

Puesta al día en VRS-asma. El papel de la genómica

Asunción Mejías^a y Octavio Ramilo^b

^aAssistant Professor of Pediatrics, Division of Pediatric Infectious Diseases, The University of Texas Southwestern Medical Center and Children's Medical Center, Dallas, Texas. ^bProfessor of Pediatrics, Division of Pediatric Infectious Diseases, The University of Texas Southwestern Medical Center and Children's Medical Center, Dallas, Texas.

INTRODUCCIÓN

El virus respiratorio sincitial (VRS) es un virus RNA, no segmentado, formado por una única cadena de RNA de sentido negativo. Perteneció al género *Pneumovirus* y la familia *Paramixoviridae* y está constituido por 10 genes que codifican 11 proteínas de diferentes pesos moleculares¹. Entre las proteínas estructurales, las glicoproteínas G y F, asociadas a la envoltura constituyen los mayores determinantes antigénicos del virus ya que inducen la formación de anticuerpos neutralizantes. La proteína G media la adhesión del virus a las células del epitelio respiratorio y se ha relacionado con la producción de una respuesta predominantemente Th2, mientras que la proteína F facilita la entrada del virus, inserción del RNA en las células del huésped y la formación de sincitios. Estudios en humanos y modelos animales sugieren que la proteína F estimula una respuesta Th1 predominante (fig. 1).

Existen dos tipos principales de VRS, A y B, que pueden co-circular en la comunidad durante la estación de invierno. No está claro si un tipo es más virulento que otro². Mientras que los anticuerpos anti-proteína F confieren protección frente a los dos tipos de VRS, los dirigidos frente a la proteína G usualmente no son protectores contra los dos tipos, ya que solo hay un 35% homología entre la proteína G de los tipos A y B. De ahí que la proteína F es la principal diana para las intervenciones terapéuticas³.

EPIDEMIOLOGÍA

En la actualidad el VRS constituye la primera causa de bronquiolitis y hospitalización secundaria a infección del tracto respiratorio inferior en países desarrollados⁴, además de representar una causa importante de morbi-mortalidad en países en vías de desarrollo. Solo en Estados Unidos el VRS es responsable de más de 150.000 hospitalizaciones anuales y su número está en aumento⁵. El aumento de la supervivencia en niños de alto riesgo como lactantes prematuros, niños con cardiopatía congénita o

displasia broncopulmonar ha supuesto que el riesgo de bronquiolitis severa haya aumentado de forma paralela.

Además de la morbilidad aguda causada por el VRS, numerosos estudios desde hace más de 40 años han descrito la asociación entre la infección por VRS en la infancia y el desarrollo posterior de sibilancias recurrentes e hiperreactividad bronquial (HRB); no sólo en lactantes hospitalizados con bronquiolitis severa⁶, sino también en niños con bronquiolitis que no requirieron hospitalización y se siguieron de forma ambulatoria⁷. Aun no está claro si es la infección por VRS en etapas tempranas de la vida responsable por sí sola de las alteraciones en la función pulmonar que se observan posteriormente o por el contrario, es la combinación de la infección por VRS en ciertas etapas de la vida con factores propios del huésped, como ciertos polimorfismos en los genes que codifican o regulan la expresión de la IL-8, IL-13 o en las proteínas del surfactante A y D^{3,8,9}, que parecen alterar o aumentar la predisposición a padecer asma posterior. Lo

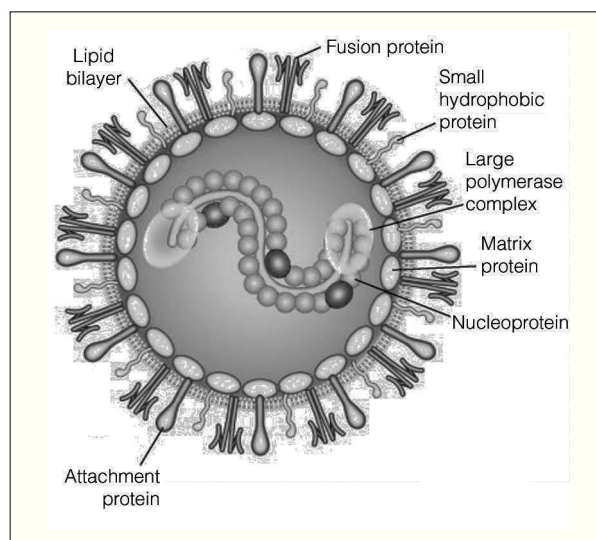


Figura 1.

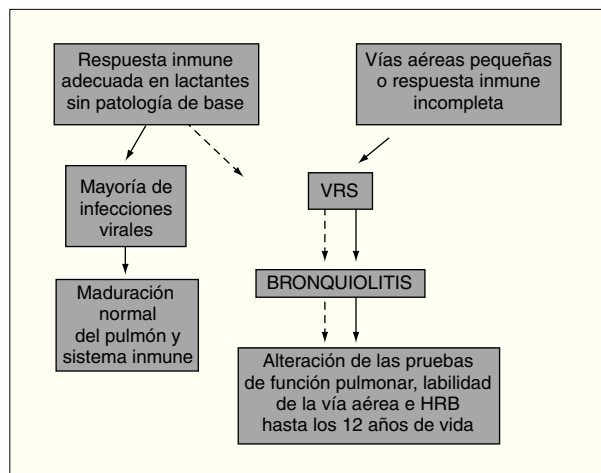


Figura 2.

que es aun más interesante es el hecho de que la mayoría de lactantes infectados por VRS que desarrollan posteriormente HRB no tienen factores de riesgo evidentes (fig. 2).

Existe además evidencia reciente que parece indicar que los mecanismos asociados al desarrollo de sibilancias post-bronquiolitis cambian a lo largo del tiempo. Las sibilancias tempranas se han asociado a la producción sistémica de IL-10¹⁰ mientras que las sibilancias más tardías se han asociado con polimorfismos de la IL-13⁹. Asimismo, estudios en modelos animales han demostrado que la naturaleza de la inflamación pulmonar tras la infección por VRS aunque persistente, es también cambiante y se correlaciona con las alteraciones en las pruebas de función pulmonar observadas: durante la fase aguda el infiltrado inflamatorio está compuesto fundamentalmente de macrófagos, neutrófilos y algunos linfocitos, mientras que en la fase crónica se observa un predominio de células plasmáticas y linfocitos^{11,12}.

PATOGENESIS

En general la respuesta inmune primaria a la infección por VRS es pobre e incompleta, de ahí que las re-infecciones sean frecuentes a lo largo de la vida a pesar de la presencia de títulos altos de anticuerpos neutralizantes. La mayoría de las reinfecciones ocasionan afectación leve del tracto respiratorio superior con la producción de IgG1, IgG3 e IgA a nivel tanto local como sistémico¹³. El VRS no se replica normalmente fuera del aparato respiratorio, y la infección queda restringida a la mucosa respiratoria. Sin embargo ciertos estados de inmunosupresión de células B o T favorecen el desarrollo de viremia y/o manifestaciones extrapulmonares¹⁴⁻¹⁶.

Las manifestaciones de la infección por VRS son el resultado no solo del efecto citopático directo del virus sobre las células del epitelio respiratorio si no también de la respuesta inmune, a menudo exagerada del huésped. En

la infección por VRS existe un desequilibrio entre las dos ramas de la inmunidad: la inmunidad innata y la adaptativa.

Inmunidad Innata

En los lactantes con bronquiolitis por VRS se liberan diferentes citoquinas, quemocinas y otros mediadores de la inmunidad celular que se encargan de regular la respuesta local y que constituyen la primera respuesta a la infección. La interrelación entre todos estos factores es compleja ya que actúan de forma coordinada reclutando y activando células dendríticas¹⁷, células mononucleares, y neutrófilos en la vía aérea¹⁸. Entre ellos se encuentran citoquinas como IL-6, TNF- α , quemocinas como IL-8, MIP-1 α y RANTES¹⁹, así como mediadores inflamatorios neuronales no-colinérgicos, no-adrenergicos, que junto con la producción de moco aumentada llevara a un estrechamiento de la vía aérea (mediada en parte por la liberación de leucotrienos, prostaglandinas y óxido nítrico) con la consiguiente producción de sibilancias, atelectasias e hiperinsuflación pulmonar, signos clínicos característicos de la bronquiolitis²⁰.

Desequilibrio Th1-Th2

En general las infecciones virales promueven una respuesta celular Th1 dominada por la producción de niveles elevados de IFN- γ ; mientras que el asma y la atopia promueven una respuesta Th2 con la consiguiente producción de IL-4 e IL-5. En la infección por VRS los datos publicados acerca de la respuesta Th1-Th2 en humanos y modelos animales son contradictorios, en parte debido a las diferencias en el diseño de los estudios realizados. Probablemente, es el modo en el que se realiza la presentación de antígeno más que la estructura de las proteínas virales las responsables de mas una respuesta Th1 o Th2²¹. Cabe también la posibilidad que lactantes con bronquiolitis severa por VRS atraigan ciertos componentes del sistema inmune al lugar de la inflamación, estando por tanto ausentes en sangre periférica^{17,22}.

Persistencia del Virus

Estudios preliminares han demostrado que la prevención de la infección por VRS en lactantes prematuros y también en modelos animales se asocio a una reducción significativa del desarrollo posterior de HRB, por lo que parece que el virus parece jugar un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad^{12,23-25}. Existe evidencia reciente in vitro, modelos experimentales animales²⁶ y en humanos que sugieren²⁷ que el VRS podría permanecer en "estado latente o en forma de bajo grado de replicación" en lugares inmunológicamente privilegiados, bien a través de las proteínas virales no estructurales NS1/NS2 o del receptor CX3CR1 expresado en leucocitos y neuronas del pulmón, evadiendo así al sistema inmune. Quizás los efectos a largo plazo que se observan tras la

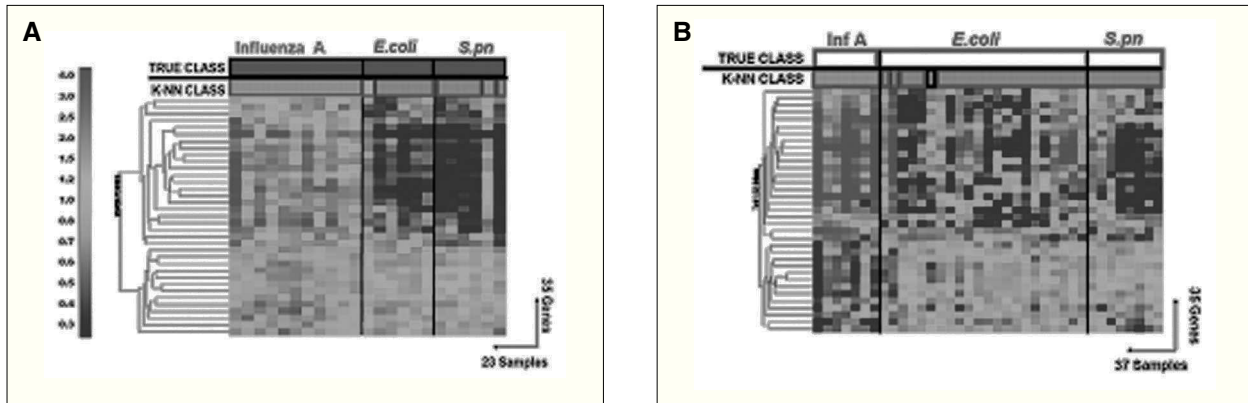


Figura 3. **A)** Panel izdo: El análisis por predicción de clases identifico un grupo de 35 genes que discriminaron pacientes con infección aguda por Influenza A (verde) de infecciones bacterianas (rojo). El patrón de expresión génica está representado en forma de un mapa de colores donde cada línea representa un gen y cada columna un paciente, (rojo = aumento en la expresión, azul = disminución en la expresión y amarillo: sin cambio). **B)** Panel dcho: La capacidad discriminadora de estos genes se comprobó en un grupo independiente de pacientes.

infección por VRS, se podrían explicar en parte por la persistencia del VRS en el aparato respiratorio. El VRS mantendría una estimulación constante del sistema inmune y sería responsable de la inflamación crónica y de los cambios en el patrón de citoquinas y quemocinas que se observan en niños con HRB inducida por VRS.

PAPEL DE LA GENÓMICA (MICROARRAYS)

Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la asociación entre la infección por VRS en etapas tempranas de la vida y el desarrollo posterior de HRB, sin embargo los mecanismos específicos y tipos celulares responsables de estas secuelas a largo plazo no están completamente definidos. Por ello, en los últimos años hemos aplicado una nueva tecnología basada en el análisis global y conjunto de la respuesta del huésped a la infección²⁸, gracias al estudio del fenotipo molecular de los leucocitos en sangre periférica, que constituyen una fuente de información accesible y fiable además de reflejar lo que ocurre en el lugar de la infección²⁹. No solo buscamos identificar el agente infeccioso como causa de la enfermedad, si no que gracias a los microarrays podemos estudiar y entender la respuesta global del huésped como fuente única de biomarcadores de la enfermedad.

ESTUDIOS PRELIMINARES

Inicialmente nuestro objetivo principal fue determinar si existían distintos perfiles de expresión génica que nos permitiera diferenciar pacientes con diferentes tipos de infecciones virales o bacterianas (perfil diagnóstico). Usando el algoritmo predictor de clases por proximidad (K-NN), identificamos 35 genes que diferenciaban con 95% de precisión pacientes con *Influenza A* vs pacientes con infecciones por Gram negativos (*E. Coli*) o Gram positivos (*S. pneumoniae*). Estos genes “clasificadores” se obtuvieron de una cohorte inicial de pacientes perfecta-

mente seleccionados y pareados en relación a la edad, sexo, raza y severidad de la infección para evitar cualquier tipo de confusión en el análisis, y se validaron posteriormente en una cohorte independiente de pacientes con el mismo tipo de infecciones²⁹ (fig. 3A y B).

Gracias a los microarrays no solo hemos podido diferenciar, pacientes con distintos tipos de infecciones: virales vs bacterianas, sino que hemos podido identificar patrones de expresión génica patógeno-específico en pacientes que debutaron con manifestaciones clínicas similares, en este caso neumonía. Seleccionamos 27 pacientes con neumonías de diferentes etiologías y 7 controles como referencia. Utilizando los distintos grupos de genes clasificadores identificados previamente²⁹ (fig. 4), obtuvimos 137 genes que agruparon los pacientes en 4 patrones diferentes (fig. 5). Niños controles sanos que se diferenciaron claramente del resto. Un segundo patrón de expresión en pacientes con infección por *influenza A* (formada predominantemente por genes relacionados con el interferón) claramente diferente de un tercer patrón dominado por las infecciones bacterianas (*S. aureus* y *S. pneumoniae*; incluyendo genes asociados a los neutrofilos).

También identificamos un cuarto patrón de expresión que combinó elementos de los patrones anteriores (genes asociados al interferón y los neutrofilos) en 4 pacientes: 3 de ellos con *influenza A* y uno con neumonía por *S. aureus*, que sugiere que estos pacientes estaban co-infectados con virus y bacterias. Las implicaciones clínicas de estos hallazgos son enormes, ya que el diagnóstico etiológico de las neumonías y por tanto manejo clínico es especialmente limitado en la práctica clínica²⁹.

Pero las aplicaciones de los microarrays no son solo diagnósticas, si no que permite la identificación de marcadores de severidad de la enfermedad así como marcadores pronósticos, de hecho nos está permitiendo estu-

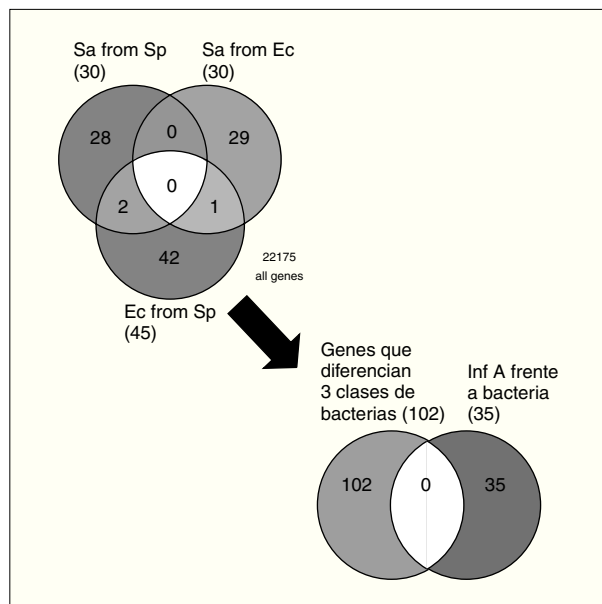


Figura 4. Mínima superimposición entre genes que discriminan pacientes con infección aguda por Influenza A, E. coli, S. aureus o S. pneumoniae. (a) Además de los 30 genes que encontramos diferenciaban S. aureus de E. coli (Diagrama de Venn, dcha: Sa de Ec); identificamos 30 genes que diferencian S. aureus de S. pneumoniae (Diagrama de Venn, izda: Sa vs Sp); y 45 genes que diferencian E. coli de S. pneumoniae (Diagrama de Venn, abajo: Ec vs Sp). Solo encontramos 3 genes compartidos entre cualquiera de los grupos. (b) Los tres grupos de genes que discriminaban pacientes con infecciones bacterianas (figura a) se sumaron (102 genes únicos; diagrama de venn izda) y se compararon con los genes derivados de la comparación de influenza A vs infecciones bacterianas (35 genes, diagrama de Venn, dcha). No encontramos ningún gen compartido entre estos dos últimos grupos.

diar en profundidad la patogénesis de la infección por VRS y su asociación con el desarrollo de HRB posterior al estudiar en su conjunto la respuesta del huésped a la infección.

MODELOS EXPERIMENTALES

Con el fin de estudiar la inmunopatogénesis de la infección por VRS hemos adaptado en nuestro laboratorio un modelo experimental de VRS en ratones, que nos permite estudiar de forma más controlada la dinámica de la infección por VRS. Utilizando este modelo hemos podido cuantificar la replicación viral y producción de mediadores inflamatorios en el tracto respiratorio inferior, así como valorar el impacto de estos cambios inflamatorios en la función pulmonar tanto en la fase aguda de la enfermedad como a largo plazo¹¹. Gracias al modelo murino, hemos demostrado que después del aclaramiento del

virus documentado por cultivos celulares, y la recuperación de la fase aguda de la enfermedad³⁰, los ratones progresan hacia una fase crónica caracterizada por HRB e inflamación de la vía aérea que persiste hasta 154 días después de la infección¹¹ (fig. 6A y B). Pero lo que quizá es más importante es que estos cambios persistentes a nivel histológico se acompañaron de cambios funcionales en los parámetros de función pulmonar.

A diferencia de los cultivos celulares que fueron consistentemente negativos después de la primera semana tras la inoculación, la RT-PCR para VRS permaneció positiva en ratones infectados tanto en la fase aguda de la enfermedad (días 1-5) como hasta 6 semanas después de la inoculación. Además demostramos que el número de copias de RNA del VRS se correlacionó significativamente con la HRB observada en ese momento ($p < 0,001$, $r = 0,83$)^{26,31}.

Con el fin de estudiar en detalle y caracterizar el impacto de la infección por VRS en la expresión génica durante la fase crónica de la enfermedad, cuando las manifestaciones clínicas de la infección aguda por VRS, no están ya presentes, hemos aplicado esta nueva metodología a nuestro modelo experimental. Tras extraer RNA del pulmón de ratones infectados con VRS, controles no infectados y ratones infectados con VRS y tratados con motavizumab (anticuerpo monoclonal anti-proteína F derivado de palivizumab) a modo de profilaxis, 24h previas a la infección) identificamos 541 genes expresados significativamente diferente entre los tres grupos estudiados. Ocho de estos genes, la mayoría relacionados con la inmunidad humoral se correlacionaron significativamente con la HRB ($r 0,7-0,8$; $p < 0,05$) que habíamos observado previamente y todos ellos tenían un nivel de expresión significativamente superior en el grupo de ratones infectado con VRS³².

Por tanto hemos encontrado que la HRB persistente en ratones infectados con VRS en comparación con el grupo control se asocio a) con la presencia de un infiltrado pulmonar crónico a expensas principalmente de mononucleares (fig. 6B) y fue diferente del observado en la fase aguda de la enfermedad b) persistencia de copias de RNA del virus detectadas por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) en muestras de pulmón de ratones infectados con VRS a largo plazo (días 12-42) c) expresión de ciertos grupos de genes relacionados con la inmunidad humoral.

ESTUDIOS PROSPECTIVOS EN LACTANTES CON BRONQUIOLITIS AGUDA

Recientemente hemos aplicado esta tecnología a muestras de pacientes con infecciones respiratorias: bronquiolitis por VRS, influenza y virus parainfluenza. Utilizando test estadísticos no paramétricos ($p < 0,01$) encontramos que el patrón génico en la infección por VRS en lactantes con bronquiolitis es único y diferente del que ocurre

Figura 5. Diferentes patrones en la expresión de los genes de leucocitos en sangre periférica en niños con neumonía. Los 137 genes que diferenciaron influenza A de las infecciones bacterianas y los tres grupos de infecciones bacterianas se sumaron y usaron para identificar los patrones de expresión en 27 pacientes con neumonía y 7 controles sanos. El análisis de las muestras agrupo a los pacientes en 4 patrones principales. Tres muestras pertenecientes a pacientes con influenza A y una de *S. aureus* se agruparon en un 4 grupo caracterizado por un patrón mixto (*).

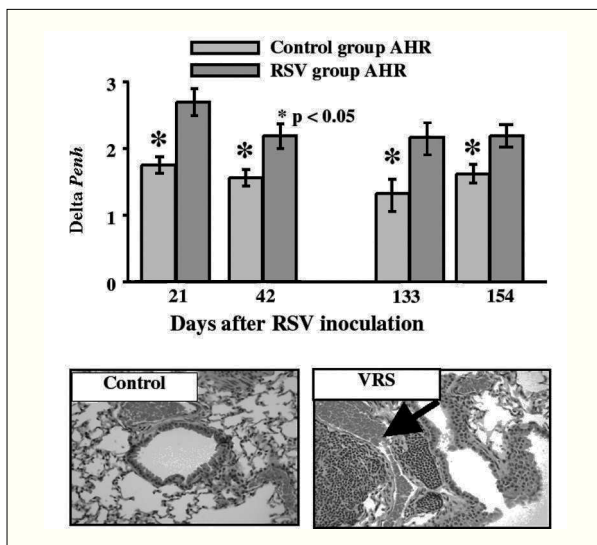
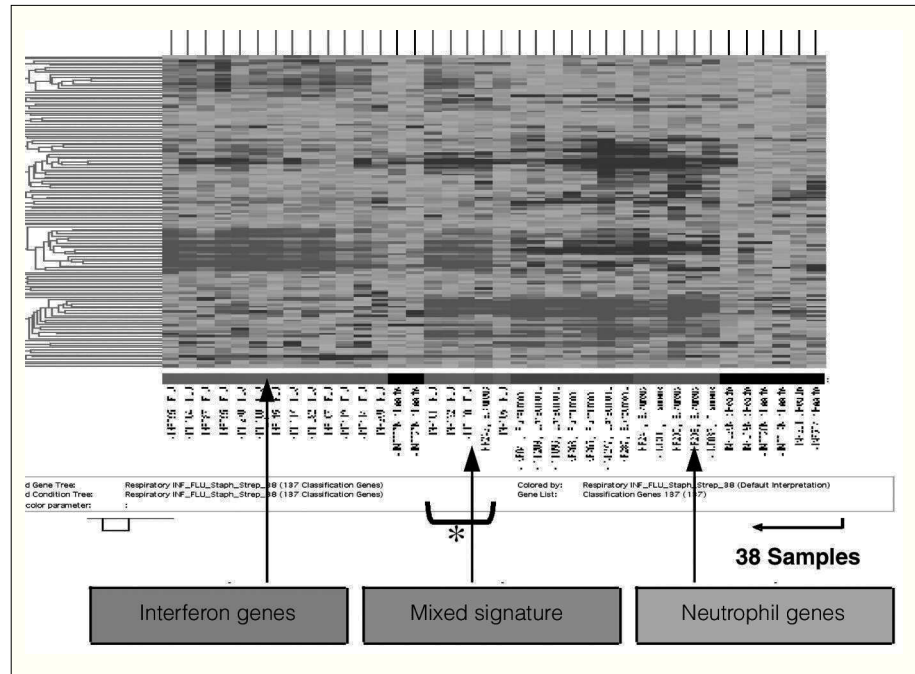


Figura 6. Análisis con microarrays identifica marcadores génicos que se correlacionan con las secuelas largo plazo producida por el VRS. Ratones infectados con VRS progresan hacia una fase crónica caracterizada por HRB e inflamación crónica persistente e expensas de un infiltrado mononuclear hasta 5 meses después de la infección. La metilcolina, aunque ocasiona incrementos leves en la HRB en controles no infectados, la respuesta es significativamente superior en los ratones infectados con VRS.

en otros tipos de bronquiolitis³³. Es más, con el fin de entender el significado biológico de los genes expresados y saber si estos genes se correlacionaban con parámetros

clínicos de severidad de la infección, aplicando análisis estadísticos multivariados no paramétricos en distintos grupos de pacientes AHR con bronquiolitis por VRS (pacientes con enfermedad severa vs pacientes con enfermedad leve) encontramos ciertos grupos de genes co-regulados que se correlacionaron con el score clínico de severidad de la infección³⁴.

Estos hallazgos, además de aportar evidencia adicional y ayudar a entender en profundidad la patogénesis de la infección por VRS, demuestran la capacidad que tiene el VRS de inducir cambios crónicos en el pulmón a nivel orgánico y funcional. Enfatizan además el valor de estas nuevas técnicas para identificar marcadores que se correlacionan con la severidad de la infección, representando por tanto candidatos ideales para la realización de intervenciones terapéuticas que prevengan las secuelas pulmonares a largo plazo causadas por el VRS en la población pediátrica.

BIBLIOGRAFÍA

- Dickens LE, Collins PL, Wertz GW. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol.* 1984;52:364-9.
- Devincenzo JP. Natural infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: a study of frequency, disease severity, and viral load. *Pediatr Res.* 2004;56:914-7.
- Mejías A, Chavez-Bueno S, Ramilo O. Respiratory syncytial virus pneumonia: mechanisms of inflammation and prolonged airway hyperresponsiveness. *Curr Opin Infect Dis.* 2005;18:199-204.
- Leader S, Kohlhasse K. Respiratory syncytial virus-coded pediatric hospitalizations, 1997 to 1999. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21:629-32.

5. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *Jama*. 1999;282:1440-6.
6. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. 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;161:1501-7.
7. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet*. 1999;354:541-5.
8. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax*. 2000;55:1023-7.
9. Ermers MJ, Hoebee B, Hodemaekers HM, Kimman TG, Kimpen JL, Bont L. IL-13 genetic polymorphism identifies children with late wheezing after respiratory syncytial virus infection. *J Allergy Clin Immunol* 2007.
10. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, et al. Monocyte IL-10 production during respiratory syncytial virus bronchiolitis is associated with recurrent wheezing in a one-year follow-up study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1518-23.
11. Jafri HS, Chavez-Bueno S, Mejías A, et al. Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis* 2004;189:1856-65.
12. Mejías A, Chavez-Bueno S, Ríos AM, et al. Anti-respiratory syncytial virus (RSV) neutralizing antibody decreases lung inflammation, airway obstruction, and airway hyperresponsiveness in a murine RSV model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:1811-22.
13. Heidema J, Kimpem JLL, van Bleek, GM. Pathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis: Immunology and Genetics. In: Kimpen JLL, Ramilo O, ed. *The Microbe-Host Interface in Respiratory Tract Infections*: Horizon Bioscience. 2005. p. 233-53.
14. Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, et al. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med*. 1986;315:77-81.
15. Delage G, Brochu P, Robillard L, Jasmin G, Joncas JH, Lapointe N. Giant cell pneumonia due to respiratory syncytial virus. Occurrence in severe combined immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 1984;108:623-5.
16. Whimbey E, Couch RB, Englund JA, et al. Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adult patients with leukemia. *Clin Infect Dis*. 1995;21:376-9.
17. Gill MA, Palucka AK, Barton T, et al. Mobilization of plasmacytoid and myeloid dendritic cells to mucosal sites in children with respiratory syncytial virus and other viral respiratory infections. *J Infect Dis*. 2005;191:1105-15.
18. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev*. 2004;5 Suppl A: S119-26.
19. Sheeran P, Jafri H, Carubelli C, et al. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18:115-22.
20. Smyth RL, Openshaw PJ. Bronchiolitis. *Lancet*. 2006;368:312-22.
21. Johnson TR, Varga SM, Braciale TJ, Graham BS. Vbeta14(+) T cells mediate the vaccine-enhanced disease induced by immunization with respiratory syncytial virus (RSV) G glycoprotein but not with formalin-inactivated RSV. *J Virol*. 2004;78:8753-60.
22. Pitrez PM, Ponzi D, Machado DC, Bauer ME, Jones MH, Stein RT. Discrepancy between cytokine production from peripheral blood mononuclear cells and nasal secretions among infants with acute bronchiolitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004;92:659-62.
23. Wenzel SE, Gibbs RL, Lehr MV, Simoes EA. Respiratory outcomes in high-risk children 7 to 10 years after prophylaxis with respiratory syncytial virus immune globulin. *Am J Med*. 2002;112:627-33.
24. Simoes EA, Carbonell-Estrany X, Kimpen J, Rieger CHL, Morris D, Pollack PF, Groothuis JR. Palivizumab use decrease risk of recurrent wheezing in preterm children. In: 14th European Respiratory Society Annual Congress; 2004; Glasgow, Scotland. Abstract No 1349; 2004.
25. Mejías A, Chávez-Bueno S, Ríos AM, et al. Comparative effects of two neutralizing anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibodies in the RSV murine model: time versus potency. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4700-7.
26. Chávez-Bueno S, Mejías A, Gómez AM, et al. Respiratory syncytial virus-induced acute and chronic airway disease is independent of genetic background: an experimental murine model. *Virol J*. 2005;2:46.
27. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1618-23.
28. Relman DA. The human body as microbial observatory. *Nat Genet*. 2002;30:131-3.
29. Ramilo O, Allman W, Chung W, et al. Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections. *Blood*. 2007;109:2066-77.
30. Mejías A, Ramilo O. Asthma and respiratory syncytial virus. Myth or reality? *An Esp Pediatr*. 2002;57:199-204.
31. Chávez-Bueno S, Mejías A, OK, Ríos AM, Fonseca-Aten M, Hatfield J, Gómez AM, Ramilo O, Jafri SH. Respiratory Syncytial Virus (RSV)-Induced Long Term Airway Hyperresponsiveness (AHR) is Associated with Viral Persistence Detected by Real Time Polymerase Chain Reaction (RLT-PCR). *Pediatric Res*. 2004;1:335A (1908).
32. Mejías A, Ríos AM, Chávez-Bueno S, et al. Lung gene expression profiling correlates with pulmonary function abnormalities induced by RSV in the mouse model. *Pediatric Academic Societies Annual Meeting*; Washintong, DC 2005.
33. Mejías A, Allman W, Long K, Chung W, Ardura, Torres E, Palucka K, Banchereau J, Chaussabel D, Ramilo O. Differential Gene Expression Profiles in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) of Children with Respiratory Syncytial Virus (RSV) and Influenza Virus (Flu) Infections. In: 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2005; Washington, DC, US.; 2005.
34. Mejías A, Ardura MI, Glaser C, Estripeaut D, Torres E, Banchereau J, Chaussabel D, Ramilo O. Transcriptional signatures as a new approach for assessing disease severity in children with Respiratory Syncytial Virus (RSV) bronchiolitis. In: 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2006; San Francisco, CA.