 in children.

Inés Sananez, Silvina C Raiden, Silvia C Algieri, Macarena Uranga, Nicolás A Grisolia, Daniela Filippo, Norberto De Carli, Sandra Di Lalla, Héctor Cairoli, María J. Chiolo, Claudia N. Meregalli, Emilia Cohen, Graciela Mosquera, María Marcó Del Pont, Lorena I. Giménez, Gabriela Gregorio, Mariam Sarli, Ana L. Alcalde, Carolina Davenport, María J. Bruera, Nancy Simaz, Mariela F. Pérez, Valeria Nivelá, Carola Bayle, Laura Alvarez, María Revetria, Patricia Tuccillo, María T. Agosta, Hernán Pérez, Susana Villa Nova, Patricia Suárez, Eugenia M. Takata, Mariela García, Jorge Lattner, María J. Rolón, Patricia Coll, Melina Salvatori, Claudio Piccardo, Constanza Russo, Augusto Varese, Vanesa Seery, María P. Holgado, María L. Polo, Ana Ceballos, Myriam Nuñez, Juan Martín Gómez Penedo, Fernando Ferrero, Jorge Geffner, Lourdes Arruvito.

EBioMedicine, 2021. 72:103615. Doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103615.

4. Blood neutrophils from children with COVID-19 exhibit both inflammatory and anti-inflammatory markers.

Vanesa Seery, Silvina C. Raiden, Silvia C. Algieri, Nicolás A. Grisolia, Daniela Filippo, Norberto De Carli, Sandra Di Lalla, Héctor Cairoli, María J. Chiolo, Claudia N. Meregalli, Lorena I. Gimenez, Gabriela Gregorio, Mariam Sarli, Ana L. Alcalde, Carolina Davenport, María J. Bruera, Nancy Simaz, Mariela F. Pérez, Valeria Nivelá, Carola Bayle, Patricia Tuccillo, María T. Agosta, Hernán Pérez, Susana Villa Nova, Patricia Suárez, Eugenia M. Takata, Mariela García, Jorge Lattner, María J. Rolón, Patricia Coll, **Inés Sananez**, María P. Holgado, Fernando Ferrero, Jorge Geffner, Lourdes Arruvito.

EBioMedicine, 2021. 67:103357. Doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103357.

5. Fcγ Receptor 2a (FCGR2A) polymorphism is associated with Severe Respiratory Syncytial Virus disease in Argentinian infants.

María Pía Holgado, Silvina Raiden, **Inés Sananez**, Vanesa Seery, Leonardo De Lillo, Lucas L. Maldonado, Laura Kamenetzky, Jorge Geffner, Lourdes Arruvito.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020. 10:607348. Doi: 10.3389/fcimb.2020.607348.

6. CD32 ligation promotes the activation of CD4+ T cells.

María Pía Holgado, **Inés Sananez**, Silvina Raiden, Jorge Geffner, Lourdes Arruvito.

Frontiers in Immunology, 2018, 9:2814. Doi: 10.3389/fimmu.2018.02814.

7. Respiratory syncytial virus infects CD4+ T cells: the frequency of circulating CD4+RSV+ T cells as a marker of disease severity in young children.

Silvina Raiden, **Inés Sananez**, Federico Remes-Lenicov, Julieta Pandolfi, Cecilia Romero, Leonardo De Lillo, Ana Ceballos, Jorge Geffner, Lourdes Arruvito.

Journal of Infectious Diseases, 2017; 215(7):1049-1058. Doi: 10.1093/infdis/jix070.