
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E SAÚDE DA
CRIANÇA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

ANDRÉ LUIZ BECKER

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA STAT3 NA INFECÇÃO VÍRUS SINCICIAL
RESPIRATÓRIO
E RESPOSTA DE CÉLULAS T CD8 DE MEMÓRIA
PORTO ALEGRE
2016**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

ANDRÉ LUIZ BECKER

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA STAT3 NA INFECÇÃO VÍRUS SINCICIAL
RESPIRATÓRIO E RESPOSTA DE CÉLULAS T CD8 DE MEMÓRIA**

Porto Alegre, 2016

ANDRÉ LUIZ BECKER

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA STAT3 NA INFECÇÃO VÍRUS SINCICIAL
RESPIRATÓRIO E RESPOSTA DE CÉLULAS T CD8 DE MEMÓRIA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina /Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina-Pediatria e Saúde da Criança.

Orientador: Prof. Dr. Renato Tetelbom Stein
Co-orientadora: Prof.^a Dr^a. Ana Paula Duarte Souza

Porto Alegre, 2016

Ficha Catalográfica

B395a Becker, André Luiz

Avaliação do papel da proteína STAT3 na infecção Vírus Sincicial Respiratório e resposta de células T CD8 de memória / André Luiz Becker .
– 2016.

78 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Renato Tetelbom Stein.

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Duarte de Souza.

1. Imunologia Clínica. 2. Células T CD8 de memória. 3. STAT3. 4. Vírus Sincicial Respiratório. 5. Memória Imunológica. I. Stein, Renato Tetelbom. II. Souza, Ana Paula Duarte de. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre”.

Albert Einstein

Dedicatória

Aos meus professores, muitos já falecidos, que desde as séries iniciais abriram meu coração para o aprendizado.

Aos milhares de pacientes que, ao longo de décadas de trabalho médico, tanto me ensinaram.

Aos meus inspirados orientadores e professores desta magnífica instituição e meus generosos jovens colegas.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos aos meus orientadores Prof. Dr. Renato Tetelbom Stein e Prof.^a Dr^a. Ana Paula Duarte Souza, pela liderança, por todo o auxílio e sabedoria que sempre me emprestaram.

Aos colegas que me guiaram pelos caminhos do laboratório nos experimentos: Deise Nascimento, Krist Antunes, Mariana D'Ávila da Cunha; aos caríssimos colegas do Instituto de Pesquisas Biomédicas, em especial aos do Laboratório 31 do Centro *Infant* de Imunologia e Alergologia Pediátrica e aos incansáveis professores, nossa secretária Carla Rothmann, aos caríssimos colegas do Mestrado em Pediatria e Saúde da Criança e aos demais que muito apoiaram num período difícil. Ao colega Rodrigo Benedetti Gassen pelo apoio e ao Prof. Dr. Cristian Roncada pelo precioso ensinamento de ferramentas de busca com operadores Booleanos. Aos dedicados professores da banca examinadora: Florencia M. Barbé-Tuana, PhD (UFRGS); Thiago J. Borges, PhD (PUCRS) e Rita Mattiello PhD (PUCRS); por todo o apoio e ensinamentos com sua crítica muito construtiva.

À minha compreensiva família pelo apoio.

Agradeço também à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos recebida.

RESUMO GERAL

Introdução: A formação de células T de memória é fundamental na imunidade adaptativa, quando da reexposição a um dado antígeno, pois permite uma resposta praticamente imediata neste novo desafio. Esta condição é muito importante nas infecções, vacinas e no câncer. As células T CD8 (LTCD8) apresentam características próprias dentre os demais linfócitos, também no tocante a formação de suas subpopulações de células de memória. O intrincado mecanismo de citocinas e fatores de transcrição que definem os diferentes fenótipos resultantes, vem sendo recentemente estudados. Um fator relevante neste processo é a ativação dos transdutores de sinal para o núcleo (STATs), que ativam a transcrição do DNA. Deste grupo a STAT3 (*Signaling Transducer and Activator of Transcription 3*) parece ter papel crucial na formação de LTCD8 de memória. **Objetivos:** Aprofundar o conhecimento sobre a formação de células T de memória, em especial as LTCD8, através da proteína STAT3 fundamental neste processo; revisar a literatura conhecida e ampliar com experimentos originais o enfoque clínico-laboratorial de imunidade ao VSR no tocante à relação CD8-STAT3. **Metodologia:** Artigo de revisão: Foi feita uma busca na base de dados utilizando operadores Booleanos na plataforma PUBMED, sobre a relação entre STAT3 e o desenvolvimento das células T CD8 de memória. Os artigos foram analisados e resumidos neste trabalho. Artigo original: Foi realizada uma análise *in vitro* sobre o efeito do VSR na STAT3 e sua relação com os diferentes perfis de LTCD8 de memória.

Resultados: Artigo de revisão: Foram selecionados dezessete arquivos, sendo que destes dois foram excluídos. Artigo original: O VSR reduziu a expressão de STAT3 no lavado nasal de crianças infectadas, porém aumentou a ativação de STAT3 via fosforilação *in vitro* em células mononucleares infectadas.

Conclusão: A STAT3 é parte importante na definição do perfil dos LTCD8 de memória e sofre alterações relevantes quando da infecção pelo VSR, indicando uma nova possibilidade de alvo para imunoterapia.

Palavras chave: STAT3, célula CD8 de memória, Vírus Sincicial Respiratório.

OVERVIEW:

Introduction: The formation of memory T cells is critical in adaptive immunity, when re-exposure to an antigen, it allows immediate response in this new challenge. This condition is very important in infections, vaccines and cancer. CD8 T cells present specific characteristics among the other lymphocytes regarding the formation of its memory cell populations. Recently the complex mechanism of cytokines and transcription factors that direct to the different phenotypic outcomes has been studied. A relevant factor in this process is the activation of signal transducers to the nucleus (STATs), which activate the transcription of DNA. From this group STAT3 (Signaling Transducer and Activator of Transcription 3) seems to have a crucial role in the formation of memory CD8 T cells.

Objectives: To deepen the knowledge about the formation of memory T cells, mostly CD8 T cell, through STAT3 protein in this process. Also to review the literature and expand with original experiments the clinical and laboratory approach of immunity to RSV regarding the CD8-STAT3 relationship. **Methods:**

Review article: A search was made in the database using Boolean operators in PUBMED platform on the relationship between STAT3 and development of CD8 memory T cell subsets. The selected articles were analyzed and summarized.

Original article: In vitro experiments were performed to analyze the effect of RSV in STAT3 and its relationship with the different memory CD8 T cell profiles.

Results: STAT3 is an important part in defining the profile of memory CD8 T cells and undergoes significant changes during RSV infection.

Conclusion: STAT plays a central role in the outcome of the memory CD8 T cell development. STAT3 activation and expression are indeed influenced by RSV infection in human and murine models, which suggests new possibilities for therapeutical interventions.

Key words: STAT3, CD8 memory T cell, RSV.

LISTA DE FIGURAS:

CAPÍTULO II

Artigo de Revisão

FIGURA-1: As vias de ativação de STAT3 por fosforilação.....	35
FIGURA-2: Fluxograma de seleção dos artigos para revisão.....	37

CAPÍTULO III

Artigo Original

FIGURA-1: Análise da expressão relativa de STAT3 em pacientes infectados pelo VSR.....	64
FIGURA-2: Análise da expressão de STAT3 em células mononucleares....	65
FIGURA-3: Análise de células LTCD8 em cultura com VSR usando ou não o inibidor AG490.....	66
FIGURA-4: Análise da fosforilação de STAT3 em células dendríticas humanas derivadas de monócitos incubadas com VSR.....	67
FIGURA-5: Análise de células T CD8 em cultura com VSR por 4 dias, usando ou não o inibidor AG490.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E GLOSSÁRIO

AD-HIES- Autosomal Dominant Hiper IgE Syndrome – síndrome de imunodeficiência primária com larga produção de IgE e imunodeficiência com maior risco de infecções recorrentes fúngicas e bacterianas e propensão a neoplasias., que hoje, se sabe ter ausência de STAT3. Em português: Síndrome Hiper-IgE.

Anexina V- Anexina 5 é usada como marcador de morte celular por apoptose, evento que deve ser reduzido quando há transformação do grupo de células estudadas para um perfil de memória.

Balb/c- Linhagem dos camundongos utilizados nos experimentos.

Bcl-1, Bcl-2- (*B cell Lymphoma*) são genes reguladores contra a morte celular por apoptose (anti-apoptóticos), esta família foi identificada primeiramente em linfomas, como genes de sobrevivência.

BMDCs- *Bone marrow dendritic cells* – células dendríticas derivadas da medula óssea.

Caspases- Cisteíno-asparto-protesases, são enzimas envolvidas na morte celular programada, por apoptose, necroptose e piroptose.

CCR7- Receptor de quimiocinas 7 caracteristicamente expresso nas células virgens e nas de memória central é um receptor de localização “*homing*” junto ao linfonodo, seu marcador é o CD197.

CD- *Cluster of differentiation*, marcadores de diferenciação celular.

CD127- Receptor de interleucina-7 IL-7R.

CD25- Marcador de ativação linfocitária.

CD27- Marcador de memória central ou célula virgem.

CD28- Marcador de memória central ou célula virgem.

CD3- Marcador de linfócitos “T” é parte do RCT = receptor de células T.

CD4- Marcador de linfócitos T auxiliares.

CD44- Marcador de célula T de memória.

CD45RA- Marcador de células virgens humanas.

CD45RO- Marcador de célula de memória.

*À medida que as células T adquirem experiência com o antígeno vão aumentar a expressão de CD45RO e perder a de CD45RA.

CD62L- Ligante do CD62, é um marcador de células virgens e de células de memória central (receptor de localização-“*homing*” junto ao linfonodo).

CD8- Marcador de linfócitos T citotóxicos.

DPOC- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.

Eomes- Eomesodermina, fator de transcrição da T-box do linfócito T.

ERK- extracellular signal-regulated kinase.

IELs- *Intra-epithelial Lymphocytes* – linfócitos intraepiteliais T CD8 do intestino e com marcadores de memória (TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8⁺ e CD45RO⁺)

HI-LOW- sinalizam alta ou baixa expressão de um marcador

IgE- imunoglobulina E (anticorpo)

IL-2, 6, 7, 10, 15, 21, 27 Interleucinas

JAK- Janus Kinases – é uma família de proteíno-tirosinoquinases não-receptoras que inclui JAK-1, JAK-2, JAK-3 e Tyk-2 (tirosinoquinase-2), que se associam aos domínios de receptores de citocinas. Quando são fosforiladas elas induzem a fosforilação das STATs as quais vão atuar

na transcrição de sinal junto ao núcleo, agindo na função e diferenciação celulares.

JAK-STAT- é um complexo destes dois sistemas de proteínas, de ativação celular junto à membrana celular. (JAK= Janus Kinase).

KLRG1- *Killer-cell lectin like receptor G1*, marcador de células efectoras.

KO- *Knockout*, gene deletado o nocauteado^{KO}, silenciado para experimento.

LCMV- Vírus da coriomeningite linfocítica.

LT CD8 efector- CD45RA⁺ CD45RO⁻ CCR7⁻ CD62L⁻

LT CD8 virgem- CD45RA⁺ CD45RO⁻ CCR7⁺ CD62L⁺

MPECs- *memory precursor effector cells*, células precursoras de memória CD127^{hi} KLRG1^{low}

PD-L1- *Programmed Death Ligand 1-* ligante de receptor de morte programada.

DP-R1- Receptor de morte programada 1.

RPMI- Roswall Park Memorial Institute - meio de cultura de células.

Sca-1- É uma molécula de membrana característica de células tronco e serve como marcador para células de memória T CD8 central.

SFB- Soro fetal bovino (complementa o meio de cultura).

SLEC- *Short Lived Effector Cell* – células T efectoras de vida curta.

SOCS3- *Silencer of Citokines 3-* grupo de proteínas que reduzem a atividade das citocinas.

STAT3- *Signaling Transducer and Activator of Transcription 3*, proteína sinalizadora ativadora da transcrição nuclear.

Tbet- *T-box expressed in T cells-* efector da T-box que gera um perfil Th1 associado ao IFN- γ , induzido por STAT1.

Tbox- Conjunto de proteínas de transcrição encontrados em diferentes grupos de células.

Tcm- Célula T de memória central (T central memory):

CD45RA⁻ CD45RO⁺ CCR7⁺ CD62L⁺

TCR- Receptor de células T.

Tem- Célula T de memória efectora (T effector memory):

CD45RA⁻ CD45RO⁺ CCR7⁻ CD62L⁻

TG 101348- Inibidor seletivo de JAK-2 e conseqüentemente bloqueador de STAT3- Signaling Transducer and Activator of Transcription 3.

TIM-3- *T cell inhibitory molecule* (molécula inibidora de células T).

TGF- β - Fator de crescimento tumoral- β .

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α .

Tyk2- Enzima tirosinoquinase-2.

VSR- Vírus Sincicial Respiratório.

Zap70- Marcador genérico de células T.

SUMÁRIO:

DEDICATÓRIA.....	6
AGRADECIMENTOS.....	7
RESUMO GERAL.....	8
OVERVIEW:.....	9
LISTA DE FIGURAS:.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E GLOSSÁRIO.....	11
SUMÁRIO:.....	14
1. CAPÍTULO I	16
1.1 APRESENTAÇÃO.....	17
2. CAPÍTULO II.....	27
2.1 ARTIGO DE REVISÃO.....	28
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
OBJETIVO.....	35
METODOLOGIA.....	35
RESULTADOS.....	36
DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
3 CAPÍTULO III.....	54
3.1 ARTIGO ORIGINAL.....	55
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
INTRODUÇÃO.....	58

MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS.....	63
DISCUSSÃO.....	69
CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
4. CAPÍTULO IV.....	75
4.1 CONCLUSÕES.....	76
4.2 PERSPECTIVAS FUTURAS:.....	76
5. ANEXOS.....	77
5.1 INSCRIÇÕES E PROTOCOLOS:.....	78

1. CAPÍTULO I

APRESENTAÇÃO

JUSTIFICATIVA

OBJETIVOS

REFERÊNCIAS

1.1 APRESENTAÇÃO

O Vírus Sincicial Respiratório é sabidamente, a causa predominante de pneumonia e bronquiolite em bebês menores de um ano. É um dos mais importantes agentes virais e pode causar doenças severas no trato respiratório de lactentes e crianças em todo o mundo (1). Praticamente todas as crianças são infectadas antes dos dois anos, sendo que nestas a reinfeção é extremamente comum, mesmo sem haver variação dos antígenos virais. Isto resulta em expressiva mortalidade e morbidade, gerando sofrimento e alto impacto nos custos dos sistemas de saúde. Há mais de 30.000.000 infecções pelo VSR por ano com uma taxa estimada de 200.000 mortes em crianças abaixo do 5 anos em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde é uma causa *mortis* importante (2).

Também no paciente idoso, nos imunocomprometidos, ou com doença pulmonar grave como DPOC, o VSR tem um impacto muito marcante(3). De outra forma, nos adultos saudáveis a infecção pelo VSR costuma ser leve, semelhante a um resfriado comum.

O VSR foi primeiramente isolado em chimpanzés em 1955 e logo após de crianças infectadas. Durante muitos anos seu cultivo foi ineficiente e só a partir de 1981, a sua biologia foi mais bem compreendida. É do gênero *Pneumovirus*, da família do *Paramoxivírus* da ordem dos *Mononegavírus*. Possui dois subtipos humanos: A e B. Tem como pares uma forma bovina (BRSV), uma ovina (ORSV) e da pneumonia murina (PVM). É um vírus de fita simples de RNA negativa. O VSR codifica onze proteínas separadas, sendo desta forma mais complexo que a maioria dos membros dos *Paramyoxivírus*, os quais tipicamente apresentam seis a sete RNA_m, codificando de sete a nove proteínas separadamente. Seu envelope apresenta em sua superfície duas proteínas principais: G (altamente glicosilada e variável), que funciona para adesão às outras células e F que é a proteína de fusão. Também na superfície está a viroporina-canal de íons (SH), mas esta difere dos anteriores por não servir como antígeno de proteção ou neutralização. Na face interna do envelope apresenta a proteína M (montagem). No interior há um

ribonucleocapsídeo com as proteínas: N que faz a ligação ao RNA; P fosfoproteína, L uma polimerase, M2-1 de processamento de transcrição. A formação do capsídeo é função de N e P; a replicação de RNA é função da N, P e L; e N, P, L e M2-1 atuam na transcrição. Além disso, o vírus secreta duas proteínas não estruturais NS-1 e NS-2 que interferem na resposta imune, inibindo a indução e sinalização de IFN-1 e inibindo apoptose. O capsídeo protege contra a degradação o frágil RNA e também previne a exposição do RNA aos receptores de reconhecimento de padrão (PRR) nas células hospedeiras, os quais iniciam uma resposta imune inata (4).

Até o momento não há vacina ou tratamento eficazes, seja na prevenção da primeira infecção, ou para evitar recidivas. Existem tratamentos como um anticorpo monoclonal humanizado (Palivizumab), mas que, com alto custo, e de sendo de aplicação preventiva, tem resultado parcial nos pacientes expostos; tendo difícil acesso e utilização. Além disso, não existem medicações antivirais disponíveis que sejam eficazes no combate ao vírus.

Na década de 1960 uma tentativa de vacina com o vírus inativado por formalina, embora tenha gerado boa quantidade de anticorpos teve resultado temerário, gerando pior evolução na infecção natural pelo vírus, inclusive duas mortes registradas (5–8). Desde então vem se buscando entender melhor o papel da imunidade no tocante a evolução do quadro clínico seja no primeiro contato ou na reinfecção. Apesar de se demonstrar uma resposta adaptativa específica contra o VSR, tal fato não confere imunidade protetora e reinfecções são comuns ao longo da vida. A presença de anticorpos contra o vírus parece não ser garantia de proteção contra a doença, uma vez indivíduos que possuem anticorpos neutralizantes ainda são susceptíveis a reinfecções com a mesma cepa viral. Estes achados sugerem que os anticorpos neutralizantes e as células T de memória não estejam suficientemente capazes de gerar proteção efetiva após a infecção natural pelo VSR (9).

Durante a infecção, uma complexa atividade imunológica é desencadeada. Isto se manifesta por atividade imune em vários pontos na imunidade inata e na adaptativa. Alguns fatores parecem ter uma ação paradoxal como a IL-10 que inibe parcialmente a reação inflamatória, mas que quando inibida parece levar a um desfecho mais grave da doença (10).

As células dendríticas também exercem um papel marcante nas infecções virais, apresentando antígenos e modulando a resposta linfocitária com a síntese de interferons (IFNs). Quando infectadas, estas células também se tornam uma porta de entrada para o VSR, reduzindo a ativação local das células efetoras.

Células T CD8 específicas para o VSR atuam diretamente no combate à infecção e eliminação do vírus, no entanto a infecção primária pelo VSR não gera resposta protetora adequada de células T CD8 (2). Parece plausível que a pouca eficiência na resposta imunológica inclua produção inadequada de células memória contra o VSR, possivelmente por alguma interferência do VSR na diferenciação destes linfócitos.

O efeito imunomodulador do VSR na indução de células T CD8 e regula o influxo de células T CD8 específicas para o antígeno para os pulmões durante a infecção. A PD-L1 é induzida nas células epiteliais brônquicas infectadas e liga-se a DP-R1, presente nas células LTCD8, inibindo a ativação local destas células LTCD8. As proteínas do VSR NS1 / NS2 antagonizam a resposta IFN tipo I, que leva à supressão de da ativação da função efetora das células LTCD8. O VSR impede o influxo de células LTCD8 (que são CX3CR1⁺) com a variante segregada da sua proteína G. Esta proteína G contém um motivo conservado CX3C, imitando fractalcina, e reduz a migração de células T CX3CR1⁺ para o pulmão (2,3). A infecção do pulmão pelo VSR suprime a ativação do LTCD8 de efetora e a formação de LTCD8 de memória (11).

Existem proteínas cuja função é a transmissão dos sinais recebidos pelos receptores na superfície das células e ativação da transcrição no núcleo de genes relacionados ao sinal recebido, gerando modificações funcionais na célula. Este grupo inclui as proteínas ativadoras da transcrição de sinais (STATs) que operam como condutoras da sinalização percebida pelos receptores de interleucinas na superfície das células do sistema imunológico ativando a transcrição de genes responsáveis pelas características funcionais de cada célula. No caso específico dos linfócitos LTCD8 de memória, recentemente foi demonstrado que uma mutação na proteína STAT3 (*Signaling Transducer and Activator of Transcription 3*) impede a formação das células LTCD8 de memória (12). Estes dados indicam que a diminuição de

STAT3 pode influenciar na resposta de memória CD8. A formação das células LTCD8 de memória é induzida pela interleucina IL-21 que traduz sua ação através da ativação de STAT3 que age junto ao núcleo do linfócito. A via da STAT3 parece ser crítica na manutenção de um pool de células de memória CD8 funcionalmente maduras através de IL-21 IL-10 (10).

1.2 JUSTIFICATIVA:

Atualmente ainda não se conhece totalmente os mecanismos da geração de células LTCD8 de memória, as quais são cruciais na defesa contra infecções virais. A geração destas LTCD8 guarda profunda relação com a atividade da STAT3. Deste modo foi realizada uma revisão da literatura no tocante à relação de STAT3 com a formação dos perfis de LTCD8 de memória.

Dada a real gravidade e morbidade da infecção pelo VSR em crianças pequenas e pacientes imunocomprometidos, bem como a falta de uma vacina ou tratamentos eficazes, abordamos em experimentos num artigo original a relação entre o VSR, a STAT3 e o perfil de células T CD8 de memória geradas quando da infecção por este vírus.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivos gerais da dissertação:

Revisar as evidências sobre a participação específica da STAT3 na formação de células TCD8 de memória.

1.3.2 Objetivos específicos

1.3.2.1-Artigo de Revisão:

Revisar a literatura científica para uma melhor compreensão sobre a função da STAT3 na formação das células LTCD8 de memória.

1.3.2.2-Artigo Original:

Estudar *in vitro* o efeito do VSR na STAT3 e sua relação com os diferentes perfis de células LTCD8 de memória.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-Associated Hospitalizations Among US Children, 1980-1996. *JAMA* [Internet]. American Medical Association; 1999 Oct 20 [cited 2015 Nov 2];282(15):1440–6. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=192009>
 2. Rossey I, Sedeyn K, De Baets S, Schepens B, Saelens X. CD8+ T cell immunity against human respiratory syncytial virus. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;32(46):6130–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X14012213>
 3. Openshaw PJ, Chiu C. Protective and dysregulated T cell immunity in RSV infection. *Curr Opin Virol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;3(4):468–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2013.05.005>
 4. Mukherjee S, Lukacs NW. Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines [Internet]. 2013. 139-154 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-38919-1>
 5. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1969 Apr [cited 2015 Oct 8];89(4):422–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4305198>
 6. Hurwitz JL. Respiratory syncytial virus vaccine development. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. Taylor & Francis; 2014 Jan 9 [cited 2015 Nov 11]; Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/erv.11.120?journalCode=ierv20>
 7. Connors M, Giese NA, Kulkarni AB, Firestone CY, Morse HC, Murphy BR. Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *J Virol* [Internet]. 1994 Aug [cited 2015 Oct 8];68(8):5321–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=236482&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 8. Murphy BR, Walsh EE. Formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine induces antibodies to the fusion glycoprotein that are deficient in fusion-inhibiting activity. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1988 Aug [cited 2015 Nov 11];26(8):1595–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=266671&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
-

-
9. Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr* [Internet]. 2003 Nov [cited 2015 Nov 2];143(5 Suppl):S112-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615709>
 10. Cui W, Liu Y, Weinstein JSS, Craft J, Kaech SMM. An Interleukin-21-Interleukin-10-STAT3 Pathway Is Critical for Functional Maturation of Memory CD8+ T Cells. *Immunity* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Nov 23 [cited 2015 Nov 16];35(5):792–805. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761311004651>
 11. Chang J, Braciale TJ. Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+ T-cell effector activity and peripheral CD8+ T-cell memory in the respiratory tract. *Nat Med* [Internet]. 2002 Jan [cited 2016 Jul 31];8(1):54–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11786907>
 12. Olson JA, Jameson SC. Keeping STATs on memory CD8+ T cells. *Immunity* [Internet]. Elsevier; 2011 Nov 23 [cited 2016 Jan 29];35(5):663–5. Available from: <http://www.cell.com/article/S1074761311004675/fulltext>
 13. Colić M, Jandrić D, Stojić-Vukanić Z, Antić-Stanković J, Popović P, Vasilijić S, et al. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro using granulocyte-macrophage colony stimulating factor and low concentration of interleukin-4. *Vojnosanit Pregl* [Internet]. Jan [cited 2016 Aug 2];60(5):531–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14608830>
 14. Morse MA, Zhou LJ, Tedder TF, Lyerly HK, Smith C. Generation of dendritic cells in vitro from peripheral blood mononuclear cells with granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha for use in cancer immunotherapy. *Ann Surg* [Internet]. 1997 Jul [cited 2016 Aug 2];226(1):6–16. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1190901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 15. Zou GM, Tam YK. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw* [Internet]. 2002 Jul 5 [cited 2016 Aug 2];13(2):186–99. Available from: http://www.jle.com/fr/revues/ecn/e-docs/cytokines_in_the_generation_and_maturation_of_dendritic_cells_recent_advances_90214/article.phtml?tab=texte
 16. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* [Internet]. 1992 Dec 1 [cited 2016 Jun 3];176(6):1693–702. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2119469&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
-

-
17. Liu T, Castro S, Brasier AR, Jamaluddin M, Garofalo RP, Casola A. Reactive oxygen species mediate virus-induced STAT activation: Role of tyrosine phosphatases. *J Biol Chem*. 2004;279(4):2461–9.
 18. Iyer SS, Ghaffari AA, Cheng G. Lipopolysaccharide-Mediated IL-10 Transcriptional Regulation Requires Sequential Induction of Type I IFNs and IL-27 in Macrophages. *J Immunol* [Internet]. NIH Public Access; 2010 Nov 1 [cited 2016 Jul 24];185(11):6599–607. Available from: [/pmc/articles/PMC4103176/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4103176/?report=abstract)
 19. Bode JG, Ehltling C, Häussinger D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal* [Internet]. 2012 Jun [cited 2016 May 17];24(6):1185–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330073>
 20. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Kuby Immunology*. *Kuby Immunol* [Internet]. 2007;6:574. Available from: <http://books.google.com/books?id=oOsFf2WfE5wC&pgis=1>
 21. Kuchipudi S V. The Complex Role of STAT3 in Viral Infections. *J Immunol Res* [Internet]. 2015;2015:272359. Available from: [/pmc/articles/PMC4496485/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4496485/?report=abstract)
 22. Frank DA. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Lett* [Internet]. 2007 Jun 28 [cited 2016 Jul 29];251(2):199–210. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129668>
 23. Jie Z, Dinwiddie DL, Senft AP, Harrod KS. Regulation of STAT signaling in mouse bone marrow derived dendritic cells by respiratory syncytial virus. *Virus Res* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;156(1–2):127–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3726278&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 24. Acacia de Sa Pinheiro A, Morrot A, Chakravarty S, Overstreet M, Bream JH, Irusta PM, et al. IL-4 induces a wide-spectrum intracellular signaling cascade in CD8+ T cells. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2016 Apr 6];81(4):1102–10. Available from: <http://www.jleukbio.org/content/81/4/1102.long>
 25. Siegel AM, Heimall J, Freeman AF, Hsu AP, Brittain E, Brenchley JM, et al. A critical role for STAT3 transcription factor signaling in the development and maintenance of human T cell memory. *Immunity* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Nov 23 [cited 2016 Jan 29];35(5):806–18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3228524&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 26. Ives ML, Ma CS, Palendira U, Chan A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations
-

underlying autosomal dominant hyper-IgE syndrome impair human CD8(+) T-cell memory formation and function. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2016 Jan 29];132(2):400–11.e9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3785237&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

27. Molavi O, Ma Z, Hamdy S, Lai R, Lavasanifar A, Samuel J. Synergistic antitumor effects of CpG oligodeoxynucleotide and STAT3 inhibitory agent JSI-124 in a mouse melanoma tumor model. *Immunol Cell Biol* [Internet]. Australasian Society for Immunology Inc.; 2008 Jan 8 [cited 2015 Dec 24];86(6):506–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2008.27>
28. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2003 Jan [cited 2016 Mar 21];21:685–711. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615891>