



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS

**“UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE
INFLAMACIÓN, ESTRÉS OXIDATIVO Y VITAMINA D COMO FACTORES
PRONÓSTICOS EN LACTANTES CON BRONQUIOLITIS AGUDA”**

GLORIA M^a MORENO SOLÍS

TESIS DOCTORAL

CÓRDOBA 2014

TITULO: *UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN, ESTRES OXIDATIVO Y VITAMINA D COMO FACTORES PRONOSTICOS EN LACTANTES CON BRONQUIOLITIS AGUDA*

AUTOR: *Gloria Maria Moreno Solís*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2014
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: “UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN, ESTRÉS OXIDATIVO Y VITAMINA D COMO FACTORES PRONÓSTICOS EN LACTANTES CON BRONQUIOLITIS AGUDA”

DOCTORANDO/A: Gloria M^a Moreno Solís

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

Juan Luis Pérez Navero, DNI 30060508-Z, Profesor Titular de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba y Jefe de Servicio de Pediatría, Críticos y Urgencias Pediátricas del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, hago constar que el proyecto de Tesis Doctoral reseñada anteriormente ha sido realizado bajo mi dirección conjuntamente con el Dr. Javier Torres Borrego, considero que el trabajo realizado por la doctoranda es de gran calidad científica y reúne las condiciones para ser defendido ante el Tribunal correspondiente.

Es de destacar la consecución de varios premios, tanto por el proyecto científico original como por la presentación de los resultados en diferentes Sociedades Científicas, así como la publicación de trabajos derivados en revistas de impacto, lo que muestra la calidad del trabajo.

Por todo ello, solicito que la doctoranda Dña. Gloria M^a Moreno Solís pueda optar al grado de Doctor por la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba y tras haber revisado el manuscrito autorizo la presentación de la tesis doctoral para su defensa.

Córdoba, 11 de Junio 2014

Firma del director

Fdo. Prof. Dr. Juan Luis Pérez Navero



TÍTULO DE LA TESIS: “UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN, ESTRÉS OXIDATIVO Y VITAMINA D COMO FACTORES PRONÓSTICOS EN LACTANTES CON BRONQUIOLITIS AGUDA”

DOCTORANDO/A: D^a. GLORIA MORENO SOLÍS

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

El proyecto de tesis doctoral presentado en su momento versa sobre el estudio de la respuesta inmunológica e inflamatoria en lactantes menores de 12 meses hospitalizados por bronquiolitis aguda, patología que constituye el principal motivo de ingreso en niños durante los meses de invierno. Dicho proyecto se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos planteados en el mismo.

Los resultados obtenidos han permitido la elaboración de unas conclusiones concisas que pueden en un futuro próximo ser la base de intervenciones estratégicas para prevenir ingresos por esta enfermedad y/o detectar los casos que pueden tener mayor gravedad. Como fruto de este trabajo, se han generado tres artículos científicos, dos de ellos ya aceptados para su publicación en revistas específicas de Pediatría.

Por todo ello, considero que el trabajo realizado cumple las condiciones la presentación de la tesis doctoral ante el Tribunal correspondiente.

Córdoba 11 de junio de 2014

Firma del director

Fdo. Dr. Javier Torres Borrego

FINANCIACIÓN

La tesis doctoral ha sido posible gracias a fondos de APRODEPECO (Asociación para el desarrollo de la Pediatría en Córdoba) y al Premio recibido por el proyecto de investigación “7 ml”, concedido por la Sociedad Española de Neumología Pediátrica en el Congreso Nacional en Mayo de 2010.

COMUNICACIONES

Algunos de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral han sido objeto de comunicaciones en diversos Congresos Nacionales.

1.- Comunicación oral: G. Moreno Solís, J. Torres Borrego, F. Fernández Gutiérrez, MJ. De la Torre Aguilar, JL. Pérez Navero. Respuesta inflamatoria en niños ingresados por bronquiolitis aguda. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología Clínica y Alergología Pediátrica, celebrado en Madrid del 8 al 10 de Mayo 2014. **Primer premio a la mejor comunicación oral libre.**

2.- Comunicación oral: M. Cruz Cañete, G. Moreno Solís, F. Fernández Gutiérrez, J. Torres Borrego, J.L Pérez Navero. Niveles bajos de Vitamina D en niños ingresados por bronquiolitis aguda. VII Congreso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica, celebrado en Santiago de Compostela del 6 al 8 de Marzo 2014.

3.- Comunicación oral: MJ de la Torre Aguilar, JL Pérez Navero, G Moreno Solís, F Llorente Cantarero, J Torres Borrego, C Muñoz Villanueva. “Respuesta inflamatoria a nivel sistémico y de mucosa nasal en bronquiolitis aguda”.62º Congreso de la Asociación Española de Pediatría, celebrado en Sevilla del 6 al 8 de Junio 2013.

4.- Comunicación del premio en Sociedad Española de Neumología Pediátrica: J. Torres Borrego, G. Moreno Solís, F. Fernández Gutiérrez, JL Gómez-Chaparro Moreno, AB Molina Terán, JL Pérez Navero, M Gil Campos. “Utilidad de *la determinación de citoquinas, estrés oxidativo, estado de la vitamina D y proteómica como factores pronósticos en la bronquiolitis aguda*”. Presentación del trabajo seleccionado como finalista y becado en el XXXIV Congreso de la Sociedad de Neumología Pediátrica celebrado en San Sebastián, en Mayo 2012.

ARTÍCULOS (Publicados o en vías de publicación en revistas con factor de impacto).

1. **Artículo de revisión:** Torres Borrego J, Moreno Solís, G, Molina Terán AB. Diet for the prevention of asthma and allergies in early childhood: much ado about something? *Allergol Immunopathol.* 2012 40(4):244-52. (Anexo 1)

2. **Artículo original:** Moreno Solís G, Torres Borrego J, De la Torre Aguilar MJ, Fernández Gutiérrez F, Llorente Cantarero FJ, Pérez Navero JL .Analysis of the local and systemic inflammatory response in infants hospitalized due to Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Allergol Inmunopathol* 2014 DOI: 10.1016/j.aller.2014.02.002 (Pendiente de fecha de publicación). (Anexo 2)

3. **Artículo original:** Moreno Solís G, Fernández Gutiérrez F, Torres Borrego J, Torcello R, Pérez Navero JL. Low serum 25-hydroxyvitamin D levels and bronchiolitis severity in Spanish infants. Aceptado para revisión en *European Journal of Pediatrics* (pendiente de contestación por revisores y editor de la revista).

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
I.INTRODUCCIÓN	17
MÓDULO1. Bronquiolitis aguda.....	17
1. Definición.....	17
2.Etiología.....	19
2.1Virus respiratorio sincitial	19
2.2Otros virus.....	21
3. Epidemiología	33
3.1 Incidencia y prevalencia	33
3.2 Patrón geográfico y estacional	35
3.3 Transmisión de la enfermedad	36
4. Fisiopatología	36
5. Factores de riesgo	39
6. Clínica.....	42
6.1 Criterios de gravedad-hospitalización de la bronquiolitis aguda	43
6.2 Escalas clínicas de gravedad.....	44
7. Diagnóstico.....	45
7.1Diagnóstico del agente etiológico.....	46
7.2Pruebas complementarias de diagnóstico	46
8.Diagnóstico diferencial.....	47
9.Tratamiento	48
9.1Tratamiento aplicado de forma ambulatoria	48
9.2 Tratamiento hospitalario.....	48
9.2.1 Medidas generales/ Tratamiento de soporte.....	49
9.2.2 Oxígeno	49
9.2.3Heliox.....	50
9.2.4 Fármacos	50
10. Estrategias de profilaxis en la actualidad	54
10.1Recomendaciones higiénico-sanitarias	55
10.2 Profilaxis pasiva	56
10.2.1Inmunoglobulina policlonalhiperinmune (IGIV)	56
10.2.2Anticuerpos monoclonales: Palivizumab	56
10.3Profilaxis activa.....	59

MÓDULO 2. Bronquiolitis aguda y respuesta inflamatoria. Respuesta inflamatoria: Citoquinas-quimiocinas en la bronquiolitis aguda.....	61
1.Factores relacionados con el huésped en la respuesta inmune-inflamatoria.....	61
2.Respuesta inmune en bronquiolitis aguda	62
2.1Inmunidad innata.....	62
2.2 Inmunidad adaptativa	62
3.Respuesta inflamatoria: Citoquinas y quimiocinas en la bronquiolitis aguda	63
3.1Citoquinas y quimiocinas en la respuesta inmune frente a VRS	68
3.2 Factores que influyen en la polarización en la respuesta Th-1/ Th-2 en bronquiolitis aguda	68
3.2.1Predominio de la respuesta Th1/Th2 en bronquiolitis aguda	68
3.2.1.1 Predominio de la respuesta Th2 en bronquiolitis aguda.....	68
3.2.1.2 Déficit de respuesta Th1 en bronquiolitis aguda.....	70
3.2.2 Patrón de citoquinas-quimiocinas en función de la edad	71
3.2.3 Patrón de citoquinas-quimiocinas en función de la gravedad de la bronquiolitis aguda	71
3.2.3.1 Revisión bibliográfica de bronquiolitis aguda en niños Hospitalizados	72
3.2.3.2 Influencia de la genética en bronquiolitis aguda.....	73
3.2.3.3 Revisión bibliográfica de bronquiolitis aguda en pacientes ambulatorios:Cohorte de Tucson	74
3.2.4 Patrón de citoquinas-quimiocinas por el agente causal implicado en la bronquiolitis aguda	75
3.2.5 Patrón de citoquinas-quimiocinas como factores pronósticos en la bronquiolitis aguda	76
3.2.6Patrón de citoquinas-quimiocinas en el seguimiento, tras bronquiolitis aguda.....	79
MÓDULO 3. Estrés oxidativo y bronquiolitis aguda.....	81
1. Formación de radicales libres y mecanismos antioxidantes	81
1.1 Actuación de las especies reactivas del oxígeno sobre las diferentes biomoléculas.	83
1.2 Sistema de defensa antioxidante. Clasificación de los mecanismos de defensa antioxidante	84
2. Estrés oxidativo y patología inflamatoria de las vías respiratorias.....	86
2.1 Estrés oxidativo y asma	87
3. Estrés oxidativo en relación con VRS	89

4. Modulación de estrés oxidativo a nivel pulmonar con antioxidantes.....	92
MÓDULO 4. Vitamina D y bronquiolitis aguda	95
1. Metabolismo y mecanismo de acción de la vitamina D	96
1.1 Metabolismo de la vitamina D.....	96
1.2 Mecanismo de acción de 1,25 vitamina D.....	98
2. Definición y prevalencia de “niveles bajos de vitamina D”	99
3. Acción de la vitamina D sobre el sistema inmune/ enfermedades infecciosas..	100
4. Estudios específicos en relación a Infecciones respiratorias y Bronquiolitis aguda ...	102
5. Vitamina D y predisposición a respuesta th2.....	106
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO	109
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	111
1. Diseño experimental	111
2. Sujetos.....	111
2.1 Criterios de inclusión	111
2.2 Criterios de exclusión	111
2.3 Selección de sujetos participantes en el estudio.....	112
3. Historia clínica, valoración de la gravedad	113
4. Recolección de muestras	113
4.1 Diagnóstico viral	113
4.2 Marcadores de inflamación, estrés oxidativo y vitamina D.....	114
4.2.1 Recogida de secreciones nasales.	115
4.2.2 Recogida de muestras sanguíneas.	115
5. Instrumentación	115
5.1 Virus BinaxNowRSV-Seegene RV16.....	115
5.2 Luminex® X MAP™ Technology Labscan™ 100.....	117
5.3 Lector de microplacas Synergy HT de Bio-TEK.....	118
5.4 Vitamin D RIA de ImmunoDiagnosticSystem	120
6. Estudio Estadístico	121
IV. RESULTADOS	123
1. Antecedentes personales y familiares. Factores de riesgo de los casos de bronquiolitis aguda	124
1.1 Datos epidemiológicos	124
1.1.1. Datos demográficos y factores de riesgo de los lactantes incluidos en el estudio de parámetros de inflamación y oxidación	126

1.1.2. Datos demográficos y factores relacionados de los lactantes incluidos para la determinación de vitamina D	127
1.2 Antecedentes familiares.....	127
1.3 Evolución temporal de inclusión de pacientes	128
2. Clínica.....	128
2.1 Sintomatología desde el inicio hasta su atención hospitalaria.....	128
2.2 Tiempo de empeoramiento del cuadro de bronquiolitis aguda	129
2.3 Valoración de la gravedad del cuadro clínico.....	130
2.3.1 Valoración de la gravedad al ingreso mediante la puntuación en la escala de Wood-Downes modificada por Ferrés	130
2.3.2 Valoración de la gravedad según Saturación Transcutánea de O ₂ y necesidad de Oxigenoterapia	130
2.4 Ingreso hospitalario por bronquiolitis aguda.....	131
2.4.1 Estancia hospitalaria media.....	131
2.4.2 Ingresos en UCIP	132
2.4.3 Reingresos	132
3. Pruebas complementarias	132
3.1 Diagnóstico virus	132
3.2 Parámetros de inflamación	132
3.2.1 Marcadores de inflamación en aspirado nasal.....	132
3.2.2 Parámetros de inflamación en plasma.....	139
3.2.3 Correlación entre parámetros de inflamación en aspirado nasal y plasma	142
3.3 Biomarcadores de estrés Oxidativo	142
3.3.1 Correlaciones entre parámetros de inflamación y estrés oxidativo	145
3.4 Vitamina D.....	145
V. DISCUSIÓN	149
1. Período de estudio. Epidemia gripe A-VRS 2009-2010.....	149
2. VRS, estudio de otros virus.....	149
3. Datos epidemiológicos de la población del estudio	150
3.1 Edad	150
3.2 Sexo	151
3.3 Lactancia materna	151
3.4 Dermatitis atópica.....	151
3.5 Tabaquismo pasivo parenteral.....	152
3.6 Convivientes (Nº de hermanos	152
3.7 Antecedentes familiares	153

4. Evaluación clínica. Valoración de la gravedad al ingreso	153
5. Biomarcadores de inflamación	155
5.1 Validez de la determinación de citoquinas y quimiocinas en aspirado nasal	155
5.2 Niveles de citoquinas y quimiocinas en aspirado nasal.....	155
5.3 Papel de la edad en la respuesta Th1-Th2	157
5.4 Papel del virus.....	157
5.5 Valoración de los niveles de citoquinas y quimiocinas por gravedad, en función de la necesidad de oxígeno al ingreso.....	158
5.6 Niveles de citoquinas y quimiocinas en plasma	159
6. Biomarcadores de estrés oxidativo	160
6.1 Justificación del estudio de marcadores de estrés oxidativo en bronquiolitis aguda-VRS.....	160
6.2 Marcadores de estrés oxidativo valorados por gravedad de la bronquiolitis aguda	160
6.3 Alteración de marcadores de estrés oxidativo a nivel sistémico en bronquiolitis aguda: ¿Significación clínica	160
6.4 Marcadores de estrés oxidativo sistémicos en bronquiolitis aguda VRS	161
7. Vitamina D	162
7.1 Prevalencia del déficit de vitamina D	162
7.2 Relación de la vitamina D e infecciones de vías respiratorias inferiores	163
7.3 Factores asociados al déficit de vitamina D	164
7.4 Acción inmunomoduladora de la vitamina D	164
7.5 Niveles adecuados de vitamina D.....	165
7.6 Niveles bajos de vitamina D: ¿causa o consecuencia de la infección Respiratoria	166
7.7 Suplementación de la vitamina D	166
VI.CONCLUSIONES.....	167
VII. RESUMEN	169
VIII.BIBLIOGRAFÍA	171
ANEXOS.....	207

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ApoA-1: Apolipoproteína A-1

ARN: Ácido ribonucleico

BA: Bronquiolitis aguda

BA-VRS: Bronquiolitis aguda por VRS

BAL: Lavado broncoalveolar

BHA: Butilhidroxianisol

BovH: Bocavirus humano

BPV: Parvovirus bovino

CAT: Catalasa

CD25: Receptor de IL-2

CMnV: Parvovirus canino

CuZnSOD: Superóxidodismutasa de cobre y zinc

ELISA: Técnicas de enzimoimmunoensayo

ENRs: Especies nitrogenadas reactivas

EO: Estrés oxidativo

EROs: Especies reactivas del O₂

ESPGHAN: Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GPox: Glutación peroxidasa

GSSG: Glutación oxidado

GST: Glutación-S-transferasa

GT: Glutación total

H₂O₂: Peróxido de hidrogeno

hCAP-18: Catelicidina humana antimicrobiana péptido 18

HTLV-1: Virus linfotrópico humano tipo 1

HURS: Hospital Universitario Reina Sofía

IC: Intervalo de confianza

ICC: Insuficiencia cardiaca congestiva

IFN- γ : Interferón gamma

IFN- α : Interferón alfa

IFN- β : Interferón beta

IgA: Inmunoglobulina A

IgE: Inmunoglobulina E

IgG: Inmunoglobulina G

Índice

IGIV: Inmunoglobulina policlonal hiperinmune

IL-2 : Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-9: Interleucina 9

IL-10: Interleucina 10

IL-13: Interleucina 13

IL-15: Interleucina 15

IMIBIC: Instituto Maimónides de investigación Biomédica de Córdoba

iNOs: NO-sintetasa inducible

IVRI: Infección respiratoria de vía inferior

IVRS: Infección respiratoria de vía superior

L: Nucleoproteína mayor del VRS

LPO: Lipoperóxidos

LTC4: Cistenil-leucotrieno C4

MDA: Malondialdehido

MIP-1 α : Proteínas inflamatorias del macrófago 1 α

MIP-1 β : Proteínas inflamatorias del macrófago 1 β

Mpvh: Metapneumovirus

N: Nucleoproteína del VRS

NK: Células natural Killers

NO: Oxido nítrico

NOe: Oxido nítrico en aire espirado

O₂⁻ : Anión superóxido

O₂ : Oxígeno

OH: Radical hidroxilo

ONOO⁻: Aniones peroxinitratos

P: Fosfoproteína del VRS

PaCO₂ : Presión arterial de dióxido de Carbono

PAF: Factor de activación plaquetaria

PaO₂ : Presión arterial de Oxígeno

PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa

PF: Proteína F del VRS

PG: Proteína G del VRS

Piv : Virus parainfluenza

Índice

PMAP: Patrón molecular asociado a patógenos

Redox: Estado óxido-reducción

RRP: Receptores reconocedores de patrones

RTL: Receptor toll like

Rv: Rinovirus

SatcO₂: Saturación Transcutánea de O₂

SDA: Sistema de defensa antioxidante

SOD: Superóxidodismutasa

Th1: Linfocitos T cooperadores tipo 1

Th2 : Linfocitos T helper o cooperadores tipo 2

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TNF- β : Factor de necrosis tumoral beta

UCIP: Unidad de cuidados intensivos pediátricos

UTM-RT: Universal Transport Medium

VDR: Receptor vitamina D

VDBP: Proteína de unión de la vitamina D

VEFG: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VM: Ventilación mecánica

VRS: Virus respiratorio sincitial

WD: Escala de Wood-Downes

WDF: Escala de Wood-Downes modificada por Ferrés

1,25(OH)₂D: 1, 25-dihidroxitamina D o calcitriol

25(OH) D: 25-hidroxitamina D o calcidiol

Abreviaturas de unidades utilizadas en la medición de los parámetros

ng/ml nanogramo por mililitro

nmol/L nanomol por litro

pg/ml picogramos por mililitro

UI Unidad Internacional

μ Mol micromol

μ Mol/ g Hb micromol por gramo de hemoglobina

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.Relación entre la edad y la infección respiratoria causada por el virus influenza A. (Extraída de Reina et al, 2001)30

Tabla 2.Principales características halladas en 100 niños menores de 15 años diagnosticados de infección respiratoria por adenovirus. (Tomada de Reina, 2004)...32

Tabla 3.Factores de riesgo de infección respiratoria de vía respiratoria inferior.....34

Tabla 4.Criterios clínicos de gravedad para la evolución de la bronquiolitis. (Extraída de M. Simó, 2010)44

Tabla 5.Factores de riesgo en relación con la gravedad de la bronquiolitis44

Tabla 6.Escala clínica Wood-Downes modificada por Ferrés45

Tabla 7.Diagnóstico diferencial de bronquiolitis aguda47

Tabla 8.Recomendaciones actuales de inmunoprofilaxis con palivizumab58

Tabla 9.Casos en los que no está recomendado hacer profilaxis59

Tabla 10. Patrones Th1 y Th2 de secreción de citoquinas64

Tabla 11. Polarización de los linfocitos T helper hacia la producción de IFN- γ e IL-465

Tabla 12. Comparación de los niveles de citoquinas. (Modificada de Bermejo-Martin et al, 2006)78

Tabla 13.Resumen de las publicaciones que relacionan biomarcadores con la gravedad de la bronquiolitis aguda80

Tabla 14.Expresión diferencial de las enzimas antioxidantes mediante la aplicación de electroforesis bidimensional en gel, en lavado broncoalveolar: ratones infectados por VRS frente a controles sanos.(Modificada de Hosakote et al, 2011).....91

Tabla 15.Niveles de 25(OH) D actualmente usados para la definición del estado de la vitamina D.....99

Tabla 16.Niveles séricos de vitamina D y número de ingresos hospitalarios por asma en niños costarricenses.(Modificada de Brehm et al, 2009)103

Tabla 17.Relación entre los niveles de 25(OH) vitamina D y la gravedad de IVRI en niños hospitalizados.(Modificada de Inamo et al, 2011)104

Tabla 18. Características basales y polimorfismo del receptor de vitamina D (VDR) en casos con IVRI y grupo control (Tomada de Roth et al, 2008)	105
Tabla 19. Esquema general de los parámetros analizados en este estudio.....	114
Tabla 20. Datos demográficos-factores relacionados de los niños con BA por VRS y el grupo control analizados para el perfil inflamatorio de citoquinas y estrés oxidativo ...	126
Tabla 21. Datos demográficos-factores relacionados de los casos con BA y el grupo control analizados para vitamina D	127
Tabla 22. Síntomas y signos principales de los casos de BA al ingreso	129
Tabla 23. Niveles de citoquinas Th1 y VEGF (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo (AN) en grupo control, y niños con BA-VRS con/sin oxigenoterapia.....	136
Tabla 24. Niveles de citoquinas Th2 (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo (AN) en grupo control y niños con BA-VRS con/sin oxigenoterapia.....	137
Tabla 25. Niveles de quimiocinas (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo (AN) en grupo control y niños con BA-VRS con/sin oxigenoterapia	138
Tabla 26. Índice IL-4/ IFN- γ en aspirado nasofaríngeo (AN) en grupo control y niños con BA-VRS con/sin oxigenoterapia	139
Tabla 27. Concentraciones de citoquinas y quimiocinas (medidos en pg/ml) en plasma en niños con BA-VRS y controles	140
Tabla 28. Niveles de citoquinas Th1 (medidos en pg/ml) en plasma en grupo control y niños con BA-VRS subdivididos por la puntuación en la escala de gravedad aplicada al ingreso.....	140
Tabla 29. Niveles de citoquinas Th2 (medidos en pg/ml) en plasma en grupo control y niños con BA-VRS subdivididos por la puntuación en la escala de gravedad aplicada al ingreso.....	141
Tabla 30. Niveles de quimiocinas (medidos en pg/ml) en plasma en grupo control y niños con BA-VRS subdivididos por la puntuación en la escala de gravedad aplicada al ingreso.....	141
Tabla 31. Correlación entre niveles de citoquinas en aspirado nasofaríngeo y plasma	142
Tabla 32. Niveles de biomarcadores de estrés oxidativo (LPO, GSH, GT) estudiados con BA-VRS subdivididos por escala de gravedad al ingreso y comparados con el grupo control.....	143

Tabla 33. Niveles de biomarcadores de estrés oxidativo (GSSG, GSH/GSSG, GPox) estudiados con BA-VRS subdivididos por escala de gravedad al ingreso y comparados con el grupo control	143
Tabla 34. Niveles biomarcadores de estrés oxidativo en grupo control, y niños con BA-VRS con / sin oxigenoterapia.....	144
Tabla 35. Niveles biomarcadores de estrés oxidativo en grupo control, y niños con BA-VRS con / sin oxigenoterapia.....	145
Tabla 36. Niveles de la vitamina 25 (OH) D en los controles y casos de BA.....	145
Tabla 37. Comparación de niveles de 25 (OH) vitamina D (ng/ml) entre grupo control y subgrupos de BA por gravedad de la enfermedad.....	147
Tabla 38. Proporción de los participantes en el estudio con niveles séricos de 25(OH) vitamina D deficientes, insuficientes y suficientes según guías actuales (Holick et al, 2011; Pludowski et al, 2013	148
Tabla 39. Correlación entre niveles de 25 (OH) vitamina D y la gravedad de la bronquiolitis aguda tipificada por la escala Wood-Downes-Ferrés (W-D-F) al ingreso	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.Imagen representativa de las vías respiratorias inferiores que se afectan en los niños con bronquiolitis aguda.....18

Figura 2. Estructura del VRS. (Modificada de Breese, 2001.....19

Figura 3.Edad de los niños hospitalizados por virus respiratorio durante dos temporadas (Septiembre 2006-Mayo 2007 y septiembre 2007-Mayo 2008) en el Hospital de Caen y Flers. (Modificada de Freymuth et al, 201022

Figura 4.Evolución de las infecciones víricas respiratorias. Porcentaje de virus respiratorios aislados por mes en los niños hospitalizados en los hospitales de Caen y Flers. Recoge las temporadas de septiembre a Mayo de 1999 a 2009. (Modificada de Freymuth et al, 2010.....22

Figura 5. Distribución mensual del las muestras positivas para Rinovirus-C y otros virus respiratorios.(Modificada de Wisdom et al, 2009.....24

Figura 6.Frecuencia de detección de rinovirus-C y otros virus respiratorios en sujetos que presentan diagnóstico de infección de vías respiratorias superiores (IVRS), infección de vías respiratorias inferiores (IVRI) y otras con escasa sintomatología respiratoria o no relevantes (NR). (Modificada de Wisdom et al, 2009.....25

Figura 7.Prevalencia de infecciones respiratorias y episodios de sibilantes en el tercer año de vida, clasificados por virus (Virus respiratorio sincitial –RSV y rinovirus –RV, otros no identificados No-RSV no-RV) y gravedad (Modificada de Lemanske et al, 2005)26

Figura 8a.Patrón epidemiológico de las infecciones del VRS en relación con los brotes epidémicos de bronquiolitis aguda en los años 1993 a 1998. (Modificada de Breese, 2001)27

Figura 8b.Patrón epidemiológico de los serotipos de parainfluenza 1,2 y3 en relación con los brotes epidémicos de bronquiolitis aguda en los años 1993 a 1998. (Modificada de Breese, 2001)28

Figura 9.Patrón epidemiológico de VRS y virus Parainfluenza tipo 1,2 y 3 en relación con los picos de incidencia de bronquiolitis durante 1993 a 1998. (Modificada de Breese,2001)29

Figura 10.Evolución de los porcentajes de aislamiento del virus respiratorio sincitial y el virus influenza A. (Extraída de Reina et al, 2001.)31

Figura 11. Asociación multifactorial entre factores infección viral respiratoria y desarrollo de sibilancias	39
Figura 12. Esquema representativo de las citoquinas. Principales citoquinas implicadas en la respuesta inmune tipo 1 (Th1) y 2 (Th2)	3
Figura 13. Movimiento leucocitario regulado por citoquinas quimiocinas.(Adaptado de Luster, 1998)	66
Figura 14. Regulación de la inmunidad innata a nivel del epitelio tras la infección por VRS. (Modificada de Garofalo et al, 2000).....	67
Figura 15. Representación lineal de la hipótesis en el asma de la inflamación mediada por la respuesta Th2.(Modificada de Holgate,1998).....	69
Figura 16. Representación esquemático de la respuestas Th1/ Th2 en equilibrio. Índice IL-4/ IFN- γ representativos de los cambios en la respuesta Th1/Th2 como principales representantes de cada respuesta.....	70
Figura 17. Niveles de IL-4 (pg/ml) y MIP-1 β (pg/ml) en secreciones nasofaríngeas de niños controles e infectados por VRS ó por influenza/ parainfluenza.(Modificada de Kristjansson et al, 2005)	76
Figura 18. Niveles plasmáticos de cortisol (ng/ml) en niños clasificados por enfermedad grave y leve por VRS y grupo control.(Modificada de Pinto et al,2006).....	77
Figura 19. Representación de la interacción de citoquinas y factores de estrés oxidativo y sus efectos fisiopatológicos.....	81
Figura 20. Esquema representativo de la actuación de los EROs.....	82
Figura 21. Mecanismos por los que las especies reactivas del Oxígeno producen inflamación en el asma(Modificada de Macnee, 2001).....	90
Figura 22. Representación esquemática de los posibles mecanismos por los que la infección del VRS produce estrés oxidativo a nivel celular. (Modificada de Hosakote et al, 2009).....	90
Figura 23. Niveles de marcadores de estrés oxidativo medidos en secreciones nasofaríngeas de niños con infecciones por VRS.....	92
Figura 24. Síntesis de la vitamina D. (Modificada de Misra et al, 2008)	97
Figura 25. Prevalencia de niveles bajos de vitamina D. (Modificada de Binkeley et al, 2010)	100

Figura 26. Efectos de la vitamina D sobre la inmunidad innata y adaptativa. (Modificada de Hewison, 2010).....	101
Figura 27. Niveles séricos de IgE específica a ovoalbúmina (A) e IgG ₁ en controles y tratados con vitamina D.(Modificada de Matheu et al, 2003).....	107
Figura 28. Niveles de citoquinas en lavado broncoalveolar determinados por ELISA en controles y tratados con vitamina D.(Modificada de Matheu et al, 2003)....	107
Figura 29. Número de sujetos, casos y controles, que participaron en el estudio. Subdivisión por número de niños que se contaron para los análisis de los parámetros realizados	114
Figura 30. Bote específico para aspiración de la muestra y contención tras realización de lavado nasal	116
Figura 31. Muestra positiva para VRS mediante técnica de inmunocromatografía BinaxNowRSV	118
Figura 32. Pantalla del programa visor-lectura de datos de Seegene RV16: resultado VRS + (serotipo B).....	118
Figura 33. Luminex®xMAP™	119
Figura 34. Lector de microplacasSynergy	120
Figura 35. RIA de ImmunoDiagnosticSystem IDS	123
Figura 36. Representación explicativa del número de lactantes en los que se realizaron la determinación de los parámetros de inflamación-oxidación y la vitamina D	124
Figura 37. Distribución etaria (meses) de los lactantes incluidos en el estudio.....	125
Figura 38. Distribución de la inclusión de los casos de BA durante Diciembre 2009 a Marzo 2010.....	128
Figura 39. Distribución de los casos según la Saturación Transcutánea de O ₂ al ingreso hospitalario	130
Figura 40. Distribución de los casos por necesidad de oxígeno y modalidad de oxigenoterapia	131
Figura 41. Distribución de los casos de bronquiolitis aguda según días de estancia hospitalaria	131
Figura 42. Diagrama de caja de las concentraciones de citoquinas Th1 y VEGF (medidos en pg/ml) en lavado nasal del grupo control y del grupo de las BA-VRS subdivididos según la escala de gravedad.....	133

Figura 43. Diagrama de caja de las concentraciones de citoquinas Th2 (medidos en pg/ml) en lavado nasal del grupo control y del grupo de las BA-VRS subdivididos según la escala de gravedad.....	133
Figura 44. Diagrama de caja de las concentraciones de quimiocinas (medidos en pg/ml) en lavado nasal del grupo control y del grupo de las BA-VRS subdivididos según la escala de gravedad	134
Figura 45. Diagrama de caja de las concentraciones de citoquinas Th1 y VEGF (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo de niños afectados de BA-VRS (divididos en función de la necesidad de oxígeno) y de controles sanos	134
Figura 46. Diagrama de caja de las concentraciones de citoquinas Th2 (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo de niños afectados de BA-VRS (divididos en función de la necesidad de oxígeno) y de controles sanos	135
Figura 47. Diagrama de caja de las concentraciones de quimiocinas (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo de niños afectados de BA-VRS (divididos en función de la necesidad de oxígeno) y de controles sanos	135
Figura 48. Niveles de 25 (OH) vitamina D (ng/ml) en grupo control frente grupo de niños ingresados por bronquiolitis aguda	146
Figura 49. Niveles de 25 (OH) vitamina D (ng/ml) en grupo control y niños ingresados por bronquiolitis aguda, subdivididos por la gravedad de la infección	147

I.INTRODUCCIÓN

MÓDULO 1.

Bronquiolitis aguda

La bronquiolitis aguda (BA) es la infección respiratoria aguda de las vías respiratorias inferiores más frecuente en los primeros años de la vida, constituyendo la principal causa de ingreso hospitalario en lactantes durante los meses de otoño-invierno en nuestro medio (Shay et al, 1999; Leader et al, 2003). Además, en las últimas décadas se ha constatado un aumento en su frecuencia, reafirmando como el primer motivo de ingreso en este grupo de edad (Boyce et al, 2006).

El virus respiratorio sincitial (VRS) es el agente etiológico más frecuente, estando otros virus implicados en menor proporción. El VRS infecta a prácticamente toda la población antes de los 2 años de edad (Vicente et al, 2003). En la mayoría de los casos, esta infección se manifiesta con afectación e infección de las vías respiratorias superiores (IVRS), aunque en el 30% de los casos produce infección de vías respiratorias inferiores (IVRI). Se estima que entre el 1-5% de los afectados de BA precisan ingreso hospitalario, 5-16% de éstos en unidad de cuidados intensivos pediátricos (UCIP), con una mortalidad aproximada del 1 % en pacientes sanos admitidos en UCIP (3-5 % si existe enfermedad cardíaca o pulmonar de base) (Vicente et al, 2003).

La gravedad de la enfermedad parece estar relacionada con la respuesta inmunológica-inflamatoria y la coexistencia de factores personales (edad, prematuridad entre otros), familiares así como factores de riesgo ambientales (exposición pasiva al humo de tabaco, lactancia artificial, entre otros) (Carlsen et al, 1987; Sims et al, 1981; Chung et al, 2005; Maldonado et al, 2005).

Dada la importancia del tema, desde hace años se está realizando un esfuerzo muy importante para el estudio de esta patología, y pese a la enorme información científica a la que se puede acceder, todavía en la actualidad es difícil poder afirmar que existe un acuerdo unánime en cuanto a aspectos tan básicos como su definición, diagnóstico y tratamiento o identificar el papel que juega en el desarrollo ulterior de asma.

1. Definición

Se define bronquiolitis aguda como el primer episodio de dificultad respiratoria en un niño menor de 2 años de edad con síntomas clínicos acompañantes de infección viral. Según el grupo de trabajo que ha elaborado la última Guía de Práctica Clínica sobre bronquiolitis Aguda establece por consenso una definición como *“el primer*

I.Introducción

episodio de inflamación de las vías respiratorias bajas (figura 1), presumiblemente inducida por virus, en menores de 24 meses “(Simó et al, 2010).

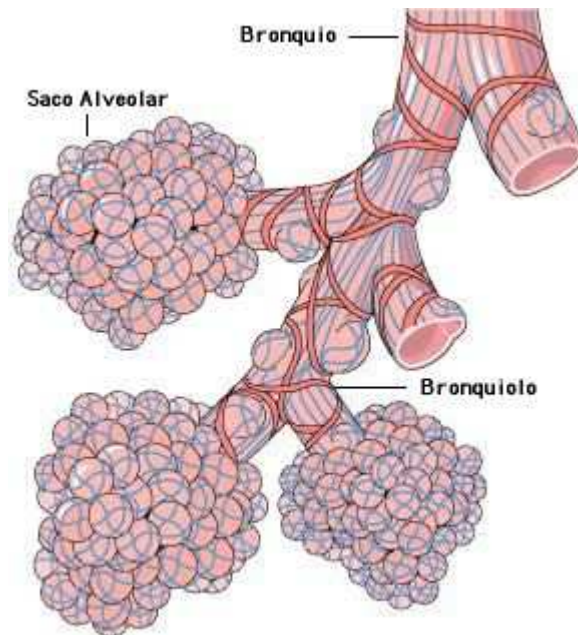


Figura 1. Imagen representativa de las vías respiratorias inferiores que se afectan en los niños con bronquiolitis aguda

En la actualidad, salvo por algunos matices introducidos en conferencias de consenso o revisiones científicas, se siguen empleando los criterios clásicos referidos por McConnochie (1983) para su definición:

1. Disnea espiratoria de comienzo agudo.
2. Edad inferior o igual a 24 meses.
3. Signos de enfermedad respiratoria vírica como coriza, otitis media o fiebre.
4. Con o sin indicios de distrés respiratorio, neumonía o atopia.
5. Primer episodio

Según lo referido, queda plasmado que la bronquiolitis se define como una entidad de diagnóstico eminentemente clínico. Desgraciadamente, la información sobre la validez y precisión de los distintos signos y síntomas para definirla procede exclusivamente de estudios descriptivos y opinión de expertos. Por ello no sorprende que el espectro clínico de los pacientes estudiados en las diferentes publicaciones (Opavsky et al, 1995; Moler et al, 1999; Brooks et al, 1999; Levine et al, 2004) sea tan heterogéneo.

2. Etiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que de los 12 millones de muertes anuales en niños menores de 5 años, una tercera parte es debida a infecciones agudas del tracto respiratorio inferior (Garenne et al, 1992).

Desde que por primera vez se identificara al VRS como el patógeno que causaba coriza en chimpancés en 1955 (Morris et al, 1956), y posteriormente se aislara en tejido pulmonar en niños con patología pulmonar en Baltimore (Chanock et al, 1957), el virus respiratorio sincitial ha sido descrito como el virus más importante como agente causal de infecciones del tracto respiratorio inferior en niños, principalmente en lactantes. Se estima que el VRS produzca epidemias que cause aproximadamente 1 millón de muertes por año a nivel mundial (DeVincenzo et al, 2007).

Con el desarrollo de las técnicas diagnósticas más sensibles, recientemente se ha aumentado la capacidad diagnóstica y ha permitido caracterizar “nuevos virus” de las muestras en las que el VRS resultaba negativo (Rand et al, 2011).

2.1 Virus respiratorio sincitial

El VRS es uno de los principales patógenos respiratorios en lactantes y niños pequeños en todo el mundo (Tregoning et al, 2010).

El virus respiratorio sincitial (VRS) es un virus ARN de la familia paramixoviridae, perteneciente a la subfamilia pneumoviridae, y al género neumovirus. Es un virus cuyo genoma está compuesto por una cadena de ARN lineal no segmentada del que se descodifican 11 proteínas (Handforth et al, 2000; Breese, 2001) que incluye (Figura 2):

- Proteínas estructurales transmembrana G, F y SH

- Proteínas de la nucleocápside helicoidal N, P, L, y M2

- Proteína de la matriz ó M

- Proteínas no estructurales NS1 y NS2.

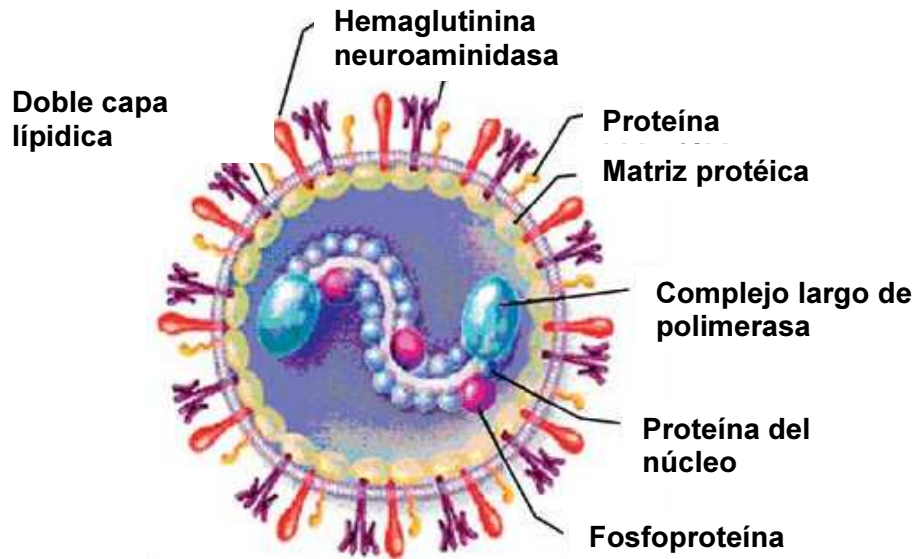


Figura 2. Estructura del VRS. (Modificada de Breese, 2001).

De las 3 proteínas estructurales asociadas a la envoltura, las 2 primeras (proteínas G y F), desarrollan un papel importante en cuanto al desarrollo de inmunidad frente al virus (Simoes 1999; McNamara et al, 2002):

Proteína G (PG): responsable de la adhesión del virus a la membrana celular. Dicha función también parece poder desempeñarse por la proteína F. La proteína G junto con la proteína F constituyen los principales determinantes antigénicos de superficie.

Proteína F (PF): encargada de la penetración a nivel celular, y la fusión con la membrana celular y posterior diseminación célula a célula con la formación de cúmulos de células gigantes llamados sincitios (característica por la que recibe en VRS su denominación).

Proteína SH ó proteína pequeña hidrofóbica, parece que no interviene en la replicación viral ni en la formación del sincitio, como se indica en las 2 anteriores, por lo tanto su función sigue siendo una incógnita en la actualidad.

En cuanto a las otras proteínas estructurales:

La proteína M, que forma una cubierta proteica en la cara interna de la envuelta viral, se piensa que interviene en el ensamblaje viral, al mantener la nucleocápside transcripcionalmente inactiva antes del ensamblaje y mediar la asociación de la nucleocápside con la envuelta nueva durante la morfogénesis del virus.

La nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) y la nucleoproteína mayor (L) están en la nucleocápside, y junto a los co-factores M2-1 y M2-2, forman parte del complejo polimerasa ARN-dependiente, y por tanto involucrados en la síntesis del ARN.

I.Introducción

Las denominadas NS1 y NS2 se consideran las proteínas no estructurales puesto que no se han encontrado en virus maduros y si abundan en células infectadas. Sus funciones no están del todo establecidas, pero sí parece que intervienen como factores reguladores en la síntesis de ARN.

El VRS se divide en 2 grupos antigénicos principales, grupo A y B, definidos por la variabilidad antigénica y diferencias en los aminoácidos de la proteína G. Además dentro de ambos grupos, se establecen subgrupos por la diversidad de combinaciones antigénicas posibles. Se piensa que las variaciones antigénicas en ambos grupos podría explicar la habilidad del virus para producir las posibles reinfecciones posteriores a lo largo de la vida (Tregoning et al, 2010).

VRS A y B pueden cocircular durante la misma epidemia, variando la incidencia no sólo de año en año o durante la misma temporada, sino también dependiendo de la localización geográfica.

2.2 Otros virus

En los casos de BA de niños hospitalizados, el VRS es el más comúnmente detectado (en algunas series publicadas es responsable en más del 80% de los caso) (Rodríguez, 2006; Schuh, 2011), seguido por rinovirus, bocavirus, adenovirus y metapneumovirus (Papadopoulos et al, 2003; Antunes et al, 2010) (Figura 3 y 4). Otros virus menos frecuentes son: parainfluenza (4,3%), influenza (2,5%) y coronavirus (1,4%).

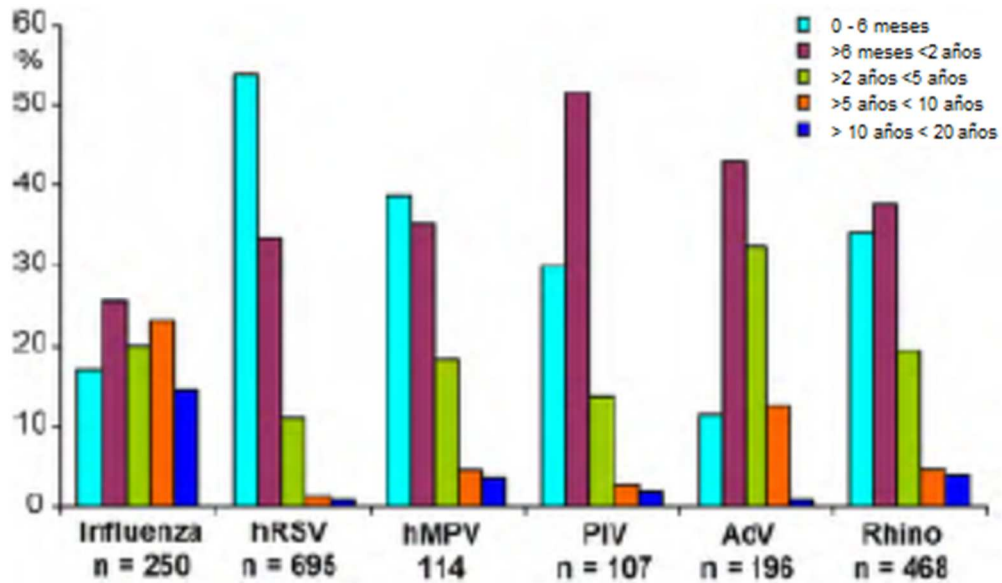


Figura 3. Edad de los niños hospitalizados por virus respiratorio durante dos temporadas (Septiembre 2006-Mayo 2007 y septiembre 2007-Mayo 2008) en el Hospital de Caen y Flers (Francia). (Modificada de Freymuth et al, 2010).

Porcentaje de cada virus diagnosticado por rango de edad. Influenza A y B, VRS (hRSV), metapneumovirus (hMPV), virus parainfluenza 1, 2,3 (PIV) y rinovirus (rhino). En los cuadros de bronquiolitis de la comunidad, parece que existe un reparto diferente (Freymuth et al, 2010): VRS 42%, rinovirus 19,5%, y el resto entre coronavirus, parainfluenza y metapneumovirus.

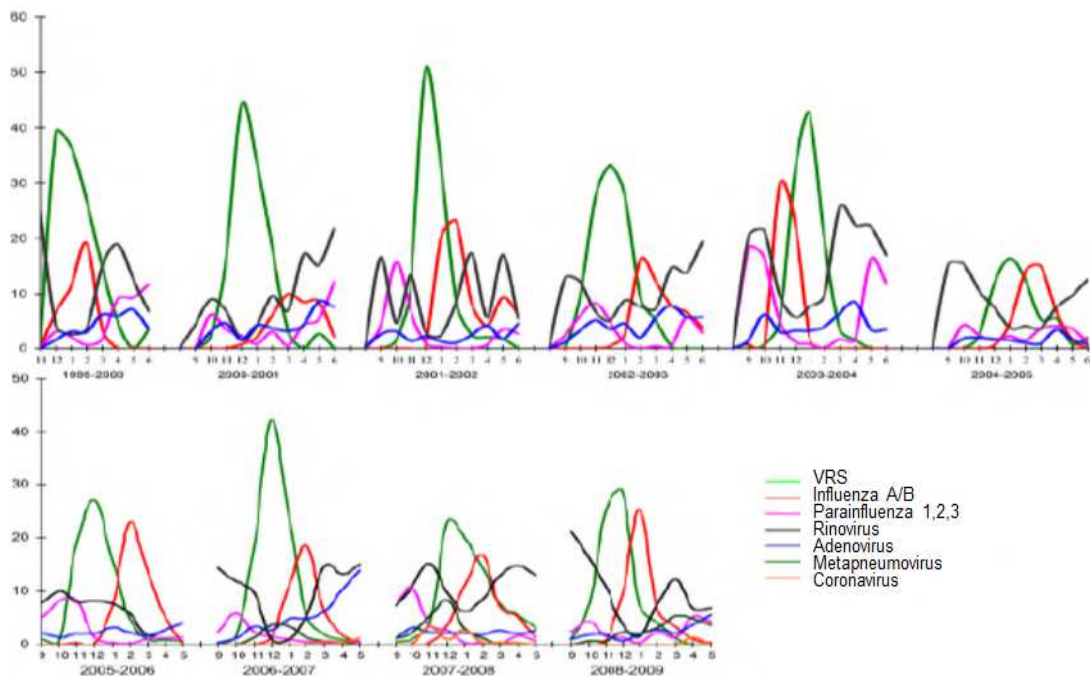


Figura 4. Evolución de las infecciones víricas respiratorias. Porcentaje de virus respiratorios aislados por mes en los niños hospitalizados en Caen y Flers (Francia).

I.Introducción

Recoge las temporadas de septiembre a Mayo de 1999 a 2009. (Modificada de Freymuth et al, 2010).

Rinovirus

El Rinovirus (Rv) es reconocido como el agente causal más común de las infecciones respiratorias de vías altas, tanto en niños como en adultos (Holgate, 2006). Pertenecen a la familia *Picoarnviridae*, género Rinovirus. Se clasifican en 3 genotipos: A, B y C. Las infecciones por Rv son frecuentes en los niños; ha sido comprobado que más del 75% de los niños ha tenido contacto con este virus antes de los 2 primeros años de vida, y además en la última década se ha identificado al Rv como agente causal de la bronquiolitis e infecciones respiratorias de vías bajas (Lemanske et al, 2005). En relación con los episodios de obstrucción bronquial son clínicamente indistinguibles del cuadro de bronquiolitis por VRS, salvo que suele afectar a niños mayores de 1 año. El mayor número de casos se concentran en nuestro medio entre los meses de septiembre a abril. Se ha relacionado la infección por Rv con la presencia de dermatitis atópica y de eosinofilia durante la misma.

La gravedad de la BA por Rv está recogida de diferente manera según los estudios analizados (Lemanske et al, 2005; Kotaniemi-Syrjänen et al, 2003): Hay estudios que demuestran su importancia cuando existe coinfección con otros virus, en especial con VRS, si bien no existe unanimidad al respecto. Por otro lado, hay series publicadas en las que muestran cómo la BA por rinovirus es significativamente menos grave que por VRS o la coinfección de ambos, al presentar scores clínicos inferiores, con menor necesidad de oxigenoterapia y/o menor duración de hospitalización. Por otra parte habría que considerar que las diferencias encontradas entre los estudios se deban a la implicación de distintos serotipos que hayan circulado durante el período de recogida de datos, ya que existen estudios recientes en los que algunos autores asocian al nuevo serotipo C a las formas más graves de bronquiolitis y neumonías en el niño (Wisdom et al, 2009) (Figura 5).

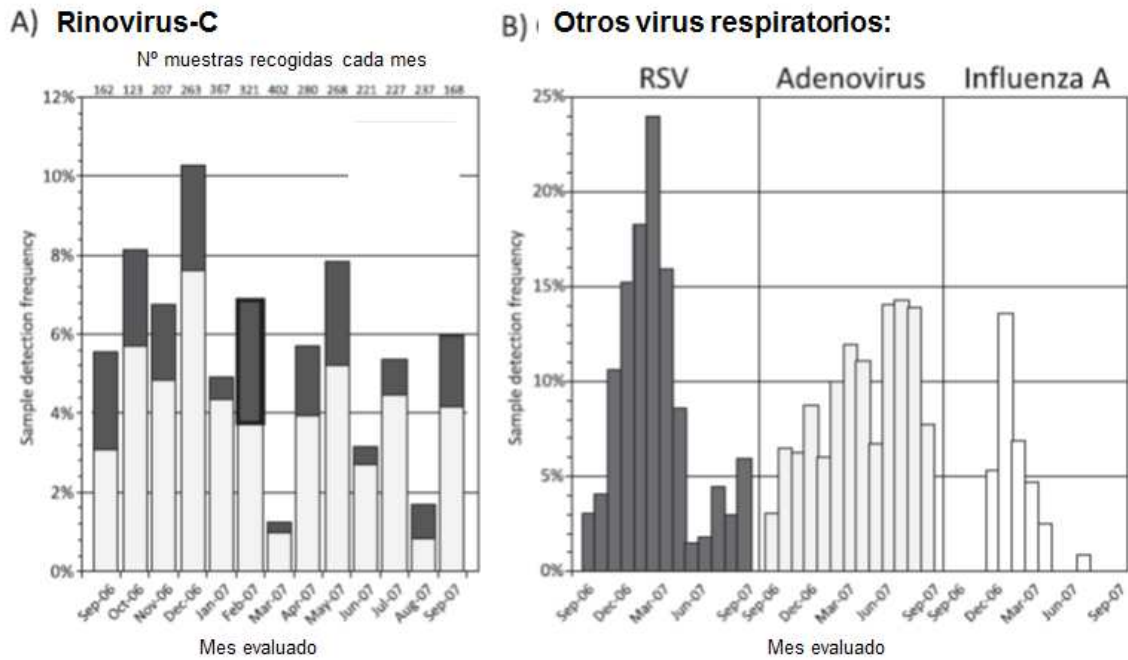


Figura 5. Distribución mensual de las muestras positivas para Rinovirus-C y otros virus respiratorios. (Modificada de Wisdom et al, 2009).

En niños mayores el Rv parece ser que el virus más implicado como desencadenante de exacerbaciones asmáticas, de ahí el interés suscitado en los últimos años en estudios que demuestran que sea un patógeno más común de lo esperado y en relación a una evolución a sibilantes recurrentes (Dulek et al, 2011; Miller et al, 2009; Kim et al, 2010)

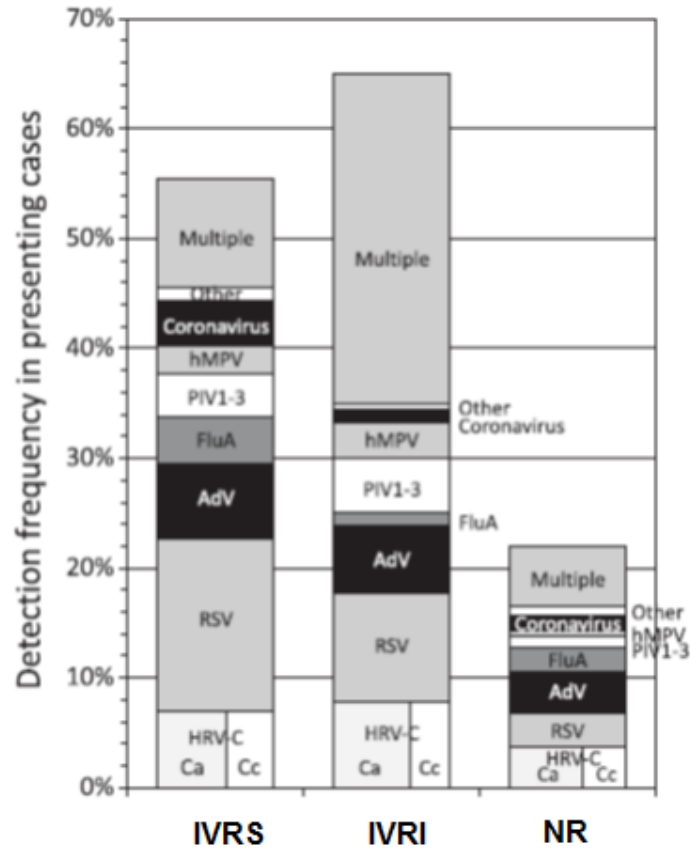


Figura 6. Frecuencia de detección de rinovirus-C y otros virus respiratorios en sujetos que presentan diagnóstico de infección de vías respiratorias superiores (IVRS), infección de vías respiratorias inferiores (IVRI) y otras con escasa sintomatología respiratoria o no relevantes (NR). (Modificada de Wisdom et al, 2009).

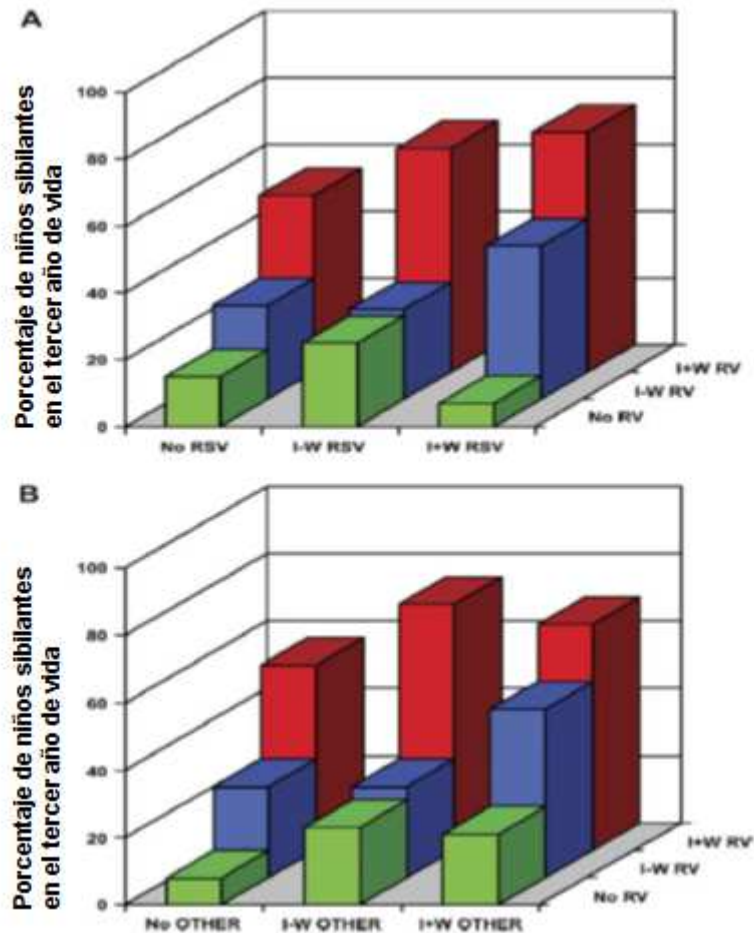


Figura 7. Prevalencia de infecciones respiratorias y episodios de sibilantes en el tercer año de vida, clasificados por virus (Virus respiratorio sincitial –RSV y rinovirus –RV, otros no identificados No-RSV no-RV) y gravedad: I-W infección moderada-grave sin sibilancias, I+W infección moderada-grave con sibilancias. (Modificada de Lemanske et al, 2005).

Bocavirus

El bocavirus humano (BovH) es un virus descrito por primera vez en el año 2005 por Allander y cols, al ser identificado en muestras de aspirado nasofaríngeo en niños con infecciones del tracto respiratorio inferior.

Muestran una estrecha relación el BovH con dos miembros de la familia *Parvoviridae*: parvovirus bovino (BPV) y canino (CMnV), de ahí su nombre (“bo” de bovino y “ca” de canino).

En los niños menores de dos años hospitalizados por una infección respiratoria se describe una prevalencia de 2,7% a 19% según diferentes estudios (Schildgen et al, 2008; Allander et al, 2007). Estas diferencias podrían explicarse por la estacionalidad, predominando en invierno, y por las distintas poblaciones recogidas en los estudios. En un trabajo (Antunes et al, 2010) que recogen niños que requirieron atención médica por infecciones respiratorias de septiembre a abril, se demostró en 32 niños infección

I.Introducción

respiratoria por BovH, de ellos 22 requirieron ingreso hospitalario en el contexto de infección respiratoria de vías bajas: 8 BA, 9 exacerbaciones crisis de asma y 1 neumonía. Este estudio subraya que hasta 1 de cada 5 de los niños en los que se detectó BovH presentaban síntomas gastrointestinales. También confirma el alto porcentaje de co-infección con otros virus lo que ha llevado a cuestionar su rol como patógeno principal respiratorio (Zeng et al, 2010).

Parainfluenza.

Las características epidemiológicas de la infección por parainfluenza (Piv) han sido ampliamente estudiadas y de cierta forma muestra un patrón paralelo a la infección por VRS (Breese, 2001) (Figuras 8a y 8b). De los 4 subtipos identificados (Piv 1, 2,3 y 4), las infecciones por Piv 3 son las más frecuentes, y tienen lugar en nuestro medio principalmente durante los meses de otoño y de invierno. Como para el VRS y el metapneumovirus, son infecciones que se identifican predominantemente en los lactantes, pero a diferencia de los otros 2, éste es menos frecuente en los menores de 6 meses, con pico de incidencia en torno a los 10 meses. Se ha indicado que niños de raza caucásica causa con más frecuencia una infección a nivel del tracto respiratorio superior en comparación con otros grupos étnicos en los que es más probable que presenten un cuadro de bronquiolitis. Otros factores relacionados son: el sexo masculino, no recibir lactancia materna, y la existencia de antecedentes familiares de primer grado de asma (Vega-Briceño et al, 2007).

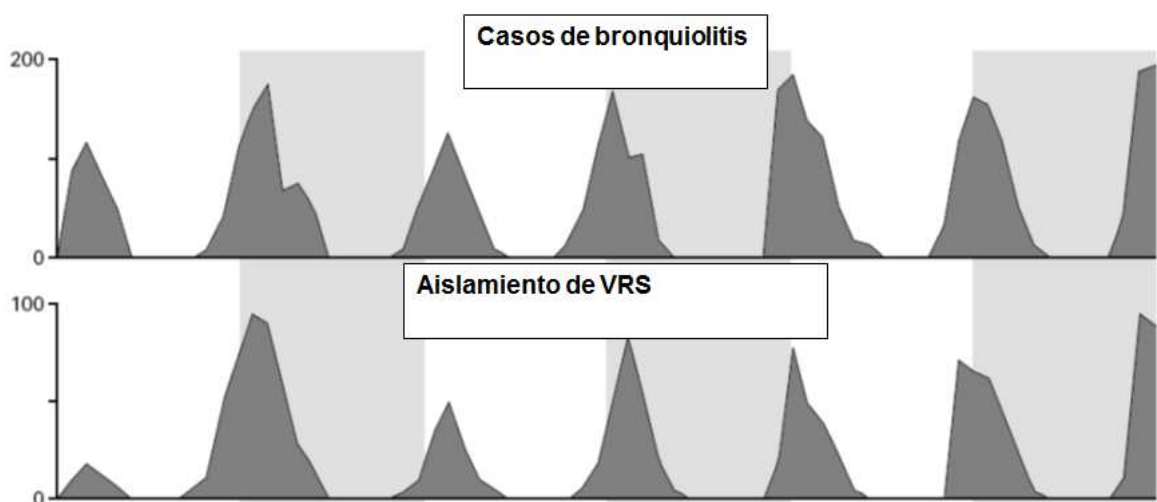


Figura 8a. Patrón epidemiológico de las infecciones del VRS en relación con los brotes epidémicos de bronquiolitis aguda en los años 1993 a 1998. (Modificada de Breese, 2001)

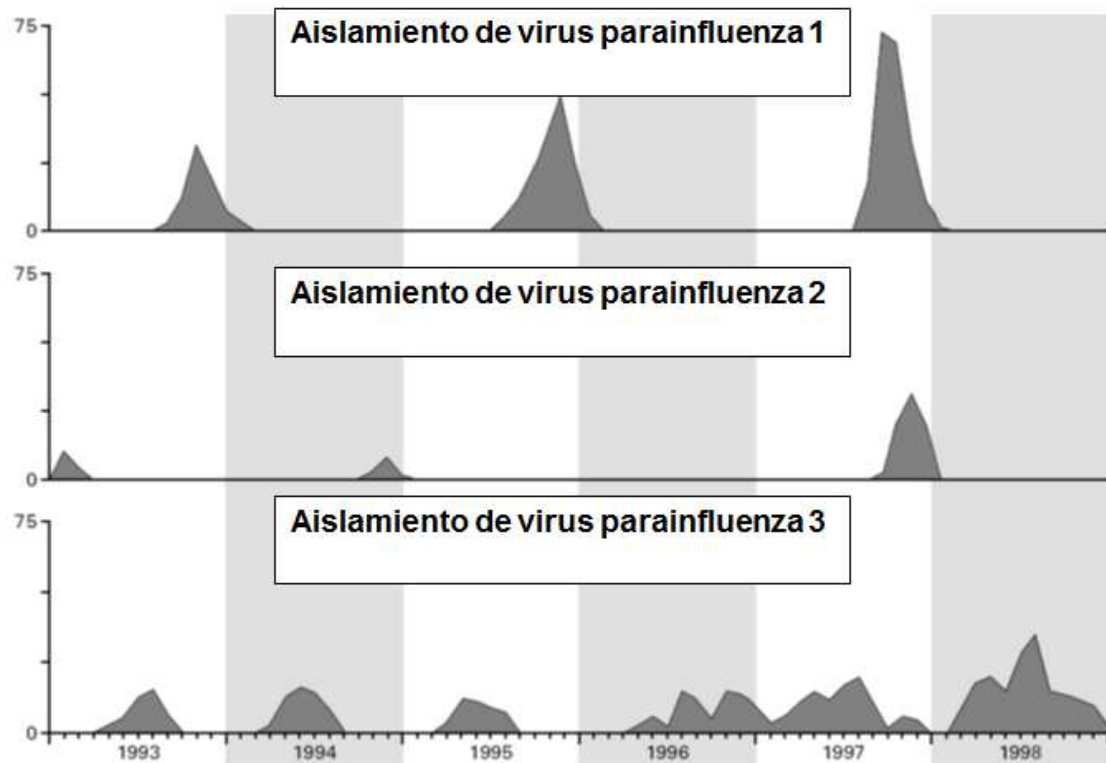


Figura 8b. Patrón epidemiológico de las infecciones de los serotipos de parainfluenza 1,2 y 3 en relación con los brotes epidémicos de bronquiolitis aguda en los años 1993 a 1998. (Modificada de Breese, 2001)

Metapneumovirus

El metapneumovirus (Mpvh) es un nuevo virus respiratorio descubierto en el año 2001. El género Metapneumovirus pertenece a la familia Paramyxoviridae y la subfamilia Pneumoviridae, a la que también pertenecen el VRS y parainfluenza. Afecta exclusivamente a humanos y de ahí su denominación como metapneumovirus humano. La evidencia acumulada desde su descubrimiento sugiere que Mpvh es uno de los principales agentes etiológicos de infección respiratoria baja en niños (Papenburg et al, 2010).

Tiene una distribución temporal similar al VRS, presentándose principalmente en invierno, pero hay trabajos que lo demuestran también durante toda la primavera (Figura 9). Su circulación es mayor tras la desaparición del VRS, de hecho parece existir una correlación negativa entre ambos virus: el número de infecciones por Mpvh por temporada es inversamente proporcional al de infecciones por VRS (Kim et al, 2010). Suele afectar a la misma franja de edad que VRS y Rv, siendo el VRS más frecuente en lactantes pequeños (de 3 a 6 meses) en comparación con los otros 2 virus (Papenburg et al, 2010).

I.Introducción

A priori la BA por Mpvh es considerada de características clínicas similares (García-García et al, 2006) que aquella en la que se demuestra VRS.

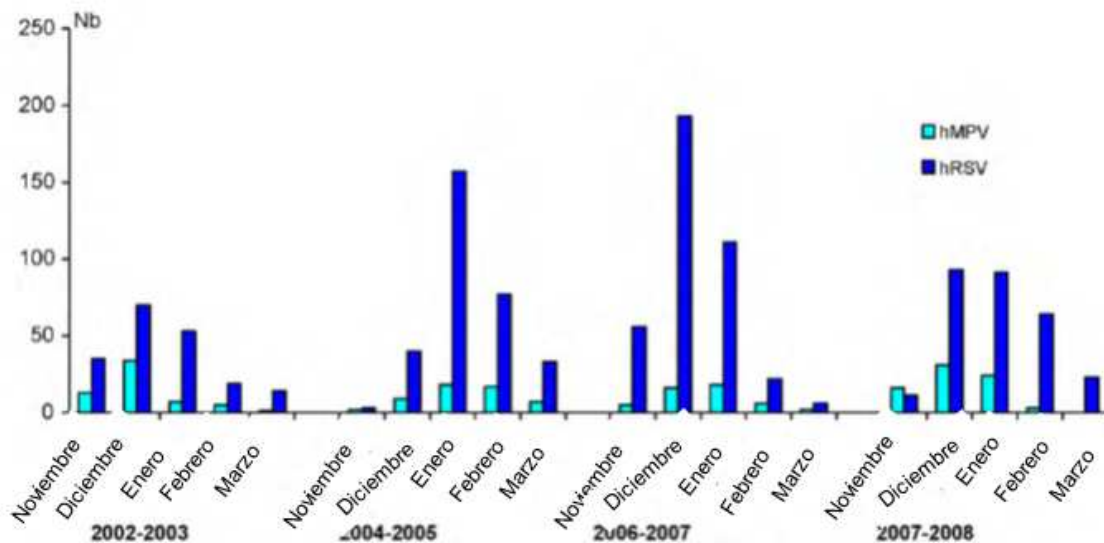


Figura 9. Patrón epidemiológico de VRS y virus Parainfluenza tipo 1,2 y 3 en relación con los picos de incidencia de bronquiolitis durante 1993 a 1998. (Modificada de Breese, 2001).

Virus Influenza

La gripe, cuadro causado por el virus influenza, es una infección viral causante de importante morbilidad respiratoria especialmente en ancianos y en niños pequeños, sobre todo lactantes menores de 24 meses (Rojo et al, 2006). Se estima que el 20 % de los niños y el 5% de los adultos contraen una infección sintomática por virus influenza cada año. Aunque las tasas de hospitalización por gripe varían según la virulencia de las cepas circulantes en diferentes años parece demostrado que la mayor parte de las hospitalizaciones se encuentran en el grupo metapneumovirus (Mpvh) de menores de 2 años (Rojo et al, 2006; Calvo et al, 2005).

Los virus influenza son virus ARN pertenecientes al grupo de los *Orthomyxovirus* y tienen una gran diversidad antigénica. Existen tres tipos de virus influenza: A, B y C, si bien los tipos A y B son los agentes causales de los brotes epidémicos. Los virus influenza A son los más extendidos y se clasifican en subtipos en función de las diferencias antigénicas de sus dos glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina y la neuraminidasa. Aunque existen 15 hemaglutininas (H1-H15) y 9 neuraminidasas (N1-N9), sólo los subtipos H1, H2, H3 y N1, N2 afectan de forma habitual al hombre. Para

I.Introducción

influenza B sólo se reconoce un subtipo de hemaglutinina y neuraminidasa (Pickerin et al, 2007).

Ambas glicoproteínas mutan cada año y son las responsables del cambiante comportamiento epidemiológico del virus y de su capacidad infectiva. El subtipo H3N2 se reconoce como causante de epidemias más graves que el H1N1 o la influenza B, al originar mayores tasas de ingreso y mayor

Morbilidad. En los pacientes afectados de BA predomina el subtipo H3N2 (Reina et al, 2001), (Tabla 1).

Tabla 1. Relación entre la edad y la infección respiratoria causada por el virus influenza A. (Extraída de Reina et al, 2001.)

Infección respiratoria	Edad (meses)				Total
	1-3	4-6	7-12	>13	
Bronquiolitis					62 (52,9%)
H1N1	3	3	1	0	7
H3N2	28	16	11	0	55
Neumonía					17 (14,5%)
H1N1	0	1	0	0	1
H3N2	1	2	9	4	16
Síndrome febril					38 (32,4%)
H1N1	0	0	1	3	4
H3N2	2	2	13	17	34
	34 (29,1%)	24 (20,5%)	35 (29,9%)	24 (20,5%)	117

La presentación clínica de la gripe en niños pequeños es bastante inespecífica, por lo que puede ser atribuida a otros agentes etiológicos si no se realiza un diagnóstico definitivo de infección, lo que a menudo subestima la importancia de la gripe en los lactantes.

Los niños, que presentan un sistema inmune menos desarrollado, suelen ser los primeros afectados y por tanto el pico de incidencia en niños es previo al pico de máxima incidencia en los adultos.

Desde el punto de vista epidemiológico, se ha observado que el virus influenza A puede alcanzar porcentajes muy cercanos a los detectados por el VRS, especialmente en las semanas de mayor actividad gripal (Reina et al, 2001), (figura 10).

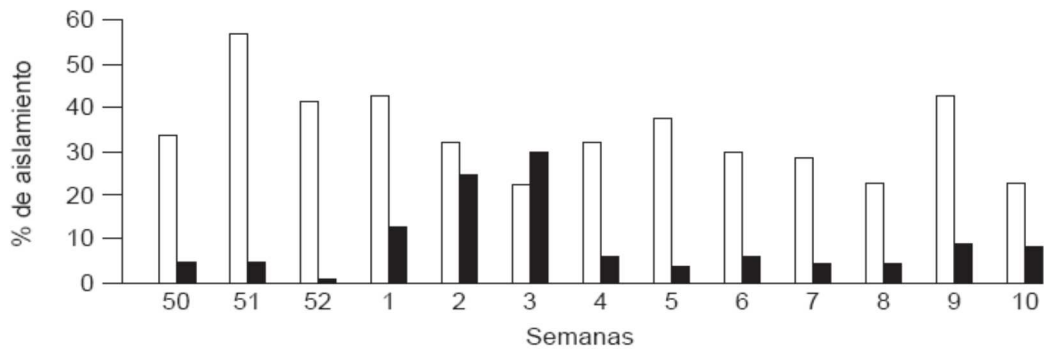


Figura 10. Evolución de los porcentajes de aislamiento del virus respiratorio sincitial y el virus influenza A. (Extraída de Reina et al, 2001.)

Debido a que normalmente las epidemias de bronquiolitis por VRS y la epidemia de gripe invernal se solapan durante unos 2-3 meses, se hace muy difícil desde el punto de vista clínico y especialmente en los niños menores de doce meses, en los que la gripe no presenta características clínicas semejantes al adulto, diferenciar entre estas dos etiologías víricas (Garofalo et al, 2005). De hecho la gravedad de la BA, medida por parámetros como frecuencia respiratoria o saturación transcutánea de oxígeno (SatcO₂), no es estadísticamente significativa entre ambas infecciones virales (Reina et al, 2001).

Adenovirus

Los adenovirus son un grupo viral ampliamente difundido que afecta a la población humana provocando una gran variedad de procesos clínicos. De entre ellos, las infecciones respiratorias constituyen un trastorno frecuente en todos los grupos de edad, y de forma particular en los niños menores de 5 años (Reina et al, 2004). El hecho de que aproximadamente el 50 % de estas infecciones sean asintomáticas y se transmitan preferentemente por vía respiratoria, favorece la difusión y la elevada prevalencia de esta infección en la comunidad (Reina et al, 2004).

Las infecciones respiratorias producidas por los adenovirus pueden afectar a vías altas y bajas. Las manifestaciones clínicas respiratorias y/o manifestaciones sistémicas de las infecciones causadas por adenovirus son prácticamente indistinguibles de otras infecciones respiratorias virales, con los que además comparten una alta prevalencia y estacionalidad. La mayoría de infecciones humanas por adenovirus se presentan en los meses de otoño e invierno (en el hemisferio norte), preferentemente en el primer cuatrimestre del año (Horwitz, 2001). Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado cómo los adenovirus son los causantes del 5-24 % de las infecciones respiratorias en los niños de menos de 5 años, disminuyendo su

I.Introducción

incidencia a medida que aumenta la edad, excepto en comunidades cerradas (Parrott, 1963; Brandt et al, 1969). Las infecciones respiratorias de vías bajas por adenovirus, son indistinguibles de las causadas por VRS. Se ha relacionado mayor prevalencia en aquéllos con antecedentes previos de otras enfermedades respiratorias como BA previa por VRS o manifestación clínica de asma bronquial, por lo que se ha sugerido que la infección de adenovirus en mayores de 6 meses, es favorecida por la existencia de alteraciones previas del tracto respiratorio inferior, ya que en un estudio (Ruuskanen et al, 1997) el 72% de los niños que presentaron infección respiratoria por adenovirus tenían antecedentes previos de otras enfermedades respiratorias: bronquiolitis por VRS o manifestaciones previas de asma bronquial (Tabla 2). También se ha observado la posible existencia de cierta predisposición familiar en broncopatías crónicas, según un estudio el 56 % de los niños infectados por adenovirus encontraban familiares con este tipo de enfermedades respiratorias (Reina et al, 2004). De esta manera este tipo de procesos pulmonares crónicos podrían ser un factor predisponente o favorecedor de las infecciones respiratorias por los adenovirus al existir un tracto respiratorio previamente afectado y con menor respuesta celular (Cherry, 1998).

Tabla 2. Principales características halladas en 100 niños menores de 15 años diagnosticados de infección respiratoria por adenovirus. (Tomada de Reina, 2004).

Diagnóstico	Número
Bronquiolitis	42
VRS +	14
VRS -	28
Bronquitis	10
Bronconeumonía	9
Crisis asmática	11
Prematuridad	2
Antecedentes Familiares	
Asma	43
Broncopatías crónicas	13

Por otro lado, se ha implicado al adenovirus como uno de los principales virus con mayor porcentaje de casos de bronquiolitis obliterante (Colom et al, 2006). La bronquiolitis obliterante, forma grave e infrecuente de enfermedad obstructiva crónica durante la infancia, puede ser la consecuencia tardía de una infección por adenovirus

grave (sobre todo las asociadas a los serotipos 3, 7 y 21), ya que se ha observado que antecedentes de BA por adenovirus y la necesidad de ventilación mecánica (VM) son factores relacionados con el riesgo de conllevar secuelas importantes como este síndrome, además de bronquiectasias, síndrome del pulmón hiperclaro unilateral y la alteración de las pruebas de función pulmonar (Zhang et al, 2000).

3. Epidemiología

La falta de consenso en cuanto a definición y diferencias en el diagnóstico sobre epidemiología de BA hace que nos encontremos con una gran heterogeneidad en los datos publicados. Además la excesiva homogeneidad en la selección de los casos en función de la población recogida en las diferentes publicaciones favorece este hecho. Así muchos estiman la frecuencia de las BA sólo en relación a casos hospitalizados, lo que potencialmente daría información de un grupo reducido de los que presentan ésta patología, y más aun si se tienen en cuenta la variabilidad entre criterios de ingreso en las diferentes regiones y/ o sistemas sanitarios. Habría que reseñar además la importancia de detallar la edad de los pacientes así como la existencia de antecedentes médicos previos como factores de riesgo de la población estudiada para así poder analizar los datos publicados en concordancia.

Por otro lado al tratar de epidemiología, dado que el VRS constituye ser el principal patógeno implicado es esta entidad, consideramos de interés centrarnos en la BA por VRS (BA-VRS).

3.1 Incidencia y prevalencia

Alrededor de 90000 niños en Estados Unidos y aproximadamente 20000 en Reino Unido son ingresados anualmente por BA (Levy et al, 1997; Academia Americana de Pediatría, 2006), lo que llega a suponer del hasta el 20% del total de las consultas de los servicios de urgencias pediátricas durante la epidemia. En España en concreto, la frecuencia de ingreso hospitalario oscila entre 1 - 5% (5-16% de éstos en UCIP), con una mortalidad aproximada entre 0.5 - 1 % en pacientes sanos admitidos ingresados (3-5 % si existe enfermedad cardiaca o pulmonar de base) (Carlsen et al, 1987).

Aunque no se conoce del todo el mecanismo por el que las infecciones virales producen posteriormente afectación del tracto respiratorio inferior y/o sibilancias, sí que está claro la estrecha relación en los primeros años de vida entre el inicio de clínica respiratoria con la existencia concomitante de infección viral. A su vez, con la no desdeñable frecuencia de infecciones respiratorias que se producen durante los

I.Introducción

primeros años de la vida, parece difícil determinar la incidencia exacta de sibilancias en este periodo. Hay estudios como la cohorte de Tucson (Martínez et al, 1995; Taussing et al 2003) que reflejan cifras de hasta el 20% de todos los lactantes incluidos tienen al menos un episodio de sibilancias en su primer año de vida (principalmente relacionado con infecciones virales) llegando al 40% si incluimos aquellos que los presentan entre el primer y el tercer año de vida (20% que presentan sibilancias a partir del año de edad).

Datos en relación a poblaciones con factores de riesgo en nuestro medio (Tabla 3), sitúa la frecuencia de ingreso por bronquiolitis en torno al 10%, como el caso de los prematuros (10, 6% para ≤ 32 semanas de edad gestacional, 7.9% entre las 33 y 35 semanas de edad gestacional) (Carbonell et al, 2002; Bonillo et al, 2000). En cuanto a niños con enfermedad de base, existen intervalos de frecuencia amplios y en general poco precisas. Así en niños diagnosticados y en seguimiento por displasia broncopulmonar se estima entre el 7,3 – 42% (en función del grado de afectación) o cardiopatas sin inmunoprofilaxis alrededor del 9,8% (Bonillo et al, 2000).

Tabla 3. Factores de riesgo de infección respiratoria de vía respiratoria inferior

Prematuridad
Displasia broncopulmonar
Cardiopatía congénita
Enfermedad crónica pulmonar
Inmunodeficiencias

Otro factor de riesgo para ingreso hospitalario por BA sería la edad inferior a 6 meses. Al nacimiento parece ser que todos los niños adquieren de forma pasiva anticuerpos específicos anti-VRS producidos por sus madres. La cantidad de anticuerpos transmitidos progresivamente decrece de forma gradual hasta desaparecer en los primeros 6 - 7 meses de vida (Handforth et al, 2000).

Aunque la mayoría se infecta durante la infancia, llama la atención cómo no todos los niños manifiestan clínica de tracto respiratorio inferior (BA). De hecho, en el primer año de vida se estima que hasta el 50% de los niños son infectados por el VRS, pero sólo alrededor del 30% se presenta clínicamente como BA. De 3 a 5 años se estima que el 95% de todos los niños se han infectado. Más del 50% de los niños que ingresan por BA tienen entre 1 y 3 meses de edad. Hay estudios que hacen hincapié en el ligero predominio del sexo masculino frente al femenino (1.3 al 1.5 veces más

I.Introducción

frecuente en niños que en niñas) de los casos ingresados por BA, sin existir un riesgo adicional por origen racial (Handforth et al, 2000; De Boeck, 1996). Las reinfecciones ocurren de forma frecuente, aunque la clínica y severidad de la infección disminuye conforme el niño adquiere cierta inmunidad de la exposición anterior.

Pese a la tendencia creciente de ingresos hospitalarios por cuadros de BA en las últimas décadas (generalmente debidas al VRS), en los últimos años parece existir un descenso en el número de BA-VRS positivos (se podría explicar con la quimioprofilaxis con palivizumab aplicada a grupos de riesgo, mayores medidas preventivas en la transmisión del VRS, posible aumento de bronquiolitis por otros agentes virales, mejora en las técnicas microbiológicas y diagnóstico de otros “nuevos” virus) pero si han aumentando casos VRS negativos, por lo que tampoco parece que estén disminuyendo en términos globales las hospitalizaciones por BA, y en la actualidad se le está dando mayor importancia a los estudios epidemiológicos que permitan conocer estos cambios evidenciados (Cobos et al, 2009).

3.2 Patrón geográfico y estacional.

Los ingresos hospitalarios por cuadros de bronquiolitis se distribuyen según un patrón claramente estacional predominante en los meses de invierno, principalmente entre noviembre y enero en nuestro medio (de clima templado), o al coincidir con la bajada de las temperaturas en la estación húmeda en países de clima tropical. En un amplio porcentaje de los casos está implicado el VRS, principal agente infeccioso en cuadros de BA, por lo que es lógica la coincidencia del mayor número de infecciones producidas por el VRS con la epidemia anual de cuadros BA. Un aumento en el número de lactantes/niños con diagnóstico de infecciones de vía respiratoria inferior indica el inicio de la “temporada de VRS” anual. El desencadenante del inicio de la epidemia con el consiguiente aumento de casos no está claro, aunque parece que existe relación con el descenso de la temperatura. La severidad de la epidemia del VRS varía cada año, se ha relacionado con la existencia de un patrón bianual según predominio de serotipos A o B (Reyes et al, 1997), asociándose al B mayor virulencia, pero actualmente no se ha llegado a ninguna evidencia al respecto. Se ha observado, que conforme se va alcanzando el pico de incidencia por el VRS, los otros virus implicados en cuadros de BA disminuyen su incidencia. En ocasiones VRS y el virus de la Influenza A pueden coincidir, aunque raramente ambos picos se superponen.

3.3 Transmisión de la enfermedad.

Los virus respiratorios, y en particular el VRS, se transmiten con facilidad. Suelen tener un periodo de incubación de 1 semana (generalmente de 5 a 8 días). Su transmisión puede ser directa de contactos, a través de secreciones respiratorias en forma de gotitas, o indirecta, mediante la contaminación de superficies u objetos de una persona previamente infectada. Se conoce como los virus son capaces de sobrevivir en superficies durante más de 6 horas. Así mismo, hay estudios que demuestran que no es posible la infección si se deja más de 1 metro de distancia de la persona infectada y de las pequeñas partículas nebulizadas que puedan ser desprendidas por ella, ya que el virus difunde a partir de partículas gruesas, por lo que es necesario un contacto estrecho para favorecer su transmisión (Darville et al, 1998).

En el caso del VRS, parece que la duración y el grado de presencia viral se correlacionan con la clínica y severidad del cuadro. Los niños infectados por VRS, pueden seguir siendo fuente de contagio entre 3 a 6 días después del contacto, pero en algunos se detecta hasta 4 ó más semanas desde el inicio del cuadro (en inmunodeprimidos este periodo incluso se puede prolongar durante meses), y como es lógico en época de epidemia la contagiosidad se incrementa de forma exponencial en la población. La propagación resulta más fácil en instituciones cerradas o colectivas (guarderías, hospitales) (Darville et al, 1998). Es frecuente la exposición familiar (la existencia de un hermano mayor que ha iniciado en los días previos un cuadro de infección respiratoria de vía superior) y posteriormente el hermano menor ó lactante resulta infectado de forma secundaria. También se ha postulado la correlación entre mayor tamaño familiar con la mayor incidencia de casos de la enfermedad.

La entrada al organismo se consigue por la vía nasal como conjuntival (considerándose igual de buenas ambas rutas a diferencia de la mucosa oral) y su inoculación subsiguientes a por el tracto respiratorio superior, e inferior en la BA con los siguientes síntomas y signos clínicos que provoca.

4. Fisiopatología

Muchos niños padecen un episodio de sibilancias cada vez que inician una infección respiratoria viral. Las sibilancias ponen de manifiesto la afectación de las vías respiratorias inferiores, al provocar una obstrucción parcial de bronquios y bronquiolos. El resultado parece claro, sin embargo hay que seguir buscando por qué se produce en algunos sujetos y en otros no dicha clínica resultante de la interacción entre la capacidad de defensa del huésped/ modulación de la respuesta inflamatoria y la patogenicidad intrínseca del virus.

I.Introducción

Una vez que se propaga el VRS a lo largo de la mucosa del tracto respiratorio inferior mediante la fusión de las células infectadas y no infectadas, da lugar a masas de células gigantes con muchos núcleos (sincitios). El daño ocasionado en el epitelio respiratorio conlleva a la activación de una cascada de procesos inflamatorios por lo que da lugar a la obstrucción de la luz bronquial. Entre estos procesos destacan (Collado, 1985; West, 1981):

Necrosis y edema del epitelio bronquial

Destrucción de células ciliadas, lo que produce alteración en la eliminación de las secreciones, acúmulo de detritus celulares y paso de barrera antiinfecciosa, así como la acumulación de células descamadas y de fibrina que producen tapones de moco (que junto con el edema pueden favorecer la formación de atelectasias)

Infiltrado peribronquial de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, células plasmáticas, macrófagos y otros elementos proinflamatorios.

Hiperreactividad de vías respiratorias. La hiperreactividad bronquial podría ser resultado del daño viral directo al epitelio de las vías respiratorias mediante los mecanismos enumerados con anterioridad al provocar un estado proinflamatorio.

El daño epitelial tras la agresión viral, se ha postulado que también podría conducir a la exposición y sensibilización de fibras nerviosas sensoriales y colinérgicas, que en condiciones normales están cubiertas por el epitelio (Larsen et al, 1999). El tono muscular de la vía aérea depende de la interacción de los 3 sistemas que intervienen en su inervación:

- Adrenérgico, induce broncorrelajación a través de sus mediadores, fundamentalmente la adrenalina.

- Colinérgico, induce broncoconstricción a través de la liberación de acetilcolina.

- No-adrenérgico no-colinérgico, constituido por fibras nerviosas sensoriales, llamadas fibras C, que al ser estimuladas por irritantes físicos o químicos, liberan unas sustancias llamadas taquininas, de las cuales la más importante es la sustancia P. La sustancia P al ser estimulada mediante su receptor NK-1, es considerada un potente agente broncoconstrictor y proinflamatorio al aumentar la permeabilidad del endotelio, favoreciendo el edema de la mucosa bronquial. Además estimula la proliferación y activación de linfocitos T y B, la degranulación de mastocitos, y favorece en los monocitos y macrófagos la liberación de citoquinas. Trabajos (Piedimonte et al, 1999; Dusser et al, 1989) en modelo animal han mostrado como la destrucción del epitelio de las vías respiratorias por virus, reducía la acción enzimática de la neoprolisina, una endopeptidasa que se encarga en condiciones normales de degradar a la sustancia P. Derivada de la acción inflamatoria e inmunomoduladora de las taquininas, y en

I.Introducción

especial de la sustancia P, y su interacción neuroinmune, se ha postulado su papel como promotor de broncoconstricción e hiperreactividad persistente en las vías respiratorias.

Si se produjera la recuperación de las lesiones a nivel bronquial, se explicaría la recuperación de la "reactividad normal" en las vías respiratoria. En condiciones normales, la recuperación se suele producir lentamente, aconteciendo primero la regeneración de la mucosa (durante la primera semana) y más tardíamente la regeneración ciliar (entre la 3ª y 4ª semana). Sin embargo dicha recuperación del árbol bronquial no siempre es completa, con la persistencia frecuente de algunas lesiones, como son (Breese, 2001): hipertrofia de las glándulas mucosas y del músculo liso bronquiolar, "agrietamiento" de las uniones intercelulares del epitelio que conlleva a la exposición de los receptores nerviosos, como la estimulación de la sustancia P, a diferentes irritantes y por ello se facilitaría la penetración de alérgenos y su posterior respuesta en forma de hiperreactividad tras la exposición.

Por otro lado hay algunos estudios que analizan el papel del óxido nítrico en la reactividad de las vías respiratorias. Los estudios indican que la deficiencia en la producción de óxido nítrico endógeno en el epitelio de las vías respiratorias después de una infección viral podría contribuir a favorecer un estado de hiperreactividad bronquial (Nijkamp et al, 1994; Busse, 1990).

Función pulmonar disminuida: ¿infección por si sola o existe alteración previa?

Estudios realizados en lactantes hospitalizados por BA (Stark et al, 1991) versus IVRS (Martínez et al, 1990), han mostrado el papel de los virus en alteraciones posteriores de la función pulmonar. Entre las alteraciones encontradas se incluyen tasas de flujos más bajas, aumento en la resistencia inspiratoria y espiratoria y un incremento del volumen pulmonar residual. Algunos de estos cambios persistieron más de un año en lactantes con bronquiolitis, pero la función pulmonar resultó normal después de un mes en aquellos lactantes con sólo IVRS.

Estudios en adultos sanos, con infecciones respiratorias virales, también han mostrado la existencia de la alteración en la función pulmonar, al evidenciarse obstrucción de las vías respiratorias finas tras IVRS. Por tanto, parece que los virus respiratorios puedan afectar la función pulmonar en sujetos sanos de cualquier edad, al menos de forma transitoria, pero por lo general de forma subclínica. No parece que ocurra de la misma forma en sujetos predispuestos, como es el caso de niños con cuadros de sibilancias previas, en las que las infecciones virales son manifiestas al provocar un nuevo episodio de broncoespasmo.

5. Factores de riesgo

La capacidad de respuesta antiviral de un organismo define la susceptibilidad a producir en él una infección sintomática y por tanto, se podría considerar una de las variables que determinan la predisposición a la presencia de sibilancias. Diversos factores tanto endógenos como exógenos, pueden predisponer a ciertos lactantes a un mayor riesgo de desarrollar sibilancias tras padecer un cuadro viral. No obstante, hasta un 20% de los niños de 3 años de edad con sibilancias no presentan ninguno de los principales factores de riesgo reconocidos, por lo que podrían existir otros factores de riesgo aún desconocidos.

En cuanto al huésped se hablan de diferentes factores de riesgo que aumentan su susceptibilidad (Figura 11):

-Edad y sexo. Las sibilancias de origen viral son más frecuentes en lactantes. Las sibilancias graves no son comunes antes de los 2 meses de edad y parece existir una disminución pronunciada de la incidencia alrededor de los 2 años de edad. Esto es explicado principalmente por factores inmunológicos, y también se podría tener en cuenta el tamaño de la vía respiratoria. Los episodios de sibilancias han sido estudiados en función al agente causal, y parece que las debidas a VRS, parainfluenza 1 y 3, así como adenovirus son más frecuentes en el sexo masculino. Esto se ha relacionado con diferencias en la función pulmonar y diámetro de las vías respiratorias (Tepper et al, 1986).

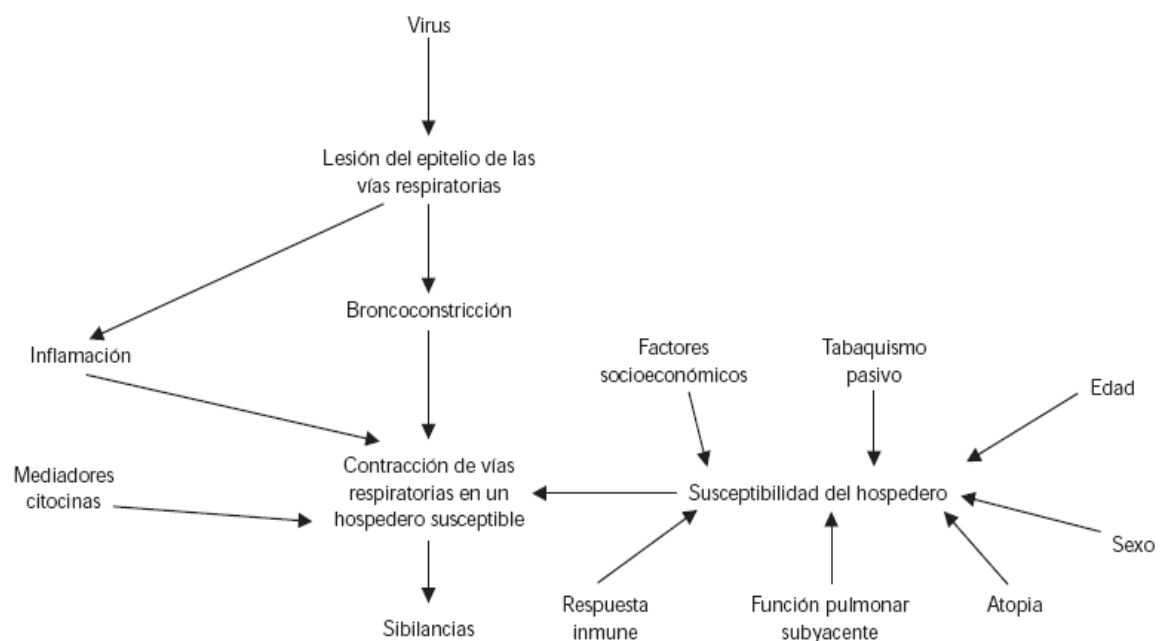


Figura 11. Asociación multifactorial entre factores infección viral respiratoria y desarrollo de sibilancias

I.Introducción

-Factores socioeconómicos. El riesgo por padecer enfermedad grave por VRS es mucho mayor en lactantes de familias de recursos bajos, y esto parece relacionarse con la existencia en condiciones de hacinamiento y con familias numerosas (Halcken et al, 1995). La presencia de hermanos mayores aumenta el riesgo de bronquiolitis.

-Tabaquismo pasivo. Se ha demostrado una relación positiva entre la exposición a humo de tabaco y la presencia de enfermedades respiratorias en todas las edades. La exposición al humo del tabaco en hijos de madres fumadoras se ha relacionado con incremento de hasta 4 veces el riesgo de sufrir bronquiolitis y sibilancias precoces (Halcken et al, 1995; Martínez et al, 1995), pero no existe asociación a los 6 años (Martínez et al, 1995) ni a los 13-14 años (Kramer et al, 2004), siendo su efecto mayor cuanto menor es la edad.

El riesgo se relaciona con el tabaquismo materno más que el paterno, esto podría explicarse por el mayor tiempo que suelen pasar las madres con sus hijos. También ha sido estudiado el tabaquismo materno durante el embarazo, habiéndose constatado alteraciones en el desarrollo fetal del pulmón, lo que conllevaría a disminución de la función pulmonar al nacimiento y un estado de hiperreactividad bronquial durante al menos las 10 primeras semanas de vida (Wright et al, 1991).

-Lactancia materna. Según los trabajos publicados, parece claro que la lactancia materna confiere un cierto grado de protección frente a enfermedades de vías respiratorias inferiores. Un metaanálisis de estudios prospectivos sugiere que la lactancia materna exclusiva durante al menos los primeros 4 meses de vida se asocia con menor tasa de asma en la infancia y que tal efecto es más pronunciado en niños con historia familiar de atopia (Gdalevich et al, 2001). Este dato podría reflejar tan sólo un efecto protector de la lactancia materna frente a las infecciones respiratorias, principales desencadenantes de sibilancias en los primeros meses de vida (Kjellman, 1994; Oddy et al, 1999).

En particular ha sido estudiado en niños con cuadros por VRS, en los que su papel esencial no sería la prevención de las infecciones, sino la reducción de la gravedad de la enfermedad (Wright et al, 1989). Se ha detectado en el calostro materno una actividad neutralizante contra VRS, producida por inmunoglobulinas tipo A (IgA) maternas (Chiba et al, 1987).

-Atopia. El desarrollo de enfermedades atópicas depende de la interrelación de factores genéticos, de la exposición a factores ambientales e interacción con la estimulación de un perfil Th-2. Hay resultados contradictorios en cuanto a la posible relación causal entre el desarrollo de sibilancias tras infección viral y la atopia. En parte, es debido a la dificultad para definir y diagnosticar la atopia en pacientes durante el primer año de vida, la heterogeneidad en el planteamiento de diferentes

I.Introducción

estudios, junto con la compleja relación entre infecciones respiratorias y el desarrollo ulterior de sibilancias persistentes / asma. En dicha relación se implican diferentes factores del huésped: la edad, desarrollo del sistema inmune tanto de la respuesta innata y adaptativa así como el número y gravedad de las infecciones. Actualmente se han puesto en relieve factores relacionados con la maduración inmune que parecen estar enlazados frente a la resistencia de infecciones virales y sensibilización atópica, y cuya alteración/ déficit se ha demostrado en niños con alto riesgo de atopia (Openshaw et al, 2005).

Además las infecciones virales en general (Culley et al, 2006), rinovirus y VRS en particular (Openshaw et al, 2005; Oddy et al, 2002), se ha postulado su capacidad de modular mecanismos inmunológicos durante el desarrollo inmune postnatal y contribución al desarrollo de asma durante la infancia. Estudios que apoyan la asociación con infecciones virales y sensibilizaciones alérgicas a los 9-10 años después del ingreso por BA, la prevalencia de sibilantes era hasta 3 veces mayor que en un grupo control (Noble et al, 1997).

En un estudio australiano (Young et al, 1995), observaron que los niños que requirieron ingreso por BA tenían una función pulmonar subóptima al mes de vida (previo al desarrollo de síntomas respiratorios), favoreciendo la hipótesis que el padecimiento de BA identifica aquellos niños con más riesgo de desarrollo de episodios recurrentes de sibilantes en respuesta a infecciones respiratorias.

La mayoría de los principales estudios hasta el momento, no establecen un riesgo aumentado de sensibilizaciones alérgicas en niños con antecedente de BA (Martínez et al, 1995; Sigurs et al, 2000; Stein et al, 1999). Por tanto el aumento de riesgo de sibilancias después de infección grave por VRS no está asociado a un riesgo aumentado de atopia, indican que podrían existir anomalías previas que lo favorezcan (Wennergren et al, 2001).

Realmente para definir la cuestión si la infección por VRS es causa o asociación con el desarrollo de sintomatología respiratoria persistente posterior y aumento de sensibilizaciones alérgicas, sería necesario el desarrollo de estudios prospectivos, randomizados, en los que se midiera de forma objetiva alteraciones previas a la infección.

Por tanto, el grado en el que el status atópico determina susceptibilidad para el desarrollo de la infección viral y que produce, son cuestiones sin respuestas en la actualidad.

-Factores pulmonares. La importancia de la función pulmonar basal, como factor de riesgo para sibilancias, fue mostrada en un estudio que midió la función pulmonar en lactantes antes de que hubieran contraído cualquier enfermedad de vías

I.Introducción

respiratorias inferiores (Young et al 1995, Martínez et al, 1988). Aquellos lactantes en los que la función estaba disminuida, tuvieron un riesgo de tres a seis veces mayor de padecer episodios de sibilancias durante el primer año de vida. Incluso, el riesgo de sibilancias todavía se encontraba presente al tercer año de seguimiento (Martínez et al, 1991).

El daño pulmonar temprano también parece aumentar el riesgo de padecer enfermedad en las vías respiratorias inferiores y sibilancias. Los lactantes con antecedentes de prematuridad, tienen mayor riesgo de padecer sibilancias, en particular si requirieron ventilación mecánica. De igual forma ocurre en los lactantes con displasia broncopulmonar (Morgan et al, 1992).

6. Clínica

Tras un periodo de incubación aproximado de 4 a 5 días, en el cual se produce la replicación viral en nasofaringe y su diseminación posterior a vías respiratorias inferiores, un tercio de pacientes afectados manifestarán síntomas a dicho nivel, como cuadro de BA. 1-3 días después de la aparición de los síntomas de vías altas, aparecerá la tos, febrícula y luego dificultad respiratoria progresiva con aparición de sibilancias. La BA se comporta como un cuadro respiratorio obstructivo, de vía aérea baja, precedido de una infección respiratoria alta.

En un porcentaje elevado de casos la resolución del cuadro ocurre entre los 7-12 días, pero en los casos más graves, en los que progresan la tos y la dificultad respiratoria, pueden conllevar rechazo de la alimentación, taquipnea o una serie de circunstancias que facilitan la insuficiencia respiratoria en el lactante con cianosis y/o crisis de apnea.

En el primer mes de vida la clínica puede ser atípica, con febrícula, irritabilidad, rechazo de la alimentación o episodios de apnea.

En la mayoría de los lactantes que inicia un cuadro de bronquiolitis existen antecedentes de contacto con niños mayores o adultos con infecciones respiratorias leves en la semana precedente al comienzo de la enfermedad, que actúan como transmisores del virus.

Sus síntomas más relevantes, polipnea, tiraje e hiperinsuflación pulmonar no son exclusivos de la bronquiolitis y pueden deberse también a asma del lactante o neumonía viral.

La clínica manifestada es la producida tras la inflamación y obstrucción de las pequeñas vías aéreas mediada por la infección viral. Clínicamente los pacientes con bronquiolitis presentan tos que va en aumento de forma paulatina en frecuencia e intensidad, y se acompaña de signos de dificultad respiratoria: taquipnea y tiraje, en

I.Introducción

los casos más graves aparece aleteo nasal, cianosis y con deterioro del estado general. La auscultación respiratoria es variable (Everard, 2006): presentando en algunos casos estertores subcrepitantes y crepitantes, como resultado del predominio del edema y el acumulo de secreciones en las vías respiratorias (más frecuente en lactantes pequeños), y en otros en los que predominan el broncoespasmo con sibilancias y espiración alargada como síntoma guía.

La dificultad respiratoria suele tener una intensidad creciente, y alcanza su máxima expresividad clínica a las 24-48 horas, en las que se producen la mayoría de los ingresos hospitalarios (González de Dios et al, 2010) y después mejora gradualmente. Sin embargo, algunos pacientes muestran un curso grave y desarrollan cuadros de insuficiencia respiratoria con hipoxia, deshidratación, neumotórax e incluso insuficiencia cardiaca congestiva (ICC) por lo que precisarán ser ingresados en UCIP (Crespo, 2001).

6.1 Criterios de gravedad-hospitalización de la bronquiolitis aguda

Son necesarios de cara a poder identificar los casos de BA graves de forma precoz y así prevenir las complicaciones de riesgo vital.

La gravedad está relacionada con mayor necesidad de oxígeno (O₂), mayor estancia hospitalaria, necesidad de ingreso en unidades de cuidados intensivos o necesidad de asistencia respiratoria.

Los criterios de gravedad se pueden clasificar en 3 grupos (tabla 4 y 5):

1. Factores relacionados con alto riesgo de enfermedad grave por VRS
2. Criterios obtenidos de la anamnesis y/ o exploración física.
3. Criterios relacionados con la función respiratoria.

En base a estos criterios se puede establecer los casos que tienen más riesgo de hospitalización:

- Menores de 3 meses, especialmente los menores de 6 semanas.
- Grupos de riesgo por antecedentes personales de comorbilidad.
- Apneas espontáneas o tras maniobras realizadas.
- Persistencia del distrés respiratorio (dificultad respiratoria intensa, taquipnea mayor de 60 respiraciones por minuto, signos de hipoxia como cianosis, somnolencia o letargia, irritabilidad).
- Existencia de trastornos digestivos (rechazo del alimento o vómitos, signos de deshidratación)
- Signos físicos relacionados con necesidades de O₂: entre los signos de dificultad respiratoria el que ha demostrado tener un gran valor predictivo es la intensidad del tiraje.

I.Introducción

- Datos de hipoxemia demostrada: SatcO₂ < 95% respirando aire ambiente o PO₂ < 75 mmHg o cianosis. **Tabla 4.** Criterios clínicos de gravedad para la evolución de la bronquiolitis. (Extraída de M. Simó, 2010)

Criterios clínicos

Rechazo del alimento o intolerancia digestiva

Presencia de letargia

Historia de apnea

Taquipnea para su edad

Aleteo nasal, tiraje grave, la presencia de quejido y cianosis

Tabla 5. Factores de riesgo en relación con la gravedad de la bronquiolitis.

Factores de riesgo:

Edad menor a 12 semanas

Presencia de comorbilidades: cardiopatía congénita hemodinámicamente significativa, inmunodeficiencia, enfermedad pulmonar crónica, prematuridad.

Tiempo de evolución corto (< 72 horas)

Presencia de tabaquismo en el entorno

Mayor número de hermanos, asistencia a guardería

Hacinamiento y pobreza

La falta de lactancia materna

Bajo peso al nacimiento (< 2500g)

Madre joven

Menor edad al inicio de la estación del VRS.

6.2 Escalas clínicas de gravedad

Si bien a través de la anamnesis y de la exploración se identifican signos y síntomas predictivos de la gravedad del cuadro, mediante la elaboración de escalas clínicas se intenta establecer con mayor precisión valores predictivos para indicar la hospitalización, discriminar mejor la gravedad de la bronquiolitis y valorar la eficacia de las medidas terapéuticas empleadas. Son múltiples las escalas internacionales existentes, sin que ninguno sea universalmente aceptado por su validez o precisión para la valoración de la gravedad y criterios de ingreso de la BA.

I.Introducción

Entre los signos o síntomas clínicos que se deben incluir por ser los que mejor se han correlacionan con el grado de hipoxemia, se encuentran la intensidad del tiraje, la frecuencia respiratoria por minuto y la cianosis.

Además de emplear signos clínicos para la evaluación de la gravedad, es preferible incluir entre los parámetros la medición de SatcO₂ ya que se gana en precisión, pues es útil en la valoración inicial o en el control de los cambios clínicos que puedan existir, siendo el mejor método disponible para la estimación no invasiva de la oxigenación del paciente (González de Dios et al, 2010).

En la actualidad pese a la no existencia de escalas específicamente validadas para BA, una de las más utilizadas en la práctica clínica es la de Wood-Downes modificados por Ferrés (WDF) (tabla 6).

Tabla 6. Escala clínica Wood-Downes modificada por Ferrés (Tomada de Ferrés, 1992)

Puntos	Sibilancias	Tiraje	Frecuencia Respiratoria	Frecuencia Cardíaca	Ventilación	Cianosis
0	No	No	< 30	< 120	Simétrica Buena	No
1	Final espiración	Subcostal Intercostal	31-45	>120	Simétrica regular	Si
2	Total espiración	Supraclavicular Aleteo nasal	46-60		Muy disminuída	
3	Inspiración y espiración	Supraesternal e intercostal	> 60		Tórax silente	

Gravedad según la escala: Crisis leve: 1-3 puntos, moderada: 4-7 puntos, grave: 8-14 puntos

7. Diagnóstico

El diagnóstico de la bronquiolitis es eminentemente clínico. La mayoría de autores sospechan el inicio de una bronquiolitis por el cuadro clínico (el primer episodio de dificultad respiratoria en un lactante), la edad del paciente sobre todo si es en época epidémica (mayor incidencia entre los meses de octubre y marzo, especialmente entre diciembre y febrero). No existen estudios para confirmar el diagnóstico de la enfermedad (González de Dios et al, 2010).

7.1 Diagnóstico del agente etiológico

Para el diagnóstico de la BA no es obligatorio la realización de pruebas microbiológicas, pues el conocimiento del agente causal realmente no va a influir en el manejo del paciente. De hecho, no existe consenso sobre la utilidad de las pruebas de diagnóstico rápido del VRS, siendo éste el principal agente causal. De todas maneras dado que la forma empleada en la detección del VRS en moco nasal por inmunofluorescencia directa (Mackie et al, 2001) es rápida a la vez que simple se debería utilizar al menos en los casos hospitalizados por: permitir la vigilancia epidemiológica, el aislamiento del paciente hospitalizado, simplificar el manejo diagnóstico-terapéutico en las formas clínicas febriles, así como orientar en el manejo de los pacientes graves.

Las técnicas de diagnóstico para la detección del VRS en secreciones nasales más rápidas son mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) o de inmunofluorescencia directa e indirecta, que permite la identificación de antígenos del virus en moco nasal. Posee una excelente fiabilidad, ya que ha mostrado una aceptable sensibilidad y especificidad en relación al cultivo viral .La técnica de inmunofluorescencia (inmunocromatografía e inmunoensayo óptico) es más rápida (menos de una hora) que el ELISA, pero requiere la disponibilidad de un microscopio de fluorescencia (Reina et al, 2004).

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrece la mayor sensibilidad que la inmunofluorescencia, ya que detecta un importante porcentaje de virus no identificados mediante cultivo viral o pruebas de detección antigénica, por lo que son consideradas como patrón de referencia, pero por su coste, complejidad y falta de estandarización, hace que su disponibilidad a nivel asistencial sea menor (Kuypers et al, 2006).

7.2 Pruebas complementarias de diagnóstico

En general ante un cuadro de BA, no se recomienda realizar pruebas complementarias de rutina, pues en la mayoría de las ocasiones son innecesarias e inespecíficas (Simó et al, 2010). El hemograma suele ser normal, y en otras ocasiones completamente inespecífico. Puede tener utilidad para detectar sobreinfección bacteriana (junto con reactantes de fase aguda como proteína C reactiva y/ o procalcitonina). A veces muestra leucocitosis mayor de 12 000/mm³ debido a la linfocitosis, también influenciados por las situaciones de estrés e hipoxia, sin embargo, en muchos casos puede ser rigurosamente normal.

I.Introducción

Se deberían efectuar hemocultivos en todos los pacientes en los que se piense que pueda existir una sobreinfección bacteriana, aunque se ha constatado que el riesgo de infección bacteriana asociada en pacientes con síntomas de BA es generalmente bajo (Purcell et al, 2002 y 2007). Se debería solicitar hemocultivo en los niños con BA que presenten aspecto tóxico, fiebre elevada (mayor de 39 °C) así como en aquellos que presenten infiltrados segmentarios o lóbares en la radiografía de tórax, ya que podrían coexistir infecciones vírales y bacterianas en niños hospitalizados (Purcell et al, 2004; Randolph et al, 2004).

Múltiples estudios han demostrado incrementos notables en suero de niveles de inmunoglobulinas E (IgE) y G (IgG) e en niños con BA-VRS que presentan sibilancias, lo que podría explicar que el broncoespasmo es consecuencia de una reacción de hipersensibilidad.

La radiografía de tórax en la BA tampoco debe realizarse de forma rutinaria. Estaría indicada sólo en aquellos casos en los que existen dudas diagnósticas o con mala evolución clínica. Se ha observado que si bien en los cuadros de bronquiolitis leve no existen alteraciones, en el resto suele mostrar como dato más destacado una hiperinsuflación pulmonar por atrapamiento aéreo difuso o localizado como infiltrado intersticial difuso parahiliar (Brooks et al 1999; Kneyber et al 2001). La temperatura por encima de 38,5 °C y la SatcO₂ por debajo de 92-94% incrementan el riesgo de tener una radiografía de tórax alterada (García et al, 2004; Schuh et al, 2007). A menudo se observan atelectasias laminares o segmentarias, infiltrados perihiliares y en ocasiones infiltrados intersticiales bilaterales ó zonas de consolidación. Excepcionalmente aparecen complicaciones como enfisema intersticial, neumotórax y/ o neumomediastino.

8. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de bronquiolitis debe realizarse con todas las enfermedades que se acompañen de dificultad respiratoria y sibilancias (tabla 7).

Tabla 7. Diagnóstico diferencial de bronquiolitis aguda

Asma
Tos ferina
Aspiración por reflujo gastro-esofágico/ trastorno de la deglución
Cuerpo extraño en vías respiratorias
Fibrosis quística
Anomalías pulmonares congénitas
Infección por Chlamydia trachomatis
Inmunodeficiencias
Cardiopatías congénitas
Neumonitis intersticial
Bronquiolitis obliterante

9. Tratamiento

La bibliografía publicada en relación con el tratamiento de la BA es muy amplia, pero como en otros aspectos, existen limitaciones importantes por la gran variabilidad existente entre los diferentes estudios revisados (en base a distintos criterios de ingreso hospitalario, de gravedad o de inclusión-exclusión de pacientes y edad entre otros). Ello explicaría la heterogeneidad en los resultados obtenidos.

En los últimos años, el mayor avance en el arsenal frente a la BA ha sido desarrollado en la prevención (anticuerpos monoclonales como inmunoprofilaxis), pero en el tratamiento de la fase aguda falta definición (Landau, 2006) y continúa siendo esencialmente sintomático, esencialmente basado en medidas de soporte.

Sería interesante encontrar elementos en el tratamiento de la BA encaminados a (Calogero et al, 2007): disminuir la morbi-mortalidad, el número de ingresos hospitalarios y días de hospitalización así como disminuir secuelas a largo plazo como patología respiratoria recurrente y/o asma.

9.1 Tratamiento aplicado de forma ambulatoria

Suele ser suficiente en las formas leves de bronquiolitis. Se basa fundamentalmente en las medidas de soporte, si bien no existe un tratamiento de soporte específico en el manejo de la BA.

Se consideran recomendaciones basadas en opiniones de expertos y de buena práctica clínica las siguientes:

Mantener una hidratación adecuada, con fraccionamiento de tomas/comidas, empleo de lavados nasales con suero fisiológico y aspiración de secreciones (antes de las tomas, antes de tratamiento inhalado, si se objetivan signos de dificultad de vías altas), medidas posturales (posición semiincorporada o elevación de la cabecera de la cuna), control de la temperatura, evitar irritantes como el humo/ exposición al tabaco entre otras medidas.

9.2 Tratamiento hospitalario

En caso de BA moderadas-graves, y los de presentación en niños de alto riesgo, debe valorarse si necesitan ser hospitalizados, como se ha mencionado con anterioridad.

9.2.1 Medidas generales/ tratamiento de soporte

Además de las medidas generales expuestas en el apartado anterior, las ventajas que aporta el ingreso en un centro hospitalario es poder monitorizar el paciente, junto con otros cuidados específicos como: alimentación por sonda

nasogástrica, fluidoterapia (si hay intolerancia digestiva, gran dificultad respiratoria o alteraciones electrolíticas) y oxigenoterapia.

9.2.2 Oxígeno

Se trata del tratamiento hospitalario actual más útil en la BA. La decisión de administrar O₂ se debe basar en la valoración conjunta de los signos clínicos y los valores obtenidos mediante pulsioximetría. Los niños con signos de dificultad respiratoria en aumento y/o cianosis, o en los que se demuestre una SatcO₂ < 92% deben recibir O₂ suplementario, si bien actualmente sigue sin existir un punto de corte crítico para establecer la oxigenoterapia (Bush et al, 2007; Team, 2012; González de Dios et al, 2010). Se debe administrar O₂ humidificado, en los lactantes pequeños se debe administrar caliente, normalmente en gafas nasales, para mantener una SatcO₂ > 94 %.

La necesidad de ventilación mecánica se presenta cuando pese el tratamiento de soporte es adecuado, la PaO₂ es menor de 40 mm Hg y la PaCO₂ es superior a 75 mm Hg. Las indicaciones más frecuentes de ventilación mecánica en los niños con BA son los episodios de apneas y la insuficiencia respiratoria con acidosis o hipoxia a pesar del tratamiento con O₂, o tras intentar técnicas de ventilación no invasiva como paso intermedio previo a la intubación. En este sentido se ha visto que la ventilación no invasiva en modalidad CPAP contribuye a disminuir el trabajo respiratorio, previene las atelectasias y mejora la distribución de gases en vías aéreas con obstrucción, con lo que en muchos casos en aquellos pacientes que presenten dificultad respiratoria grave, hipercapnia o episodios de apnea se evitan la necesidad de ventilación invasiva (Thia et al, 2008).

La ventilación no invasiva y la oxigenoterapia de alto flujo son métodos intermedios entre la ventilación mecánica invasiva y la oxigenoterapia convencional que pueden ser útiles en pacientes con insuficiencia respiratoria moderada, evitando en muchos casos la progresión a una insuficiencia respiratoria grave.

Estudios recientes (Arora et al, 2012; Milési et al, 2013; Bressan et al, 2013) han publicado resultados prometedores sobre la ventilación no invasiva y afirman que ésta debería ser una parte fundamental del tratamiento en las bronquiolitis y la mayoría de las guías clínicas las recomienda con un alto nivel de evidencia (Simó et al, 2010). Por ello, la oxigenoterapia de alto flujo con cánulas nasales constituye actualmente parte fundamental en el cuidado de los niños con BA que ingresan (Oñoro et al, 2011).

9.2.3 Heliox

Existen pocos trabajos sobre la utilidad del eliox (mezcla gaseosa de helio y O₂) en la bronquiolitis aguda. Los resultados obtenidos en los diferentes trabajos son discordantes en cuanto a mejoría clínica, aunque todos ellos coinciden en la ausencia de efectos adversos.

En la actualidad parece que el uso del heliox podría ser de utilidad en pacientes con bronquiolitis moderada-grave, pero se requieren más estudios que refuercen esta afirmación. El heliox administrándolo en nebulización puede mejorar la cantidad de fármaco que penetra distalmente y su distribución (Garner et al, 2006; Hess et al, 1999), no obstante no hay estudios específicos en BA.

Un trabajo realizado en una UCIP en el que se estudia la administración de heliox mediante máscara facial (Martín-Torres et al, 2008) encuentra una estancia media en UCIP significativamente menor en el grupo "heliox". El uso conjunto del heliox con CPAP (Martín-Torres et al, 2002) demuestra también una mejoría en la escala clínica de gravedad de los pacientes, un descenso de los niveles de CO₂ medido con un sensor transcutáneo y aumento de la saturación arterial de O₂, que se produce en ambos grupos de tratamiento aunque con mayor intensidad en el grupo tratado con heliox.

Sin embargo en otro estudio (Liet et al, 2005) que compara la necesidad de ventilación no invasiva en un grupo a los que se administra heliox versus un grupo tratado con mezcla de aire- O₂ no encuentra diferencias significativas en su evolución.

Los datos discordantes de los estudios son muy dependientes de los aspectos técnicos de la administración del heliox (tipo de interfase, concentración de helio, aplicación con o sin presión positiva, modo continuo o discontinuo); en general los beneficios se obtienen cuando el heliox se administra de forma continua (Garner et al, 2006), ya que el heliox es un gas inerte cuyo efecto solo persiste mientras se administra. Ante estos datos se considera actualmente el uso selectivo del heliox en BA moderada-grave utilizado con mascarilla con reservorio y de forma continua con un concentración 70/30; en los casos de BA grave y/ o refractarios al tratamiento con heliox a través de mascarilla con reservorio se recomienda utilizar el heliox combinado con CPAP.

Fármacos

Suero salino hipertónico

El suero salino hipertónico (SSH) nebulizado actúa atrayendo agua del interior de la pared bronquial hasta la luz de las vías aéreas y, de esta forma puede promover

I.Introducción

la hidratación de las secreciones respiratorias (disminuir la viscosidad) y favorecer su movilización (aclaramiento mucociliar) y así mejoraría alteraciones patofisiológicas de la BA (Mandelberg et al, 2010). También produce un efecto tusígeno, lo que puede contribuir a la movilización de éstas secreciones.

El SSH es considerado un tratamiento eficaz siempre que sea bien tolerado. Parece ser útil en el manejo de la BA del niño hospitalizado, ya que no presenta riesgos (no se han demostrado) y sí ciertos beneficios (reduce días de hospitalización, mejoría en puntuaciones clínicas y disminución número de hospitalizaciones) (Zhang et al, 2008), aunque también estudios recientes lo cuestiona (Zhang et al, 2013; Jacobs et al 2014). No está claro cual es la pauta más adecuada a seguir (concentración, dosis, frecuencia de administración) para maximizar su efecto (Balaguer et al, 2009). Dado el buen perfil riesgo-beneficio del SSH nebulizado se debe considerar su uso en el tratamiento de la BA, sólo o en combinación con broncodilatadores, que en este caso tendría el beneficio de evitar el potencial efecto secundario de broncoespasmo derivado de la administración de una solución hipertónica en el árbol bronquial.

Broncodilatadores (salbutamol, adrenalina, bromuro de ipratropio)

Son utilizados en un alto porcentaje de los casos tanto hospitalizados como los tratados de forma ambulatorio. Existen claras divergencias entre estudios en los que encuentran eficacia y los que no demuestran ningún beneficio (no se ha demostrado que mejore la SatcO₂, reducción de ingresos hospitalarios tras su administración en urgencias, ni disminuyen la duración de la enfermedad ni días de ingresos) o incluso los consideran incluso perjudiciales (coste y efectos adversos) (Gadomski et al, 2010).

B-adrenérgicos: salbutamol

El salbutamol es un beta 2 adrenérgico de acción rápida que actúa a nivel de los receptores produciendo broncodilatación. En varios meta-análisis se ha observado que producen una leve y corta mejoría en algunos parámetros clínicos de algunos pacientes, sin embargo no han demostrado claramente mejoría clínica (no mejoran la oxigenación ni reducen el número de ingresos), por lo que finalmente no debe ser recomendado de forma rutinaria (Gadomski et al, 2010).

Es probable que la estandarización de su uso en la BA, se deba a la semejanza de los síntomas y signos entre BA y asma. Ya se ha reseñado la fisiopatología de la bronquiolitis consistente principalmente en la obstrucción por el daño epitelial, el edema, la infiltración celular peribronquial y el acumulo de células y fibrina en la luz bronquial fruto de la respuesta inflamatoria tóxica, más que por el componente de broncoespasmo. De hecho es probable que el espasmo de la musculatura lisa de la

I.Introducción

vía respiratoria en cuestión juegue un papel insignificante a diferencia de lo que ocurre en el asma.

Como en lactantes < 6 meses predomina la obstrucción intrabronquial frente al predominio del broncoespasmo, éste último empieza a ser más evidente en los niños mayores de 6 meses por lo que parece que sí podrían ser más útiles por encima de dicha edad. De todos modos, pese a la ausencia de evidencia científica, se puede considerar la realización en caso de duda de una prueba terapéutica con salbutamol (Simó et al, 2010).

Adrenalina

Diferentes autores (Martín-Torres et al, 2002; Valverde, 2005) sugieren que la adrenalina nebulizada produciría una mejoría clínica más importante que el salbutamol gracias a su potencial beneficio teórico por su efecto alfa (vasoconstrictor con reducción del edema y de la secreción mucosa) y beta-adrenérgico (broncodilatador). Sin embargo se considera que la adrenalina tampoco se debe utilizar de forma rutinaria en la BA, por una relación beneficio-riesgo parcialmente desfavorable (debido a los efectos adversos, coste de la medicación con respecto a una mejoría leve y transitoria), y por ello sólo se debería considerar realizar una prueba terapéutica en lactantes. Y debería ser suspendido si tras su aplicación no se objetivan mejoría (Hartling et al, 2011; Martín-Torres et al, 2002; Valverde, 2005).

En las guías de práctica clínica se inclinan por la adrenalina nebulizada como broncodilatador de elección en urgencias y en los casos hospitalizados, no así en domicilio en las BA leves (que sería más apropiado el uso de salbutamol). Los meta-análisis publicados consideran que la eficacia de la adrenalina es superior a la del salbutamol (Simó et al, 2010; Skjerven et al, 2013) (al mejorar puntuación en la escala de gravedad, SatcO₂). Dado que los broncodilatadores ofrecen una leve mejoría en las puntuaciones de las escalas clínicas a corto plazo, dicho beneficio, y siempre teniendo en cuenta la falta de otros agentes terapéuticos, debe sopesarse su administración.

Bromuro de Ipratropio

Se trata de un anticolinérgico con perfil más bronco-selectivo y menos efectos secundarios colaterales que la atropina. Desde que se introdujo en el tratamiento de la BA ha tenido unos resultados controvertidos, y en la actualidad prácticamente ningún estudio encuentra beneficios, por lo que se desaconseja su uso (Simó et al, 2010).

Los broncodilatadores orales como el salbutamol oral no se considera eficaz, al tener una relación beneficio-riesgo muy desfavorable (efecto broncodilatador pobre y efectos adversos mas frecuentes en comparación con la vía inhalada) por lo que se considera inapropiado su uso en el tratamiento de la BA (Simó et al, 2010).

Corticoides nebulizados (budesonida, fluticasona, dexametasona)

I.Introducción

No se han visto beneficios a corto plazo en la fase aguda de la bronquiolitis (Richter et al, 1998; Cade et al, 2000; Bentur et al, 2005; Ochoa et al; 2007). Tampoco se ha observado que su uso tras un episodio de bronquiolitis reduzca los episodios de sibilancias recurrentes en estos pacientes (Fox et al, 1999; Kajosaari et al, 2000; Wong et al; 2000), aunque hay autores que opinan que su utilización durante y después de la bronquiolitis podría disminuir las posibilidades de desarrollar asma posteriormente, apoyándose en los resultados obtenidos en niños de alto riesgo (atopia, antecedente familiar de atopia, tabaquismo materno, IgE elevada) sí parece mostrar algún efecto protector (Bacharier et al, 2009).

En un estudio randomizado y controlado donde se comparó placebo con el uso de corticosteroides nebulizados en BA-VRS se concluyó que no existen efectos clínicos beneficiosos a corto ni a largo plazo con la utilización de corticoides nebulizados en la fase aguda de bronquiolitis por VRS (Wong et al, 2000).

Corticoides sistémicos (metilprednisolona, dexametasona)

Debido a que la inflamación y la respuesta inmune están implicadas en la patogénesis de la obstrucción en la BA, muchos autores vislumbraron las posibilidades derivadas de su uso.

Actualmente no existen dudas a cerca de la ineficacia de los corticoides sistémicos en el tratamiento de la bronquiolitis e incluso en algunas circunstancias pueden ser perjudiciales, ya que presentan una clara relación beneficio-riesgo desfavorable (exposición a medicación innecesaria con potenciales efectos sistémicos adversos frente a posibilidad de mejoría en el seguimiento de algunos pacientes y éstos sin resultados concluyentes).

Se ha analizado el efecto del tratamiento en monoterapia dexametasona oral (Corneli et al, 2007) o en combinación con adrenalina nebulizada (Plint et al, 2009) mostrando conclusiones diferentes. Probablemente su uso combinado con adrenalina nebulizada es por el efecto sinérgico del broncodilatador asociado, demostrando que se reducía el número de ingresos frente al uso de ambos fármacos por separado, no obstante ajustando los resultados por comparaciones múltiples el efecto protector se diluía (riesgo relativo: 0.65, intervalo de confianza IC:0.41-1.03).

Montelukast

Aunque se haya demostrado que niños con bronquiolitis tienen altos niveles de leucotrienos proinflamatorios en la vía aérea, un estudio (Bisgaard et al, 2008) reciente en el que se administraba montelukast o placebo durante 6 meses a niños menores de 2 años tras padecer BA, no demostró reducción de sintomatología respiratoria frente a placebo, por lo que actualmente tampoco se recomienda el tratamiento con montelukast en las guías de práctica clínica (Simó et al, 2010).

Ribavirina

En principio es el único tratamiento específico en la BA-VRS, ya que se trata de un agente antiviral con actividad frente al VRS. En el año 1996 se consideró su uso en pacientes de alto riesgo con infección VRS confirmado, casos graves y/o precisaran de ventilación mecánica, aunque diversos ensayos clínicos han observado un efecto dudoso de este fármaco en la reducción de la gravedad (Academia Americana del comité pediátrico de enfermedades infecciosas, 1996).

Dado que los resultados de este antiviral no han sido satisfactorios se ha dejado de recomendar su uso clínico debido además del alto coste que supone así como su posible efecto teratógeno en las gestantes, ha quedando relegado a su uso en pacientes de riesgo muy seleccionados, principalmente en inmunodeprimidos graves (Simó et al, 2010).

Antibióticos

La tasa de bacteriemia en niños con BA febriles es muy baja, aproximadamente de 0,2% (Willwerth et al, 2006). Los antibióticos carecen de valor terapéutico salvo que se constata una neumonía bacteriana secundaria u otra sobreinfección como complicación del cuadro de BA. Hay que tener en cuenta que el propio VRS puede producir en estos niños una bronconeumonía, por lo que en muchas ocasiones se sobreestima la necesidad de antibioterapia al ser confundidas con sobreinfecciones de etiología bacteriana, llegando en más del 50% de estos casos a recibir antibióticos de forma innecesaria. En aquellos niños con cuadro grave de BA con necesidad de asistencia ventilatoria si es frecuente encontrar un riesgo aumentado de coinfecciones bacterianas (Thorburn et al, 2007).

Si bien los macrólidos han demostrado tener propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras además de su actividad antibacteriana, sin embargo son dispares los resultados en bronquiolitis (Tahan et al, 2007; Kneyber et al, 2008).

10. Estrategias de profilaxis en la actualidad

La gravedad de la BA y la morbi-mortalidad se encuentran relacionadas con la existencia de factores de riesgo. Tanto la morbilidad de la BA (por las consultas que genera tanto en centros de atención primaria y servicios de Urgencias, número de ingresos hospitalarios, necesidad de cuidados específicos/ intensivos en algunos casos), como el riesgo de mortalidad, se incrementan de forma general en los niños de menor edad y en los que tienen algún factor de riesgo debido a la mayor susceptibilidad y gravedad que pueden suponer el cuadro en estos niños.

Además de la morbi-mortalidad durante la fase aguda de la enfermedad, estudios realizados en los últimos años han relacionado de diferentes formas la

capacidad posterior de provocar un estado de hiperreactividad bronquial en forma de episodios de sibilancias recurrentes y/o asma en los sucesivos años (Stein et al, 1999; Kusel et al, 2006; Jackson et al, 2010; Sigurs et al, 2005; Sly et al, 2010).

Ello justifica la importancia de desarrollar no sólo estrategias terapéuticas sino también preventivas (González de Dios et al, 2010), junto con marcadores biológicos que nos ayuden a predecir la evolución del cuadro, logrando en este sentido, una disminución de la frecuencia y gravedad durante la fase aguda así como la disminución de los episodios de sibilancias recurrentes posteriores a un episodio de BA.

10.1 Recomendaciones higiénico-sanitarias

Las guías actuales (Simó et al, 2010) que analizan la prevención de BA, hacen hincapié en las medidas higiénicas como aspecto crucial para intentar la reducción de la transmisión del VRS, más importante si cabe en niños con factores de riesgo. Como es lógico, se tratan de medidas básicas fundamentales que han de realizarse de forma cuidadosa y previa a la administración farmacológica de la inmunoprofilaxis en aquellos con factores de riesgo.

Por ello la importancia de concienciar a los familiares / cuidadores en evitar la exposición a irritantes como el humo de tabaco o a comunidades cerradas / aglomeraciones (guarderías, grandes almacenes...) durante períodos epidémicos. Además se debe insistir en la necesidad de emplear de forma frecuente el lavado de manos, así como el uso de soluciones desinfectantes alcohólicas, tanto en el hábitat del niño, como en guarderías, especialmente en la época de mayor incidencia o si ha existido contacto con otros sujetos afectados de infecciones respiratorias.

En los centros sanitarios, desde que el tema de la infección nosocomial es reconocido como un problema que supone un elevado coste económico (Macartney et al, 2000), se han puesto en marcha planes de concienciación de los profesionales en cuanto a riesgos que conlleva y las medidas higiénicas necesarias como bases fundamentales en su control. Algunas de estas medidas son el diagnóstico precoz de la infección, la utilización de batas y mascarilla, el reagrupamiento de pacientes y cuidadores, la limitación de visitas externas y, sobre todo, el lavado de manos, que se ha demostrado como la medida más efectiva para la prevención de la infección nosocomial (Academia Americana del comité pediátrico de enfermedades infecciosas, 1996).

10.2 Profilaxis pasiva

10.2.1 Inmunoglobulina policlonal hiperinmune (IGIV)

Se trata de una inmunoglobulina hiperinmune policlonal recogida de donantes escogidos por sus altos títulos de anticuerpos frente al VRS, que serviría para neutralizar las cepas del virus. Fue el primer fármaco utilizado y aprobado para la prevención de la infección por VRS en niños menores de 24 meses de edad gestacional con enfermedad pulmonar crónica o nacidos antes de las 35 semanas de gestación. Durante su uso se observó una reducción en la incidencia y la duración de la hospitalización por VRS en los niños de riesgo en los que se aplicaba. Como contrapartida, en niños cardiopatas (Meissner et al, 2003) no se evidenció este descenso en la hospitalización y además se observó un aumento en los episodios cianosantes y de la mortalidad (en los afectos de cardiopatía cianótica y cortocircuito derecha-izquierda) y esto fue atribuido a la sobrecarga de volumen que suponía su administración.

Este hecho, junto con el incomodo esquema de administración (por la necesidad de un acceso venoso una vez al mes, duración de la infusión de cuatro horas), la interferencia con la administración de vacunas de virus vivos y la posibilidad teórica de transmisión de enfermedades infecciosas, desaconsejó su utilización (Groothuis et al, 2002). En la actualidad ha quedado relegado por el palivizumab.

10.2.2 Anticuerpos monoclonales: Palivizumab.

Palivizumab es un anticuerpo monoclonal IgG₁ humanizado, dirigido contra un epítipo del espacio antigénico A de la proteína de fusión VRS. Este anticuerpo monoclonal se obtiene mediante ingeniería genética, compuesto por secuencias aminoacídicas de anticuerpo humano (95%) y murino (5%). Tiene una potente actividad inhibitoria de la fusión (al unirse y bloquear a nivel de la proteína F del VRS) y como consecuencia se reduce la actividad viral y su transmisión entre células. Su efecto neutralizante es activo frente a cepas de los subtipos, A y B del VRS.

Según ficha técnica, palivizumab está indicado en la prevención de la enfermedad respiratoria grave baja causada por el VRS en pacientes pediátricos de alto riesgo de enfermedad por VRS.

Al ser un fármaco de elevado coste, se indica a una población muy selectiva de alto riesgo (Handforth et al, 2004; Heikkinen et al, 2005), por lo que principalmente ha sido valorada su utilidad en grupos de riesgo: lactantes con antecedentes de prematuridad, con o sin enfermedad pulmonar crónica asociada, y lactantes con cardiopatías congénitas.

I.Introducción

Eficacia

Actualmente sólo existen dos ensayos clínicos con palivizumab, de alta calidad metodológica y con similar diseño:

1. El estudio IMPact (1998) en niños con antecedente de prematuridad (con o sin displasia broncopulmonar),
2. Estudio en lactantes con cardiopatía congénita (Feltz et al, 2003) (hemodinámicamente significativas).

En el estudio IMPact 1.502 niños fueron incluidos en un ensayo multicéntrico con asignación aleatoria, distribución 2 a 1 entre el grupo de tratamiento y el de placebo, y doble enmascaramiento. La población de la muestra estaba constituida por:

- Niños menores de 2 años con displasia broncopulmonar (DBP) y tratamiento médico continuado en los 6 meses previos a la epidemia.
- Niños prematuros con 35 o menos semanas de gestación y menos de 6 meses al comienzo del período epidémico.

En el ensayo en lactantes con cardiopatía congénita se incluyeron 1.287 niños menores de 24 meses entre 1998 y 2002. El estudio fue multicéntrico, con asignación aleatoria, doble enmascaramiento y controlado con placebo.

Los resultados en ambos estudios muestran la utilidad del palivizumab como tratamiento preventivo para disminuir la hospitalización por VRS en lactantes con los factores de riesgo estudiados (pretérminos con o sin BDP y en recién nacidos con cardiopatías hemodinámicamente significativas), al observarse una reducción tanto relativa como absoluta del riesgo de ingreso. Otros beneficios clínicos observados fueron la disminución en los días de hospitalización por infección VRS y la disminución en la necesidad de suplementos de O₂. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de ingresos en UCI, los días en UCI o la necesidad de ventilación mecánica.

También hay que señalar que cuanto más importante es el factor de riesgo, los resultados son peores en los pacientes más graves, es decir: tanto en prematuros <32 semanas de edad gestacional, prematuros con BDP y cardiopatías cianógenas.

Se ha visto que para conseguir el mayor beneficio de la inmunopofilaxis coincidiendo durante el pico anual de la epidemia su administración debe comenzar al menos 30 días antes de éste, que según un reciente estudio se debe tener en cuenta la mediana del inicio del pico durante los últimos cinco años, y administrar al menos 5 dosis (Panozzo et al, 2010).

Según todo lo anterior, parece claro los beneficios obtenidos en los pacientes en los se indica palivizumab, más si se tiene en cuenta su escaso potencial de efectos

I.Introducción

adversos, pero su administración sigue estando altamente condicionado por su elevado precio, y que crea la necesidad de redefinir sus indicaciones en aquellas poblaciones de mayor riesgo. De hecho, aunque la utilidad de la inmunoprofilaxis con palivizumab en prematuros entre 32-35 semanas en términos de incidencia de infección por VRS, riesgo de hospitalización o potencial necesidad de ventilación son claras (Panozzo et al, 2010; Lanctôt et al, 2008), por las limitaciones -principalmente económicas- suponen una restricción a la vacunación de estos pacientes.

Uno de los principales obstáculos para la inclusión de los prematuros de edad gestacional 32-35 semanas es que constituyen aproximadamente un 70% del total de los prematuros. Una tarea crucial estaría en redefinir un subgrupo de pacientes con edad gestacional entre 32-35 semanas con mayor riesgo de presentar infecciones graves por VRS y hospitalización. En este sentido recientemente se ha publicado la validación de una escala para estratificar específicamente el riesgo de infección VRS en prematuros con edad gestacional entre 32-35 semanas (estudio FLIP) (Simoes et al, 2011). Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, las recomendaciones actuales de inmunoprofilaxis con palivizumab así como en los casos que no están recomendado se muestran en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Recomendaciones actuales de inmunoprofilaxis con Palivizumab

Niños nacidos con 32 semanas de gestación o menos y menores de 6 meses de edad al inicio de la estación VRS.

Niños nacidos a las 28 semanas o menos de gestación, entre 6-12 meses al inicio de la estación VRS.

Niños menores de 2 años de edad con enfermedad pulmonar crónica y/o displasia broncopulmonar que han necesitado tratamiento en los 6 meses previos al comienzo de la epidemia.

Niños prematuros > 32 semanas con enfermedades de base graves.

Niños prematuros nacidos entre 32-35 semanas y menores de 6 meses de edad al inicio de la estación VRS si durante la campaña existe un aumento significativo de ingreso hospitalario.

Niños menores de 2 años de edad al inicio de la estación VRS y con cardiopatía congénita hemodinámicamente significativa. La decisión de tratar debe realizarse en base al grado de compromiso cardiovascular:

- Niños que reciben medicación para la insuficiencia ICC.
- Niños con hipertensión pulmonar grave o moderada.
- Niños con enfermedad cardíaca cianótica.

Tabla 9. Casos en los que no está recomendado hacer profilaxis.

Enfermedad cardiaca no importante (defecto septal atrial, defecto ventricular septal pequeño, estenosis pulmonar, estenosis aórtica no complicada, coartación moderada de la aorta en paciente con ductus arterioso). Niños con lesiones corregidas por la cirugía, aunque sigan requiriendo medicación para la ICC. Niños con cardiomiopatía que no reciben terapia médica.
--

En cualquier caso se debe tener en cuenta que la decisión de iniciar la inmunoprofilaxis ha de ser individualizada y la necesidad de reforzar las recomendaciones higiénico-sanitarias y consejos a la familia.

En la actualidad, y siguiendo los pasos del palivizumab, se están intentando desarrollar nuevos anticuerpos monoclonales que lo superen en inmunogenicidad, tolerancia, seguridad y propiedades, y probablemente también en precio. De ellos, el Motavizumab que actualmente se encuentra en fase I y II parece ser más potente que su predecesor (Gill et al, 2009; Fernández et al, 2010). El motavizumab se trata de otro anticuerpo monoclonal dirigido a un epítipo de la proteína F del VRS y que está demostrando una clara mejoría en la neutralización de VRS *in vitro* y *in vivo* (Zhu et al, 2011; Mejías et al, 2007), ya que en estudios animales que se ha evidenciado una reducción de VRS a nivel pulmonar hasta 100 veces mayor que con palivizumab. La mayor potencia sugiere la posibilidad de su uso en situaciones clínicas complejas, como en otras poblaciones de pacientes más allá de las actuales de riesgo.

10.3 Profilaxis activa

Pese a la importancia del VRS y su aparente simplicidad (al menos como agente viral), éste virus pone en marcha mecanismos inmunopatogénicos que hasta la fecha ha sido imposible los intentos de desarrollar una vacuna efectiva y segura para la prevención de esta enfermedad. Actualmente se siguen realizando intentos dirigidos enfocados a:

1. Subunidades de glicoproteínas F y G del VRS. Fundamentalmente con las de la glicoproteína F (Karron, 2008; Díez et al, 2011), por ser muy similar entre los subtipos A y B del virus, ser estable y válida antigénicamente. El objeto de las vacunas centradas en dichas glicoproteínas radicaría en que estimularían la formación de anticuerpos neutralizantes que protegieran frente a la BA, por ello su indicación incluiría sujetos que previamente hayan pasado la infección VRS y así la evitación de recaídas. Pero hasta el momento, la producción de estos anticuerpos se ha visto que caen con el tiempo, por lo que se requeriría dosis anuales para el mantenimiento de

I.Introducción

anticuerpos protectores (Tristam et al, 1994), o problemas en relación con su seguridad, sobre todo en vacunas basadas en la glicoproteína G (Karron, 2008; Díez et al, 2011).

Por otro lado se están desarrollando vacunas vivas atenuadas, que tratarían de reproducir la infección natural sin producir enfermedad, y asegurando de que en caso de que los vacunados padecieran la infección no fuera de mayor gravedad que la infección en niños no vacunados¹⁹⁰. Por el momento se intenta desarrollar una vacuna de administración tópica nasal segura, y que no provoque gran irritación en aparato respiratorio. Actualmente se están también desarrollando vacunas de virus vivos con mutaciones en el genoma del VRS mediante ingeniería genética (Karron, 2008; Díez et al, 2011), pero todavía siguen ofreciendo resultados dispares y vacunas con virus quiméricos en fases iniciales de ensayos (Tristam et al, 1994; Blanco et al, 2010).

MÓDULO 2.

Bronquiolitis aguda y respuesta inflamatoria. Respuesta inflamatoria: Citoquinas-quimioquinas en la bronquiolitis aguda

El VRS es responsable de reinfecciones respiratorias anualmente en toda la población, y antes de llegar a los dos años prácticamente el 100% de niños ha tenido al menos una infección por dicho virus. Se desconoce por qué produce en la mayoría de los niños infecciones de vías altas y en otros afectación bronquial, que de ellos un pequeño porcentaje requerirán ingreso.

Se han postulado alteraciones en la respuesta inmune e inflamatoria así como características intrínsecas del huésped y/o del virus, que explicarían la diferente afectación clínica de la BA-VRS.

1. Factores relacionados con el huésped en la respuesta inmune-inflamatoria.

La infección por VRS en niños se ha relacionado con la aparición de sensibilizaciones alérgicas y alteraciones en el desarrollo pulmonar del lactante (Martínez, 2003). Los atópicos, genéticamente predispuestos, que padecen la infección por VRS en los primeros meses de vida, podrían ser más susceptibles de desarrollar bronquiolitis aguda, sibilantes recurrentes y/o asma, actuando el VRS como marcador, que sacaría a la luz la predisposición genética a padecer asma (Crestani et al, 2004; Singh et al, 2007), hasta pasados los 5 años de edad (Kusel et al, 2007).

Se ha propuesto una interpretación de este hecho, en el que la existencia de una infección vírica precoz en niños predispuestos induciría procesos inflamatorios en la vía aérea durante un periodo fundamental de inmadurez, crecimiento y desarrollo pulmonar. Esta inflamación en las vías respiratorias provocaría una alteración en la diferenciación y reparación de los tejidos dañados en condiciones fisiológicas, que podría ser el inicio del deterioro del epitelio, causa y consecuencia a la vez de la hiperreactividad bronquial y del broncoespasmo recidivante, que constituyen un estímulo adicional para el remodelado bronquial, proceso en el que existen cambios estructurales en la vía aérea. Por otro lado, también se ha sugerido que en niños predispuestos, existe una disfunción de barrera epitelial previa, que conduce a una mayor susceptibilidad a IVRI (Holgate, 2012).

2. Respuesta inmune en bronquiolitis aguda

Las manifestaciones clínicas de la infección por VRS son resultado del efecto citopático directo del virus sobre las células del epitelio respiratorio junto con la respuesta inmune del individuo (innata y adaptativa) frente a la infección.

2.1 Inmunidad innata

La inflamación producida en las vías respiratorias frente a la infección es consecuencia de una compleja respuesta coordinada en la que se produce el reclutamiento y activación de células dendríticas, polimorfonucleares y macrófagos (Gill et al, 2005; Ogra, 2004). Constituyen la primera línea de defensa, encargada de regular la respuesta local al liberar *in situ* radicales libres de O₂, proteasas, citoquinas, quimiocinas y otros mediadores de la inmunidad celular que producen la inflamación y que junto con la producción de moco hacen que se obstruya la vía aérea, causa de los signos clínicos de bronquiolitis aguda. La alteración en la respuesta innata a nivel del tracto respiratorio se postula como punto clave en la conexión entre la infección viral en los primeros meses de vida y la persistencia de sibilancias posteriormente (Smyth, 2009).

2.2 Inmunidad adaptativa

En general, las infecciones víricas promueven una respuesta adaptativa Th1, de protección frente al patógeno, con un predominio claro de liberación de interferón- γ (IFN- γ); mientras que el asma y la atopia se caracterizan por favorecer una respuesta Th2, con elevada producción de interleuquinas 4 y 5 (IL-4, IL-5).

En la BA-VRS se ha encontrado un aumento de la respuesta Th2, en concreto en los casos más graves, con elevación de citoquinas proinflamatorias en tracto respiratorio (Bendelja et al, 2000; Román et al, 1997; Waris et al, 1996; Legg et al, 2003; Bont et al, 2000; Pitrez et al, 2005) (Figura 12). En este hecho radica el estudio de los niveles de citoquinas y quimiocinas como biomarcadores de inflamación en la bronquiolitis aguda.

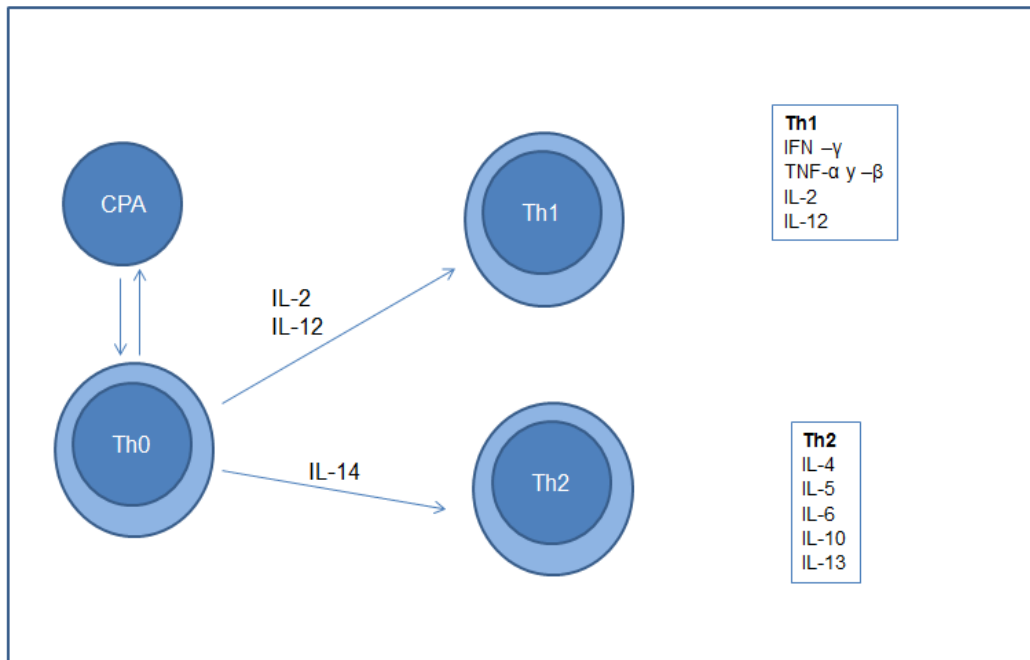


Figura 12. Esquema representativo de las citoquinas. Principales citoquinas implicadas en la respuesta inmune tipo 1 (Th1) y 2 (Th2).

CPA:células presentadoras de antígeno; Th0: Linfocito T helper preinmunes o vírgenes; Th1: Linfocito T helper 1 (linfocito polarizado a respuesta inmune tipo 1);Th2:Linfocito T helper 2 (linfocito polarizado a respuesta inmune tipo 2);IL-2: interleuquina 2; IL-12: interleuquina 12; IL-4:interleuquina 4; IFN- γ :interferón gamma; TNF- α :factor de necrosis tumoral alfa; TNF- β : factor de necrosis tumoral beta; IL-5:interleuquina 5; IL-6:interleuquina 6; IL-10: interleuquina 10; IL-13: interleuquina 13.

3. Respuesta inflamatoria: Citoquinas-quimiocinas en la bronquiolitis aguda

Un numeroso grupo de citoquinas son las responsables de iniciar, seleccionar la dirección y amplificar el tipo de respuesta producida, controlando la intensidad de la inflamación en función de la intensidad de la estimulación antigénica como parte de los mecanismos de defensa frente a la infección.

Mosmann y Coffman (1989) mostraron en un modelo murino que los clones de células T cooperadoras (T helper) podían ser divididos en dos tipos, definidos por su patrón de producción de citoquinas. Los linfocitos T helper (Th) tipo 1 (Th1), producen principalmente IL-2, IFN- γ y TNF- α , responsables de la promoción de la respuesta inmune de tipo celular frente a virus y bacterias. Los linfocitos T helper (Th) tipo 2 (Th2) secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, y serían los responsables de la cooperación con las células B en la respuesta humoral, o inmune de tipo 2 (Mosmann

I.Introducción

et al, 1986) (tabla 10), originariamente la establecida frente a parásitos y característica de las reacciones de hipersensibilidad mediada por IgE.

Estos patrones de secreción no son totalmente extrapolables a los linfocitos humanos (Karulin et al, 2000), los cuales presentan patrones de secreción de citoquinas no excluyentes que frecuentemente combinan la secreción de citoquinas tipo 1 y tipo 2. Por tanto, aunque existen respuestas inmunes de tipo 1 y de tipo 2 bien diferenciadas, éstas no se basan en el predominio de dos tipos de clones Th1 o Th2, sino en el predominio de clones productores de IL-4 o IFN- γ , siendo por ello de mayor interés el estudio de los factores que influyen en la diferenciación de los linfocitos T cooperadores hacia la producción de IL-4 o IFN- γ (tabla 11).

Tabla 10. Patrones Th1 y Th2 de secreción de citoquinas

Citoquina	Th1	Th2
IL-2	++	-
IFN- γ	++	-
IL-12	++	-
TNF- α	++	+
TNF- β	++	-
IL-3	+	++
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-10	+	++

IL-2: interleuquina 2; IFN- γ : Interferon gamma; IL-12: interleuquina 12; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; TNF- β : factor de necrosis tumoral beta; IL-3: interleuquina 3; IL-4: interleuquina 4; IL-5: interleuquina 5; IL-10: interleuquina 10.

Tabla 11. Polarización de los linfocitos T helper hacia la producción de IFN- γ e IL-4

Polarización hacia producción de IFN- γ	Factores favorecedores	Presencia de IL-12 + IFN- γ Presencia de CTL CD8+ activados Antígenos que requieren fagocitosis Patógenos intracelulares
	Factores inhibidores	Presencia de IL-10 o IL-4 Presencia de células productoras de IL-4 activadas
Polarización hacia producción de IL-4	Factores favorecedores	Presencia de IL-4 Linfocitos B como CPA Dosis altas de antígenos
	Factores inhibidores	Presencia de IL-12 + IFN- γ Presencia de CTL CD8+ o células productoras de de IFN- γ

La polarización de la respuesta de los linfocitos T helper hacia la producción de interferón gamma (IFN- γ) o interleuquina 4 (IL-4) viene determinada por factores todavía mal conocidos que dependen de la naturaleza y vía de entrada del antígeno y de la predisposición genética (respuesta condicionada por el huésped). La identificación de las células productoras de IFN- γ o IL-4 depende de criterios funcionales como la producción de citoquinas. CTL: linfocitos T citotóxicos. CPA: células presentadoras de antígenos.

Las quimiocinas controlan el paso de los leucocitos del torrente sanguíneo a los tejidos mediante quimiotaxis, esencial para la inflamación y defensa del huésped ante la infección (figura 13). Entre ellas destacan la IL-8 y las proteínas inflamatorias del macrófago MIP-1 α y 1 β . Entre los estímulos para la producción de quimiocinas, destacan las citoquinas IL-1 y TNF- α , productos infecciosos de bacterias y virus, y las principales de Th1 y Th2 (IFN- γ e IL-4) (Luster, 1998).

En condiciones normales citoquinas y quimiocinas actúan de forma sinérgica y controlada, generando inflamación frente a la agresión, regulando la circulación del pool de leucocitos, de las moléculas de adhesión y la contrarregulación entre patrones Th1/Th2. No obstante, se conoce poco sobre la dinámica de estos mediadores, incluyendo su degradación y vida media (Prieto et al, 2005).

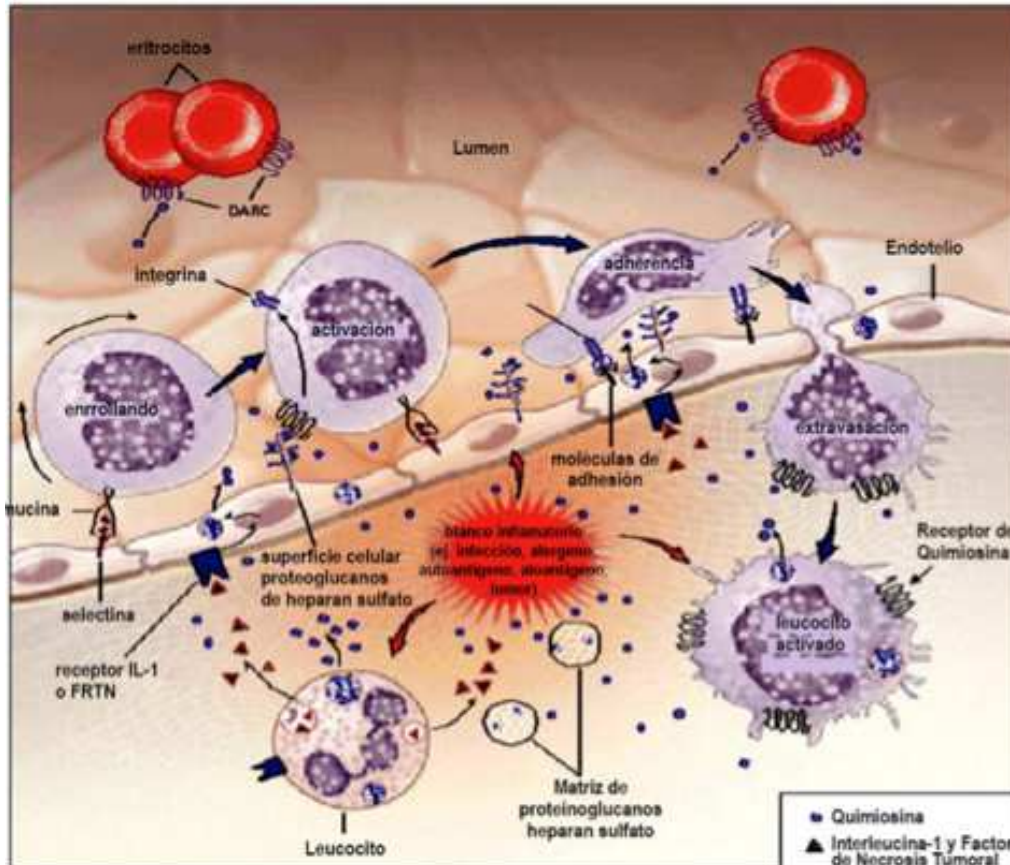


Figura 13. Movimiento leucocitario regulado por citoquinas-quimiocinas. (Adaptado de Luster, 1998)

3.1 Citoquinas y quimiocinas en la respuesta inmune frente a VRS.

Al epitelio bronquial le corresponde una importante función de barrera protectora frente a agresiones externas (agentes infecciosos, irritantes y alérgenos entre otros). Tras la inhalación o inoculación del virus en la mucosa nasal e infección del epitelio respiratorio, un importante número de biomoléculas producidas por el mismo ponen en marcha mecanismos pro y anti-inflamatorios.

A lo largo de la evolución, la inmunidad innata ha desarrollado un sistema muy eficaz de reconocimiento de los microorganismos mediante los receptores reconocedores de patrones (RRP), del patrón molecular asociado a patógenos (PMAP) común y constante de la superficie microbiana. Uno de los RRP más conocidos son los receptores toll-like (TLR). Con la unión del PMAP al RRP se inicia una cascada de señalización intracelular y de funciones antimicrobianas, que incluyen la transcripción de mediadores inflamatorios. Estos mediadores con potentes acciones inmunomoduladoras e inflamatorias son (Tosi, 2005; Garofalo et al, 2000):

Citoquinas esenciales en el desarrollo de la inmunidad innata tales como IL-1, TNF- α , interferones (IFN- α / β / γ), IL-6 e IL-11 que producen activación de Linfocitos B,

I.Introducción

contribuyen al infiltrado celular mononuclear e inducen producción de neuropéptidos y sustancias colinérgicas relacionadas con el broncoespasmo.

Quimiocinas (IL-8, MIP-1 entre otras). IL-8 constituye un potente quimioatrayente de neutrófilos hacia la vía respiratoria siendo la responsable del infiltrado predominante en ésta. IL-8 además regula la producción de IL-6 y del factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) que favorece la inducción de la inflamación.

Factores de crecimiento, entre ellos el endotelial (VEFG) y moléculas producidas por el macrófago activado que potencian la producción de IL-1, TNF- α , Factor de activación plaquetaria (PAF), IL-6, IL-8 e IL-10 entre otras.

Estos mediadores (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IFN- α e IFN- β) están implicados en la inmunidad innata y en el reclutamiento linfocitario necesario para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, que requiere de la activación y proliferación específica de los linfocitos T, estimulados principalmente por la IL-2 y la IL-15.

Con todo ello, las células epiteliales respiratorias quedarían dotadas para regular la respuesta innata del organismo en la primera línea defensiva. Esta defensa es llevada a cabo a través de la expresión local de genes, que orquestan y regulan la reacción proinflamatoria-inmunológica, realizando la reparación tisular con la producción de los elementos señalados como barrera local (figura 14) (Holgate et al, 2000; 1998).

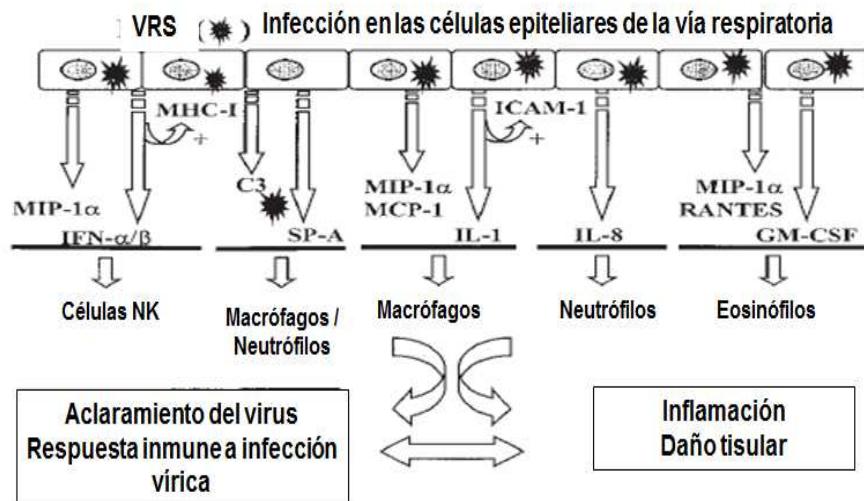


Figura 14. Regulación de la inmunidad innata a nivel del epitelio tras la infección por VRS. (Modificada de Garofalo et al, 2000)

Representación esquemática de la respuesta inmunomoduladora producida en el epitelio de la vía respiratoria infectado por el VRS. IL: interleuquina. MIP-1: proteína inflamatoria del macrófago 1 alfa. IFN- α/β : interferones alfa y beta. MHC: complejo

mayor de histocompatibilidad 1. C3: porción 3 del complemento. ICAM-1: molécula 1 de adhesión intercelular. SP-A: proteína surfactante A.

3.2 Factores que influyen en la polarización en la respuesta Th-1/ Th-2 en bronquiolitis aguda

Se han publicado estudios (Protonotariou et al, 2004; Cohen, 2000) acerca del comportamiento de la respuesta inmune en etapas tempranas de la vida, destacando los que relacionan los efectos del ambiente en los mecanismos inmunológicos que subyacen en el desarrollo de asma y sensibilizaciones alérgicas (Pala et al, 2002) como es la maduración postnatal del sistema inmune tras una infección vírica temprana.

3.2.1 Predominio de la respuesta Th1/Th2 en bronquiolitis aguda

La patogenia de la bronquiolitis aguda se caracteriza por una respuesta de citoquinas Th1 (van Schaik et al, 1999). Su mejor representante, IFN- γ limita la replicación viral y contrarresta la acción de citoquinas Th2, que junto con la estimulación de la respuesta inmune innata e inhibición de la respuesta inmune adaptativa genera inflamación, asociada con la obstrucción de la vía aérea (van Schaik et al, 2000). El desequilibrio en la respuesta inmune hacia una respuesta Th2 por el contrario se ha asociado con los casos más graves de BA, desarrollo de sibilantes recurrentes en los primeros años de vida y asma (Legg et al, 2003; Pala et al, 2002; Allander et al, 2005).

3.2.1.1 Predominio de la respuesta Th2 en bronquiolitis aguda

En el asma alérgico, existe una respuesta Th2 que desencadena una respuesta inflamatoria excesiva frente a alérgenos. Desde los años 90 se ha ido estructurando la hipótesis de inflamación mediada por una respuesta Th2 (Anderson, 2008) para comprender la asociación entre atopia, aumento de la IgE, inflamación eosinofílica y asma (Figura 15). En otros fenotipos de asma, como en el inducido por virus, no siempre se puede explicar la hiperreactividad bronquial y el remodelado de la vía aérea por el predominio de una respuesta Th2 (Tripp et al, 2002; Robinson et al, 1992). Varios estudios desarrollados en las últimas décadas, han demostrado la existencia durante y tras la BA de un patrón Th2 que de forma característica se asocia a la gravedad de la misma (Alonso et al, 2005; Bermejo-Martín et al, 2007; Hoebbe et al, 2003), evolución a sibilantes recurrentes (Bont et al, 2000; Renzi et al, 1997) o

existencia de antecedentes familiares/personales de atopia (Legg et al, 2003; Robinson et al, 1992; Hassantoufighi et al, 2007).

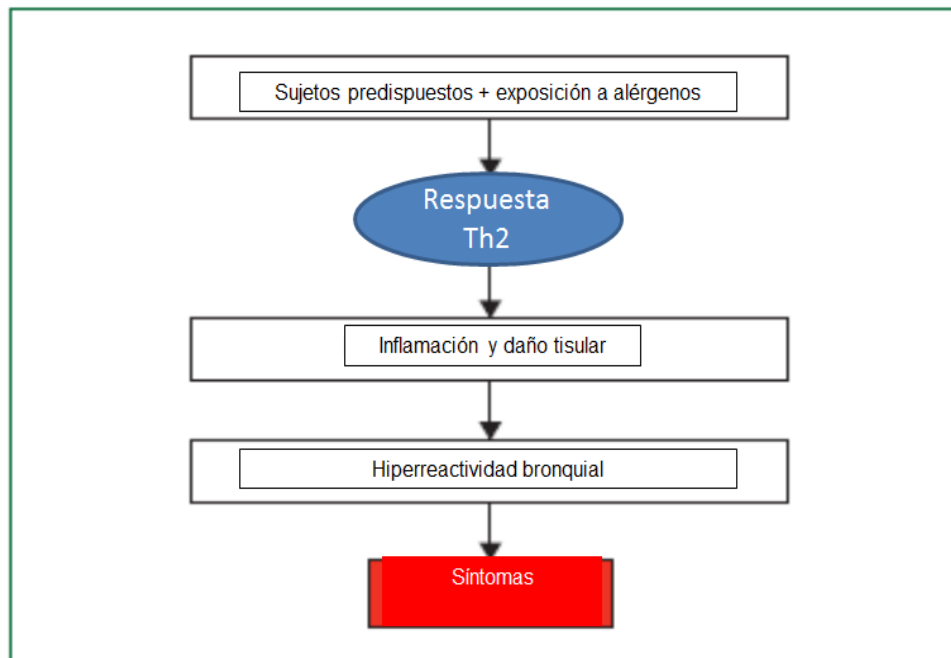


Figura 15. Representación lineal de la hipótesis en el asma de la inflamación mediada por la respuesta Th2. (Modificada de Holgate, 1998)

Un interesante estudio sigue a niños con atopia parental su evolución clínica y de biomarcadores en sangre durante su primer invierno (Legg et al, 2003). Los niños con BA, presentaron un ratio IL-4/IFN- γ elevado en secreciones nasales al inicio de la infección frente a los que sólo presentaron IVRS, es decir, un predominio Th2. También se ha demostrado un predominio relativo de respuesta Th2 inducido por VRS en secreciones nasales frente a su medición en plasma (Bermejo-Martin et al, 2007).

Múltiples publicaciones estudian citoquinas en secreciones respiratorias y en sangre existiendo discrepancias en los resultados (Pitrez et al, 2005; Bermejo-Martin et al, 2007). Esto es debido a que valores de citoquinas obtenidos en sangre no tienen que reflejar la respuesta a nivel local (Pitrez et al, 2005), ya que ambos compartimentos mantienen cierto grado de independencia que hace a su vez que la reacción inmunológica local no tenga repercusión sistémica (Bermejo-Martin et al, 2007). Por otro lado, hay que tener en cuenta que la medición de mediadores en vía respiratoria superior puede estar condicionada además por factores extrínsecos (humo de tabaco y otros virus por entre otros) (Flores et al, 2011).

3.2.1.2 Déficit de respuesta Th1 en bronquiolitis aguda

El predominio de respuesta Th2 en BA graves no está clara, y otros trabajos plantean la existencia de una respuesta Th1 insuficiente como responsable de la evolución del cuadro de BA (Figura 16). El déficit de la respuesta Th1 puede ser debido a una respuesta inmune inmadura, poco desarrollada en la que predomina una respuesta Th2 del nacimiento (Protonotariou et al, 2004) o bien por la propia infección (por consumo o incluso inhibición de la misma) (Mejías et al, 2013). Es por ello que la valoración del desequilibrio de Th1/ Th2 debería ser estimado por representantes de ambas respuestas, como el ratio de IFN- γ /IL-4 (Protonotariou et al, 2004; Cohen 2000).

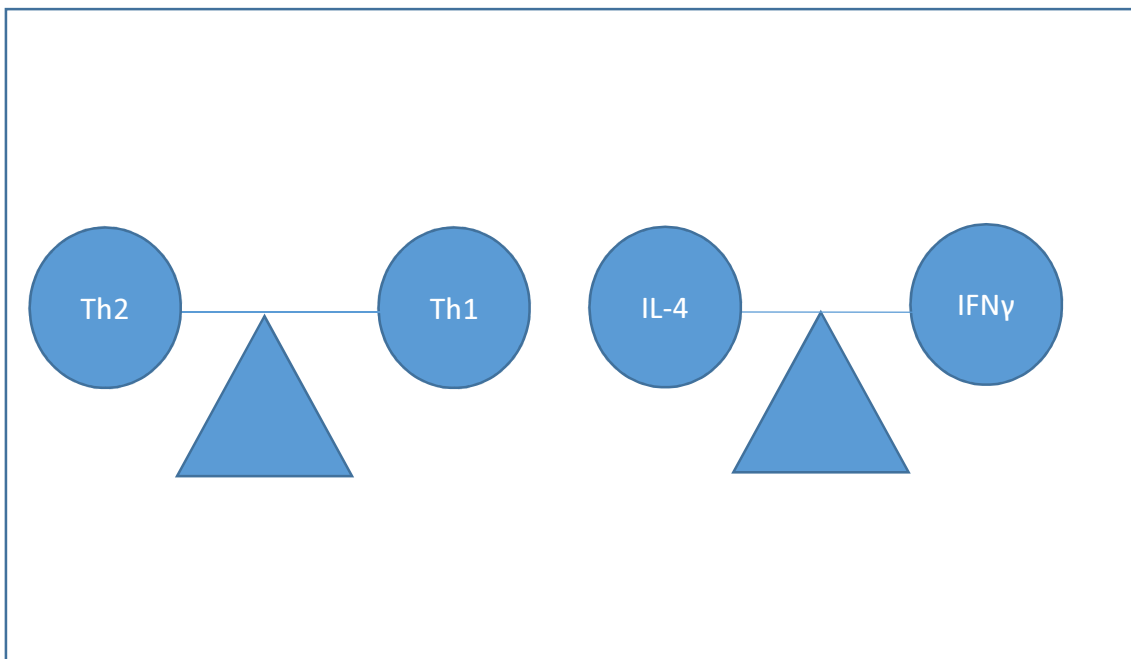


Figura 16. Representación esquemático de la respuestas Th1/ Th2 en equilibrio. Índice IL-4/ IFN- γ representativos de los cambios en la respuesta Th1/Th2 como principales representantes de cada respuesta.

El desequilibrio o polarización de la respuesta inmune hacia Th1 o Th2 puede ser debido a un incremento en uno de los sentidos, valorado por el aumento de los mediadores representativos (Th1 o Th2) pero también por la disminución de uno de los componentes que favorecería la potenciación de la otra respuesta. Para el análisis de dicha polarización lo más correcto sería usar índices entre representantes de ambas vías como puede ser el índice IL-4/ IFN- γ .

Se ha mostrado un déficit de IFN- α / β tras la infección viral (Durbin et al, 2002), que refleja el desarrollo insuficiente de la respuesta celular T, con menor capacidad de eliminación de células infectadas y explicaría la gravedad de la BA. Aberle et al. (1999), han hallado niveles plasmáticos bajos de IFN- γ y de linfocitos T en niños con

I.Introducción

BA moderada-grave, explicado por un posible efecto inhibitorio del virus sobre la respuesta innata, ya de por sí inmadura, inversamente asociada a la edad. Los autores reconocen una debilidad del estudio, que fue no medir IFN- γ en secreciones respiratorias, compartimento en el que se podría haber desplazado el IFN- γ dando una sensación falsa de déficit en plasma.

También se ha asociado la elevación de TNF- α a la gravedad de la BA (Puthothu et al, 2009) que favorecería en estos casos una marcada inflamación de la vía aérea, que se correlacionaba con la gravedad del cuadro e incluso evolución posterior a asma. En otro trabajo se expone el papel del TNF- α producido en respuesta a la infección por VRS, que posee una función protectora en la respuesta inmune innata, pero que si esta respuesta no es regulada podría tener como efectos la exacerbación de la infección (Rutigliano et al, 2004).

Recientemente se ha demostrado que el VRS inhibe parcialmente la respuesta Th1 al inhibir genéticamente al IFN en la fase aguda y meses después de la infección. Lo han denominado como “inmunodisregulación por VRS” describiendo una asociación significativa entre la expresión genética en BA-VRS y la gravedad clínica de la BA (Mejías et al, 2013). Previamente estos había sido sugerido que probablemente la existencia de una respuesta inmune disminuida en la vía aérea esté asociado con la gravedad de la enfermedad más que un exceso de la respuesta (Bennet et al, 2007; García et al. 2012; Mella et al, 2012).

Tanto el tratamiento con anticuerpos anti-TNF o la administración de IFN- γ durante la infección por VRS en modelos murinos disminuyen la gravedad del cuadro (Hussell et al, 2001; Empey et al, 2012), lo que podría ser extrapolable en humanos (Puthothu et al, 2009; Rutigliano et al, 2004).

3.2.2 Patrón de citoquinas-quimiocinas en función de la edad

La edad en la que se desarrolla la primera infección por VRS parece determinante en la respuesta inmunológica inicial (Sly et al, 2012), ya que se ha sugerido la existencia de un efecto etario dependiente que pueda influir en el equilibrio Th1/ Th2 (Legg et al, 2003; Flores et al, 2011; Bermejo-Martin et al, 2007; Buck et al, 2002), y por tanto en las infecciones ulteriores por dicho virus.

Durante la vida fetal existe una desviación inmunológica hacia Th2 con la finalidad de frenar las repuestas Th1 tóxicas para la placenta, evitando así un posible aborto por rechazo inmunológico. Tras el nacimiento, este predominio de linfocitos Th2, vira en condiciones normales hacia otra respuesta inmunitaria apta para ejercer su función protectora (con predominio de linfocitos Th1, y producción de IFN- γ), a medida que el individuo se enfrenta a diferentes microorganismos. La capacidad de

I.Introducción

producción de IFN- γ aumenta en etapas tempranas de la vida merced a la exposición precoz a patógenos, que influencia la maduración del sistema inmune hacia una respuesta Th1. Aunque los mecanismos relacionados con la polarización de la respuesta inmune aún no se conocen totalmente, se plantea que las infecciones durante la infancia pueden proteger contra el desarrollo de la alergia a través de productos microbianos que propiciarían señales de activación para la maduración de los linfocitos Th1 (Koppelman et al, 2001; Miller, 2005), aunque ésta respuesta en los primeros meses de vida pueda ser inmadura, por tanto deficitaria y predomine la respuesta Th2.

En los niños atópicos no se produce este cambio de patrón de citoquinas, potenciándose la respuesta Th2 e inhibiéndose la respuesta Th1, lo que favorece la producción de IgE y la respuesta inflamatoria alérgica ante sustancias inocuas para el resto de la población. Varios estudios (Bendelja et al, 2000; Román et al, 1997; Waris et al, 1996; Legg et al, 2003; Bont et al, 2000; Pitrez et al, 2005) demuestran que en niños tras la infección por VRS existe un predominio de la respuesta Th2. Se desconoce si ésta respuesta ha sido alterada por el virus ó si previamente este patrón existía y ha sido desenmascarado por el patógeno. Se ha hecho hincapié en que la edad en la que se desarrolla la primera infección por VRS puede ser un parámetro con impacto en la respuesta inmunológica al favorecer un aumento de respuesta Th2 (Sly et al, 2010). Otro factor relacionado con la asociación virus-inducción respuesta Th2 en niños muy pequeños es por la pobre producción de IL-12 por las células dendríticas y monocitos, que conllevaría a una limitación en la respuesta Th1 (Melendi et al, 2007; Gern et al, 2006).

3.2.3 Patrón de citoquinas-quimiocinas en función de la gravedad de la bronquiolitis aguda

La gravedad de la BA podría ser uno de los factores claves para comprender la posible evolución a sibilantes recurrentes y asma, así como a entender la disparidad de resultados publicados con respecto a niveles de citoquinas en función de la población estudiada: niños hospitalizados por BA (casos más graves) frente a BA que no precisaron ingresar.

3.2.3.1 Publicaciones en niños hospitalizados por bronquiolitis aguda

Aproximadamente en el 40% de los niños la infección por VRS afecta al tracto respiratorio inferior (Shay et al, 1999), de ellos el 1 al 4 % se estima que evolucionen a un cuadro grave que precise hospitalización (Vicente et al, 2003). Si bien se conocen diferentes factores de riesgo asociados a enfermedad grave, se ha visto que la mayor

I.Introducción

parte de los niños hospitalizados no presentan ninguna patología previa predisponente. Se ha evidenciado un aumento de la proporción de sibilantes recurrentes (Fjaerli et al, 2007) y asma (Pullan et al, 1982; Schauer et al, 2002) niños ingresados por BA con VRS en comparación con niños sanos controles, presentando además una función pulmonar disminuida a los 10 años de edad (Pullan et al, 1982).

Uno de los estudios más representativos, en una cohorte de niños hospitalizados por bronquiolitis VRS comparados con controles, ha demostrado que existían diferencias estadísticamente significativas a los 17 años entre ambos grupos en cuanto a la frecuencia de sibilantes recurrentes posteriores. En él se destaca como factores predictores estadísticamente significativos la BA-VRS ingresadas y la existencia de rinoconjuntivitis alérgica, objetivando en el grupo VRS una función pulmonar basal disminuida en relación al grupo control. Ello sugiere que la infección por VRS grave puede afectar de forma directa al desarrollo pulmonar debido a la inflamación y remodelado de la vía respiratoria (Sigurs et al, 2010; Malmström et al, 2011).

En la cohorte llamada RSV Bronchiolitis in Early Life (RBEL) hasta un 48 % de los niños hospitalizados por VRS, han sido diagnosticados de asma en algún momento durante sus primeros 7 años de vida. Entre los factores de riesgo asociados, destaca como factor predictor de asma el antecedente de asma materno, así como la existencia de sensibilizaciones precoces, así como biomarcador nasal en la fase aguda de la infección la quimiocina CCL5 (Bacharier et al, 2012).

3.2.3.2 Influencia de la genética en bronquiolitis aguda

Aunque muchos estudios han demostrado un aumento en el riesgo de asma en casos hospitalizados por BA VRS, otros sólo encuentran este riesgo en aquellos sujetos con predisposición genética. Una interesante investigación se centró en la posible relación genética entre atopía e infección grave por VRS y sibilantes, pues en niños ingresados se ha encontrado una sobreexpresión del gen que determina la producción de IL-4. Esto apoya la hipótesis en la que la infección por VRS favorecería la sobreexpresión de citoquinas de la respuesta Th2, evidenciando un nexo genético con la gravedad del cuadro (Choi et al, 2002).

Para explicar la susceptibilidad genética de padecer una infección por VRS grave se ha estimado secuenciar la base genética. Para ello se ha seleccionado una región genética en relación con infección grave por VRS, que engloba 11 genes que codifican citoquinas de la respuesta Th2. Se ha encontrado asociación en los genes de IL-4 e IL-13, con mayor significación en niños menores de 6 meses ingresados por BA. La sobreexpresión de IL-13 e IL-4 se ha asociado a un riesgo elevado de infección grave por VRS, también observado en la atopía y en el asma (Forton et al, 2009). Estos datos

I.Introducción

sugieren que la infección y sensibilización alérgica comparten los mismos loci justificando la mayor susceptibilidad de los atópicos a BA-VRS grave.

SNP en el cromosoma 17q21 parece ser un factor de riesgo para infecciones respiratorias tempranas y asma inducido por virus. Con dicha variante se produciría una activación de un patrón de respuesta inmune innata ante la agresión viral que promueve el desarrollo de inflamación crónica en la vía respiratoria, lo que se traduciría en la susceptibilidad de desarrollar sibilantes recurrentes o asma en los siguientes años de la infección (Smit et al, 2010).

También se ha intentado explicar mediante estudios genéticos el predominio de BA grave por VRS en niños (varones) frente a niñas. Se ha encontrado un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en el gen de IL-9, que si se presenta en un varón incrementaría la susceptibilidad hacia un curso grave de la enfermedad y necesidad de ingreso, mientras que en las niñas sería protector, lo que ayudaría a entender el predominio de cuadros más graves en el niños ²⁵⁴. Este hecho, junto con las diferencias en la distribución y disposición del músculo bronquial ^{42, 43} y en la ratio vía aérea/volumen pulmonar entre ambos sexos, constituyendo el denominado crecimiento pulmonar disináptico (Bjornson, 2000; Boezen et al. 2004), podría explicar también las diferencias de la prevalencia y gravedad del asma en niños y niñas antes y después de la pubertad.

3.2.3.3 Publicaciones de bronquiolitis aguda en pacientes ambulatorios: Cohorte de Tucson

En 1980 se inició el seguimiento de la cohorte de Tucson para investigar el nexo entre IVRI precoces y el desarrollo de sibilantes recurrentes (Taussig et al, 1989). En ella se observó asociación entre IVRI por VRS durante los 3 primeros años de vida con un aumento en el riesgo de continuar con episodios de sibilancias a los 6 y 11 años, que iba debilitándose con la edad, de forma que el antecedente de infección por VRS dejaba de ser un factor de riesgo a los 13 años de edad. Por tanto la BA-VRS pasó a ser considerado un factor de riesgo independiente para el desarrollo de sibilantes. En dicha cohorte no se encontró asociación entre IVRI por VRS y atopia, pero sí se evidenció una disminución de la función pulmonar a los 11 años de edad en niños sin antecedentes familiares de atopia que habían padecido BA-VRS, lo que contribuyó a considerar factores asociados “pre-infección” ó congénitos (Stein et al, 1999), como el tabaquismo materno durante la gestación o la existencia de una alteración funcional que condicionara hiperreactividad bronquial en los sujetos sin predisposición atópica. En los

niños que precisaron ingreso, sí existía una mayor probabilidad de atopia, lo que explicaría la evolución posterior por ese mismo motivo.

3.2.4 Patrón de citoquinas-quimiocinas por el agente causal implicado en la bronquiolitis aguda

Los estudios sobre BA se refieren principalmente al VRS, agente diagnosticado en la mayoría de los casos hospitalizados. Con el desarrollo de las técnicas microbiológicas y moleculares, se ha empezado a considerar otros virus en el desarrollo de IVRI precoces en los niños.

En publicaciones recientes, se ha estudiado la posibilidad de que existan de diferentes patrones de citoquinas en función del virus responsable de la BA. Un estudio publicado en 2011 (Flores et al, 2011), encuentra que el VRS, en comparación con otros virus, produce mayor aumento de IFN- γ en secreciones nasofaríngeas en los niños mayores de 6 meses. Además de este predominio relativo de Th1, destaca una respuesta Th2 disminuida con niveles de IL-4 bajos en los niños que recibían lactancia materna. Por el contrario en los niños expuestos a tabaquismo pasivo existe un predominio relativo de respuesta Th2 debido al descenso en la expresión de Th1. Sin embargo este estudio carece de potencia estadística para poder individualizar entre diferentes virus, a diferencia de otro estudio en el que también encuentran diferencias del patrón de citoquinas en exudado nasofaríngeo, dependiendo del agente causal estudiado (Kristjansson et al, 2005) (RSV, parainfluenza y parainfluenza) durante los primeros 3 meses de vida, encontrándose un patrón característico de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5) que sugiere que la respuesta inmune desarrollada tras la infección además de ser inespecífica, es edad-dependiente. (Figura 17).

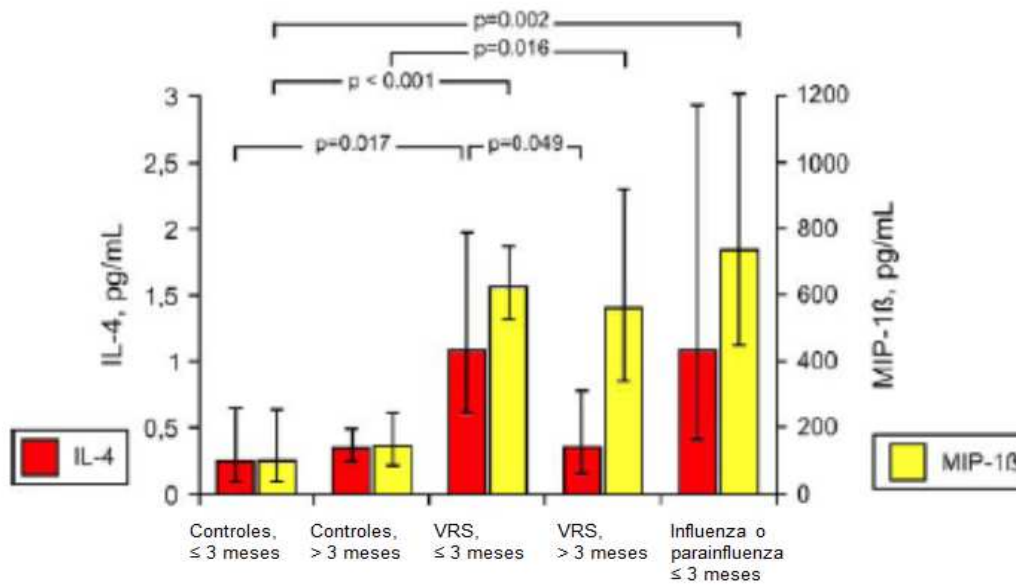


Figura 17. Niveles de IL-4 (pg/ml) y MIP-1β (pg/ml) en secreciones nasofaríngeas de niños controles e infectados por VRS o por influenza/ parainfluenza. (Modificada de Kristjansson et al, 2005).

El adenovirus, agente etiológico con peor pronóstico, produce un patrón proinflamatorio a nivel local (aumento de IL-1, IL-8 en secreciones nasales) se correlaciona en niños que requirieron ingreso con la gravedad de la BA (Moro et al, 2009).

En general se puede afirmar que los niveles de IFN-γ se relacionan de forma inversamente proporcional con la gravedad en cuadros de bronquiolitis aguda por VRS, mientras que una mayor expresión del polimorfismo del gen para IL-4 lo hace de forma directa. Un reciente estudio ha señalado que existe una respuesta inmune sistémica diferenciada entre VRS, influenza y rinovirus. En la BA-VRS parece ser inhibida la respuesta inmune adaptativa por supresión genética de la producción de IFN en la fase aguda y meses después del ingreso por BA-VRS (Mejías et al, 2013).

3.2.5 Patrón de citoquinas-quimiocinas como factores pronósticos en la bronquiolitis aguda

En una cohorte de niños coreanos con bronquiolitis aguda por VRS, se observó mayor frecuencia del SNP -589T, que aumenta la transcripción y actividad de IL-4, fundamentalmente en los casos graves (Choi et al, 2001). Estos resultados sugieren que la existencia de una respuesta Th2 predominante esté regulada y favorecida desde el nacimiento debido a la sobreexpresión de factores genéticos. Ello apoya la hipótesis que la misma susceptibilidad genética, compartida con la atopia, favorecería

I.Introducción

cuadros de bronquiolitis aguda grave en niños con predisposición atópica.

Se ha demostrado un incremento en el nivel de cortisol plasmático durante la infección aguda por VRS proporcional a la gravedad del cuadro (Pinto et al, 2006) (figura 18). En este estudio explica el desequilibrio de la respuesta Th1/ Th2 por la existencia de un déficit Th1 con altos niveles de cortisol en los casos graves. Se estima que este desequilibrio dependería del polimorfismo del gen del receptor glucocorticoide y actividad enzimática del eje esteroideo. Así se explicaría como los glucocorticoides disminuirían la síntesis de IFN- γ por la acción directa sobre los linfocitos T CD4+ e indirectamente inhibiendo la producción de IL-12 por los monocitos. En este sentido, se había relacionado los niveles de IL-12 bajos con la gravedad del cuadro, medidos por la duración del tratamiento con VM (Bont et al, 2000).

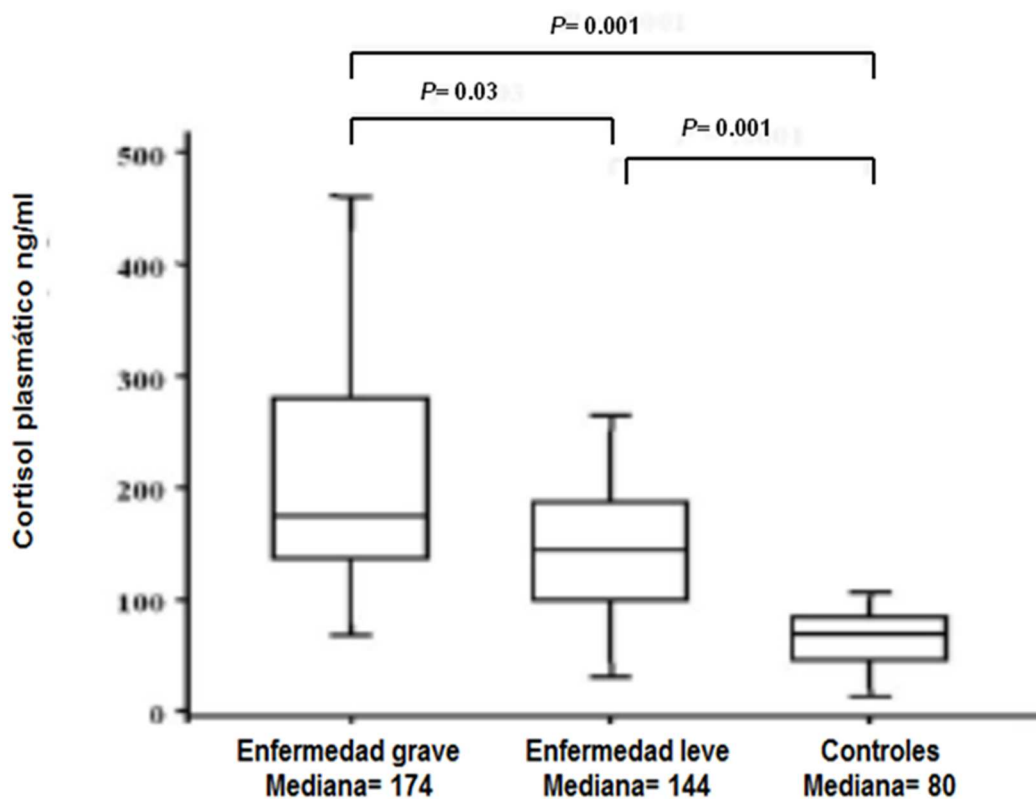


Figura 18. Niveles plasmáticos de cortisol (ng/ml) en niños clasificados por enfermedad grave y leve por VRS y grupo control. (Modificada de Pinto et al, 2006).

También la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) medida en lavado nasal de niños con BA se ha señalado como marcador pronóstico estando los niveles disminuidos en los niños con BA que precisaron ingreso. A su vez los niveles de LDH se correlacionarían con la respuesta inmune evidenciada por la producción de citoquinas (Laham et al, 2010).

I.Introducción

Otro estudio cuestiona si los niños que contraen infección por VRS en los primeros meses de vida difieren de los que adquieren la infección más tarde por el patrón de citoquinas al nacimiento. Los niños que precisaron ingreso por bronquiolitis por VRS en los primeros meses de vida tenían al nacimiento niveles elevados de IL-6 e IL-8 (tabla 12), lo que sugiere ciertas diferencias en la respuesta inmune innata predisponen desde el inicio a padecer una infección grave por VRS (Bermejo-Martín et al, 2006; Juntti et al, 2009).

Tabla 12. Comparación de los niveles de citoquinas. (Modificada de Bermejo-Martin et al, 2006)

	Grupo 1 (A) N=8	Grupo 2 (B) N=14	Controles por Grupo 1 (C) N=6	Controles por Grupo 2 (D) N=11	P (a)	P (b)	P (c)
IL-6	502 (1033)	135 (296)	19 (33)	28 (34)	0.008'	0.001'	0.110
IL-8	8749 (8765)	3565 (3895)	540 (737)	913 (1479)	0.001'	0.001'	0.029'
IL-10	215 (457)	105 (206)	20 (114)	34 (64)	0.228	0.051	0.330
IL-2	33 (137)	16 (109)	12 (32)	12 (48)	0.414	0.687	0.714
IFN γ	36 (71)	14 (55)	3 (12)	14 (46)	0.345	0.536	0.868
IL-12p70	119 (283)	87 (114)	42 (108)	36 (200)	0.108	0.202	0.365
TNF- α	257 (295)	100 (266)	78 (198)	27 (154)	0.282	0.222	0.330
IL-1 β	851 (5036)	704 (937)	104 (83)	124 (295)	0.013'	0.001'	0.664
IL-5	33 (63)	35 (75)	14 (36)	10 (17)	0.345	0.120	0.714
IL-4	18 (137)	40 (94)	22 (46)	18 (26)	0.573	0.095	0.664

La lactancia materna es un factor protector que favorece la respuesta inmune al transferir agentes antiinfecciosos (inmunoglobulinas, lactoferrina, oligosacáridos y citoquinas). Se ha observado que los niños alimentados con leche de fórmula presentan mayor gravedad del cuadro en relación con los que son amamantados (Bachrach et al, 2003). La duración de la lactancia materna previa al cuadro de bronquiolitis aguda, tiene una correlación inversa con la duración de la enfermedad (Dixon et al, 2010). Se ha relacionado un descenso de IL-8 en niños que recibían lactancia materna frente a los que no. A su vez la menor concentración de IL-8 se ha asociado con la gravedad y duración del cuadro de bronquiolitis aguda más que con el tipo de alimentación recibida.

Se ha señalado relación directa entre las concentraciones plasmáticas de IL-10, y el receptor de IL-2 (CD25) con la necesidad oxigenoterapia suplementaria durante la fase aguda (Alonso et al, 2005). Además la producción de IL-10 no solo aumentaría durante el curso de la bronquiolitis por VRS sino que también se observa en niños con sibilancias recurrentes y asma posterior (Bont et al, 2000). También el

índice IFN- γ / IL-10 se ha correlacionado inversamente con la duración y necesidad de O₂ suplementario (Bont et al, 2000).

Garcia et al. (2012) analizan diferentes citoquinas en lavado nasofaríngeo y la relación con la necesidad de oxigenoterapia en cuadros de BA. Identifican una correlación directa entre MIP-1 α y la necesidad de oxigenoterapia, mientras que con los niveles de IFN- γ ésta correlación es inversa. Bennet et al. (2007) evidencian una correlación negativa entre los niveles de IL-6, MIP-1 β , IL-8, e IL-10 en exudado nasofaríngeo y la gravedad del cuadro de BA.

3.2.6 Patrón de citoquinas-quimiocinas como factores pronósticos a largo plazo de la bronquiolitis aguda

Múltiples trabajos han mostrado el predominio de una respuesta Th2 mediada que explicaría la evolución tras la infección aguda (Bermejo-Martín et al, 2007; Noma et al, 1996). Se ha demostrado que diferentes perfiles de los mediadores expresados, implicados directa o indirectamente en la patogénesis del asma, continúan elevados tras el cuadro de BA. Es el caso de IL-6, IL-8 y el VEGF (Bermejo-Martín et al, 2007; Barbato et al, 2006; Lee et al, 2000) lo que refleja la persistencia de una respuesta inflamatoria y posible explicación del por qué presentan sibilantes recurrentes tras el primer cuadro de BA

Se ha indicado la capacidad del VRS como agente sensibilizante para inducir susceptibilidad a neumoaérgenos o trofoaérgenos, explicado por el aumento de citoquinas como IL-4 (Noma et al, 1996).

Recientemente Bacharier et al. (2012) han destacado la expresión elevada de la quimiocina CCL5 medida en epitelio nasal durante la fase aguda de bronquiolitis por VRS como posible marcador posterior de asma. CCL5 se elevaba durante la BA en los lactantes que a los 7 años presentaban asma tras varios años de sibilantes recurrentes.

Los estudios que analizan los patrones de citoquinas tras BA-VRS, demuestran un cambio en la respuesta inmune, con diferentes mecanismos asociados a un desequilibrio en la activación de las células T. El estudio de los patrones de las citoquinas y otros inmunomoduladores y su relación con la gravedad del cuadro de bronquiolitis aguda, podría constituir un paso más en el conocimiento de marcadores de evolución tanto de la fase aguda (casos graves) como de la posibilidad de aparición de sibilantes recurrentes (tabla 13), si bien es cierto que en la actualidad, ni siquiera existe unanimidad en la caracterización de dichos perfiles tanto en niños como en adultos diagnosticados de asma (Pukelsheim et al, 2010).

Tabla 13. Resumen de las publicaciones que relacionan biomarcadores con la gravedad de la bronquiolitis aguda,

Autores, año	Biomarcadores relacionados con gravedad (lugar medición)	Valoración de la gravedad
Legg et al, 2003	IL-4/IFN- γ elevado (secreción nasal)	Frente a los que infección solo IVRS
Durbin et al, 2002	déficit de IFN- α / β (tejido pulmonar, ratones)	Valoración clínica fase aguda
Rutigliano et al, 2004	elevación de TNF- α (BAL, ratones)	Valoración clínica fase aguda/ evolución a sibilantes recurrentes-asma
Bacharier et al, 2012	Elevación CCL5 (secreción nasal)	Evolución a sibilantes recurrentes-asma
Choi et al, 2002	SNP -589T	Ingreso
	Sobrexpresión elevada gen IL-4	Diagnóstico de asma
Forton et al, 2009	Sobrexpresión elevada de IL-13 e IL-4	Ingreso , edad (< de 6 meses)
Schuurhof et al, 2010	Expresión SNP en gen IL-9	En hombres asociado a ingreso
Flores et al, 2011	IFN- γ y de IL-12 elevados (secreción nasal)	Ingreso
Kristjansson et al, 2005	aumento IL-4 y IL-5 (secreción nasal)	Ingreso , edad (< 3 meses)
Moro et al, 2009	aumento de IL-1, IL-8 (secreción nasal)	Ingresos. Agente etiológico: adenovirus
Pinto et al, 2006	Cortisol elevado (plasma)	Valoración clínica
Bont et al, 2000	IL-12 disminuidos (plasma)	Ventilación mecánica
Juntti et al, 2009	IL-6 e IL-8 elevados (sangre cordón umbilical)	Valoración clínica fase aguda
Dixon et al, 2010	IL-8 disminuidos (secreción nasal)	Valoración clínica y duración del cuadro de BA
Alonso et al, 2005	IL-10, y el receptor de IL-2 (CD25) elevados (plasma)	Necesidad de oxigenoterapia
Bont et al, 2000	IFN- γ / IL-10 disminuido (plasma)	Duración y necesidad de oxigenoterapia
Garcia et al, 2012	MIP-1 α elevado, IFN- γ disminuido(secreción nasal)	Necesidad de oxigenoterapia
Bennet et al, 2007	IL-6, MIP-1 β , IL-8, e IL-10 disminuidos (secreción nasal)	Valoración clínica

MÓDULO 3.

Estrés oxidativo y bronquiolitis aguda

El funcionamiento e interacción de las células epiteliales, macrófagos alveolares, linfocitos, neutrófilos, entre otras células así como los productos derivados de todas ellas, tales como las citoquinas, sustancias derivadas de la membrana celular, radicales libres del O_2 , proteasas y sustancias preformadas entre otras, son causantes de daño a nivel tisular con la destrucción de las células epiteliales e inflamación con presencia de edema, incremento del mucus, infiltrado celular (Allen et al,2000; Macnee, 2001) (Figura 19). Por tanto, en estados patológicos en los que se induce un estado proinflamatorio, pueden alterar el funcionamiento celular fisiológico, romper el equilibrio y suponer una sobreproducción de radicales libres.

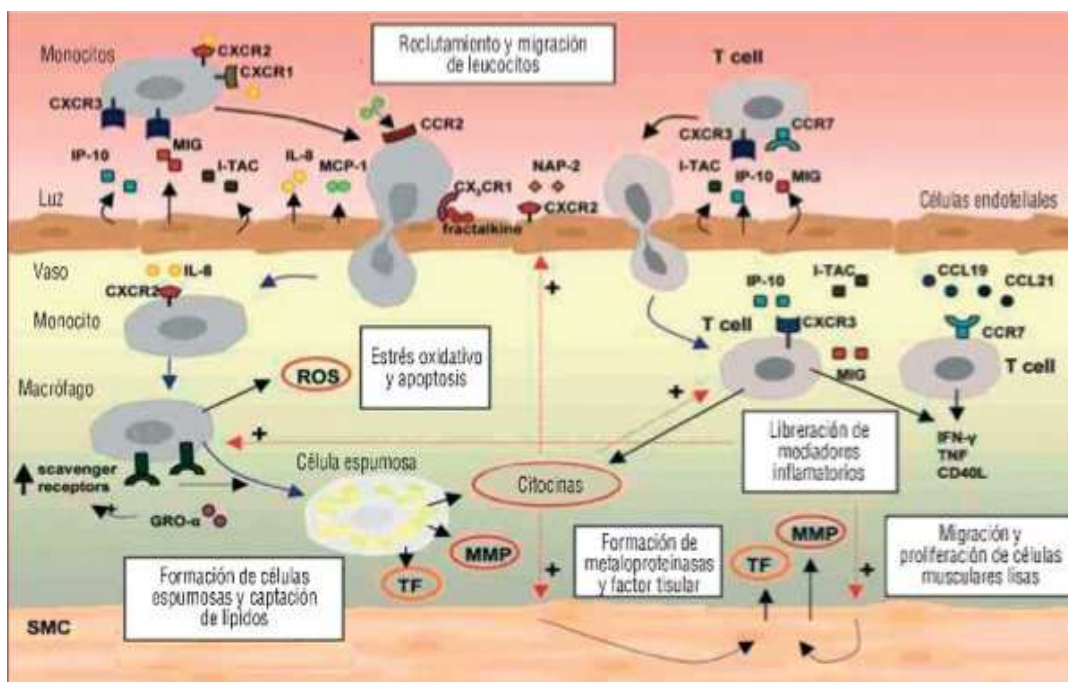


Figura 19. Representación de la interacción de citoquinas y factores de estrés oxidativo y sus efectos fisiopatológicos

1. Formación de radicales libres y mecanismos antioxidantes

En condiciones fisiológicas, sólo un pequeño porcentaje del O_2 consumido en el metabolismo de nuestro organismo (5% aproximadamente), genera moléculas tóxicas ó radicales libres tras sufrir múltiples reducciones (Figura 20). Estos elementos se denominan especies reactivas del O_2 (EROs o del inglés reactive species oxygen ROS), que al tener una configuración espacial muy inestable, son altamente reactivos,

I.Introducción

por lo que poseen una alta capacidad para combinarse inespecíficamente con diferentes moléculas integrantes de las células.

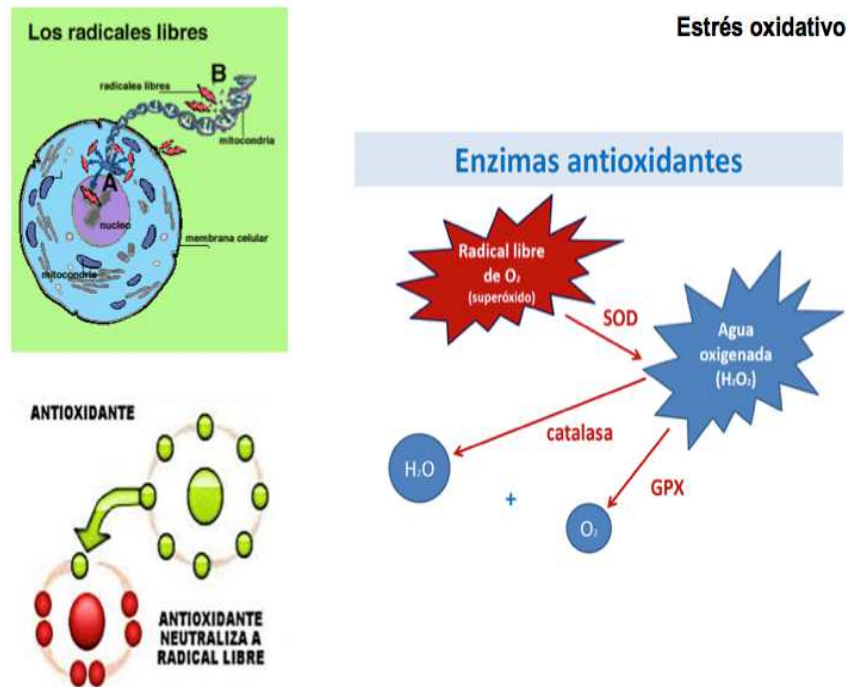


Figura 20. Esquema representativo de la actuación de los EROs

A diferencia de las condiciones normales en las que el O₂ es estable y poco reactivo con una concentración muy baja de radicales libres, existen situaciones que favorecen el incremento en la producción de EROs, como pueda ser un estado proinflamatorio, situación “pro oxidante” generadora de radicales libres. En este caso, conllevaría un aumento de reacciones químicas-enzimática, capaces de perturbar el desarrollo fisiológico metabólico habitual a nivel celular, promoviendo reacciones entre diferentes compuestos del organismo y favoreciendo reacciones que provocan daño celular e incluso podrían causar la muerte celular (Halliwell, 1996).

Los hematíes constituyen elementos especialmente vulnerables al estrés oxidativo, debido a que por su función de transporte de O₂ desde los pulmones al resto de los tejidos, se encuentran constantemente expuestos a radicales del O₂, generados por auto oxidación de la hemoglobina y el plasma, particularmente el óxido nítrico (NO) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Por ello, la existencia de un equilibrio en el estado oxidativo es fundamental para el mantenimiento de funciones esenciales y la regulación metabólica en nuestro organismo como la producción de energía, regulación de señales para la activación-inactivación de moléculas y en el recambio celular. Sin embargo, si este equilibrio entre los sistemas oxidantes y antioxidantes se rompe, por un aumento en la producción excesiva de EROs y/o con una disminución en la capacidad del sistema antioxidante

I.Introducción

que frene a los primeros, se inicia lo que se denomina estrés oxidativo (EO) (Sies, 1997). Dicho desbalance o situación de estrés oxidativo es constatable con la medición de los biomarcadores oxidativos, productos de las reacciones oxidativas acontecidas a nivel molecular (peroxidación lipídica, oxidación del ADN, proteínas), y el conocimiento de niveles bajos de antioxidantes (Rahman et al, 1996; MacNee 2001).

Estas especies reactivas, no causarían daño en condiciones normales, si los mecanismos antioxidantes a nivel celular, no fueran superados por el exceso de radicales libres o por la existencia de un descenso de dichas defensas antioxidantes.

En los últimos años, en pediatría numerosas enfermedades han sido estudiadas y atribuidas a los hallazgos de parámetros alterados de estrés oxidativo por el desbalance encontrado entre la producción de radicales libres de O₂ y la producción de factores antioxidantes (Bajcetic et al, 2005; Saugstad et al, 2005; Bajcetic et al, 2006; Stringer et al, 2009). Estos hallazgos junto con una amplia evidencia en el papel que juega el estrés oxidativo en el desarrollo y progresión de enfermedades sistémicas, da importancia el estudio y significado diagnóstico de los parámetros de estrés oxidativo. Las alteraciones de dichos biomarcadores ayudarían a predecir las consecuencias en el ciclo oxidativo celular, así como intentar diseñar estrategias de intervención o prevención apropiadas en pro de favorecer el equilibrio con el posible uso de elementos antioxidantes.

1.1 Actuación de EROS sobre las diferentes biomoléculas.

Los niveles elevados de EROs se deben considerar perjudiciales para la célula debido a que pueden reaccionar con biomoléculas de la misma y alterar su funcionamiento. Las biomoléculas celulares principales a las que afecta son los lípidos, los ácidos nucleícos y las proteínas, en menor medida los glúcidos.

Lípidos. Suponen ser el sustrato donde se produce el mayor daño mediante lo que se conoce como peroxidación lipídica ó lipoperoxidación, que afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados. Por ello, las membranas celulares, ricas en ácidos grasos insaturados, son dianas claramente vulnerables a situaciones de estrés oxidativo en las que mediante la lipoperoxidación se puede ver afectada al alterar su estructura, fluidez y permeabilidad de la bicapa lipídica, produciendo edema y muerte celular. Además, la peroxidación lipídica genera productos citotóxicos finales como los aldehídos, entre ellos el malondialdehído (MDA), capaces de producir mutaciones en el ADN, favoreciendo la posibilidad de daños estructurales y funcionales de las proteínas resultantes del ADN dañado (Gutteridge, 1995; Frei, 1994).

Proteínas. Aunque todos los aminoácidos de las proteínas son susceptibles de ser dañados, existen algunos aminoácidos más proclives a ser dañados por los

I.Introducción

radicales libres. Bajo los efectos de los radicales libres en los aminoácidos, se producen cambios en la estructura proteica (entrecruzamientos de cadenas peptídicas, rupturas de enlaces peptídicos) así como la formación de grupos carboxilos (proteínas carbonizadas) que impiden su funcionamiento habitual.

ADN. Los radicales libres pueden reaccionar con todos los componentes del ADN, y las reacciones posteriores de los radicales formados por la adición a las bases dan lugar a productos que promueven fenómenos de mutaciones, deleciones-fragmentaciones-reordenamientos cromosómicos con inactivación de genes concretos y la siguiente pérdida de expresión o síntesis de proteínas (Boldyrev, 2000).

Glúcidos. Si bien los glúcidos pueden actuar como limpiadores o bloqueadores de los efectos de algunos radicales (superóxidos e hidroxilo), muchos polisacáridos son destruidos bajo la acción de los radicales libres (Schiller et al, 1993). De hecho varios radicales libres se ha visto que son capaces de degradar glicoproteínas del moco secretado en la mucosa bronquial (Cross et al, 1995).

1.2 Sistema de defensa antioxidante. Clasificación de los mecanismos de defensa antioxidante

Partiendo de la base que todas las células aeróbicas están sometidas a estrés oxidativo, el organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante enzimática y no enzimática para su protección frente a la agresión de los radicales libres.

Por tanto se ha definido a los elementos diseñados para dicha misión o antioxidante como “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Halliwell et al, 1995).

Los antioxidantes al interactuar con un radical libre, actuarían cediéndole un electrón, oxidándose y transformando al radical libre en radical libre débil no tóxico. Por lo que los antioxidantes actuarían previniendo e impidiendo la actuación de EROs, convirtiéndolos en moléculas menos reactivas y por ello potenciando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque éstos.

La actuación de los antioxidantes supone su consumo, al actuar como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que deben repuestos (Gitto et al, 2009).

Se pueden clasificar los antioxidantes en función de su acción y el nivel en el que actúe (Gupta et al, 2009; Gitto et al, 2009):

Primer nivel: Se compone de sistemas enzimáticos capaces de realizar la reducción univalente del O_2 , efectuándolo mediante la reducción tetravalente

I.Introducción

consecutiva (4 pasos univalentes) sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos al quedar unidos al sitio activo del sistema que lo efectúa, que es principalmente el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial. Este sistema se encarga del 90 % de la reducción del O_2 en el organismo humano. Tras la reducción parcial de la molécula de O_2 , se generan especies reactivas tales como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Witztum, 1993).

Segundo nivel: Está constituido por elementos capacitados para captar el radical anión superóxido (O_2^-). La principal enzima especializada es la superóxido dismutasa (SOD) que constituye la primera defensa contra el radical superóxido y actúa catalizando la dismutación del radical superóxido de H_2O_2 (Tosaki et al, 1993). Al generar H_2O_2 , su acción es complementada con elementos que eliminen peróxidos de hidrógeno.

Nivel 3º: Lo constituyen un grupo de enzimas especializadas en neutralizar el peróxido de hidrógeno formado en el nivel anterior. Entre las enzimas implicadas se encuentran la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPox), ambas actuarían tras la acción de SOD, resultando en H_2O el radical superóxido de H_2O_2 . Dentro del ciclo del glutatión, también se encuentran la glutatión reductasa (GR) que cataliza su reducción a glutatión reducido (GSH) y posteriormente puede volver a oxidado tras la actuación de la GPox, al ser co-sustrato GSH de GSH-PX, y la glutatión-S-transferasa (GST) que se conjuga con la GSH. La GSH a su vez puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática, ó mediante la GSH-PX, enzima fundamental en el estado redox (óxido-reducción) del glutatión (Stepanik et al, 1993).

Si la actividad enzimática en estos primeros pasos está equilibrada, el riesgo de daño a nivel celular es bajo.

Nivel 4º: Se trata de la neutralización por antioxidantes no enzimáticos, tales como la vitamina E o alfa-tocoferol, vitamina C o ácido ascórbico. En el caso de la vitamina E constituye un elemento protector muy efectivo en las membranas celulares, al capturar y neutralizar el radicales libres hidroxilos, peróxidos y aniones superóxidos. Por otro lado, la vitamina C actuaría reduciendo o donando electrones, ya que reaccionaría capturando radicales hidróxilos, aniones hiperóxidos y a su vez regenerando la forma oxidada de la vitamina E (Burr 1994; Esterbauer et al, 1992; Packer, 1994).

Otros compuestos que se incluirían en la "barrera antioxidante" no enzimática en este nivel serían: proteínas como albumina, ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, moléculas de bajo peso molecular (carotenoides, bilirrubina, flavonoides, ácido lipoico, alopurinol, glutatión en su acción no enzimática), así como

I. Introducción

elementos traza requeridos en algunas enzimas antioxidantes tales como cobre, zinc, manganeso, hierro o selenio (Omen et al, 1996; Gurkan et al, 2004).

Nivel 5º: Si en los niveles previos, las sustancias antioxidantes no han conseguido abortar la acción de los EROs, y se ha producido el daño molecular, quedaría este nivel defensivo que consistiría en la reparación. Este mecanismo sería fundamental sobre las moléculas de ADN, que tras posibles efectos mutagénicos, al provocar los radicales libres rupturas y cambios en la estructura del ADN, éstos serían reparados mediante mecanismos enzimáticos que permitirían restablecer la información genética.

2. Estrés oxidativo y patología inflamatoria de las vías respiratorias

La exposición continua a moléculas “pro-oxidantes”, bien producidas por reacciones metabólicas como el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial o tras la activación y actuación de moléculas defensivas como los macrófagos, junto con las moléculas recibidas del exterior (humo de tabaco, virus, alérgenos y otros), hace que ante dicha demanda el sistema respiratorio necesite un buen desarrollo de los mecanismos antioxidantes para que no se vulnere su correcto mantenimiento. En caso contrario, o ante un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, condicionaría lo que se ha definido como estrés oxidativo o disbalance del estado redox.

A nivel del sistema respiratorio, el estrés oxidativo se ha relacionado con el remodelado de la vía aérea, ya que parece afectar a componentes de la matriz extracelular así como favorecer un aumento de la proliferación celular, que junto con la alteración de mecanismos protectores que en condiciones normales pondrían en marcha una reparación y una modulación de la respuesta inmune efectivas (figura 21).

Por ello, el avance en el conocimiento de los efectos del estrés oxidativo sobre el sistema respiratorio, en concreto sobre la creciente evidencia de la inducción de inflamación en la vía respiratoria, ha despertado gran interés con el intento de desarrollar estrategias terapéuticas tales como en la enfermedad pulmonar crónica obstructiva, sibilantes recurrentes y/o asma (Macnee, 2001).

I.Introducción

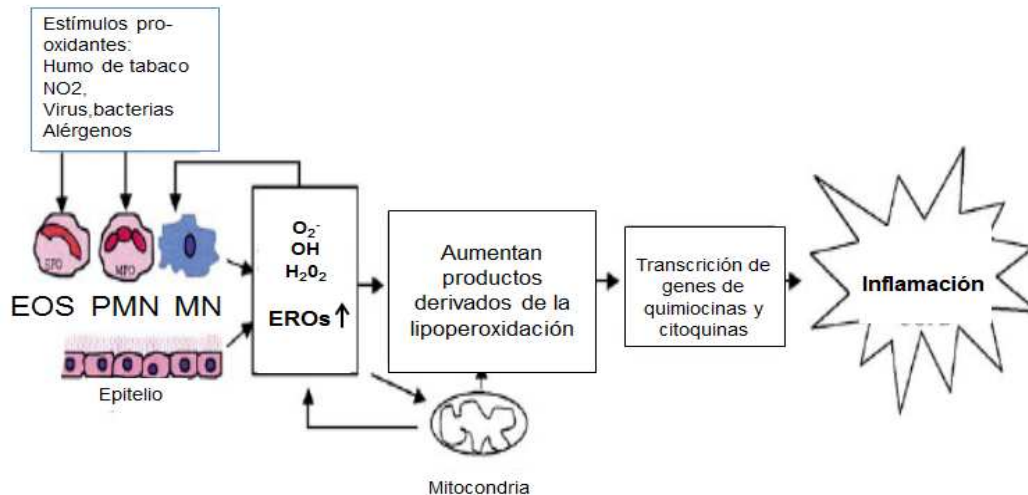


Figura 21. Mecanismos por los que las especies reactivas del Oxígeno producen inflamación en el asma (Modificada de Macnee, 2001).

EOS: Eosinófilos; PMN: Células polimorfonucleares; PMN: Células mononucleares; EROs: Especies reactivas del Oxígeno

2.1 Estrés oxidativo y asma

Se cree que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patofisiología y desarrollo del asma, como vía final/ respuesta tras la exposición a diferentes moléculas que actúan de estímulos (virus, bacterias, alérgenos, polución/ humo de tabaco, entre otras) y favorecen la inflamación y obstrucción de la vía aérea (Macnee, 2001; Doelman et al, 1990; Wood et al, 2003). De las células presentes en la vía respiratoria, en concreto la activación de células inflamatorias e inmunitarias (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos) produce un incremento de EROs demostrado en pacientes asmáticos (Dworski 2000; Downs et al, 2001; Fogarty et al, 2000). Los EROs además, parece que inducen en sí a la hiperreactividad bronquial, estado característico del asma (Cortijo et al, 1999; Katsumata et al, 1990).

Muchos de los desencadenantes que favorecen las crisis asmáticas (infecciones víricas, partículas de polución/ humo de tabaco) pueden servir como fuentes de EROs, potenciando por tanto la inflamación, que provocará los síntomas característicos de la enfermedad (Adam et al, 1999; Wood et al, 2003).

Cada vez más, existe mayor evidencia del papel que llega a ocupar los EROs en la patogenia del asma, de hecho el aislamiento de neutrófilos y eosinófilos en plasma de asmáticos que generan un aumento considerable de EROs en comparación con un grupo control, corroboró este hecho hace décadas (Seltzer et al, 1986). De forma más directa, se ha visto que eosinófilos, macrófagos alveolares y neutrófilos

I.Introducción

estudiados en lavado broncoalveolar (BAL) de personas asmáticas también producen más proporción de EROs que al ser realizada esta técnica en sujetos normales (Teramoto et al, 1996).

Se ha demostrado como los EROs, en modelos experimentales animales, contribuyen a favorecer la inflamación y producir la hiperreactividad bronquial como respuesta, por aumento del tono vagal debido al daño producido al dañar la sensibilidad de los receptores B-adrenérgicos y disminuir el aclaramiento mucociliar (Adam et al, 1999; Owen et al, 1991).

Las acciones de los EROS sobre la vía respiratoria producen una contracción directa del músculo liso y potenciar el daño a nivel de la mucosa (Hulsman et al, 1994). Además parece que los EROs puedan estimular de forma directa a los mastocitos y favorecer la degranulación de histamina, aumentando por ello la producción de moco en la vía respiratoria (Krishna et al, 1998).

Entre los biomarcadores de estrés oxidativo que se han demostrado estar alterados en el asma:

- Elevación de la concentración de H_2O_2 en aire exhalado en asmáticos, incluso con buen control de la enfermedad. Relacionada con una actividad reducida de la SOD a nivel pulmonar (y por ello una disminución de la dismutación sobre O_2^-) (Comhair et al, 2000; Mak et al, 2004).

- Disminución de glutatión y aumenta glutatión disulfuro en epitelio pulmonar, lo que genera un desbalance en el balance del glutatión (Fitzpatrick et al, 2009; Mak et al, 2004).

- Aumento de la peroxidasa eosinofílica. La peroxidasa eosinofílica que es generada por los fagocitos, se ha visto que favorece el daño oxidativo al actuar sobre las proteínas, en concreto produce la brominación de los residuos de tirosina formando la 3-bromotirosina, siendo considerado éste un marcador específico de estrés oxidativo, al encontrarse aumentado en BAL de asmáticos (Wu et al, 2004). Por otra parte, parece que la peroxidasa eosinofílica también puede interactuar con especies nitrogenadas reactivas (ENRs) presentes en asmáticos y favorecer la nitración de las proteínas. Esto ocurre, porque en el asma, la inflamación a nivel de la vía respiratoria, favorece un aumento de la producción de NO endógeno (Ricciardolo et al, 2004).

El NO como molécula de señalización intercelular, posee un importante papel regulador con una amplia variedad de funciones a nivel respiratorio y juega un papel importante en la fisiopatología de distintas enfermedades. Ya ha sido señalado que por la agresión de diferentes estímulos en la vía respiratoria, es generada de una respuesta inmune-inflamatoria que conlleva a su vez la formación de EROS (Caramori et al, 2004). Esta respuesta inflamatoria favorece la formación de NO, al inducir y

I. Introducción

estimular la enzima NO-sintetasa inducible (iNOs), que a su vez posee acción citostática y bactericida (Ricciardolo et al, 2004). Con la conjunción del aumento de la actividad enzimática y elevación de la producción de NO, los metabolitos generados en ambas vías, muchos de éstos inestables, favorecen la formación de ENRs, que también provocan la amplificación de la respuesta inflamatoria en la vía respiratoria y en el parénquima pulmonar. También los ENRs promueven daño en las proteínas (como en la unión a los residuos de tirosina, formando nitrotirosinas), en el ADN, inhibición en la cadena respiratoria mitocondrial y por ello disfunción celular. En los casos que llega a producirse, se ha denominado al proceso como estrés nitroactivo (Ricciardolo et al, 2004). Estos efectos a nivel del sistema respiratorio, conllevan a una alteración de la homeostasis respiratoria al modificar la función original del NO, alterando el tono bronquial (parece reducir la potencia del patrón β -adrenérgico) y de forma crónica se ha relacionado con el deterioro progresivo de la función pulmonar (Folkerts et al, 2001). Por ello, la elevación de NO en aire espirado (NO_e) se interpreta como marcador que nos informa de la actividad inflamatoria en la vía aérea de los asmáticos (Massaro et al, 1996; Ricciardolo et al, 2001).

La reacción entre NO y O₂⁻, resulta en la formación de aniones peroxinitratos (ONOO⁻), ENRs muy reactivos, capaces de inducir una hiperrespuesta en modelo animal (Groves, 1999; Zhang et al, 2000), inducir lipoperoxidación y formación de nitrotirosinas entre otros daños a nivel de las células epiteliales pulmonares.

- Elevación de lipoperoxidos. Se ha evidenciado en el asma, niveles elevados de productos derivados de lipoperoxidación. El 8-isoprostano, producto de la peroxidación del ácido araquidónico, junto con otras sustancias específicas producidas durante el proceso de la lipoperoxidación, se han demostrado estar en cantidades elevadas en BAL de asmáticos (Dworski, 2000). En plasma, se han relacionado los niveles de F₂-isoprostanos en relación con la gravedad de la enfermedad (Montuschi et al, 2000; Paredi et al, 2000).

3. Estrés oxidativo en relación con VRS

Como ya se ha señalado, queda claro que el EO juega un papel fundamental en la patogenia de la inflamación pulmonar. Específicamente también ha sido estudiada la respuesta de EO en la inflamación provocada por la infección por el VRS.

Ha sido demostrado como el VRS, tanto in vitro como in vivo (Hosakote et al, 2009; Castro et al, 2006), es capaz de producir EROS, e incluso se ha postulado como podría relacionarse la intensidad de la respuesta con la gravedad de la infección (Hosakote et al, 2011). Por otro lado, se está estudiando cómo la administración de un tratamiento antioxidante pueda mejorar la expresión clínica de la enfermedad (Castro et

I.Introducción

al 2006; Casola et al, 2001; Indukuri et al, 2006; Liu et al, 2004), lo que indicaría un papel importante de los EROS en la señalización celular y en concreto de la inflamación y enfermedad a nivel del bronquiolo producida por el VRS.

1) En cultivo de células epiteliales infectadas por el VRS se ha demostrado que provoca (Hosakote et al, 2009):

Significativo aumento de los productos de la lipoperoxidación (aumento de F2-8 isoprostanos y MDA).

Reducción progresiva del ratio GSH/GSSG (disminución de la glutatión total versus reducida) conforme pasan días de la inoculación del VRS en las células.

Disminución progresiva en las enzimas SOD 1 y SOD 3, catalasa y en la expresión de la GST, con aumento de la SOD total a expensas de la SOD 2. Esto sugiere como la infección por VRS potenciaría la producción a nivel celular de H_2O_2 , no pudiendo ser desintoxicados por los antioxidantes celulares con el consiguiente acumulo de radicales libres tales como OH el cual reaccionaría con lípidos, proteínas, ADN causando el daño a nivel celular (figura 22).

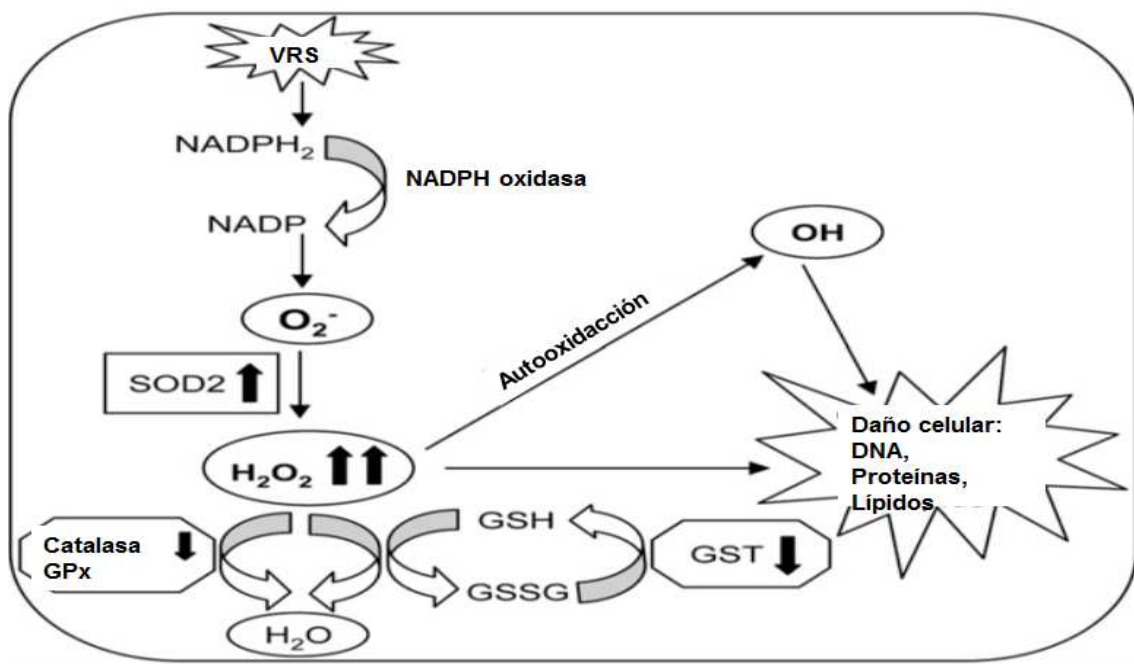


Figura 22. Representación esquemática de los posibles mecanismos por los que la infección del VRS produce estrés oxidativo a nivel celular. (Modificada de Hosakote et al, 2009).

NADPH₂: nicotinamida adenina di nucleótido fosfato, forma reducida; NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma oxidada, SOD2: Superóxido dismutasa; GPx: Glutatión peroxidasa; GSH: glutatión reducida; GSSG: glutatión oxidada; GST: Glutatión S- transferasa.

I.Introducción

Ante la posibilidad de que estos hallazgos sean debidos a un desbalance entre la producción de ROS inducida por la infección del VRS así como la modificación en la expresión de las enzimas antioxidantes a nivel celular, la modulación del EO supondría potencialmente una nueva diana para el tratamiento de la infección por VRS.

2) Intentando dar un paso más, Hosakote (Hosakote et al, 2011) estudia marcadores de EO-antioxidantes en 2 grupos de seres vivos infectados por VRS, de secreciones diferentes:

a) En un modelo murino, midiendo en células extraídas del árbol respiratorio mediante BAL (en ratones).

En niños diagnosticados de bronquiolitis en el Servicio de Urgencias, subdivididos por grupos de gravedad, mediante el estudio de sus secreciones nasofaríngeas.

En ratones encuentra diferencia entre los infectados por VRS y los controles sanos al existir una disminución significativa de enzimas antioxidantes: SOD (SOD 1, SOD 2, SOD 3), catalasa, glutatión peroxidasa y GST (tabla 14). Además la bajada de los antioxidantes es progresiva durante el transcurso de la infección, para volver al estadio basal del que partían alrededor del día 25 después de la infección por VRS.

Tabla 14. Expresión diferencial de las enzimas antioxidantes mediante la aplicación de electroforesis bidimensional en gel, en lavado broncoalveolar: ratones infectados por VRS frente a controles sanos. (Modificada de Hosakote et al, 2011).

EAO	Día 1	Día 3	Día 5	Día 9	Día 25
Catalasa	—	-2.5	-2.1	—	—
Cu/Zn SOD1	-2.3	-3.4	-2.0	-2.0	—
Glutatión peroxidasa	-1.8	-2.3	—	1.3	—
Glutatión S-transferasa	—	—	—	-6.0	—
Glutatión S-transferasa omega1	-6.8	-3.6	-2.3	-2.0	1.3
Glutatión S-transferasa alfa 4	-2.2	—	—	—	—
Glutatión S-transferasa mu 1	—	-4.0	-7.0	-1.7	1.4
Glutatión S-transferasa mu 2	—	-4.3	—	3.4	-1.3
Glutatión reductasa	—	—	—	3	—

Se muestran los cambios entre los grupos por el volumen/intensidad de la mancha por electroforesis. — indica que no existen diferencias entre grupos al ser testadas.

EAO: enzimas antioxidantes; SOD2: Superoxido dismutasa.

I.Introducción

En los niños con bronquiolitis por VRS, encuentra sólo en aquellos que están más graves, los clasificados en el grupo de “bronquiolitis hipóxica” (auscultación con sibilantes y $\text{SatO}_2 \leq 95\%$) que existe un aumento de F_2 8-isoprostanos significativo en comparación con los que el VRS era más leve (infección de vías respiratorias superiores o las clasificó como “bronquiolitis no hipóxica”), figura 23.

En ambos grupos, mide los marcadores y además realiza un estudio proteómico que facilita la interpretación del perfil proteico, al analizar la expresión proteica celular de los biomarcadores estudiados y demostrando la modulación génica proteica acontecida por la infección por el VRS.

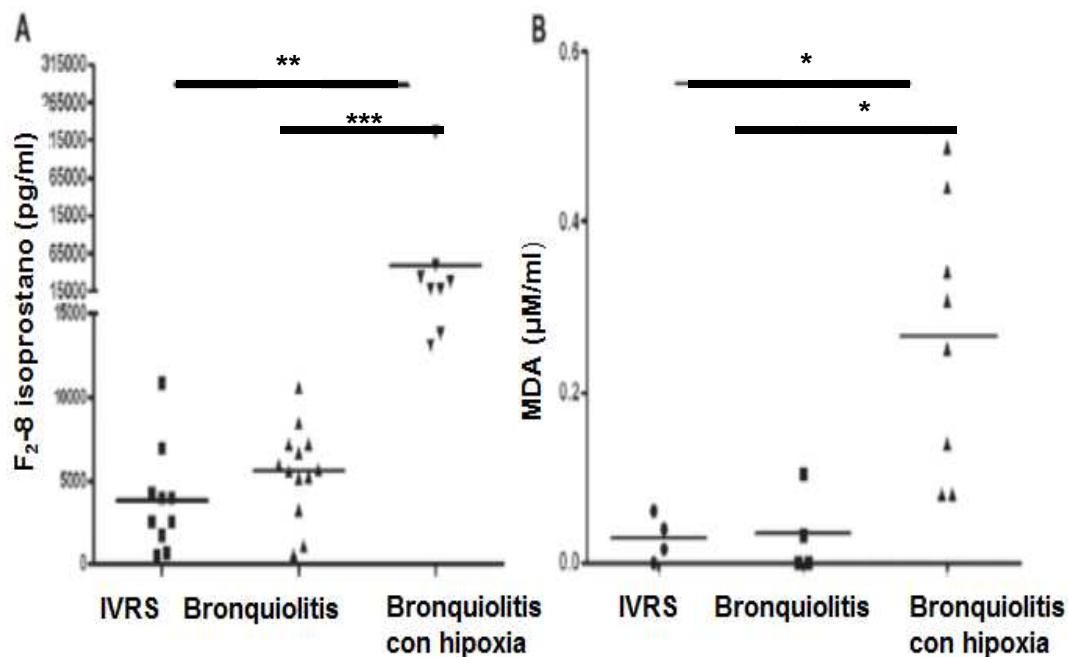


Figura 23. Niveles de marcadores de estrés oxidativo medidos en secreciones nasofaríngeas de niños con infecciones por VRS: IVRS: infecciones de vías respiratorias superiores.

(A) Niveles de F_2 -isoprostanos, (B) MDA: ácido malondialdehído. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. *no significación estadística.

4. Modulación de estrés oxidativo a nivel pulmonar con antioxidantes

La generación de EROS debido a la activación de fagocitos reclutados en las vías respiratorias durante las infecciones, supone ser una defensa antiviral importante. Sin embargo la sobreproducción de EROS ante una amplia respuesta frente a la infección conllevaría a una depleción de antioxidantes lo que causaría EO.

Para estudiar el papel de los EROS-antioxidantes en la patología pulmonar inducida por el VRS Castro et al (2006), probaron en un modelo murino el efecto de un

I.Introducción

tratamiento antioxidante induciendo una infección por VRS, tras inyectarlo en BAL de ratones. De esta forma comprobaron por primera vez, como el VRS era capaz de inducir EO a nivel pulmonar, mediante un aumento en los productos de la lipoperoxidación (MDA). Además trató a los ratones con butilhidroxianisol (BHA) oral como antioxidante, que es capaz de estabilizar a un radical libre al actuar como un agente “secuestrador” evitando posteriores reacciones de radicales libres. Con la administración de BHA los niveles de MDA disminuyeron significativamente además de constatar una mejora clínica de la enfermedad. El tratamiento con BHA era efectivo si era administrado antes o al mismo tiempo de la inducir la infección por VRS, pero no resultaba efectivo si lo hacía un día después del inicio de la infección. Por tanto, este artículo indica que es posible la modulación del EO en el contexto de la infección por VRS.

Otro estudio encabezado por Nandedkar (Nandedkar et al, 2011), indica como la apolipoproteína A-1 (ApoA-1) llamada 4F, conocida por sus propiedades antiaterogénicas a nivel coronario, también reduce la inflamación pulmonar y la resistencia de la vía respiratoria, sin poder precisar el mecanismo por el que lo hace. El estudio es realizado en un modelo murino, con ratones sensibilizados a ovoalbúmina, y comprueba que en los que se administra la ApoA-1 4F intranasal, se reduce la actividad de la peroxidasa eosinofílica así como los niveles de IgE en comparación con el grupo no tratado. Por lo que con estos hallazgos se demuestra la capacidad de la ApoA-1 4F para inhibir la hiperreactividad bronquial, al frenar la respuesta de EO.

Hosakote et al. recientemente (2012), dando otro paso más, demostraron que con la intervención farmacológica de “limpiadores” sintéticos (con capacidad de aumentar el aclaramiento viral), podría reducir in vitro la expresión genética para la formación de proteínas proinflamatorias y con ello disminuir el daño a nivel celular por el EO. Para ello, utiliza como antioxidantes a EUK-8 EUK-189, complejos de Salen de manganeso que se ha demostrado que a dosis altas disminuyen la replicación viral al favorecer la actividad de las enzimas catalasa y peroxidasas, con lo que podrían ser una nueva aproximación terapéutica para restaurar el equilibrio oxidativo a nivel celular. Estos complejos eran administrados en un cultivo de células epiteliales previamente y posteriormente a ser infectadas las células por el VRS. También miden el efecto de EUK-8 y EUK-189 a diferentes concentraciones.

Los efectos hallados en este modelo:

Disminución la elevación de los productos de lipoperoxidación generados por la infección por VRS, medidos por los marcadores MDA y 8-isoprostano.

Modulación de la expresión genética por una disminución de citoquinas-quimiocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, MIP-1 β), siendo esta disminución dosis-

I.Introducción

dependiente.

No obstante, actualmente más estudios son necesarios para recomendar un tratamiento antioxidante en la infección por VRS, si bien los estudios realizados hasta el momento parecen indicar que sólo la suplementación con antioxidantes sería efectiva si se administra en el mismo lugar de la infección. Por otro lado, todavía se desconoce la vía de administración, biodisponibilidad, distribución tisular así como otros parámetros farmacológicos básicos para que sea viable la intervención.

MÓDULO 4.

Vitamina D y bronquiolitis aguda

La determinación de la función de la vitamina D se inició en 1890 al observar que no bastaba con una buena alimentación para evitar el raquitismo en los niños de clase alta en la sociedad inglesa, sino que además era necesario su exposición a la luz solar (Hess et al, 1921; Rajakumar et al, 2003). Por esa misma época, se empezó a comprobar que alimentos como la leche, cereales o aceite de hígado de bacalao, cuando éstos eran expuestos al sol adquirirían lo que llamaron la “capacidad anti-raquítica”. Se conoce el papel de la vitamina D en la regulación del metabolismo del calcio desde hace aproximadamente un siglo, pero el conocimiento de su función inmunomoduladora es más reciente, iniciándose con el descubrimiento en 1983 del receptor de vitamina D (VDR) y su existencia en células inmunitarias, así como en otros tejidos (Provvedini et al, 1983).

La participación de la vitamina D en diferentes sistemas y su asociación con diferentes patologías, ha hecho que se esté reconociendo la importancia de mantener unos niveles séricos adecuados, estableciéndose recientemente nuevos puntos de corte para considerar éstos suficientes o insuficientes (Dawson-Hughes et al, 2005; Aloia et al, 2008; Heaney et al, 2008; Binkley et al, 2010).

Las patologías que se han asociado con deficiencia de vitamina D tanto en la infancia como en adultos, son enfermedades infecciosas como la tuberculosis (Olesen et al, 2007; Liu et al, 2008; Blanco et al, 2009), tumorales (cáncer de mama, colón, próstata) (Chlebowski, 2011; Pazdiora et al, 2011), de origen autoinmune (esclerosis múltiple ó diabetes) (Pierrot-Deseilligny, 2009; Nazarian et al, 2011), o cardiovasculares (Poole et al, 2006). Por tanto, estos datos apoyarían el concepto de importantes acciones pleiotrópicas de la vitamina D además su función clásica, en la regulación sobre la homeostasis del calcio y el metabolismo óseo (Lin et al, 2004).

Desde hace tiempo se asocia la existencia de compromiso respiratorio en los niños afectos de raquitismo (Park, 1923; Arneil, 1975; Misra et al, 2008). Recientes estudios, han demostrando que niveles deficitarios de vitamina D se asocian con un significativo aumento en la incidencia de infecciones respiratorias (Muhe et al, 1997; Najada et al, 2004; Wayse et al, 2004; Walker et al, 2009; Camargo et al, 2011). Por tanto, constituye un tema de plena actualidad dilucidar el rol inmunomodulador de la vitamina D, por la repercusión que un posible déficit podría tener en las infecciones respiratorias durante el primer año de vida, así como la indicación de profilaxis en este periodo Walker et al, 2009; Roth et al, 2008).

1. Metabolismo y mecanismo de acción de la vitamina D

1.1 Metabolismo de la vitamina D

La vitamina D que existe en el organismo tiene dos orígenes: la sintetizada en la piel (aporte endógeno) que es la vía principal de obtención de vitamina D y la obtenida a partir de la dieta (aporte exógeno), ambos precursores de la forma activa de la vitamina D.

Durante los primeros meses de vida, teniendo en cuenta la menor exposición a la luz solar, el aporte exógeno constituyen la principal fuente de obtención de vitamina D, además de considerar los valores iniciales al nacimiento, niveles prenatales de vitamina D determinados por los valores maternos durante el embarazo (Belderbos et al, 2011).

Si bien la lactancia materna constituye la mejor forma de alimentación para el lactante, es conocido que su contenido en vitamina D es deficitario. De hecho la cantidad de vitamina D media en leche materna proveniente de una madre bien nutrida, es de 22 UI/L (rango 15-50 UI/L) (Leerbeck et al, 1980) y si además el niño amantado de forma exclusiva y no se expone a la luz solar bajará a 11-38 UI/ día (Henderson, 2005), siendo las necesidades mínimas recomendadas 200 UI/día (Gartner et al, 2003; Alonso et al, 2010).

La absorción de la vitamina D procedente del aporte exógeno se realiza vía biliar. A las 4 horas de la ingestión de vitamina D, se ha observado un incremento significativo de su concentración, siendo máxima a las 12 horas y va descendiendo a partir de las 72 horas (Lo et al, 1985). No existe un órgano específico de almacenamiento, aunque si se ingiere en exceso, las mayores concentraciones se encuentran en el hígado, tejido adiposo y músculo.

La vitamina D sintetizada en la piel o ingerida en la dieta, debido a su carácter liposoluble, pasa a la circulación sanguínea unida a una proteína transportadora o proteína de unión de la vitamina D, (VDBP, vitamin D binding protein) que fija equimolecularmente a la vitamina D y a sus metabolitos una vez hidroxilados (Figura 24).

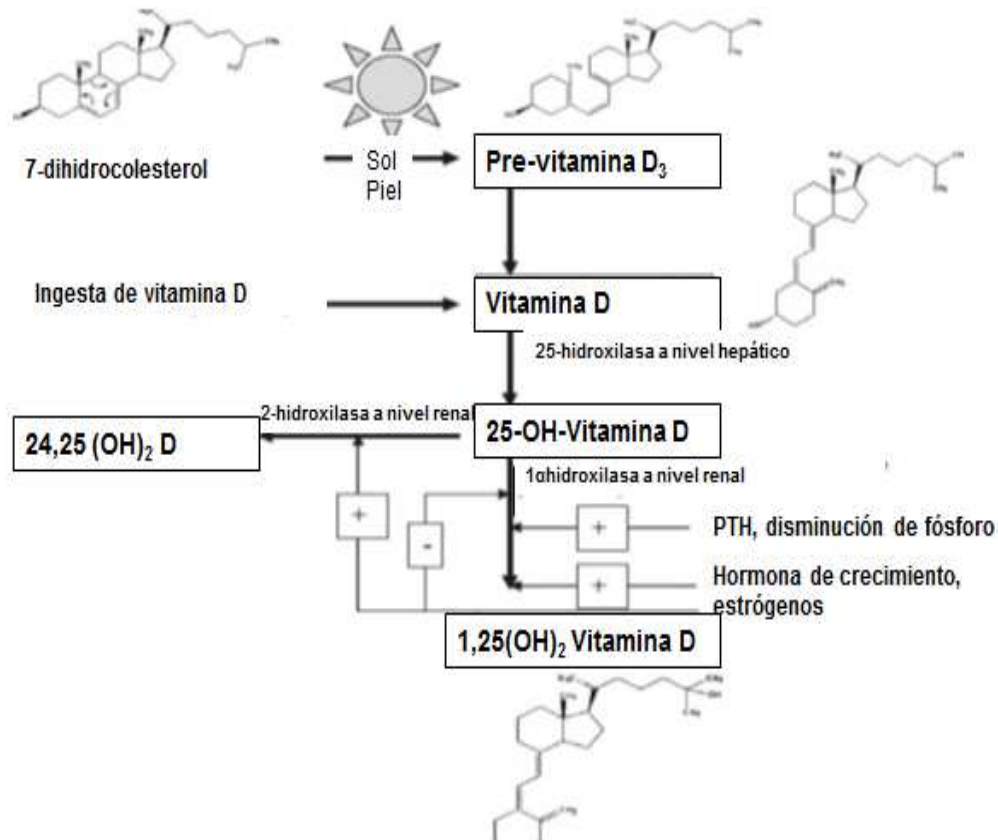


Figura 24. Síntesis de la vitamina D. (Modificada de Misra et al, 2008).

GH: hormona de crecimiento.

La máxima afinidad de unión es para el 25-hidroxicalciferol o 25-hidroxivitamina D (25(OH) D), el 24,25(OH)₂ D compite efectivamente con el 25(OH) D a concentraciones similares. La vitamina D y el 1,25 dihidroxicalciferol (1,25(OH)₂ D) son de 5 a 10 veces menos competitivos. Las afinidades de los distintos metabolitos por la VDBP son proporcionales a sus vidas medias en el plasma; en consecuencia el 1,25(OH)₂ D pasa fácilmente a los tejidos mientras que el 25(OH) D lo hace con mayor dificultad (De Luca, 1979).

El complejo vitamina D-VDBP es transportado al hígado donde la vitamina D se hidroxila en los hepatocitos mediante la 25-hidroxilasa-vitamina D (Holick, 1990). La 25(OH) D es uno de los metabolitos circulantes principales de la vitamina D; su vida media es de aproximadamente 21 días, y su concentración plasmática es un buen reflejo del aporte dietético de vitamina D y de la exposición a la luz solar.

Después de su formación en el hígado, la 25(OH) D es conducida por su transportador hasta el riñón, donde sufre una segunda hidroxilación (Gray et al, 1979) dando lugar a 1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂ D) reconocido como el metabolito activo de la vitamina D, o al 24R, 25-dihidroxivitamina D (24,25(OH) D) por la

I.Introducción

actuación de la enzima 24 R-hidrolasa. La $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ posee una vida media de 4 horas aproximadamente (Misra et al, 2008).

Aunque el riñón es el órgano principal donde se encuentran ubicadas estas hidroxilasas, en la placenta (Gray et al, 1979) y en otros tejidos tales como hueso, piel y monocitos también se han observado procesos de regulación y síntesis (Bilde et al, 1986). De hecho, estudios en cultivos celulares de linfocitos de cordón umbilical infectados por virus HTLV-I, han demostrado ser capaces de inducir el metabolismo de $25(\text{OH}) \text{D}$ hacia un metabolito identificado como $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$, de lo que se desprende que estas células infectadas por virus poseen la maquinaria necesaria para sintetizar este compuesto (Fetchick et al, 1986).

Además de los iones y los factores hormonales que regulan la vitamina D en su papel sobre el metabolismo óseo (Chesney et al, 1990), en los últimos años cobra cada vez mayor importancia la función reguladora que la vitamina D ejerce sobre el sistema inmunológico. Se ha evidenciando como en macrófagos, incluyendo queratinocitos o células epiteliales pulmonares también actuarían autorregulando la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ (Wang et al, 2004; Schaubert et al, 2006; Schaubert et al, 2007), de forma que el sistema inmune podría inducir su síntesis y automodulación de la expresión de VDR mediante una respuesta auto-paracrina (Hewison, 2010).

1.2 Mecanismo de acción de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$

La $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ ejerce la mayoría de sus efectos biológicos al actuar como factor de transcripción genético, que tras la unión con el VDR se internalizaría hasta el núcleo celular interactuando con el ADN y promovería la transcripción de la región promotora de los genes diana con la producción de más de 200 proteínas (Dusso et al, 2005; Marcinkowska, 2001). Además de las acciones a nivel genético, señales no genómicas ocurren entre segundos o minutos de la producción/ exposición a $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ en los diferentes tejidos, ya que la expresión de VDR, como ya ha sido comentado, no está restringida a las células que desarrollan la homeostasis mineral y el metabolismo óseo, sino que su presencia ha sido demostrada en más de 30 tipos celulares, tanto benignas (como en corazón, intestino, hígado, riñón, pulmones, timo, médula ósea y linfocitos T y B) como malignas (células en leucemia, mama, próstata o colon), con lo que no sólo tendría su influencia sobre el metabolismo del calcio, sino también en acciones tan diversas como la proliferación y diferenciación celular e inmunológica (Bikle, 2009).

El descubrimiento de la existencia de diferentes dianas celulares en las que $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ produzca las enzimas necesarias para su activación, ha producido

nuevas vías de conocimiento ante las ya conocidas como “clásicas acciones” de la vitamina D.

2. Definición y prevalencia de “niveles bajos de vitamina D”

El 25(OH) D, su principal forma circulante, es el metabolito de elección para conocer el estado nutricional de vitamina D adquirida de forma endógena o exógena. Por ello la mayoría de las publicaciones consideran dichos niveles como la medida más fiable para conocer el estatus de vitamina D (Misra et al; 2008). Recientemente se han considerado como puntos de cortes niveles: < 20 ng/ml 25(OH) D como deficientes, de 20 a 30 insuficientes, > 30 ng/ml suficientes (Dawson-Hughes et al, 2005; Jones et al, 2007). Si bien, hay que recordar que dichos puntos de corte, dada la variabilidad y ausencia de estándares universalmente aceptados, se pueden seguir considerando controvertidos ya que han sido establecidos para evitar la enfermedad más evidente asociada a su déficit.

Dichos puntos de corte, han sido sugeridos, en base al papel desarrollado por la vitamina D para facilitar la absorción de calcio y fósforo, a partir de la cual se evidenciaba su predisposición a osteomalacia o raquitismo (Misra et al, 2008) (Tabla 15).

Tabla 15 .Niveles de 25(OH) D actualmente usados para la definición del estado de la vitamina D

Estado de vitamina D	Niveles de 25(OH)D (ng/ml)
Deficiente	< 20 ng/ml
Insuficiente	20- 29 ng/ml
Suficiente	> 30 ng/ml

En la actualidad, sigue siendo desconocido si para la función de la vitamina D sobre el sistema inmune, son válidos los puntos de corte establecidos hasta la fecha. En 2010, tras una evaluación de las necesidades de vitamina D realizadas por el Instituto de Medicina de Estados Unidos, se concluyó que concentraciones séricas de 25(OH) D de 50 nmol/L (equivalente a 20 ng/ml) serían suficientes para su función en el metabolismo óseo para la mayoría de la población, pero no tenían datos suficientes para recomendar niveles superiores de 25(OH) D para prevenir otras enfermedades/infecciones donde está siendo estudiada (Ross et al, 2011).

Por tanto, la variabilidad en el punto de corte utilizado, hace que los resultados difieran en cuanto a la prevalencia al considerar la deficiencia de vitamina D en función

I.Introducción

de factores de la cohorte estudiada tales como la edad, sexo, raza, consumo diario en la dieta, la influencia de la latitud o la variabilidad genética, pese a que está claro la extensa prevalencia de este déficit (Gordon et al, 2008; Sullivan et al, 2005; Kumar et al, 2009; Binkeley et al, 2010) (Figura 25).

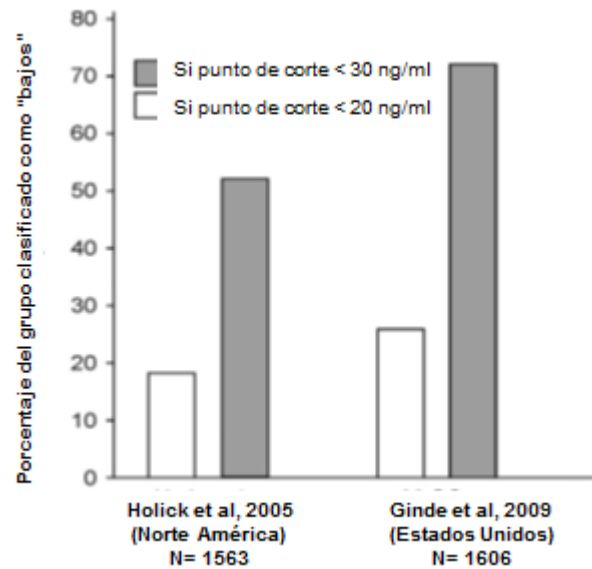


Figura 25. Prevalencia de niveles bajos de vitamina D. (Modificada de Binkeley et al, 2010)

3. Acción de la vitamina D sobre el sistema inmune/ enfermedades infecciosas

El descubrimiento del VDR en células inmunitarias sugirió la participación de la vitamina D en la regulación de la función inmunitaria. Células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, así como linfocitos T y B expresan VDR. Esta expresión puede ser constitutiva o inducida tras estimulación: así como la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ parece tener su papel en todas las células del sistema inmune de forma constitutiva, la enzima 1-hidroxilasa se ha hallado en células dendríticas y monocitos una vez estimuladas (Adams et al, 2007).

Se conocen múltiples acciones, de forma preferente desarrolladas sobre la inmunidad innata. Desde la década de los 90, se ha evidenciado que la expresión del correceptor de TLR4 (CD14) es fuertemente inducido en las células por la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ (Oberg et al, 1993). A su vez, dicha influencia de la vitamina D en la inmunidad innata parece ser dependiente de la concentración de 2 enzimas: 1-hidroxilasa y 24-hidroxilasa. Tras la activación de la respuesta inmune innata por los antígenos, resultaría en una regulación positiva de VDR y activación de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ (Prehn et al, 1992). De esta forma, la vitamina D facilita la diferenciación de precursores mieloides

I.Introducción

a macrófagos (Koeffler et al, 1984), favoreciendo su función de quimiotaxis, fagocitosis y presentación de antígeno. Además se ha visto que modula la activación de los linfocitos T, disminuyendo su proliferación ante mitógenos y antígenos, e inhibiendo la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-2, IL- 12 o TNF α , en la propia infección tuberculosa (Vidyarani et al, 2007).

Aparte de la inducción en la expresión de y la activación de los linfocitos T en la respuesta inmune, se han indicado mecanismos directos sobre la modulación de la respuesta T mediada. Ha sido demostrado la habilidad de 1,25(OH) $_2$ D de inhibir directamente la estimulación y producción de linfocitos T, y por tanto poder alterar el perfil de las citoquinas producidas (Figura 26).

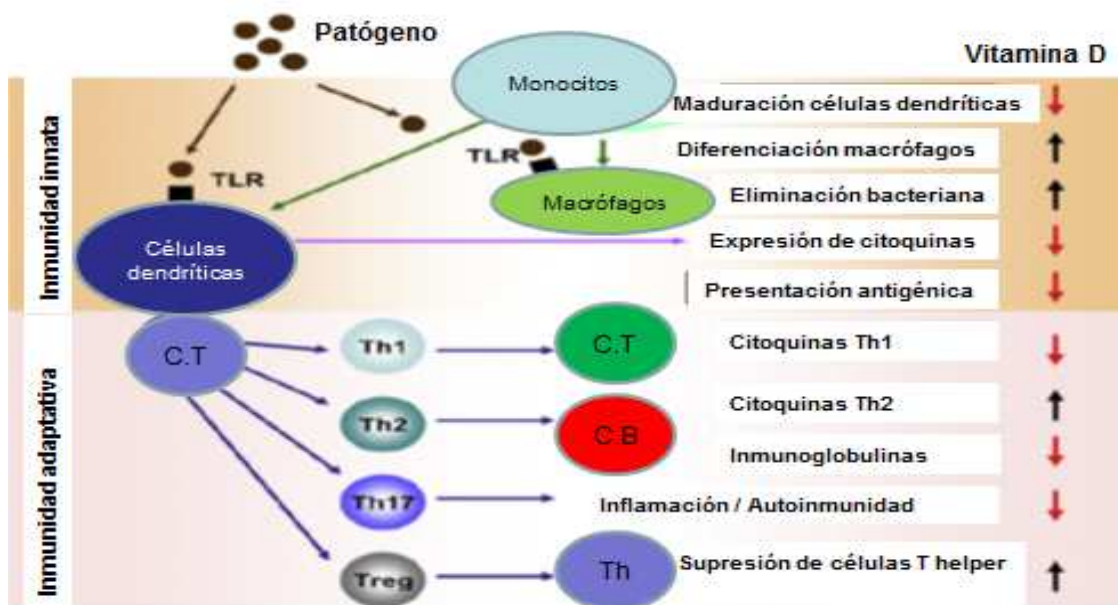


Figura 26. Efectos de la vitamina D sobre la inmunidad innata y adaptativa. (Modificada de Hewison, 2010)

RTL: receptor toll like; C.T: células T; C.B: células B; C.T citoTox: células T citotóxicas; Treg: células T reguladoras.

También era conocida la capacidad de la vitamina D para inhibir la activación de una respuesta Th1 (Bhalla et al, 1984), lo cual podría tener un efecto antiinflamatorio y por ello se ha resaltado su posible papel protector frente a patologías autoinmunes mediadas por células. Son recientes los nuevos hallazgos sobre la actuación de la vitamina D no sólo por inhibir la respuesta Th1, sino por potenciar la respuesta Th2 (Boonstra et al, 2001), inicia por tanto una nueva línea de investigación en el campo de las enfermedades alérgicas. Así la 1,25(OH) $_2$ D inhibiría la producción de las citoquinas Th1 como IL-2, IFN- γ y TNF- α favoreciendo la transcripción de

I.Introducción

factores que sobreexpresen la respuesta Th2 y sus citoquinas, tales como IL-4 (Rigby et al, 1984; Chen et al, 2007).

En cuanto a la respuesta inmune por células B, parece también estar controlada por 1,25(OH)₂D: limitando su actuación al modificar la respuesta Th por la producción de citoquinas y además se han encontrado en los linfocitos B dianas directas, acciones mediadas por el VDR. Entre las acciones mediadas por la 1,25(OH)₂D, se incluirían la inhibición en la proliferación-diferenciación y la secreción de inmunoglobulinas, así como en la generación de células B memoria e inducción a la apoptosis (Chen et al, 2007).

Conociendo las acciones de la vitamina D sobre el sistema inmune, se ha postulado la importancia de mantener unos niveles adecuados de vitamina D, lo que favorecería la protección frente a un amplio rango de patógenos, por la potenciación de la respuesta inmune innata y adaptativa (Rajakumar et al, 2003; White, 2008; Russell et al; 2010).

4. Estudios específicos en relación a Infecciones respiratorias/ Bronquiolitis aguda

En la actualidad se está reconociendo la importancia del estado nutricional para el buen funcionamiento del sistema inmune, en concreto frente a la susceptibilidad de padecer IVRI en las primeras etapas de la vida (Muhe et al, 1997; Najada et al, 2004; Wayse et al, 2004; Walker et al, 2009; Camargo et al, 2011). En relación al papel inmunomodulador de la vitamina D, se ha observado como en estudios epidemiológicos existe una asociación entre concentraciones inadecuadas de vitamina D y hospitalización por infecciones respiratorias en niños (Kresfelder et al, 2011; Randolph et al 2014) . De hecho, se está considerando la existencia de una asociación inversa entre niveles de vitamina D y la susceptibilidad ante los virus respiratorios (Ginde et al, 2009; Cannell et al, 2006). Por el contrario, la observación de altos niveles de vitamina D se asocia con menor riesgo de hospitalización por reagudización asmática (asma inducido por virus) (Tabla 16) (Brehm et al, 2009; Freishtat et al, 2010; Gupta et al, 2012): niveles de vitamina D < 10 ng/ml en asmáticos se ha asociado con 5.67 veces más probabilidad de infecciones respiratorias superiores en comparación con aquellos que presentan niveles > 30 ng/ml (Ginde et al, 2009).

Tabla 16. Niveles séricos de vitamina D y número de ingresos hospitalarios por asma en niños costarricenses. (Modificada de Brehm et al, 2009)

Variables analizadas	(Valor de P) (IC 95%)	
	Sin ajustar	Módulo multivariado
Déficit de vitamina D	1.9 (0.2 to 3.7) (0.03)	2.3 (0.65 to 4.0) (0.006) [†]
Edad (años)		-0.02 (-0.25 to 0.21) (0.9)
Sexo: mujer		0.19 (-0.68 to 1.1) (0.7)
IMC z-score		0.1 (-0.30 to 0.51) (0.6)
Respuesta a Metacolina log ₁₀		0.76 (-0.16 to 1.7) (0.1)
Educación parental		-0.06 (-0.43 to 0.3) (0.7)
IgE + a cucaracha		1.1 (0.27 to 2.0) (0.01)
Uso de medicación antiinflamatoria		0.83 (-0.03 to 1.7) (0.06)

Además se ha evidenciado un mayor riesgo de desarrollo de neumonía en los niños etíopes en los que existía un marcado déficit nutricional ó diagnosticados de raquitismo, encontrando una fuerte correlación positiva entre el déficit de vitamina D y la existencia de compromiso respiratorio (Muhe et al, 1997). Estudios realizados en países desarrollados (Najada et al, 2004; Wayse et al, 2004) en los que se incluyen niños menores de 5 años no raquíticos, encuentran la asociación entre IVRI con la existencia de un déficit subclínico de 25(OH) D, demostrándolo en reagudizaciones respiratorias de mayor gravedad, las que requerían ingreso, frente a un grupo control.

En un interesante publicación (Karatekin et al, 2009) que estudia a niños desde el período neonatal y sigue su evolución, se demuestra cómo aquellos que desarrollaban IVRI precoces presentaban niveles deficitarios de 25(OH) D. Además indica que existe una fuerte correlación cuando las concentraciones de 25(OH) D eran < de 10 ng/ml. Por otro lado Roth et al.(2010), incluyendo en su estudio a niños comprendidos entre 1 y 18 meses, demuestra también la existencia de una asociación entre niveles bajos de vitamina D y el desarrollo de IVRI.

Con estos resultados, no sólo parece que el riesgo de infecciones respiratorias es mayor en niños con déficit de vitamina D, si no que plantea el punto de corte para considerar la vitamina D suficiente en su función sobre sistema inmune podría ser mayor que el considerado actualmente, ya que en aquellos que se han objetivado una mayor susceptibilidad a infecciones sin manifestaciones clásicas de la insuficiencia de la vitamina D (raquitismo u osteomalacia).

Estudios realizados en países en vías de desarrollo acentúan el impacto financiero y social que puede conllevar el déficit de vitamina D, porque las infecciones

I.Introducción

suponen la principal causa de morbi-mortalidad, y que la adquisición de una infección grave es subsidiaria de ingreso favoreciendo el gasto sanitario.

En países desarrollados como Japón, también se ha evaluado la asociación de la gravedad de la infección respiratoria con la deficiencia de 25(OH) D (Inamo et al, 2011). Aparte de reseñar la edad como criterio de gravedad, al ser los menores de 6 meses los que mayor riesgo de manifestaciones graves tenían, los niños que recibieron lactancia materna exclusiva y con niveles de 25(OH)D < 10 ng/ml eran los que con más probabilidad precisaban oxigenoterapia suplementaria o VM(Tabla 17).

Tabla 17. Relación entre los niveles de 25(OH) vitamina D y la gravedad de IVRI en niños hospitalizados. (Modificada de Inamo et al, 2011)

	Niveles séricos de 25 (OH)D (ng/ml)			
	<10	<15	<25	<40
Número de niños incluidos	4	8	12	28
Graves	}	3	3	3
Niños que requirieron oxigenoterapia				
Niños que requirieron UCIP	1	1	1	1

En este sentido, se ha resaltado que niños con IVRI que precisaron ingresar en UCIP presentaban niveles deficitarios de 25(OH) D estadísticamente significativos en comparación con un grupo control, señalando al déficit de vitamina D como un factor de riesgo al estar presente en los cuadros más graves (McNally et al, 2009).

A favor de que niveles bajos de vitamina D favorezcan a IVRI, queda patente en un estudio realizado desde el nacimiento, en el que miden los niveles de 25(OH) D en sangre de cordón umbilical de neonatos y los siguen clínicamente en el primer año. Con este estudio se demuestra que aquellos recién nacidos con niveles bajos (< 50 nmoles/L) al nacimiento presentaban un riesgo aumentado de IVRI durante el primer año de vida, poniendo en relieve la importancia de la suplementación materna durante el embarazo (Belderbos et al, 2011) así como en los primeros meses de vida (Maxwell et al, 2012).

Camargo et al. (2011) confirmaron al medir vitamina D en sangre del cordón umbilical, que los que tenían niveles subóptimos no sólo aumentaba el riesgo de infecciones respiratorias en los primeros 3 meses (Odds ratio: 1.00 (para valores

I.Introducción

25(OH) D ≥ 75 nmol/L, 1.39 para 25–74 nmol/L, y 2.16 para <25 nmol/L) si no que también tenían mayor riesgo de sibilantes recurrentes durante la infancia.

En un estudio en el que no llegan a identificar diferencias en cuanto a niveles séricos de vitamina D con el riesgo de hospitalización por BA (Roth et al, 2009), si destaca que la mayoría de los individuos que presentaban IVRI, poseían un polimorfismo en el receptor de vitamina D, 82% de los infectados por VRS presentaban el polimorfismo denominado “FOK 1 ff”, y este se ha asociado con la expresión reducida del mismo y que se relacionaría por tanto con un incremento en la susceptibilidad de estos sujetos para el desarrollo de IVRI (tabla18) (Roth et al, 2008).

La hipótesis de la alteración de la actividad de la vitamina D por alteración del VDR también ha sido estudiada. Una menor expresión del VDR ha sido señalada, que conllevaría la hipofuncionalidad del mismo, afectando a su actividad antimembrana y su implicación en la regulación del sistema inmune e inflamación. Teóricamente la “hipofuncionalidad” del receptor sería compensada con un aumento en la producción de 25(OH) D y por ello estos niveles podrían ser normales (Roth et al, 2008).

Tabla 18. Características basales y polimorfismo del receptor de vitamina D (VDR) en casos con IVRI y grupo control (Tomada de Roth et al, 2008).

Locus RVD, modelo, genotipo	Promedio (n=120)		Submuestra (n=81)	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
FokI				
Sin ajuste				
FF	1		1	
Ff	1.34 (0.59–3.05)	.480	1.87 (0.59–5.92)	.289
ff	7.43 (1.80–30.67)	.006	26.40 (2.58–271.09)	.006
Ajuste por etnia				
FF	1		N/A	
Ff	1.40 (0.55–3.58)	.481	...	
ff	6.16 (1.31–28.95)	.021	...	
Ajuste completo				
FF	1		1	
Ff	1.04 (0.29–3.77)	.955	1.83 (0.32–10.39)	.493
ff	7.38 (1.17–46.55)	.033	29.90 (1.93–463.72)	.015
TaqI				
Sin ajuste				
TT	1		1	
Tt	1.33 (0.63–2.81)	.449	3.86 (1.31–11.39)	.014
tt	1.33 (0.30–5.88)	.704	2.50 (0.37–16.89)	.347
Ajuste por etnia				
TT	1		N/A	
Tt	1.79 (0.75–4.26)	.189	...	
tt	1.99 (0.38–10.35)	.416	...	
Ajuste completo				
TT	1		1	
Tt	2.83 (0.85–9.43)	.090	10.42 (1.55–70.25)	.016
tt	2.06 (0.25–16.97)	.503	1.77 (0.096–32.44)	.700

I.Introducción

Recientemente McNally et al. (2013) han apoyado la relación de la existencia de un polimorfismo del receptor de vitamina D y la gravedad de BA mediante una revisión de los estudios publicados hasta el 2013, concluyendo que el conocimiento de éste ayudaría a predecir los niños de riesgo de padecer una BA grave pese a que se encuentren niveles normales de 25(OH) D.

La investigación llevada a cabo en la influencia de la variabilidad genética para padecer un cuadro de bronquiolitis, ha determinado que la existencia de un polimorfismo en un solo nucleótido (single nucleotide polymorphism, SNP) en genes que regulan la inmunidad innata, entre los cuales se encontraría el receptor de vitamina D, también ayudaría a predecir la susceptibilidad a BA-VRS (Janssen et al, 2007).

Mansbach et al. evidenciaron in vitro el papel de la vitamina D sobre unas proteínas con acción defensiva y antimicrobiana, como son las catelicidinas, al incrementar la transcripción de las mismas, en concreto de la catolicísima humana antimicrobiana péptido 18 (hCAP-18). Comprueba como los niños con niveles bajos de hCAP-18 eran más susceptibles de padecer un cuadro de bronquiolitis grave por VRS, pese a tener valores normales de vitamina D (Mansbach et al, 2012). Este estudio concluye que conocer los niveles de hCAP-18 puede ser un biomarcador clínico de interés.

5. Vitamina D y predisposición a respuesta Th2

En la última década también se está investigando que la vitamina D tenga una acción inmunológica al favorecer una respuesta Th2, haciendo pensar el papel de la vitamina D en la alergia y su posible acción sobre las enfermedades autoinmunes (Boonstra et al, 2001; Searing et al, 2010).

Matheu et al. (2003) inyectaron vitamina D subcutánea en ratones y observaron que el exceso en la suplementación de vitamina D podía favorecer el desarrollo de una respuesta Th2. Plantearon que el 1,25(OH)₂D era capaz de inhibir la progresión de la respuesta Th1, probablemente por existir un viraje hacia Th2 (con inhibición de IL-12, IL-1 e IFN-γ y aumento de IL-4), y además por su acción directa sobre las células Th2, al actuar sobre la activación de células T y favorecer la regulación positiva del receptor de vitamina D. Además encontraron un aumento de los niveles séricos de IgE como resultado del tratamiento con vitamina D (Figura 27 y 28).

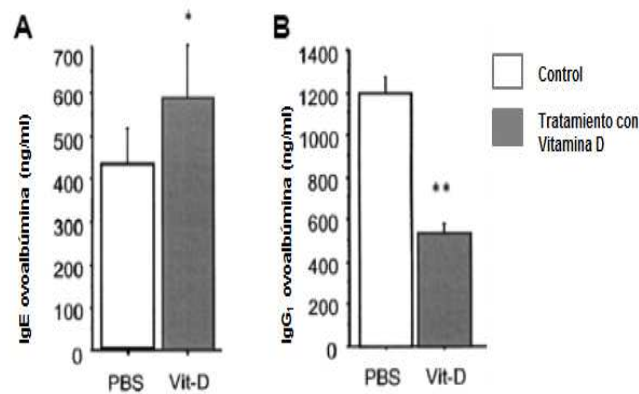


Figura 27. Niveles séricos de IgE específica a ovoalbúmina (A) e IgG₁ en controles y tratados con vitamina D. (Modificada de Matheu et al, 2003).

* $P < 0.5$; ** $P < 0.01$

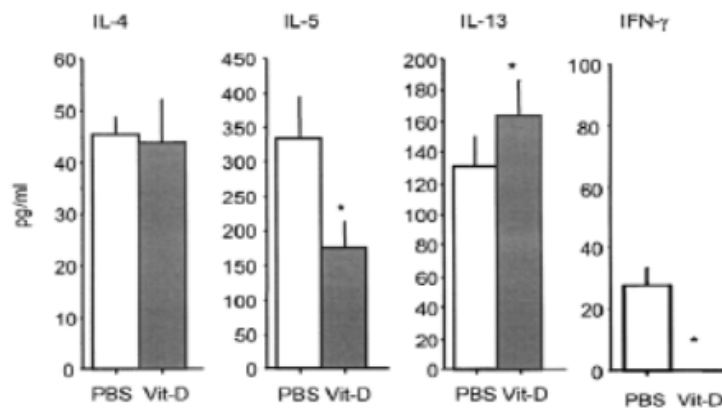


Figura 28. Niveles de citoquinas en lavado broncoalveolar determinados por ELISA en controles y tratados con vitamina D. (Modificada de Matheu et al, 2003).

* $P < 0.5$

Con ello sugieren que el exceso de suplementación con vitamina D podría favorecer el desarrollo y predominio de una respuesta Th2 in vivo, promoviendo un posterior desarrollo de sensibilizaciones alérgicas.

Ha sido evaluado el papel de la vitamina D en el sistema inmune, su efecto sobre niveles basales de citoquinas y tras la administración de ésta (Thien et al, 2005). Se ha observado que la 1,25(OH)₂D posee la capacidad para regular la producción de citoquinas de las células CD4 y CD8, favoreciendo una respuesta Th2 por la supresión de una respuesta Th1 (reducción de la producción del IL-2), sino que además este efecto es principalmente por el importante efecto estimulador producido sobre la propia respuesta Th2 (por inducir la producción de IL-4 e IL-13).

II.HIPÓTESIS DE TRABAJO

II. Hipótesis de trabajo

Este trabajo estudia en lactantes con BA la relación entre la respuesta inflamatoria a nivel local (exudado nasal) y sistémico, la posible producción de estrés oxidativo y el estado de la vitamina D en estos pacientes.

En este estudio se valora si existe relación entre la gravedad del cuadro clínico objetivado mediante escala clínica y la necesidad de oxigenoterapia en función de los siguientes parámetros: niveles de citoquinas y quimiocinas, biomarcadores de estrés oxidativo y niveles de 25(OH) vitamina D.

Se considera hipótesis nula (H0), cuando no existen diferencias en el patrón de los biomarcadores estudiados en lactantes con BA según la escala clínica de gravedad y la necesidad de oxigenoterapia.

Se considera hipótesis alternativa (H1), cuando existen diferencias cuantitativas y cualitativas en el patrón de los biomarcadores en lactantes con bronquiolitis según la escala clínica de gravedad y la necesidad de oxigenoterapia.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar la respuesta inflamatoria a nivel local (epitelio de mucosa nasal) y sistémica, a la vez que el estrés oxidativo y los niveles de 25(OH) vitamina D en un grupo de lactantes ingresados por bronquiolitis BA en relación a un grupo control sin patología respiratoria.

Determinar la utilidad de los biomarcadores estudiados como factores pronósticos en esta patología.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Inflamación

Determinar las concentraciones de citoquinas Th1 (IFN- γ , TNF- α) y Th2 (IL-4, IL-6 y IL-10), quimiocinas (IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β) y VEGF en plasma y exudado nasal de lactantes con BA y en un grupo control sano.

Evaluar la utilidad de la cuantificación de estos biomarcadores como factor predictor de la evolución de la BA, y correlacionar los niveles de dichos marcadores con la gravedad clínica de la bronquiolitis.

Oxidación-antioxidación

Determinar los biomarcadores de estrés oxidativo (LPO, GSH, GT, GSSG, ratio GSH/GSSG Y GPox) en plasma, comparar los niveles de estos marcadores en

II. Hipótesis de trabajo

relación con el grupo control sano y establecer la relación de dichos marcadores con la gravedad clínica de la BA.

Vitamina D

Determinar los niveles séricos de 25(OH) D en lactantes ingresados por BA y un grupo control sano.

Comprobar si los niveles plasmáticos de 25(OH) D puede ser un factor predictivo de la gravedad de la BA.

III.MATERIAL Y MÉTODOS

III. Material y métodos

1. Diseño experimental

Se trata de un estudio prospectivo, descriptivo, analítico y observacional de tipo casos y controles, desarrollado con la participación conjunta de los Servicios de Pediatría, Críticos y Urgencias, Bioquímica y Medicina Nuclear del Hospital Universitario Reina Sofía (HURS) de Córdoba y la Unidad de Investigación Pediátrica del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

El protocolo de estudio ha sido aprobado por el Comité Local de Investigación Clínica y Bioética del HURS con fecha 12/01/2010 (Anexo 3). Los sujetos seleccionados se han incorporado al estudio tras cumplir todos los criterios de inclusión, la aceptación y la obtención escrita del consentimiento informado del responsable legal del menor.

2. Sujetos

Para la realización de este trabajo se seleccionaron todos los lactantes menores de 12 meses que durante los meses de diciembre 2009 a marzo 2010 fueron ingresados con el diagnóstico de BA en el Servicio de Pediatría del HURS.

El grupo control fue seleccionado entre los niños menores de 12 meses sin patología médica pediátrica, que acudían a consulta externa de Cirugía Infantil y precisaban realización de análisis clínicos para estudio preoperatorio. Los controles fueron reclutados durante el mismo período de tiempo que los casos. Los lactantes controles incluidos no habían padecido clínica respiratoria ni historia de ingresos hospitalarios en el último mes.

Los padres ó tutores legales de los niños participantes en el estudio fueron informados detalladamente del estudio y aceptaron voluntariamente su inclusión firmando el consentimiento informado (Anexo 4).

2.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron en el grupo de los casos los lactantes entre 1 y 12 meses de vida, previamente sanos, que ingresan con diagnóstico de BA en el HURS. Se definió BA al primer episodio de dificultad respiratoria en un niño menor de 2 años de edad con síntomas clínicos y /o evidencia analítica compatible con infección respiratoria viral.

2.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellos lactantes que referían una evolución del cuadro superior a 7 días, así como los que ya habían presentado un episodio de sibilantes anteriormente, y en los que se encontró otra patología responsable del cuadro

III. Material y métodos

respiratorio, distinta de la propia infección viral. De igual forma se excluyeron todos los que cumplieran alguno de los siguientes factores:

- Prematuridad
- Edad inferior a 28 días (período neonatal)
- Diagnostico de displasia broncopulmonar (necesidad de O₂ suplementario a las 36 semanas de edad corregida)
- Diagnostico de enfermedades crónicas (neuropatías, cardiopatías, inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, enfermedad neuromuscular entre otras).
- Tratamiento previo con palivizumab o corticoideo.

2.3 Selección de los sujetos participantes en el estudio

Fueron incluidos en el estudio un total de 50 casos. De ellos 45 fueron VRS+. Las BA no VRS no fueron incluidas en el estudio de los parámetros de inflamación y estrés oxidativo dada que la revisión bibliográfica realizada se objetivó la posible influencia del agente causal (Flores et al. 2005, Kristjansson et al 2011) a diferencia de la vitamina D.

En cuanto a los controles, de los 30 controles reclutados, en 27 se estudiaron parámetros de inflamación y estrés oxidativo, y en todos fue posible la determinación del estado de la 25-OH vitamina D. En la figura 29 se describe el número de casos y controles para las diferentes determinaciones.

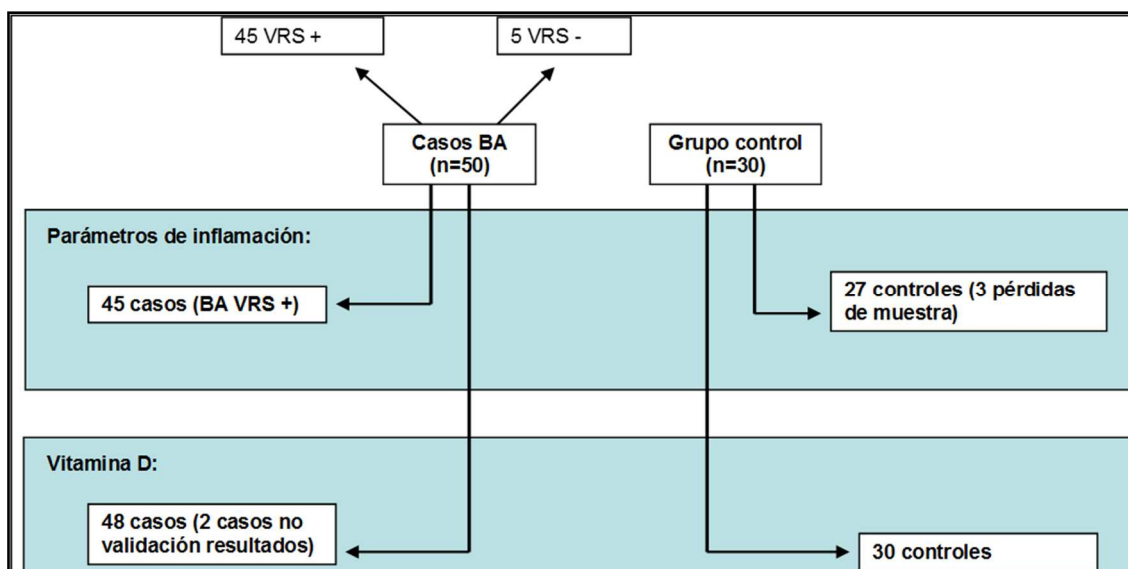


Figura 29. Número de sujetos, casos y controles, que participaron en el estudio. Subdivisión por número de niños que se contaron para los análisis de los parámetros realizados.

BA: Bronquiolitis aguda.

3. Entrevista, historia clínica, valoración de la gravedad.

Durante el estudio se tomaron los datos clínicos de interés recogidos en el anexo adjunto mediante una entrevista clínica con los padres que incluyó antecedentes personales, familiares así como clínica de presentación y duración del cuadro clínico (*Anexo 5 Hoja de recogida de datos*). Además se anotó la exploración clínica al ingreso y durante la evolución del cuadro.

La evaluación de la gravedad clínica se realizó al ingreso, y en los días sucesivos, mediante la escala de WDF (1992), (tabla 6). De esta forma, se establecieron grupos según la gravedad y así poder analizar si existen diferencias en los parámetros estudiados. Al ingreso también era anotada la necesidad de oxigenoterapia, que se instauraba si la SatcO₂ era ≤ 94%.

Tanto la recolección de los datos de la entrevista clínica, la realización de la exploración física y evolución de la gravedad cuadro, se realizaron por dos investigadores, tratando de evitar sesgos en la obtención de los datos y valoración de la gravedad del cuadro.

Tabla 6. Escala clínica de Wood-Downes modificada por Ferrés. (Tomada de Ferrés 1992)

Puntos	Sibilancias	Tiraje	Frecuencia Respiratoria	Frecuencia Cardíaca	Ventilación	Cianosis
0	No	No	< 30	< 120	Simétrica Buena	No
1	Final espiración	Subcostal Intercostal	31-45	>120	Simétrica regular	Si
2	Total espiración	Supraclavicular Aleteo nasal	46-60		Muy disminuida	
3	Inspiración y espiración	Supraesternal e intercostal	> 60		Tórax silente	

Clínica leve: 1-3 puntos; Clínica moderada: 4-7 puntos; Clínica grave: 8-14 puntos

4. Recolección de muestras

4.1 Diagnóstico viral.

Para la detección de VRS se tomaron muestras a partir de lavado nasal en cada niño en la sección de Urgencias Pediátricas, antes de ser ingresados en planta de hospitalización por BA.

III. Material y métodos

La muestra se obtuvo mediante lavado nasal instilando 3 ml de suero salino fisiológico en cada fosa nasal y posterior aspiración (figura 30). A la muestra se le añadió un medio de transporte viral con un estabilizador viral (Copan Universal Transport Medium (UTM-RT) System) (National Committee for Clinical Standards, 2004). Estas muestras se remitían al Servicio de Microbiología del HURS en un plazo no superior a dos horas.

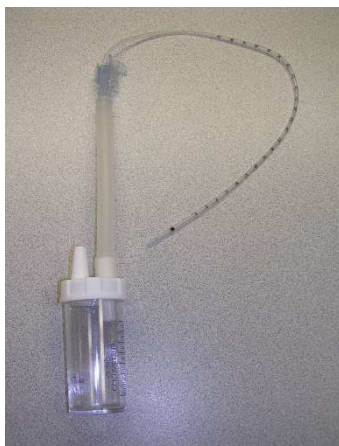


Figura 30. Bote específico para aspiración de la muestra y contención tras realización de lavado nasal

4.2 Marcadores de inflamación, estrés oxidativo y vitamina D

A todos los casos participantes en el estudio se les recogieron muestra para la evaluación de los siguientes marcadores que se esquematiza en la tabla 19.

Tabla 19. Esquema general de los parámetros analizados en este estudio.

Virus: VRS			
Citoquinas en exudado nasofaríngeo y plasma			
Th1:	Th2:	Quimiocinas:	VEGF
IFN- γ	IL-4	MIP-1 α	
TNF- α	IL-6	MIP-1 β	
	IL-10	IL-8	
Biomarcadores de estrés oxidativo			
LPO, GSH, GT, GSSG, GSH, GPox			
Vitamina D: 25(OH) D			

VRS: Virus respiratorio sincitial; IFN- γ : Interferon gamma; TNF- α : Factor necrosis tumoral alfa; IL-4: Interleuquina 4; IL-6: Interleuquina 6; IL-10: Interleuquina 10; IL-8: Interleuquina 8 ; MIP-1 α : proteína inflamatoria del macrófago 1 alfa; MIP-1 β : proteína inflamatoria del macrófago 1 beta; VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular; LPO: lipoperóxidos; GT: glutatión total; GSSG= glutatión oxidado, GSH: glutatión reducida; GPox= glutatión peroxidasa. 25(OH) D: 25-hidroxivitamina D.

4.2.1 Recogida de secreciones nasales.

Se obtenía del primer lavado nasal que se realizaba una vez el niño era ingresado, mediante instilación de 3 ml de suero salino fisiológico en cada fosa nasal y posterior aspiración. A la muestra se le añadió el medio de transporte viral UTM-RT (Chung et al, 2005). Posteriormente se centrifugó a 3600 rpm durante 5-10 minutos, separando a continuación en alícuotas el sobrenadante del resto y se congelaron inmediatamente a -82°C hasta el análisis de las muestras. De éstas se determinaron niveles de citoquinas y quimiocinas en aspirado nasal al ingreso.

4.2.2 Recogida de muestras sanguíneas.

La única extracción de sangre se realizó al ingreso hospitalario. Se extrajo mediante venopunción antecubital y separando en tubos con gelosa y EDTA para obtener suero y plasma respectivamente tras centrifugación (3600 rpm durante 10 minutos) de las muestras.

Muestras de plasma

Se dividieron en alícuotas con plasma para estudio de las citoquinas y marcadores de estrés oxidativo.

Tras la centrifugación y retirada del plasma se recogieron los leucocitos para determinación de ADN. Una vez separados los leucocitos se obtuvieron los eritrocitos para la determinación de enzimas implicadas en el sistema de defensa antioxidante (SDA).

Muestras de suero

2 ml de suero eran separados para la realización de 25-OH vitamina D en el Servicio de Medicina Nuclear mediante la técnica de radioinmunoanálisis y la determinación cuantitativa de 25-OH vitamina D.

5. Instrumentación

5.1 Virus Binax NowRSV-Seegene RV16

Las muestras para el diagnóstico viral fueron sometidas en primer lugar a una detección rápida (cribado) mediante técnica de inmunocromatografía, que consisten en la detección colorimétrica de los antígenos del VRS. La marca comercial utilizada fue Binax NowRSV. La sensibilidad de esta técnica es del 93% (IC95% 76,5-97,1) y su especificidad del 93% (IC95% 88,3%-96,4), aunque puede ser menor en muestras de baja celularidad. En caso de positividad de la misma, se informaba como: VRS positivo (figura 31).

III. Material y métodos

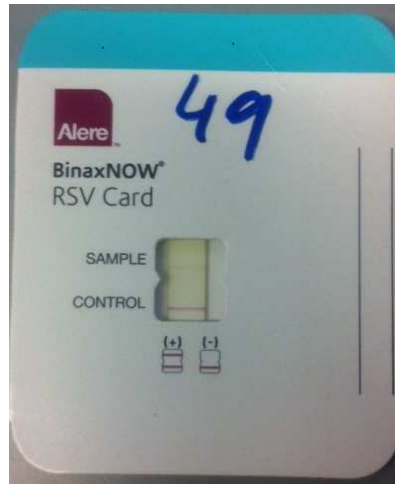


Figura 31. Muestra positiva para VRS mediante técnica de inmunocromatografía Binax NowRSV.

En caso de que la inmunocromatografía diera negativa, en el lavado nasofaríngeo se procedió a la realización del kit de virus respiratorio de Seegene RV16, que detecta simultáneamente hasta 16 virus respiratorios diferentes (incluyendo obviamente el VRS tipo A y el VRS tipo B) mediante una técnica de amplificación a tiempo real de ácidos nucleicos (PRC-rt),(figura 32). Esta técnica posee un límite de detección de 50 copias/ reacción.

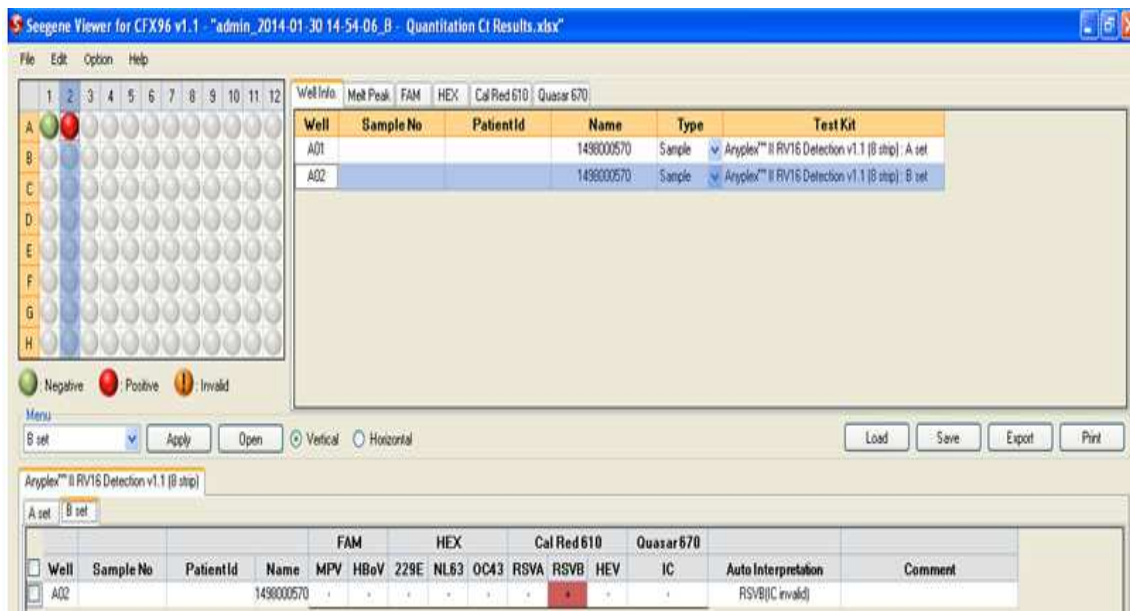


Figura 32. Pantalla del programa visor-lectura de datos de Seegene RV16: resultado VRS + (serotipo B).

5.2 Luminex® X MAP™ Technology Labscan™ 100.

El análisis de las citoquinas y quimiocinas (IFN- γ , TNF α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β y VEGF) se llevó a cabo mediante detección simultánea de multi-analitos utilizando Kits de ensayo LINCOpex y la tecnología de detección Luminex® xMAP™ en placas filtrantes de 96 pocillos (que permite medir al mismo tiempo varios analitos) (figura 33). Esta metodología permite el análisis cuantitativo mediante ELISA de varios biomarcadores utilizando una cantidad de muestra muy reducida (25-50 microlitros de plasma o suero).

La tecnología Luminex® X MAP® consiste en un inmunoensayo en la superficie de una microesfera de polietileno de 5,2 μm marcada con una fluorescencia específica que le da una combinación concreta de dos fluorocromos (la utilización de diferentes proporciones de estos fluorocromos permite colorear de distinta manera la microesfera pudiendo crear hasta cien tipos diferentes de las mismas). La superficie de esta microesfera se cubre con un anticuerpo de captura específico. A continuación el analito de la muestra es capturado por la misma y se introduce un anticuerpo de detección marcado con biotina. Esta mezcla de reacción se incuba con un conjugado de Estreptavidina-Ficoeritrina (molécula “reportera”) para completar la reacción en la superficie de la microesfera. Así la microesfera puede pasar rápidamente a través de un diodo láser que excita el primer fluorocromo (rojo e infrarrojo) a 635 nm. Un segundo láser excita al segundo (naranja) a 523 nm. Finalmente, la señal de cada microesfera es identificada y cuantificada. El cálculo de la concentración plasmática de cada analito en la muestra se extrapola gracias a la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de cada estándar mediante una regresión logística o tipo spline de cinco parámetros. (Kellar et al, 2001) (Kellar et al, 2003) (Earley et al, 2002).

La unidad en la que se expresan es en pg/ml.



Figura 33. Luminex® xMAP™

5.3 Lector de microplacas Synergy HT de BIO-TEK®.

Se realizan las determinaciones del SDA con las que se valora el estrés oxidativo y la determinación de hemoglobina a 540 nm (necesaria para el cálculo de la concentración de las enzimas). Se cuantificaron glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPox). La muestra utilizada fueron eritrocitos lavados y lisados (figura 34).



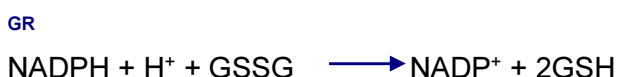
Figura 34 Lector de microplacas Synergy

Lipoperóxidos (LPO).

El método de determinación utilizado en el presente estudio valora la formación de LPO a través de las concentraciones de 4-Hidroxiálquenos (4-HDA), reflejo del grado de lipoperoxidación. El ensayo está basado en la reacción de un reactivo-cromógeno (1-metil 2 fenilidol, con 4-HDA) a 45°C. En este proceo la molécula de 4-HDA interacciona con dos reactivo-cromógenos, originando un cromofomo estable, que presenta su máxima absorbancia a 586nm (Eldelmeier et al, 1998).

Glutatión reductasa (GR):

Se utiliza el kit comercial RANDOX®. La GR es una flavoproteína NADPH-dependiente, que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), en presencia de NADPH, según la reacción:



- Principio de medida: Descrito por Carlberg et al, en 1985. La oxidación del NADPH es monitorizada espectrofotométricamente a 340 nm durante 5 minutos.

- Procedimiento de medida: En una placa de 96 pocillos se mezclan 40 µl de NADPH 0.15 M con 100 µl de GSSG 2.25 mM en cada pocillo y se preincuba a 30 °C durante 5 minutos. Seguidamente se añaden 80 µl de la muestra, previamente diluida 5

III. Material y métodos

g/l de hemoglobina, y se monitoriza la variación de absorbancia a 30 °C, durante 5 min. Paralelamente se hace un blanco sustituyendo la muestra por agua destilada, lográndose así corregir la oxidación espontánea del NADPH que se produce en ausencia de enzima. Los resultados se expresan como unidades de actividad específica. Una unidad de actividad específica de la glutatión reductasa viene definida como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 mmol de NADPH/min/mg de proteína. Las actividades se calculan en función del incremento de absorbancia por minuto.

- Unidades: mmol/min*mg Hb.

Glutatión total (GT), glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH):

La medición de estos biomarcadores de estrés oxidativo en los hematíes, se basa en la capacidad de reducción de Cu^{+2} a Cu^+ tras la acción combinada de los antioxidantes de la muestra. De dicha reacción, resulta un complejo cromógeno con Cu, que tiene una absorbancia de 490 nm. Los niveles de glutatión total (GT) y glutatión reducido (GSH) fueron evaluados usando los kits de Bioxytech GSH-420 y GSH.400 respectivamente. La determinación de los niveles de GT se basa en la formación de una tiona cromofórica, con absorbancia a 420 nm. La concentración de GSH está basada en la reacción que conlleva la formación de un cromóforo con absorbancia a 400 nm, Los niveles de la glutatión oxidada son calculados tras restar la GSH de la GT.

Glutatión peroxidasa (GPox) Selenio-dependiente y total:

Esta enzima cataliza la reducción de los hidroperóxidos (ROOH, siendo R un radical aromático o alifático, o simplemente un hidrógeno.) en presencia de GSH que se transforma en GSSG según la reacción:

GPOX



Existen dos isoenzimas, la selenio dependiente que es la enzima que cataliza la reacción anterior y la selenio independiente.

- Principio de medida: Colorimetría. Kit comercial RANSEL®. Técnica descrita por Flohé y Günzler, en el cual el GSSG producido en la reacción catalizada por la GPox se reduce de nuevo a GSH por la acción del NADPH, el cual se oxida a NADP^+ en una reacción catalizada por la GR siguiéndose la desaparición del NADPH espectrofotométricamente a 340 nm. Para medir la actividad de la GPox selenio dependiente se utiliza como sustrato H_2O_2 ; para medir la actividad de la GPox total se utiliza como sustrato tert-butilhidroperóxido (t-BOOH) (Flohé et al, 1984).

GR



III. Material y métodos

- Procedimiento de medida: En una placa de 96 pocillos se mezclan 25 µl de muestra (5 g/l de hemoglobina), 125 µl de fosfato potásico 0.1 M pH 7.0, 25 µl de glutatión reductasa 2.4 U/ml y 25 µl de GSH 10 mM y 25 µl de NADPH 1.5 mM. Posteriormente se añaden 25 µl de hidroperóxido (H₂O₂ para la GPox Se-dependiente y t-BOOH para la GPox total), siguiendo la variación de absorbancia durante 3 min. La velocidad de reacción no enzimática se midió sustituyendo la muestra por tampón. Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 µmol de sustrato NADPH por minuto. Esta actividad se refiere a la cantidad de hemoglobina de la muestra.

GPox: Esta enzima se determina ya que mediante espectrofotometría a 340 nm se puede medir la señal que se produce por la desaparición de NADPH en presencia de GSH y GR.

- Unidades: mU/min*g Hb.

5.4 Vitamin D RIA de ImmunoDiagnosticSystem®

La determinación cuantitativa de la vitamina D 25-OH se realizó mediante los kits de IDS® por inmunoextracción a partir de muestras de suero humano y posterior cuantificación por radioinmunoanálisis (RIA con I¹²⁵ Kit 25-Hydroxy Vitamin D RIA de ImmunoDiagnosticSystem®) (Holick et al, 1997) (figura 35). Según este método, la forma de la vitamina D 25-OH se ha separado del resto de las moléculas tras incubación con anticuerpo monoclonal anti 25 D respectivamente y al añadir 25D- I¹²⁵.

La adición de los reactivos de extracción a las muestras y calibradores provoca la precipitación de proteínas séricas y permite extraer la 25-OH D. Después de un paso de centrifugación, se incubaron alícuotas del sobrenadante con 25-OH D marcada con I¹²⁵ y un anticuerpo ovino de alta especificidad frente a la 25-OH D. Mediante una breve incubación con Sac-Cel® (anti-IgG ovina unida a celulosa), seguida de centrifugación y decantación, se separa del trazador libre. La radiactividad del complejo ligado es inversamente proporcional a la concentración de cada forma de la vitamina D presente en la muestra.



Figura 35. RIA de ImmunoDiagnosticSystem IDS

6. Estudio Estadístico

El cálculo del tamaño muestral se realizó en base de los niveles de 25-OH vitamina D y GSSG, según los resultados previamente publicados (Inamo et al, 2011; Dundaroz et al, 2013). Con la 25-OH vitamina D, aceptando un riesgo alfa del 5% y un riesgo beta del 20% en un contraste bilateral, se precisan 46 casos y 23 controles para detectar una diferencia igual o superior a 25 ng/ml de vitamina d (25-OH), asumiendo una desviación típica de 30 ng/ml. Para la GSSG, aceptando el mismo riesgo alfa de 5% y un riesgo beta de 20% en un contraste bilateral, se precisan 22 sujetos en cada grupo para detectar una diferencia mínima de 20 entre dos grupos, y una desviación estándar de 20.36 $\mu\text{Mol/ g hb}$.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS 18®. Los datos se presentan como media (m) \pm desviación estándar (DS) en el caso de distribuciones normales y mediana \pm rango intercuartílico (RIQ) para las distribuciones no normales. Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias relativas (porcentajes) y absolutas (recuentos).

La determinación de la bondad de ajuste a una distribución normal se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. También se comprobó la homogeneidad de las varianzas por la prueba de Levene. Si las muestras seguían una distribución normal y las varianzas eran homogéneas se aplicaron test paramétricos, en caso contrario se utilizaron test no paramétricos.

La comparación entre las variables generales de los dos grupos (BA y control) se analizó utilizando el test de la U de Mann-Whitney para distribuciones no normales y el test T de Student para las distribuciones normales. Para el estudio de la asociación de variables categóricas se utilizó el test de chi-cuadrado (χ^2) y cuando alguna frecuencia esperada fue menor o igual a 5 se aplicó el test exacto de Fisher.

Al existir diferencias en la edad media de bronquiolitis y controles, en los niveles de citoquinas y en los marcadores de estrés oxidativo, se compararon ambos grupos

III. Material y métodos

mediante el análisis de covarianza (ANCOVA) ajustado por la edad, y usando la corrección de Sidack para las comparaciones post Hoc.

La asociación entre las variables cuantitativas se realizaron mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson (correlaciones paramétricas) y del coeficiente rho de Spearman (correlaciones no paramétricas)

Para determinar posibles factores predictores independientes de gravedad (moderada-grave) de la BA (variable dependiente), se realizó mediante una regresión logística multivariante.

No se detectó ningún factor asociado a la gravedad de las BA al realizar la regresión logística utilizando como variables independientes las citoquinas en suero, moco y la edad. Ninguna de las variables presentó un nivel significativo de la odds ratio (OR) y al introducirlas en la regresión logística multivariante, ninguna se mantuvo en el modelo al realizar una regresión logística univariante para elegir las variables que se iban a introducir en el modelo. Las variables utilizadas fueron las citoquinas en sangre y moco y la edad. Ninguna de las variables presentaban un nivel significativo de la odds ratio (OR).

El estudio se realizó con un nivel de confianza del 95% siendo $\alpha = 0,05$. Todos los contrastes de hipótesis fueron bilaterales.

IV.RESULTADOS

Notas sobre la descripción de los resultados del estudio estadístico

- **n** se refiere al número en los que se ha podido analizar una determinada variable, por lo queda especificado en cada tabla. El porcentaje válido se calcula en función de dicho **n** para cada parámetro estudiado, y no frente al **N** total de la muestra.
- Se han representado con figuras y tablas las variables más relevantes y aquéllas en las que existen datos con asociación estadística significativa.
- En todos los casos, la significación estadística ha sido simbolizada con * para una $p < 0,05$, y ** para una $p < 0,001$

1. Antecedentes personales y familiares. Factores de riesgo en los casos de bronquiolitis aguda.

1.1. Datos epidemiológicos.

En este apartado se describen los datos de las variables que en este trabajo se han relacionado en los 50 casos de BA y en los 30 controles lactantes sanos incluidos. De los 50 niños con BA incluidos inicialmente, el análisis de los parámetros de inflamación y estrés oxidativo se realizó sólo en los pacientes con BA-VRS, para evitar la posible influencia de otro agente causal etiológico diferente en los resultados. En 27 de los 30 sujetos del grupo control se realizaron las determinaciones de los parámetros inflamación y estrés oxidativo, ya que hubo 3 pérdidas en el procesamiento técnico de las muestras. Para el análisis de la vitamina D no se discriminó la etiología viral y por tanto si la BA era VRS + ó -, hubo 2 pérdidas (figura 36).

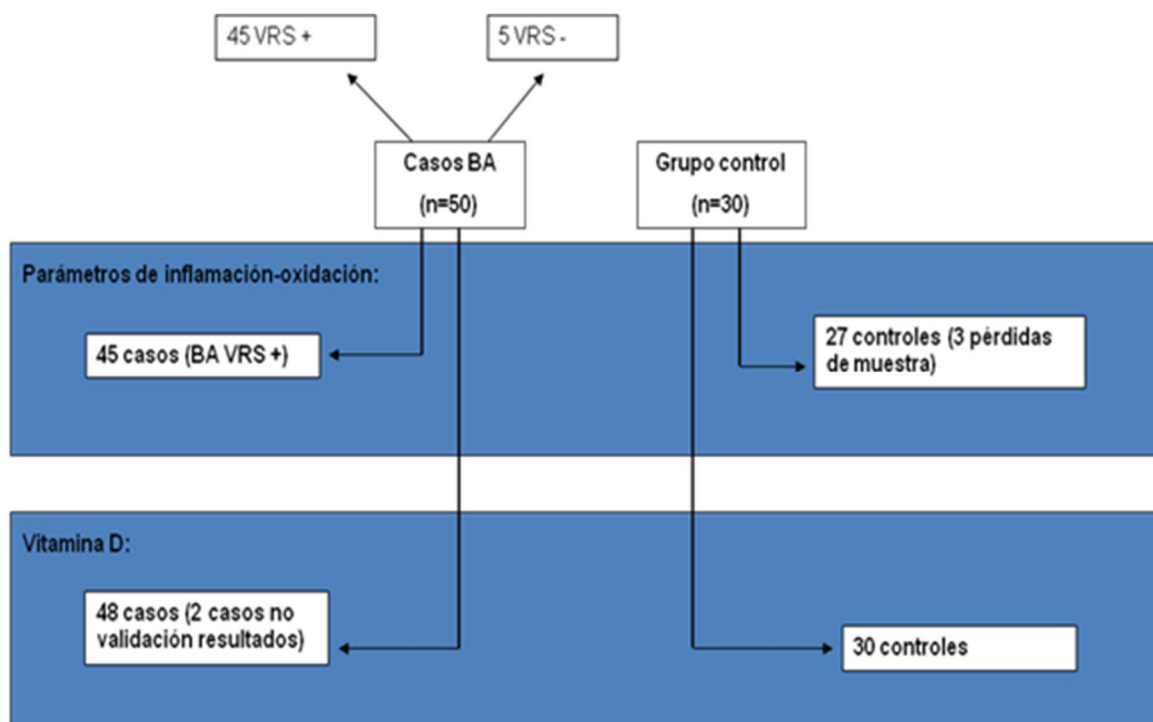


Figura 36. Representación explicativa del número de lactantes en los que se realizaron la determinación de los parámetros de inflamación, estrés oxidativo y niveles de vitamina D

IV.Resultados

Las tablas 20 y 21 muestran los datos demográficos y los factores relacionados en los dos grupos de estudio, lactantes con BA y grupo control, en función de los valores de parámetros de inflamación, estrés oxidativo y los niveles de vitamina D, estudiados.

Sexo: No existen diferencias significativas en la distribución por sexo entre casos y controles aunque si se percibe un discreto predominio masculino (tabla 20-21). Los niños ingresados por BA-VRS, 24 fueron varones (52,2%), frente a los controles varones (53,6%). En los 48 sujetos en los que se analizó la vitamina D, 27 eran varones (56,3%), frente a 15 varones controles (50%).

Edad: No hubo diferencias significativas en cuanto a la edad, si se incluyen todo los casos de BA, como puede observarse en el análisis de la vitamina D, en la que el total de pacientes BA tiene una media de 2,5 meses y los controles 3,2 meses ($p=0.08$). Sin embargo, al reducir el número de BA, a la producida por VRS, sí existieron diferencias significativas entre casos y controles (2,34 meses los casos y 4,33 meses los controles, $p=0,001$), por ello el análisis de las interleuquinas y de los biomarcadores de estrés oxidativo se ha ajustado por la edad (tablas 20 y 21).

El rango de edad de los niños estuvo incluido entre 1 y 11 meses (casos 1-11 meses, controles 1-9 meses). En la figura 37 se muestra la distribución por edades de los casos y controles incluidos en el estudio.

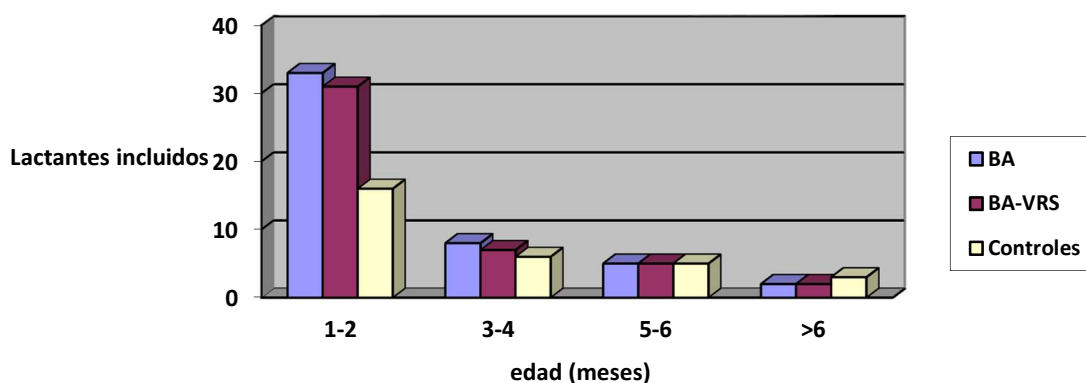


Figura 37. Distribución etaria de los lactantes incluidos en el estudio.

BA: Bronquiolitis aguda. BA-VRS: Bronquiolitis aguda por VRS.

1.1.1. Datos demográficos y factores de riesgo de los lactantes incluidos en el estudio de parámetros de inflamación y de estrés oxidativo

45 lactantes con BA-VRS fueron incluidos y 27 niños sanos conformaron el grupo control. La tabla 20 muestra los datos demográficos de los niños BA VRS + y el grupo control. No existieron diferencias entre ambos grupos en cuanto al sexo, tipo de alimentación recibida, así como de los factores de riesgo relacionados tales como haber sido diagnosticados de dermatitis atópica o el tabaquismo pasivo. La única variable en la que sí se encontraron diferencias significativas fue la edad, y por lo que el resto de variables analizadas fueron ajustadas por la edad.

Tabla 20. Datos demográficos-factores relacionados de los niños con BA por VRS y el grupo control analizados para el perfil inflamatorio de citoquinas y estrés oxidativo

	Controles (n= 27)	Bronquiolitis (n=45)	<i>p</i>
Edad (meses)	4,33±2,76	2,34±1,58	0.001**
Sexo: Hombres (%)	15 (53,6%)	24 (52,2%)	0.549
Lactancia materna (%)	20 (71,4%)	36 (78,3%)	0.347
Dermatitis atópica (%)	1 (3,6%)	8 (17,4%)	0.07
Tabaquismo parental	14 (50%)	23 (50%)	1
Antecedentes familiares de atopia (%)	8 (26%)	23 (50%)	0.091
Hermanos (%)	24 (85,7%)	30 (65,2%)	0.064

Variables cualitativas expresadas mediante frecuencias absolutas (porcentajes) y variables continuas como media ± DS. * Significación estadística tras aplicar las pruebas χ^2 a las variables cualitativas y la prueba de la t de Student o el test de la U de Mann-Whitney a las variables continuas. ** $p < 0,001$

1.1.2 Datos demográficos y factores relacionados de los niños incluidos para la determinación de vitamina D

48 niños diagnosticados de BA (89,58% RSV positivos) y 30 niños sanos fueron incluidos para el análisis de los niveles de vitamina D. La tabla 21 muestra las características demográficas de los niños en los que se determinaron estos. No se obtuvieron diferencias estadísticas en cuanto a la edad, sexo, tipo de alimentación y la suplementación de vitamina D recibida así como con los factores de riesgo relacionados para su déficit como el tiempo de exposición solar. Este último dato hay que matizar que no fue recogido en todos los niños de forma objetiva, ya que muchos padres no podían precisar el tiempo de exposición solar. Por ello se expresa el cociente en el que este dato fue recogido: en 13 de los niños ingresados por BA (27%) y en 4 de los controles (13,3%) no obtuvimos respuesta.

Tabla 21. Datos demográficos y factores relacionados de los casos con BA y el grupo control analizados en relación con los niveles de vitamina D.

	Controles (n= 30)	Bronquiolitis (n=48)	p
Edad (meses)	3,2 ± 2,3	2,5 ± 2,0	0.08
Sexo: Hombres (%)	15 (50%)	27 (56.3%)	0.61
Lactancia materna (%)	25 (83.3)	38 (79.2%)	0.21
Dermatitis atópica (%)	4 (13.3%)	6 (12.5%)	0.46
Suplementación con Vitamina D, n (%)	10 (30%)	13 (27.1%)	0.37
Exposición solar	21/25 (84%)	25/35 (71.4%)	0.30

Variables cualitativas expresadas mediante frecuencias absolutas (porcentajes) y variables continuas como media ± DS. Significación estadística tras aplicar las pruebas χ^2 a las variables cualitativas y la prueba de la t de Student o el test de la U de Mann-Whitney a las variables continuas. * p< 0,05, ** p<0,001

1.2 Antecedentes familiares

En cuanto al apartado de antecedentes familiares se recogieron como posibles factores de riesgo el tener hermanos, la existencia de dermatitis atópica en primer grado (padres o hermanos) y el tabaquismo parental.

Como se objetiva en la tabla 20 en relación con las características basales de los sujetos incluidos en el estudio, no hubo diferencias significativas en cuanto a la

existencia de antecedentes familiares de los niños ingresados con BA con respecto al grupo control.

1.3 Evolución temporal de inclusión de pacientes.

La inclusión de los casos de BA se inició una vez obtenido la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía, coincidiendo con el inicio de los primeros casos de BA. El primer caso se incluyó a finales de Diciembre 2009, finalizando la inclusión de los casos a mediados del mes de Marzo-2010. Se produjo un pico de incidencia máximo durante el mes de Enero 2010, concentrándose la mitad de los casos en los últimos 10 días de Enero y primera semana de Febrero 2010 como puede observarse en la distribución mensual reflejada en la Figura 38.

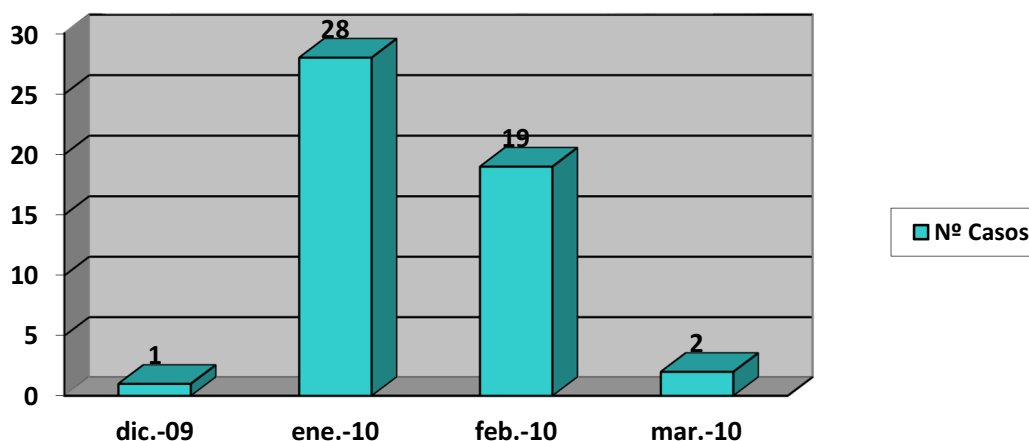


Figura 38. Distribución de los casos de BA incluidos de Diciembre 2009 a Marzo 2010.

2. Clínica

2.1 Sintomatología desde el inicio hasta su atención hospitalaria

El tiempo medio sintomático de la evolución del cuadro que relataban los padres o tutores legales era de 2,4 días (rango 1-6 días). Todos mostraban al inicio un cuadro catarral, describiendo rinorrea, estornudos, mucosidad y tos en el 100% de los casos. Presentaron febrícula o fiebre de hasta 38,5 ° C axilar 29 casos (58%), fiebre 38,5-39° C axilar 5 casos (10%), 1 caso relató fiebre >39 ° C axilar. En 27 casos (54%) además de la sintomatología catarral empeoró la tolerancia oral de la alimentación, constatándose rechazo de las tomas (se definió como una disminución en la ingesta de la mitad de una toma habitual), y en 12 de ellos (24%) presentaron vómitos reiterados

(vómitos en más de la mitad de las tomas efectuadas al día). La tabla 22 resume la clínica que presentaban los pacientes al ingreso.

Tabla 22. Síntomas y signos principales de los casos de BA al ingreso

Síntomas/ Signos	N	Porcentaje (%)
Tos	50	100
Congestión nasal	50	100
T^a > 37°C axilar	35	70
Auscultación patológica	31	62
Tiraje	46	92
FR > 50 rpm	27	54
Rechazo de las tomas	27	54
Vómitos reiterados	12	24

N= número de sujetos de los que presentaron el síntoma/ signo al ingreso. **Auscultación patológica**= existencia de sibilancias o subcrepitantes. **Tiraje**= incluye tiraje subcostal-intercostal y supraesternal. **FR > 50 rpm** = Frecuencia respiratoria mayor a 50 respiraciones por minuto, punto de corte de lo que es considerado una frecuencia respiratoria fisiológica en lactantes. **Rechazo de las tomas**= disminución en la ingesta de la mitad de una toma habitual. **Vómitos reiterados**= vómitos en más de la mitad de las tomas efectuadas al día

2.2 Tiempo de empeoramiento del cuadro de bronquiolitis aguda.

El empeoramiento la clínica de BA fue definido por un inicio/aumento de la dificultad respiratoria/disnea o de la intolerancia oral que imposibilitaba la alimentación.

El motivo principal de consulta en el Servicio de Urgencias Pediátricas fue por dificultad respiratoria en 43 casos (86%), de los cuales 10 (20%) se trataba del inicio de aumento del trabajo respiratorio y en 33 (66%) por un empeoramiento de la disnea, 1 de ellos derivado desde otro hospital por presentar apnea en las primeras 12 horas del ingreso. En 7 casos, el motivo de consulta fue empeoramiento en la tolerancia oral (rechazo de tomas y/o vómitos reiterados). El tiempo medio de empeoramiento del cuadro de BA por dificultad respiratoria desde inicio de la clínica fue 22 horas (rango 6-48 horas); mientras que si el empeoramiento se debía a una disminución de la tolerancia oral, ésta se había producido en un rango de 12-26 horas, tiempo promedio de 18 horas desde el inicio de la clínica de BA.

2.3 Valoración de la gravedad del cuadro clínico

2.3.1 Valoración de la gravedad al ingreso mediante la puntuación en la escala de Wood-Downes modificada por Ferrés

Los casos de BA-VRS según la puntuación obtenida en la escala de Wood-Downes modificada por Ferrés (WDF) (Ferrés J ,1992) al ingreso se subdividieron en: 17 casos leves (puntuación en escala WDF ≤ 4) y 28 casos moderados graves (puntuación en escala WDF ≥ 5).

En el caso de no discriminar por agente causal, tal y como se hizo para el parámetro vitamina D, tras aplicar la escala: 18 casos fueron leves (puntuación en escala WDF ≤ 4) y 30 casos moderados graves (puntuación en escala WDF ≥ 5).

2.3.2 Valoración de la gravedad según Saturación Transcutánea de O₂ y necesidad de Oxigenoterapia

Al ingreso, en 18 casos se objetivó una SatcO₂ < 94% (36%): en 3 casos <92%, y en 15 de 92-93%. 17 casos presentaron una SatcO₂ entre 94-95% (34%), 15 casos la tenían > 95% (12 casos entre 95-96% y 3 > 97%) (figura 39).

De los casos de bronquiolitis incluidos, 28 casos (56%) no precisaron aporte extra de O₂. Si consideramos sólo las BA-VRS, 24 no precisaron oxigenoterapia, mientras que sí la recibieron 21 casos, de los cuáles 4 precisaron ventilación no invasiva (2 CPAP/ 2 alto flujo de O₂) y 2 ventilación mecánica (figura 40).

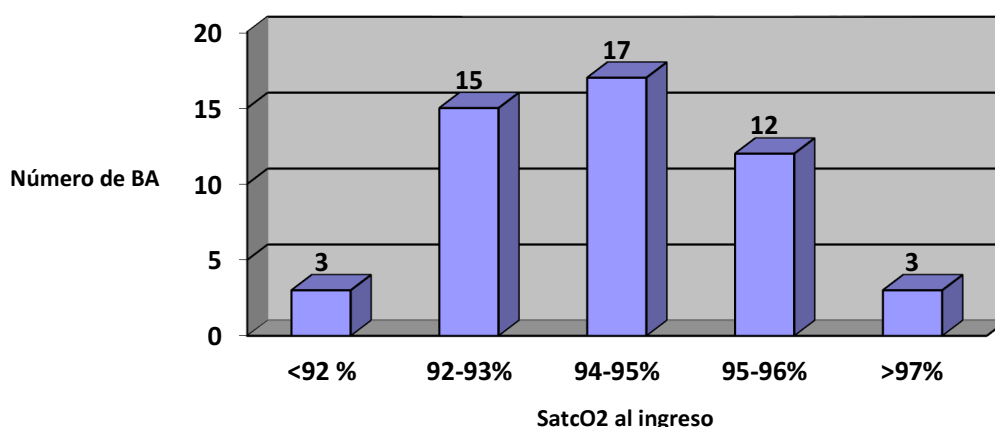


Figura 39. Distribución de los casos según la Saturación Transcutánea de O₂ al ingreso hospitalario.

BA: Bronquiolitis aguda. SatcO₂: Saturación transcutánea de oxígeno.

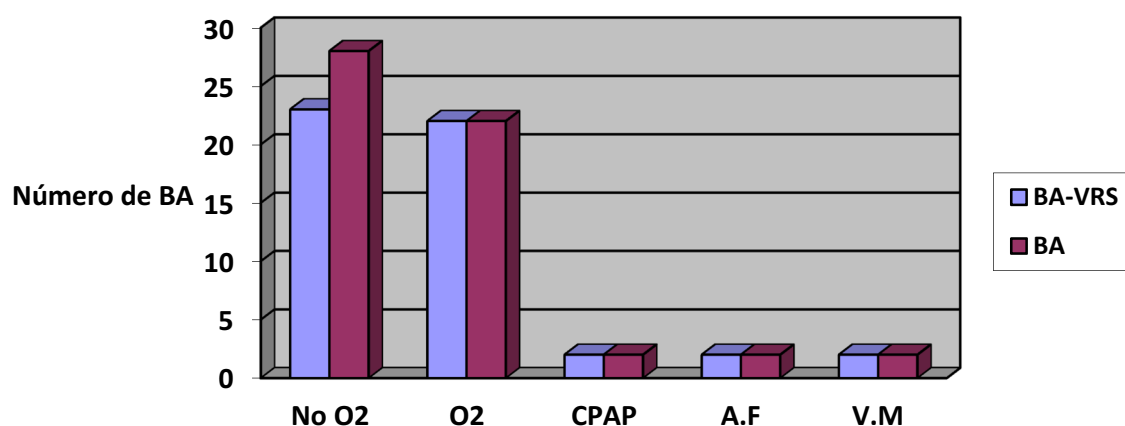


Figura 40. Distribución de los casos por necesidad de oxígeno y modalidad de oxigenoterapia.

BA: Bronquiolitis aguda. BA-VRS: Bronquiolitis aguda por VRS. No O2: Bronquiolitis aguda que no precisaron oxigenoterapia. O2: Bronquiolitis aguda que precisaron oxigenoterapia. CPAP: Presión positiva continua de la vía aérea. A.F: Alto flujo de oxígeno. V.M: ventilación mecánica

2.4 Ingreso hospitalario por Bronquiolitis Aguda

2.4.1 Estancia hospitalaria media.

La estancia media de los casos de BA en planta de hospitalización pediátrica fue de 5.2 días (rango 1-12 días), (**figura 41**).

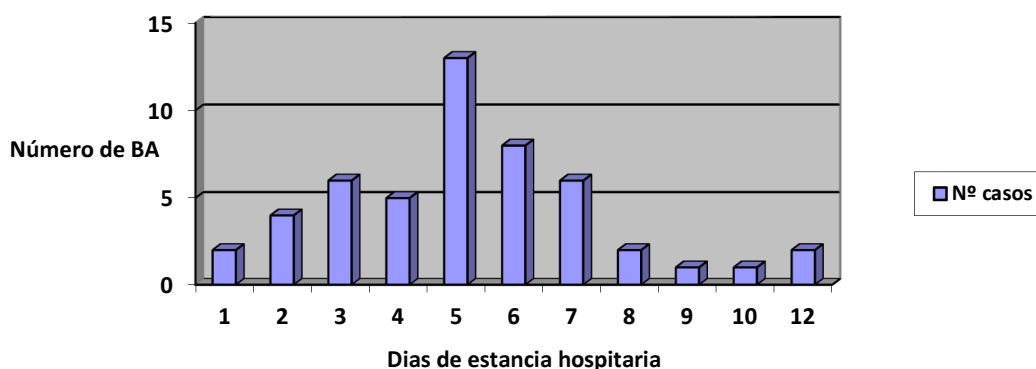


Figura 41. Distribución de los casos de bronquiolitis aguda según días de estancia hospitalaria.

BA: Bronquiolitis aguda.

2.4.2 Ingresos en UCIP

De los pacientes con BA, 4 niños (8%) precisaron ingreso en cuidados intensivos, de ellos 2 requirieron VM y 2 ventilación no invasiva: uno de ellos por empeoramiento del cuadro de dificultad respiratoria, mejoro con CPAP no precisando intubación y ventilación mecánica (VM) y otro derivado de un hospital comarcal por episodio de apnea, que precisó ventilación no invasiva con evolución favorable.

2.4.3 Reingresos.

Ningún paciente de los casos incluidos reingresó al mes posterior del alta hospitalaria.

3. Pruebas complementarias

3.1 Diagnóstico viral

De los 50 casos incluidos en la muestra 45 fueron VRS + (90% del total de los casos), que fueron analizados para el estudio de los parámetros de inflamación y estrés oxidativo. Para el análisis de la vitamina D el agente causal no se discriminó y de los 48 lactantes en los que se analizó la vitamina D, el VRS fue positivo en 43 (89,5%).

3.2 Parámetros de inflamación

3.2.1 Marcadores de inflamación en aspirado nasal

Una vez ajustados por la variable edad, los niveles de todas las citoquinas y quimiocinas analizadas se han encontrado significativamente elevados en el aspirado nasal de los lactantes ingresados por BA-VRS en comparación con el grupo control sano.

En el análisis realizado por subgrupos de gravedad no se han encontrado diferencias en los niveles respiratorios de citoquinas y quimiocinas en función de la puntuación obtenida al ingreso en la escala de gravedad WDF en los casos de BA (figuras 42, 43, 44). Sin embargo, al valorar la gravedad por la necesidad de oxigenoterapia, existían diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-6 y MIP-1 β en el aspirado nasal, estos parámetros estaban elevados en los lactantes con BA que requirieron oxigenoterapia con respecto a los que no la precisaron (figura 45, 46, 47).

La ratio IL4/ FN y , representativa de la relación entre las respuestas Th1/Th2, se encontró descendida de forma significativa en el grupo con BA con respecto al grupo control ($0,02 \pm 0,005$ vs $2,57 \pm 7,41$ respectivamente; $p: 0,009$), pero no existieron diferencias de esta ratio analizando por subgrupos según la escala de

IV.Resultados

gravedad (leves: 0.026 ± 0.006 vs moderado-graves: 0.027 ± 0.006 ; $p=1$), y tampoco al dividirlos por necesidad de O_2 durante el ingreso (sin O_2 : 0.026 ± 0.002 vs con O_2 : 0.027 ± 0.004 ; $p=0,996$), (Tablas 23, 24, 25 y 26).

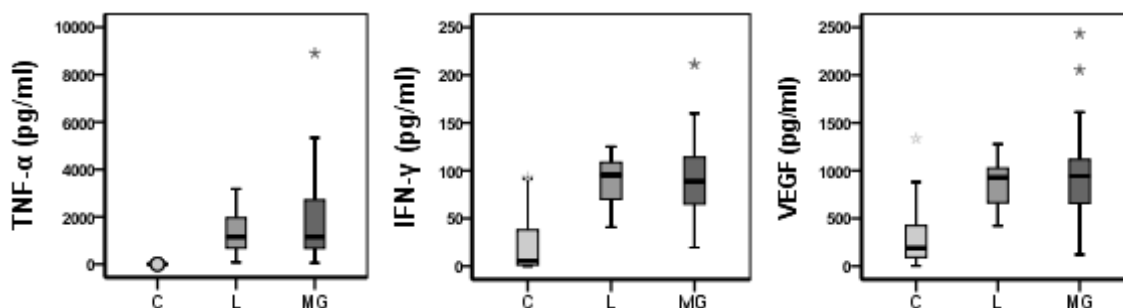


Figura 42. Diagrama de caja de las concentraciones de citoquinas Th1 y VEGF (medidos en pg/ml) en lavado nasal del grupo control y del grupo de las BA-VRS subdivididos según la escala de gravedad de Wood-Downes modificada por Ferrés. C: Control; L: Bronquiolitis leves; MG: Bronquiolitis moderada-graves; IFN- γ : Interferón gamma; TNF- α : Factor necrosis tumoral alfa; VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular. *P* con significación estadística representada. BA: Bronquiolitis aguda por VRS Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad con comparaciones post hoc de Sidak,

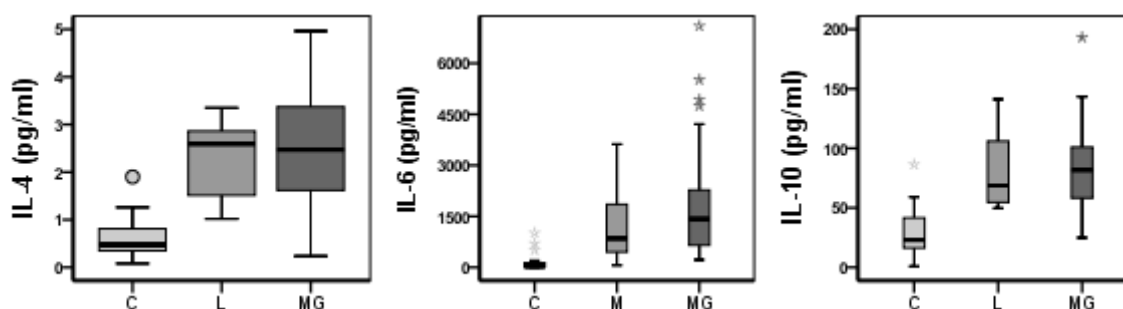


Figura 43. Diagrama de caja de las concentraciones de citoquinas Th2 (medidos en pg/ml) en lavado nasal del grupo control y del grupo de las BA-VRS subdivididos según la escala de gravedad de Wood-Downes modificada por Ferrés. C: Control; L: Bronquiolitis leves; MG: Bronquiolitis moderada-graves; IL-4: Interleuquina 4; IL-6: Interleuquina 6; IL-10: Interleuquina 10. *P* con significación estadística representada. BA: Bronquiolitis aguda por VRS. Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak.

IV.Resultados

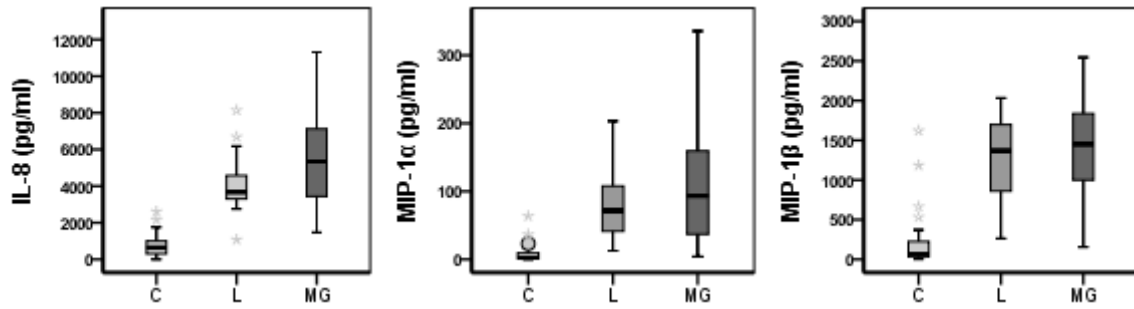


Figura 44. Diagrama de caja de las concentraciones de quimiocinas (medidas en pg/ml) en lavado nasal del grupo control y del grupo de BA-VRS subdivididos según la escala de gravedad de Wood-Downes modificada por Ferrés.

C: Control; L: Bronquiolitis leves; MG: Bronquiolitis moderada-graves. IL-8: Interleuquina 8; MIP-1α: proteína inflamatoria del macrófago alfa; MIP-1β: proteína inflamatoria del macrófago beta. *p* con significación estadística representada. BA: Bronquiolitis aguda por VRS.

Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak.

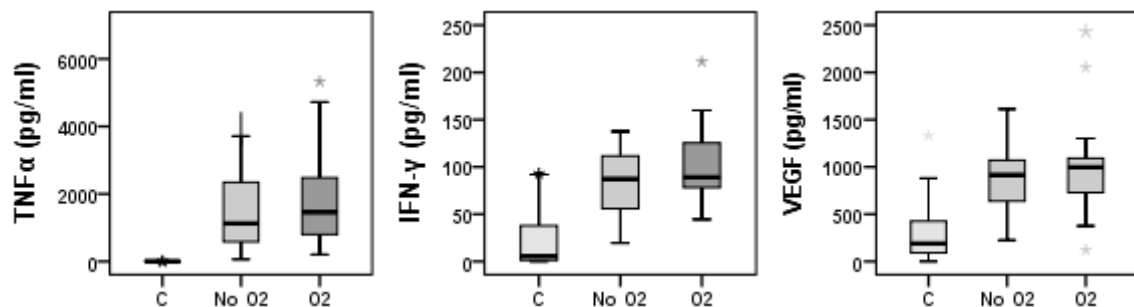


Figura 45. Diagrama de caja de las concentraciones de citoquinas Th1 y VEGF (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo de niños afectados de BA-VRS (divididos en función de la necesidad de oxígeno) y de controles sanos.

C: Control BA: Bronquiolitis aguda; No O2: Bronquiolitis aguda sin necesidad de oxigenoterapia; O2: Bronquiolitis aguda con oxigenoterapia; TNF-α: Factor necrosis tumoral alfa; IFN-γ: Interferón gamma; VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak.

IV.Resultados

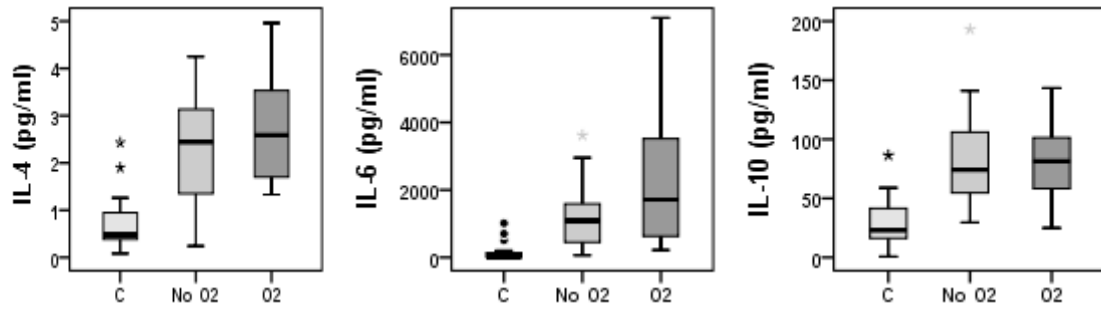


Figura 46. Diagrama de caja de las concentraciones de citoquinas Th2 (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo de niños afectados de BA-VRS (divididos en función de la necesidad de oxígeno) y de controles sanos.

C: Control BA: Bronquiolitis aguda; No O2: Bronquiolitis aguda sin necesidad de oxigenoterapia; O2: Bronquiolitis aguda con oxigenoterapia; IL-4: Interleuquina 4; IL-6: Interleuquina 6; IL-10: Interleuquina 10. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak.

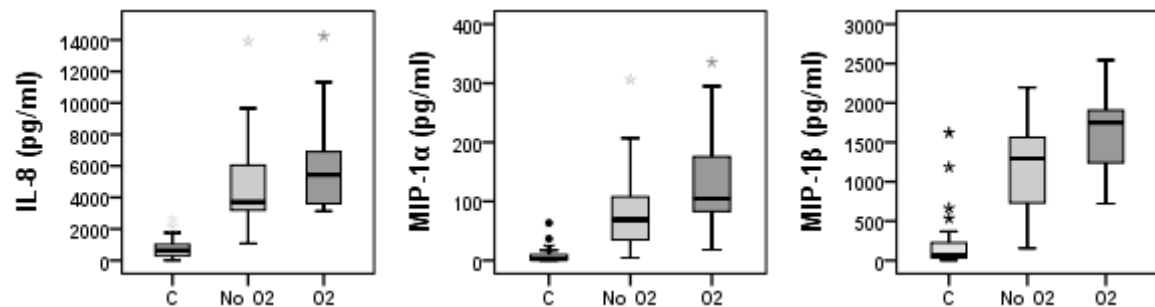


Figura 47. Diagrama de caja de las concentraciones de quimiocinas (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo de niños afectados de BA-VRS (divididos en función de la necesidad de oxígeno) y de controles sanos.

C: Control BA: Bronquiolitis aguda; No O2: Bronquiolitis aguda sin necesidad de oxigenoterapia; O2: Bronquiolitis aguda con oxigenoterapia; IL-8: Interleuquina 8; MIP-1α: proteína inflamatoria del macrófago 1 alfa; MIP-1β: proteína inflamatoria del macrófago 1 beta. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak.

IV.Resultados

Tabla 23. Niveles de citoquinas Th1 y VEGF (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo (AN) en grupo control, y niños con BA-VRS con/sin oxigenoterapia.

	Group	N	Niveles en AN (pg/ml)	p (C-BA)	p
IFN-γ	C	20	22,02 \pm 29,10		C- No O ₂ <0.001**
	No O ₂	24	84.5 \pm 31,4	<0.001	C- O ₂ <0.001**
	O ₂	21	102,56 \pm 41,36		No O ₂ - O ₂ : 0.317
TNF-α	C	20	0,70 \pm 0,61		C- No O ₂ <0.001**
	No O ₂	24	1705,71 \pm 1888,01	<0.001	C- O ₂ <0.001**
	O ₂	21	1784,33 \pm 1387,5		No O ₂ - O ₂ : 0.995
VEGF	C	20	297,15 \pm 329,55		C- No O ₂ <0.001**
	No O ₂	24	874,55 \pm 325,25	<0.001	C- O ₂ <0.001**
	O ₂	21	1003,35 \pm 524,24		No O ₂ - O ₂ : 0.724

Las dos columnas de la derecha muestran la significación estadística de las comparaciones entre controles vs BA en conjunto y entre los subgrupos (controles vs no oxigenoterapia; controles vs oxigenoterapia y BA-VRS con oxigenoterapia vs RSV-AB sin oxigenoterapia).

AN: Aspirado nasal; C: grupo control; BA: grupo Bronquiolitis aguda (VRS+); No O₂: Bronquiolitis aguda sin necesidad de oxigenoterapia; O₂: Bronquiolitis aguda con oxigenoterapia; IFN- γ : Interferón gamma; TNF- α : Factor necrosis tumoral alfa; VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular. Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak. Los datos están expresados como media \pm DS. * p< 0,05, ** p<0,001

IV.Resultados

Tabla 24. Niveles de citoquinas Th2 (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo (AN) en grupo control y niños con BA-VRS con/sin oxigenoterapia.

	Grupo	N	Niveles en AN (pg/ml)	p (C-BA)	p
IL-4	C	19	0,73±0,60		C- No O ₂ <0.001**
	No O ₂	24	2,28±1,06	<0.001	C- O ₂ <0.001**
	O ₂	21	2,77±1,14		No O ₂ - O ₂ : 0.368
IL-6	C	20	148,52±274,75		C- No O ₂ <0.038
	No O ₂	24	1221,23±895,67	<0.001	C- O ₂ <0.001**
	O ₂	21	2289,16±2001,1		No O ₂ - O ₂ : 0.027 *
IL-10	C	20	29,54±20,24		C- No O ₂ <0.001**
	No O ₂	24	83,72±37,88	<0.001	C- O ₂ <0.001**
	O ₂	21	79,97±31,25		No O ₂ - O ₂ : 0.932

Las dos columnas de la derecha muestran la significación estadística de las comparaciones entre controles vs BA en conjunto y entre los subgrupos (controles vs no oxigenoterapia; controles vs oxigenoterapia y VA-VRS con oxigenoterapia vs BA-VRS sin oxigenoterapia).

AN: Aspirado nasal: Control; BA: Bronquiolitis aguda; No O₂: Bronquiolitis aguda sin necesidad de oxigenoterapia; O₂: Bronquiolitis aguda con oxigenoterapia. IL-4: Interleuquina 4; IL-6: Interleuquina 6; IL-10: Interleuquina 10.

Significación estadística entre grupos control-casos de bronquiolitis aguda tras aplicación del test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak. Los datos están expresados como media ± DS. * p< 0,05, ** p<0,001

Tabla 25. Niveles de quimiocinas (medidos en pg/ml) en aspirado nasofaríngeo (AN) en grupo control y niños con BA-VRS con/sin oxigenoterapia.

	Grupo	N	Niveles en AN (pg/ml)	p (C-BA)	p
IL-8	C	20	792,01±700,08		C- No O ₂ <0.001**
	No O ₂	24	4804,82±2906,98	<0.001	C- O ₂ <0.001**
	O ₂	21	5899,98±2845,7		No O ₂ - O ₂ : 0.413
MIP1-α	C	20	9,42±15,75		C- No O ₂ <0.001**
	No O ₂	24	84,19±72,54	<0.001	C- O ₂ <0.001**
	O ₂	21	134,54±86,94		No O ₂ - O ₂ : 0.056
MIP1-β	C	20	254,21±438,13		C- No O ₂ <0.001**
	No O ₂	24	1203,64±560,07	<0.001	C- O ₂ <0.001**
	O ₂	21	1641,43±545,51		No O ₂ - O ₂ :0.028 *

Las dos columnas de la derecha muestran la significación estadística de las comparaciones entre controles vs BA en conjunto y entre los subgrupos (controles vs no oxigenoterapia; controles vs oxigenoterapia y BA-VRS con oxigenoterapia vs BA-VRS sin oxigenoterapia).

AN: Aspirado nasal; C: Control; BA: Bronquiolitis aguda (VRS+); No O₂: Bronquiolitis aguda sin necesidad de oxigenoterapia; O₂: Bronquiolitis aguda con oxigenoterapia; IL-8: Interleuquina 8; MIP-1α: proteína inflamatoria del macrófago 1 alfa; MIP-1β: proteína inflamatoria del macrófago 1 beta. Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak. Los datos están expresados como media ± DS. * p< 0,05, ** p<0,001

Tabla 26. Índice IL-4/ IFN- γ en aspirado nasofaríngeo (AN) en grupo control y niños con BA-VRS con/sin oxigenoterapia.

	Grupo	N	Niveles en AN (pg/ml)	<i>p</i> (C-BA)	<i>P</i>
IL-4 / IFN - γ	C	14	2,57 \pm 7,41		C - No O ₂ <0.05
	No O ₂	24	0,026 \pm 0,006	<0.001	C - O ₂ <0.05
	O ₂	21	0,0274 \pm 0,004		No O ₂ - O ₂ : 0.996

Las dos columnas de la derecha muestran la significación estadística de las comparaciones entre controles vs BA en conjunto y entre los subgrupos (controles vs no oxigenoterapia; controles vs oxigenoterapia y BA-VRS con oxigenoterapia vs BA-VRS sin oxigenoterapia).

AN: Aspirado nasal; C: Control; BA: Bronquiolitis aguda; No O₂: Bronquiolitis aguda sin necesidad de oxigenoterapia; O₂: Bronquiolitis aguda con oxigenoterapia; IL-4: Interleuquina 4. IFN- γ : Interferon gamma; IL-4/IFN- γ : Índice IL-4/IFN- γ . Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak. Los datos están expresados como media \pm DS. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

3.2.2 Parámetros de inflamación en plasma

Al comparar en plasma sanguíneo los parámetros de inflamación entre los niños con BA-VRS y el grupo control, se detectó una elevación significativa de IL-8 y una disminución de las concentraciones de las quimiocinas MIP-1 α y MIP-1 β (tabla 27), siendo los niveles del resto de citoquinas estudiadas similares en ambos grupos.

Al analizar las citoquinas y quimiocinas en plasma por subgrupos de gravedad, bien por la escala de gravedad utilizada al ingreso o en función de la necesidad de O₂, no encontramos diferencias significativas salvo para la MIP-1 β . Los niveles de MIP-1 β se encontraron significativamente disminuidos en pacientes que precisaron oxigenoterapia posteriormente o presentaban al ingreso una puntuación en la escala de WDF que correspondía a moderada-grave con respecto a formas de BA leves y los lactantes sanos del grupo control (BA con O₂: 365.4 \pm 240.9 pg/ml; BA-VRS con puntuación en la escala \geq 4: 415.2 \pm 283.7 pg/ml, vs control: 626.49 \pm 445.8 pg/ml; $p=0.002$ y $p=0.006$ respectivamente) (tabla 28, 29, 30).

Tabla 27. Concentraciones de citoquinas y quimiocinas (medidos en pg/ml) en plasma en niños con BA-VRS y controles.

Niveles (pg/ml)	Controles (n=27)	Bronquiolitis (n=45)	<i>p</i>
IFN- γ	1,38 \pm 3,5	1,32 \pm 1,43	0.827
IL-6	3,54 \pm 5,95	11,22 \pm 27,51	0.262
IL-8	1,12 \pm 0,66	2,15 \pm 2,09	0.047 *
IL-10	1,80 \pm 2,95	3,31 \pm 4,20	0.213
MIP-1 α	2,82 \pm 1,47	1,90 \pm 1,67	0.017 *
MIP-1 β	626,49 \pm 445,84	443,88 \pm 303,6	0.002 *
TNF- α	1,33 \pm 1,59	1,37 \pm 1,13	0.826

Significación estadística entre grupos control-casos de bronquiolitis aguda tras aplicación de análisis de covarianza (ANCOVA) después de ajustar por la edad. IFN- γ : Interferón gamma. IL-6: Interleuquina 6. IL-8: Interleuquina 8. IL-10: Interleuquina 10. MIP-1 α : proteína inflamatoria del macrófago 1 alfa. MIP-1 β : proteína inflamatoria del macrófago 1 beta. TNF- α : Factor necrosis tumoral alfa. Los datos están expresados como media \pm DS. * $p \leq 0.05$

Tabla 28. Niveles de citoquinas Th1 (medidos en pg/ml) en plasma en grupo control y niños con BA-VRS subdivididos por la puntuación en la escala de Wood-Downes modificada por Ferrés aplicada al ingreso.

	Grupo	N	Media \pm DE	<i>p</i>	
IFN- γ	C	27	1,38 \pm 3,5		C-L: 1
	L	17	1,43 \pm 1,15	0.982	C-MG: 0.987
	MG	28	1,25 \pm 1,58		L-MG: 0.992
TNF α	C	27	1,33 \pm 1,59		C-L: 0.994
	L	17	1,39 \pm 0,94	0.990	C-MG: 0.998
	MG	28	1,35 \pm 1,26		L-MG: 1

C: Grupo control; L: Bronquiolitis aguda leves; MG: Bronquiolitis aguda moderados-graves. IFN- γ : Interferón gamma; TNF- α : Factor necrosis tumoral alfa. Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak. *p*: significación estadística

Tabla 29. Niveles de citoquinas Th2 (medidos en pg/ml) en plasma en grupo control y niños con BA-VRS subdivididos por la puntuación en la escala de Wood-Downes modificada por Ferrés aplicada al ingreso.

	Grupo	N	Media ± DE	p	
IL6	C	27	3,54±5,95		C-L:0.984
	L	17	6,78±6,78	0.361	C-MG: 0.387
	MG	28	13,94±34,44		L-MG: 0.665
IL10	C	27	1,80±2,95		
	L	17	3.03±1,95	0.377	C-MG: 0.491
	MG	28	3,49±5,14		L-MG: 0,977

C: control; L: Bronquiolitis agudas leves; G: Bronquiolitis aguda moderada-graves. Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak. IL-4: Interleuquina 4; IL-6: Interleuquina 6; IL-10: Interleuquina 10. p: significación estadística

Tabla 30. Niveles de quimiocinas (medidos en pg/ml) en plasma en grupo control y niños con BA-VRS subdivididos por la puntuación en la escala de Wood-Downes modificada por Ferrés aplicada al ingreso.

	Grupo	N	Media ± DE	p	
IL8	C	27	1,12±0,66		C-L: 0.451
	L	17	1,98±0,7	0.091	C-MG: 0.131
	MG	28	2,25±2,6		L-MG: 0,946
MIP1β	C	27	626,49±445,84		
	L	17	489,91±337,69	0.005*	C-MG: 0.006
	MG	28	415,2±283,70		L-MG: 0.824
TNFα	C	27	1,33±1,59		
	L	17	1,39±0,94	0.990	C-MG: 0.998
	MG	28	1,35±1,26		L-MG: 1

C: control; L: leves; G: graves Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak IL-8: Interleuquina 8. MIP-1α: proteína inflamatoria del macrófago 1 alfa. MIP-1β: proteína inflamatoria del macrófago 1 beta. p: significación estadística

3.2.3 Correlación entre parámetros de inflamación en aspirado nasal y plasma

Se intentó establecer si existía correlación entre los parámetros de inflamación estudiados en aspirado nasal y en plasma. No se encontró correlación significativa entre los niveles de citoquinas medidos en aspirado nasal y plasma, pero sí entre los niveles de quimiocinas en plasma y en secreciones respiratorias: Se encontró una correlación directa para IL-8 mientras que para MIP-1 α y MIP-1 β se halló una correlación inversa (elevada en aspirado nasal y descendida en plasma) (tabla 31).

Tabla 31. Correlación entre niveles de citoquinas en aspirado nasofaríngeo y plasma.

Variable	r (n=72)	p
IFN- γ	0.02	0.876
IL-6	0.147	0.255
IL-8	0.370	0.003 *
IL-10	0.251	0.056
MIP-1 α	-0.364	0.004 *
MIP-1 β	-0.303	0.017 *
TNF- α	-0.069	0.662

IFN- γ : Interferón gamma; IL-6: Interleuquina 6; IL-8: Interleuquina 8; IL-10: Interleuquina 10; MIP-1 α : proteína inflamatoria del macrófago 1 alfa; MIP-1 β : proteína inflamatoria del macrófago 1 beta. TNF- α : Factor necrosis tumoral alpha. R: coeficiente de correlación de Rho Spearman; * $p \leq 0.05$

3.3 Biomarcadores de estrés oxidativo

Los resultados obtenidos de los biomarcadores de EO estudiados en este estudio se muestran en las tablas 32-35.

Al analizar los parámetros de EO por gravedad, por la puntuación obtenida en la escala de WDF aplicada al ingreso, ningún biomarcador resultó significativo salvo el ratio GSH/GSSG (tabla 32 y 33). El ratio GSH/GSSG se encontró significativamente disminuido en los casos de BA frente a los controles, siendo mayor la disminución en los casos moderados graves (controles $0,58 \pm 0,03$, casos leves $0,54 \pm 0,04$, casos moderados graves $0,50 \pm 0,05$). La disminución del ratio GSH/GSSG fue estadísticamente significativa entre los grupos comparados, incluyendo entre los

IV.Resultados

casos leves y moderados-graves (controles vs casos leves $p= 0,010$, controles vs casos moderados-graves $p= 0,001$, casos leves vs moderados graves $p= 0,037$)

Tabla 32. Niveles de biomarcadores de estrés oxidativo (LPO, GSH, GT) estudiados con BA-VRS subdivididos por escala de Wood-Downes modificada por Ferrés aplicada al ingreso y comparados con el grupo control.

	Grupo	N	Media \pm DE		<i>p</i>
LPO*	C	20	0,56 \pm 0,96		C-L: 0.396
	L	17	0,25 \pm 0,34	0,36	C-MG: 0.762
	MG	29	0,40 \pm 0,54		L-MG: 0.204
GSH*	C	27	15,34 \pm 4,95		C-L: 0.530
	L	17	14,10 \pm 4,25	0,473	C-MG: 0.884
	MG	27	15,26 \pm 5,97		L-MG: 0.879
GT*	C	27	26,39 \pm 8,72		C-L: 0.947
	L	17	26,16 \pm 8,66	0,416	C-MG: 0.802
	MG	27	30,36 \pm 12		L-MG: 0.484

C: Control; L: Bronquiolitis leves; MG: Bronquiolitis moderada-graves; LPO: lipoperóxidos; GSH: glutatión reducida; GT: glutatión total.*Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak.

Tabla 33. Niveles de biomarcadores de estrés oxidativo (GSSG, GSH/ GSSG, GPox) estudiados con BA-VRS subdivididos por escala de Wood-Downes modificada por Ferrés aplicada al ingreso y comparados con el grupo control.

	Grupo	N	Media \pm DE		<i>p</i>
GSSG*	C	27	11,05 \pm 3,97		C-L: 0.991
	L	17	12,06 \pm 4,7	0,064	C-MG: 0.094
	MG	27	15,09 \pm 6,62		L-MG: 0.210
GSH/GSSG*	C	27	0,58 \pm 0,03		C-L: 0.010*
	L	17	0,54 \pm 0,04	<0,001**	C-MG: 0.001**
	MG	27	0,50 \pm 0,05		L-MG: 0.037*
Gpox*	C	27	0,03 \pm 0,07		C-L: 0.999
	L	17	0,03 \pm 0,03	0,987	C-MG: 1
	MG	27	0,03 \pm 0,06		L-MG: 0.998

C: Control; L: Bronquiolitis leves; MG: Bronquiolitis moderada-graves; GSSG: glutatión oxidado; GSH/GSSG: ratio GSH/GSSG; GPox: glutatión peroxidasa. *Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

IV.Resultados

Al estudiar los biomarcadores de EO por la necesidad de oxigenoterapia al ingreso (tablas 34, 35), encontramos que GSSG estaba aumentada en los niños que precisaron oxigenoterapia (controles $11,05\pm 3,97$, casos que no precisaron O_2 $12,04\pm 5,2$ y casos que recibieron oxigenoterapia $16,17\pm 6,42$), siendo significativo este aumento entre controles y casos de BA que precisaron aporte de oxigenoterapia ($p= 0,024$) y entre casos que no precisaron oxigenoterapia extra frente a los que sí ($p=0,041$). El ratio GSH/GSSG continuó estando disminuido en los casos de BA más graves (controles $0,58\pm 0,03$, BA sin necesidad de O_2 durante el ingreso $0,53\pm 0,054$, y en los que sí precisaban aporte de O_2 $0,50\pm 0,05$) y manteniendo significación estadística (controles vs BA sin necesidad de O_2 $p= 0,001$, controles vs BA con aporte extra de oxigenoterapia $p=0,0001$) aunque no obtiene significación entre casos con / sin necesidad de oxigenoterapia ($p=0,084$).

Tabla 34. Niveles biomarcadores de estrés oxidativo en grupo control, y niños con BA-VRS con / sin oxigenoterapia.

	Grupo	N	Media \pm DE		p
	C	20	$0,56\pm 0,96$		C - No O_2 : 0.322
LPO	No O_2	24	$0,24\pm 0,30$	0.263	C - O_2 : 0.927
	O_2	22	$0,46\pm 0,60$		No O_2 - O_2 : 0.630
	C	27	$15,34\pm 4,95$		C - No O_2 : 0.336
GSH*	No O_2	24	$13,72\pm 4,69$	0.225	C - O_2 : 0.999
	O_2	20	$16,12\pm 5,90$		No O_2 - O_2 : 0.421
	C	27	$26,39\pm 8,72$		C - No O_2 : 0.908
GT*	No O_2	24	$25,77\pm 9,33$	0.123	C - O_2 : 0.428
	O_2	20	$32,29\pm 11,84$		No O_2 - O_2 : 0.125

C: Control; No O_2 : Bronquiolitis aguda sin necesidad de oxigenoterapia; O_2 : Bronquiolitis aguda con oxigenoterapia; LPO: lipoperóxidos; GSH: glutatión reducido; GT: glutatión total.* Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak.

Tabla 35. Niveles biomarcadores de estrés oxidativo en grupo control, y niños con BA-VRS con / sin oxigenoterapia.

	Grupo	N	Media ± DE		p
GSSG*	C	27	11,05±3,97		C - No O2: 0.975
	No O2	24	12,04±5,2	0.015	C - O2: 0.024
	O2	20	16,17±6,42		No O2 - O2: 0.041
GSH/GSSG*	C	27	0,58±0,03		C - No O2: 0.001**
	No O2	24	0,53±0,054	<0.001**	C - O2: 0.001**
	O2	20	0,50±0,05		No O2 - O2: 0.084
Gpxhb1*	C	27	0,03±0,07		C - No O2: 0.977
	No O2	24	0,02±0,02	0.714	C - O2: 0.962
	O2	20	0,03±0,06		No O2 - O2: 0.798

C: Control; No O2: Bronquiolitis aguda sin necesidad de oxigenoterapia; O2: Bronquiolitis aguda con oxigenoterapia; GSSG= glutatión oxidado, GSH/GSSG= ratio GSH/GSSG, GPox= glutatión peroxidasa. *Significación estadística obtenida entre grupos tras aplicar el test de ANOVA ajustado por edad y con comparaciones post hoc de Sidak. * p< 0,05, ** p<0,001

3.3.1 Correlaciones entre parámetros de inflamación y estrés oxidativo

El análisis de correlación entre los biomarcadores de inflamación y oxidación, no ha encontrado asociación significativa, por ello no se muestran los resultados.

3.4 Vitamina D

Los niveles en plasma de vitamina D (25(OH) D) en el grupo control y en los casos de BA se muestran en tabla 36, figura 48. Como se observa, los niveles de 25(OH) D (medidos en ng/ml) en los casos con BA (mediana 29.9 ng/ml, rango intercuartílico 21.4.-37.5) son significativamente inferiores que en los lactantes sanos controles (mediana 38.2 ng/ml, rango intercuartílico 26.1-48.1), (p=0,022).

Tabla 36. Niveles de la vitamina 25(OH) D en los controles y casos de BA

	Controles (n= 30)	Bronquiolitis (n= 48)	p
25(OH) D ng/ml	38,2 (26,1;48)	29,9 (21,4;37,5)	0.022

Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. Significación obtenida mediante la prueba U de Mann-Whitney.

IV.Resultados

En la tabla 37 y figura 49 los niveles de 25(OH) D son analizados en función subgrupos de gravedad de los casos, según la puntuación obtenida en la escala de gravedad al ingreso. En este caso, los niveles de 25(OH) D estaban disminuidos en los casos de BA moderados-graves en comparación con el grupo control (mediana 29.8 ng/ml (rango intercuartílico 19.2-35.9) vs 38.2 ng/ml (rango intercuartílico 26.1-48.1), ($p=0.026$). Sin embargo, no se obtuvo significación estadística al comparar los subgrupos de gravedad, entre los casos de BA moderados-graves (mediana 29.8 ng/ml (rango intercuartílico 19.2-35.9) y los casos de BA leves (mediana 30.6 ng/ml (rango intercuartílico 23.0-42.6).

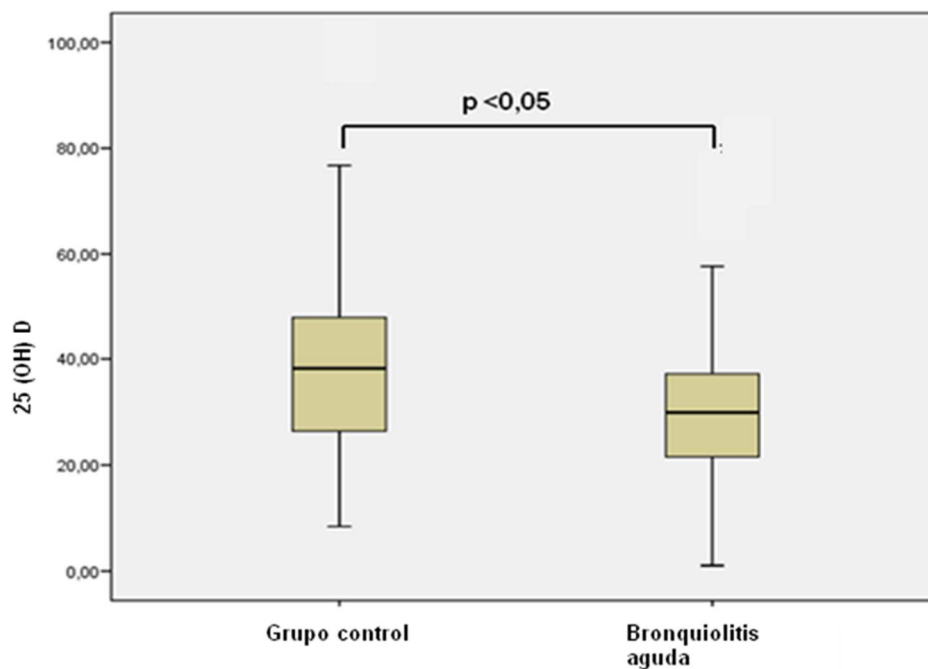


Figura 48. Niveles de 25(OH) vitamina D (ng/ml) en grupo control frente a grupo de lactantes ingresados por bronquiolitis aguda.

Tabla 37. Comparación de niveles de 25(OH) vitamina D (ng/ml) entre grupo control y subgrupos de BA por gravedad de la enfermedad.

	Controles^c (n= 30)	BA leves^L (n=18)	BA moderadas-graves^{MG} (n= 30)
25(OH) D (ng/ml)	38,2 (26,1-48,1)	30,6 (23,0-42,6)	29,8 (19,2-35,9)
	$p^{(C,L)} = 0.217$	$p^{(C,MG)} = 0.026$	$p^{(L,MG)} = 0.507$

^c controles; ^L BA leves: Bronquiolitis aguda leves; ^{MG} BA moderadas-graves: Bronquiolitis aguda moderadas-graves. 25(OH) D: vitamina D. Los datos están expresados en mediana y rango intercuartílico. Valor de *p* expresado entre grupos.

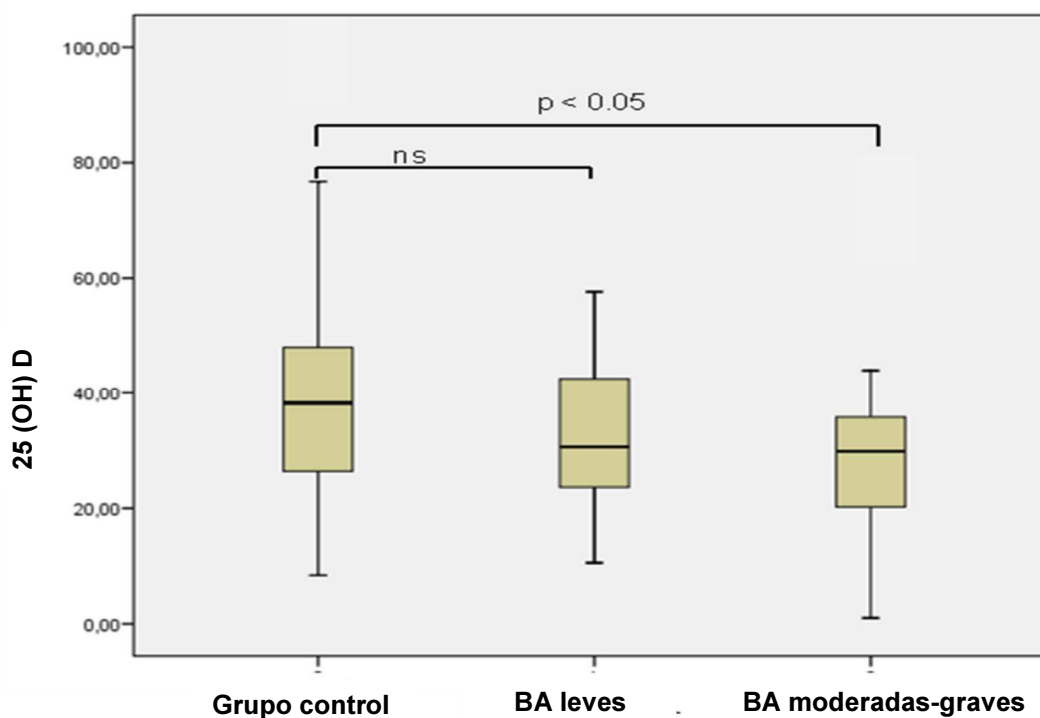


Figura 49. Niveles de 25(OH) vitamina D (ng/ml) en grupo control y lactantes ingresados por bronquiolitis aguda, subdivididos por la gravedad del cuadro clínico.

En datos absolutos, en el grupo de los casos de BA, 23 pacientes (47.9%; 95% IC: 34.1%-62%) tenían niveles suficientes de 25(OH) D (> 30 ng/ml). Sin embargo la prevalencia de niveles subóptimos de vitamina D (niveles insuficientes de 25(OH) D entre 21-29 ng/ml y deficientes si los niveles de 25(OH) D < 20 ng/ml respectivamente) fue llamativamente elevada. En 25 de los 48 casos (52.1%) los niveles de 25(OH) D se

IV.Resultados

encontraban por debajo de 30 ng/ml, incrementándose el déficit conforme aumentaba la gravedad de los casos: sólo en 7 de los 18 casos leves (38.9%; 95% IC: 17.3%-64.3%) mientras que en 18 de los 30 casos moderados-graves en los que se estudió este parámetro era deficitario (60%; 95% IC: 40.6%-77.3%), tabla 38.

Tabla 38. Proporción de los participantes en el estudio con niveles séricos de 25(OH) vitamina D deficientes, insuficientes y suficientes según guías actuales (Holick et al, 2011; Pludowski et al, 2013).

	Deficiencia (<20 ng/ml)	Insuficiencia (20-29 ng/ml)	Suficiencia (> 30 ng/ml)
Controles (n= 30)	4 (13.33%)	4(13.33%)	22 (73.33%)
Bronquiolitis (n= 48)	9 (18.8%)	16 (33.3%)	23 (47.9%)
BA leves (n=18)	1 (5.6%)	6 (33.3%)	11 (61.1%)
BA moderadas-graves (n=30)	8 (26.7 %)	10 (33.3%)	12 (40%)

Datos expresados en valores absolutos (%).

Al considerar todos los casos de BA, se encontró una correlación significativa inversa entre los niveles séricos de 25(OH) D y la gravedad de la BA ($r = -0.457$, $p < 0.001$) (tabla 39).

Tabla 39. Correlación entre niveles de 25(OH) D y la gravedad de la bronquiolitis aguda tipificada por la escala Wood-Downes-Ferrés al ingreso.

Variable	r (n=48)	p
25(OH) D	-0.457	<0.001

25(OH) D: 25(OH) vitamina D. r: coeficiente de correlación de Rho Spearman; * $p < 0.001$.

En el análisis de regresión lineal múltiple mostró cómo por cada punto que se aumenta en la puntuación de la escala de WDF, la 25(OH) D disminuyó un promedio de 5.56 ng/ml (95% IC: 2.61-8.90 ng/ml; $P = 0.001$), una vez ajustado por el resto de las variables

V.DISCUSIÓN

1. Período de estudio. Epidemia gripe A-VRS 2009-2010

La BA es la enfermedad que más ingresos hospitalarios genera en menores de un año, y es durante los meses fríos cuando su incidencia es mayor, coincidiendo con la epidemia por VRS, principal agente causal implicado. El riesgo de hospitalización varía según los estudios publicados pero en nuestro medio se ha establecido entre un 1-4% (Oñoro et al, 2011; Vicente et al, 2003), mientras que en la epidemia de BA 2009-2010 en Córdoba se ha estimado la incidencia en 8,9%, teniendo en cuenta el total de niños ingresados en Hospital Universitario Reina Sofía durante los meses de inclusión de pacientes con BA, supuso el 12,9% del total de los ingresos en el hospital infantil en esta época.

En general, la circulación del VRS es anterior al del virus de la gripe (Meerhoff et al, 2006) ya que suele empezar a circular entre 3-10 semanas antes que el virus de la gripe (Velasco et al, 2009). Sin embargo, en la temporada 2009-2010, el pico máximo de circulación del virus de la gripe A, H1N1 se adelantó, registrándose nueve semanas antes que el del VRS (Jiménez-Jorge et al, 2010). El VRS se presentó en la época de año habitual, coincidiendo con el patrón observado en el resto de países europeos (Weekly influenza surveillance overview, 2010). La mayor incidencia ocurrió a finales de diciembre de 2009, coincidiendo con una disminución en la circulación del virus de la gripe A. Se observó un aumento en la tasa de detección de VRS que alcanzó el pico máximo en la última semana del año (semana 52/2009) con un valor del 67%, significativamente superior ($P < 0.0001$) a la tasa promedio de las tres temporadas anteriores (45%). A partir de finales de enero de 2010 se observó una disminución de la circulación del VRS (Jiménez-Jorge et al, 2010). En este estudio, el primer caso fue incluido a finales de diciembre de 2009, observándose un pico de incidencia entre el 20 de enero y 8 de febrero, días en los fueron incluidos la mitad de los casos de BA (figura 38).

2. VRS, estudio de otros virus

La mayoría de los estudios publicados sobre BA incluyen los casos por VRS, el agente aislado en mayor proporción en los lactantes hospitalizados. Con el desarrollo de las técnicas microbiológicas y moleculares, se ha empezado a tener en cuenta el papel de otros virus en la BA.

Las diferencias por agente causal en las características epidemiológicas y gravedad de la BA no son concluyentes al individualizar por agente causal, pero algunos estudios han sugerido que el VRS constituye un factor de riesgo de gravedad (García et al, 2010; Papoff et al, 2011) y de mayor estancia hospitalaria (Hervás et al, 2012) frente a otros virus. Por ello en nuestra población, en el estudio de los parámetros de

inflamación y oxidación hemos valorado sólo los casos VRS + (45 casos) homogeneizando nuestros resultados al ser el agente causal mayoritario (figura 36). Además en este estudio no se han analizado otros virus, ya que durante la epidemia de gripe del año 2009-2010 en HURS sólo se realizaba de forma rutinaria el test rápido de la gripe y VRS al ingreso. Por otro lado, el estudio de los 5 casos con etiología viral diferente no hubiera tenido relevancia estadística, dado el pequeño porcentaje que supondrían en este trabajo.

3. Datos epidemiológicos de la población del estudio

El grupo de pacientes con BA no difiere del grupo control constituido en relación a sexo, alimentación con lactancia materna en el momento del ingreso, número de hermanos, antecedentes familiares de atopia, dermatitis atópica al ingreso, exposición a humo de tabaco en domicilio o suplementación con vitamina D (tablas 20 y 21).

En cuanto al factor edad, al discriminar los casos VRS negativos (5 casos) para analizar los parámetros de inflamación y oxidación sí obtuvimos diferencias entre el grupo de BA y el grupo control por lo que se tuvo que ajustar los resultados por la edad (tablas 20).

3.1 Edad

La edad se ha descrito como el principal factor asociado con la gravedad clínica y necesidad de ingreso hospitalario por BA (Pappoff et al, 2011). Se ha asociado una menor edad con mayor duración de la estancia hospitalaria (Hervás et al, 2012) y necesidad de ingreso en unidad de cuidados intensivos (Hervas et al, 2012; Oñoro et al, 2011). Se ha demostrado que el factor edad es uno de los principales factores de riesgo para ingresar por BA y por la gravedad del proceso. Es conocido que a menor edad existe una mayor inmadurez de la respuesta inmune desarrollada frente a la infección, que además de ser inespecífica parece ser edad-dependiente.

En concordancia con otros estudios (Shay et al, 1999; Prais et al, 2003; López-Guinea et al, 2007), casi tres cuartas partes de los lactantes ingresados por BA son menores de 3 meses (70%) (Figura 37). La edad medida de nuestro grupo era de 2,5 meses (rango de 1 a 11 meses). Publicaciones previas en nuestro país (Vicente et al, 2003) han determinado una tasa de ingreso del 3,7% en los menores de 6 meses de vida, descendiendo hasta el 2,5% para los menores de 12 meses.

3.2 Sexo

Detectamos un ligero predominio de varones de los casos ingresados por BA (tablas 20 y 21), concordante con estudios previos que establecen un mayor riesgo de ingreso por BA en lactantes varones (Koehoorn et al, 2008; Lowther et al, 2000). Además se ha relacionado al sexo masculino con un riesgo incrementado de necesidad de oxigenoterapia y ventilación mecánica durante el ingreso (Lowther et al, 2000; Perez Tarazona et al, 2009).

3.3 Lactancia materna

Se ha indicado la importancia de la lactancia materna como factor protector de ingreso por BA (Holberg et al, 1991; Bachrach et al, 2003; Pisacane et al, 1994; Chatzimichael et al, 2007). En este estudio llama la atención la alta tasa de alimentación de lactancia materna entre los niños ingresados por BA (> 70%), probablemente debido a la corta edad de los niños incluidos (tablas 20 y 21). Se ha afirmado que la lactancia materna exclusiva superior a 4 meses reduce en más de la mitad los ingresos por patología infecciosa, no perinatal, en menores de un año (Paricio-Talayero et al, 2006), razón suficiente para promocionar la lactancia materna en los primeros meses de vida. En este estudio no se han encontrado diferencias significativas entre lactantes controles sanos y los ingresados por BA en relación con la lactancia materna (tablas 20 y 21).

Es interesante analizar la relación entre los subgrupos de gravedad en función de la alimentación recibida, para valorar si existe una evolución más tórpida o mayor tiempo de estancia como ha sido publicado recientemente (Piñero et al, 2012), ya que incluso se ha descrito que la duración de la lactancia materna exclusiva es inversamente proporcional con el tiempo de necesidad de oxigenoterapia, viendo que por cada mes de lactancia materna exclusiva la necesidad de oxigenoterapia en pacientes con BA decrecía 11 horas (Dornelles et al, 2007). Dado el tamaño muestral, en este estudio no se ha podido realizar esta posible relación.

3.4 Dermatitis atópica

El antecedente personal de dermatitis atópica se ha asociado con un riesgo elevado de ingreso por BA (Al-Shehri et al, 2005).

En el grupo de los casos ingresados por BA no hubo mayor incidencia de dermatitis atópica en comparación con el grupo control (tablas 20 y 21) a diferencia de lo que han observado otros autores (Linnenberg et al, 2006), quizás debido a la mayor edad de los niños en dicho estudio. La baja incidencia en los casos de BA de dermatitis atópica (6 casos en total, 12,5%) entre otros motivos pudo deberse a la corta edad de

los niños, teniendo en cuenta que la dermatitis atópica se suele diagnosticar por encima de los 4 meses de edad.

3.5 Tabaquismo parental

Tanto en los controles como en los casos de BA, la mitad de los niños convivían con un fumador en el domicilio familiar, por ello no encontramos diferencias entre grupos para la exposición al tabaco y no se ha podido resaltar como factor de riesgo de gravedad de BA como en otros estudios publicados (Cano J et al, 2003, Jones et al, 2011). El tabaquismo familiar ha sido relacionado con la necesidad de O₂ suplementario y VM de los casos de BA ingresados (Semple et al, 2011) y mayor duración de la estancia hospitalaria (Chatzimichael et al, 2007). Aunque en este estudio no existan diferencias entre los casos de BA y los controles sanos ante este factor de riesgo, es de interés reseñar que en 9 casos de BA ambos progenitores fumaban y en la mitad de los hogares en los que uno o ambos padres fumaban el consumo era superior a 20 cigarrillos/ día.

Se ha observado que el hábito tabáquico materno durante el embarazo aumenta significativamente el riesgo de BA en el lactante (Cano et al, 2003; Linnenberg et al, 2006). En este trabajo no se ha estudiado dicha asociación al no haber diferencias entre los grupos de BA y controles. La información que obtuvimos sobre el tabaquismo procedía de la encuesta verbal realizada a los padres al ingreso hospitalario, por lo que es posible que pueda existir un sesgo de información en ambos grupos, debido a un menor reconocimiento del hábito tabáquico por parte de los padres, y en concreto de la madre durante el periodo de gestación.

3.6 Convivientes (Nº de hermanos)

Los virus respiratorios se transmiten rápidamente desde el caso índice al resto de convivientes, en concreto el VRS tiene una contagiosidad alta, siendo frecuente la extensión rápida entre los convivientes en el hogar, o compañeros de guardería. De ahí la importancia de considerar a los hermanos mayores escolarizados o la asistencia a guardería, como factor de riesgo relacionado con un aumento de la transmisión de infecciones virales.

El número total de lactantes con hermanos fue similar en el grupo de BA frente al grupo control, y aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre grupos, los controles tenían más hermanos que los casos de BA (tabla 20).

3.7 Antecedentes familiares

Entre los antecedentes familiares que se han relacionado con mayor gravedad de la BA se encuentran la historia familiar de atopia (Miller et al, 2011), y aquellas madres con reagudización asmática durante el embarazo (Carroll et al, 2007). En este sentido, en la cohorte *RSV Bronchiolitis in Early Life (RBEL)*, se evidencia el asma materno como factor de riesgo para sibilantes recurrentes durante los primeros años de vida, además indica que hasta un 48 % de los niños hospitalizados por VRS, han sido diagnosticados de asma en algún momento durante sus primeros 7 años de vida (Bacharier et al, 2012).

En este estudio no hay diferencias estadísticamente significativas en los antecedentes familiares de atopia el grupo de BA frente a los lactantes sanos, aunque sí podríamos afirmar que son más frecuentes en los lactantes ingresados por BA (tabla 20).

Numerosos estudios publicados en las últimas décadas han demostrado la existencia durante y tras la infección respiratoria aguda de un patrón Th2 predominante, asociado de forma característica a la gravedad de la BA (Bermejo-Martin et al, 2007; Alonso-Fernández et al, 2005; Hoebbee et al, 2003), evolución posterior a sibilantes recurrentes (Bont et al, 2000; Renzi et al, 1997) y existencia de antecedentes familiares/personales de atopia (Robinson et al, 1992; Hassantoufighi et al, 2007; Legg et al, 2003).

4. Evaluación clínica .Valoración de la gravedad al ingreso

Una guía de práctica clínica sobre diagnóstico y tratamiento de BA (González de Dios et al, 2010) anima a la creación y validación de escalas diseñadas para la valoración de la BA. Actualmente la escala más extendida es la escala de Wood-Downes (WD) original o versiones adaptadas, como la Wood-Downes-Ferrés (WDF) (Ferrés, 1992), utilizada en este estudio, pero que no han sido diseñadas específicamente para BA. De hecho, la escala de WD fue ideada inicialmente para predecir el fallo respiratorio en pacientes asmáticos o valoración de la gravedad de las crisis asmáticas.

La puntuación de la escala WD empleada en estudios pronósticos de gravedad varían significativamente entre los pacientes ingresados o ambulatorios y entre los pacientes con estancias cortas o más prolongadas (Shaw et al, 1991; Domingo et al, 2005; Somech et al, 2006), aunque los resultados ofrecidos no permiten juzgar su validez. La principal limitación de la escala WD es que no tiene en cuenta la variabilidad de la frecuencia cardíaca ni la frecuencia respiratoria en los lactantes, por lo que anula su carácter discriminativo al ser aplicada en el primer año de vida. También el parámetro “entrada de aire” es difícil de cuantificar objetivamente en la escala WD, no deja de ser

V. Discusión

subjetivo por la evaluación clínica de quién la realiza e incluso en su definición existe variabilidad por la edad: los lactantes más pequeños, por el menor diámetro de la vía aérea, no tienen por qué presentar sibilancias (como se indica y puntúa en la escala) y sí una auscultación predominante de hipoventilación y/ o crepitantes y/o espiración alargada.

Por otro lado, la necesidad de oxigenoterapia es uno de los predictores más eficaces en la duración de la estancia hospitalaria (Corneli et al, 2012; Wainwright et al 2003), constituye así un buen factor predictor de la gravedad de BA (Amat et al, 2013). En este contexto, disponer de una medición sistemática de la SatcO₂ consideramos que es una herramienta imprescindible y objetiva para la valoración de gravedad al ingreso y durante la estancia hospitalaria.

En los resultados del estudio existen diferencias en la respuesta inflamatoria en función de que se aplique la escala de WDF o la necesidad de oxigenoterapia para valoración de la gravedad de BA. Ello, supondría ser una razón suficiente para plantear la validación de una escala específica de BA estratificada por edad, y con mejor definición de los parámetros valorados en cada *ítem*, para así proporcionar un ajuste mayor a la situación del paciente, que incluya la medición de la SatcO₂ como parámetro objetivo. De esta forma se podría valorar mejor la situación clínica de los lactantes con BA, situación clínica, y la efectividad de la oxigenoterapia.

En la última década se ha puesto de relieve el papel de la respuesta inflamatoria en el desarrollo y gravedad de la BA, que se caracteriza por edema de la submucosa, producción de inflamación y fibrina que causa obstrucción bronquiolar. La respuesta inflamatoria en el tracto respiratorio inferior conlleva alteraciones significativas con necrosis del epitelio, destrucción de las células ciliadas y una importante infiltración peribronquiolar de linfocitos y neutrófilos. Todo ello justifica el interés de estudiar la respuesta inflamatoria a nivel de mucosa respiratoria nasal y su repercusión sistémica, mediante la valoración de citoquinas y quimiocinas como marcadores de inflamación.

5. Biomarcadores de inflamación

5.1 Determinación de citoquinas y quimiocinas en aspirado nasal.

En este estudio se han medido biomarcadores de inflamación (citoquinas y quimiocinas) en aspirado de mucosa nasal, ya que existen estudios previos en los que se ha determinado la validez de los niveles de estos marcadores en vía respiratoria superior como reflejo de la respuesta inflamatoria que se produce en la vía respiratoria inferior (Semple et al, 2011; Byeon et al, 2009; García et al, 2012; Joshi et al. 1998), en los se ha demostrado que los niveles de citoquinas del aspirado nasal se correlacionan con los valores en BAL de las vías respiratorias inferiores. Ello, junto con el hecho de ser una técnica incruenta y de fácil obtención, hace que las muestras de aspirado nasofaríngeo sean consideradas de elección para el estudio de la inflamación de las vías respiratorias en la BA.

5.2 Niveles de citoquinas y quimiocinas en aspirado nasal

En este estudio hemos encontrado elevación de todas las citoquinas y quimiocinas analizadas en aspirado nasal en lactantes ingresados por BA-VRS frente al grupo de lactantes sanos de control. No se han encontrado diferencias significativas entre subgrupos según la puntuación obtenida en la escala de gravedad al ingreso (Figuras 42-44). En cambio, sí hallamos elevaciones significativas de IL-6 y MIP-1 β en el aspirado nasal de los lactantes con BA que requirieron oxigenoterapia (tablas 24 y 25; figuras 46 y 47).

En condiciones normales, las interleuquinas proinflamatorias, como la IL-6, en infecciones virales estimulan el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (Silverman et al, 2004), aumentando el cortisol plasmático (con acción antiinflamatoria) sugiriendo que la IL-6 podría inducir una acción antiinflamatoria (Steensberg et al, 2003). Parece clara la importancia en el control de la respuesta inflamatoria como mecanismo esencial para la eliminación del agente infeccioso, si bien una respuesta exagerada produciría daño

V. Discusión

tisular excesivo y justificaría el empeoramiento del cuadro clínico. Otro autores también encuentra relación entre IL-6 con la gravedad BA-VRS (Díaz et al, 2013).

La respuesta a si existe un perfil de citoquinas predominante producido en respuesta frente al VRS sigue siendo controvertida. Existen múltiples datos publicados hasta el momento con resultados dispares (Hussell et al 1996; Legg et al, 2003; Bont et al, 1999; Lemanske et al, 2003). Así, se ha observado la existencia de un predominio de citoquinas Th2 (Bendelja et al, 2000; Román et al, 1997), de citoquinas Th1 (Brandenburg et al 2000) o un patrón mixto de respuesta Th1-Th2 (Hussell et al, 1996; Mobbs et al, 2002). Esta discrepancia podría deberse a diferentes factores, entre ellos los referentes al diseño del estudio en cuestión: inclusión de diferentes diagnósticos (lactantes con sibilantes recurrentes, neumonías o incluso infecciones de vías respiratorias superiores), edad de los sujetos incluidos, criterios de inclusión amplios (con posible influencia de las diferentes comorbilidades), diferente gravedad del cuadro (niños ingresados frente a los que han recibido tratamiento ambulatorio, así como el momento en que han sido recogidas las muestras (Boyce et al, 2000; Kristensen et al, 2009). Ello, junto a que también hay que tener en cuenta la influencia que pueden ejercer sobre la producción de citoquinas y quimiocinas factores ambientales a los que están expuestos los niños, como el humo de tabaco (Brandley et al, 2005), y genéticos (Hoebee et al, 2003; Hull et al, 2000; Puthothu et al, 2007) justifica la heterogeneidad de los resultados.

En este estudio, aunque observamos elevación de todas las citoquinas en aspirado nasofaríngeo, la ratio IL4/IFN γ estaba descendida significativamente en los niños con BA (tabla 26), indicando un predominio relativo de la respuesta Th1 en este grupo, algo observado previamente por otros autores (Brandenburg et al, 2000; Flores et al, 2011). Estos resultados discrepan con otros estudios, como el de Legg et al, (2003), quienes encuentran predominio de respuestas Th2 (ratio IL-4/IFN γ elevada) en niños que desarrollaron BA-VRS frente a los que sólo presentaron infección de vías altas, u otro estudio español en el que también encuentran un predominio relativo Th2 frente al VRS al comparar diversas ratios entre citoquinas Th1 y Th2 distintas de IL4/IFN γ y en niños con BA (Bermejo-Martin et al, 2007).

En la patogenia de la BA podría jugar un papel la respuesta inflamatoria exagerada mediada por citoquinas del tipo Th1 (van Schaik et al, 1999), que superaría los mecanismos de control encargados de reparar el exceso de inflamación. Se ha comprobado en modelo murino el papel dual del IFN γ , que por un lado limita la replicación viral y contrarresta las citoquinas Th2, mientras que por otro se asocia a obstrucción de la vía aérea (van Schaik et al, 2000), debido a que estimula la respuesta innata a costa de inhibir la respuesta adaptativa, generando inflamación con daño

bronquial agudo y también crónico, y que pudiera permitir la reinfección por VRS recurrente (Seemungal et al, 2001) al evadir la respuesta defensiva de memoria.

5.3 Papel de la edad en la respuesta Th1-Th2

Un factor diferenciador entre el presente estudio y los que obtienen un predominio de la respuesta Th2 (Legg et al, 2003, Bermejo-Martin et al, 2007), es que en éstos los lactantes incluidos con BA tenían mayor edad, lo que podría indicar que las respuestas Th2 aumentan con la edad (Buck et al, 2002) de forma característica, y da valor al hallazgo de un predominio relativo de Th1 en lactantes de menor edad, en los que podría constituir la respuesta predominante frente al VRS. Aunque la edad media de los grupos en este estudio fue menor de 6 meses, la edad de los controles era ligeramente mayor que la del grupo con BA, debido a que los lactantes que precisan ingreso por BA suelen tener una edad inferior (tabla 20). No obstante, el análisis estadístico fue ajustado por la edad para evitar cualquier posible influencia de este factor en los resultados.

Se ha demostrado que durante la fase aguda de la BA-VRS existe un aumento de cortisol plasmático y un descenso de la respuesta Th1 (Pinto et al, 2006). Mejías et al (2013) han encontrado concentraciones disminuidas de citoquinas, así como de marcadores de daño celular como LDH, en los cuadros de bronquiolitis graves, hecho corroborado por otros autores (Bennet et al, 2007; García et al, 2012; Laham et al, 2010). Estos autores, encuentran disminución de IL-8 y TNF- α en los lactantes con BA que ingresaban en UCIP con respecto a los que no. Ello sugiere que tanto una respuesta inflamatoria deficiente (“inmunoparálisis por el VRS”) como excesiva en la vía aérea se puede relacionar con la gravedad del cuadro clínico. Quedaría por determinar si es el VRS el que la favorece o bien el que desenmascara en los sujetos en los que existe predisposición genética el desarrollo de una respuesta inmuno-inflamatoria alterada.

Hay que resaltar los problemas éticos que se plantean al realizar estudios en lactantes sanos, problema común encontrado en otros trabajos (Chen et al, 2002; Bont et al, 1999; Semple et al, 2011, Bermejo-Martin et al, 2007), en los que los grupos control suelen además tener una edad superior a los casos con BA, dada la dificultad para reclutar controles sanos menores de 4 meses.

5.4 Papel del virus

Existe controversia sobre si el patrón de citoquinas varía dependiendo del virus infectante, con datos a favor (Flores et al, 2011; Laham et al, 2004; Guerrero-Plata et al, 2005; Melendi et al, 2007) y en contra (García et al, 2012). Para evitar este posible factor confusor, en el análisis de los biomarcadores de inflamación, sólo hemos incluido

lactantes previamente sanos, ingresados en un único centro, durante el mismo periodo epidémico, en los que la toma de muestras se realizó en las primeras 24 horas del ingreso y en los que el agente causal de BA fue el VRS.

5.5 Valoración de los niveles de citoquinas y quimiocinas por gravedad, en función de la necesidad de oxígeno al ingreso.

En el análisis de subgrupos encontramos elevaciones significativas en los niveles de IL-6 y MIP-1 β (tablas 41 y 42), así como tendencia a la significación en los niveles de MIP-1 α ($p=0,056$), en el aspirado nasofaríngeo de los lactantes con BA que requirieron oxigenoterapia durante su ingreso. También se ha relacionado un aumento de la IL-6 con la gravedad al comparar lactantes con BA-VRS graves que requirieron VM frente a los que no. (McNamara et al, 2004; Faber et al, 2012). Estos hallazgos contrastan con los de Bennet et al, 2007, quienes encuentran correlación inversa entre los niveles de IL-6 y MIP-1 β (y otras citoquinas) y la gravedad de la BA, sugiriendo que estos son factores protectores frente a la hipoxia, si bien este trabajo incluía niños con BA-VRS y otros virus.

La respuesta inflamatoria a nivel celular en la infección por VRS se caracteriza por la existencia de un predominio neutrofílico y de macrófagos (Levitz et al, 2012). En el desarrollo de la infección, parece que la expresión de IL-6 es clave para la progresión de la enfermedad (Haynes et al, 2001). De hecho, se ha asociado la existencia de un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en la zona promotora para la expresión de IL-6 con una mayor gravedad del cuadro de BA-VRS, confiriéndole a esta citoquina un rol esencial en la patogénesis y gravedad en la infección por VRS (Gentile et al, 2003), por lo que su detección rutinaria al inicio del cuadro podría constituir un predictor de gravedad, pudiendo ser útil en la práctica asistencial.

En el presente trabajo, no hemos encontrado diferencias significativas según la gravedad o necesidad de O₂ para el resto de citoquinas y quimiocinas (tablas 23-26, figuras 42-47), a diferencia de García et al, 2012 y Semple et al, 2011; que encuentran una correlación inversa entre los niveles de IFN γ y la gravedad del proceso. No obstante estos estudios deben interpretarse con cautela, pues en el primero de ellos no se analizan los parámetros de gravedad (oxigenoterapia y duración del ingreso) en función de la edad, pese a ser incluidos lactantes de hasta dos años, mientras que en el segundo llama la atención que los pacientes que precisaron O₂ eran de mayor edad que los que no lo necesitaron. De nuevo, la edad parece un factor determinante a tener en cuenta para el análisis de los niveles de citoquinas.

El VRS es un potente inductor del factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF) (Lee et al, 2000); ha sido relacionado con el aumento de la permeabilidad del epitelio

respiratorio bronquiolar (Kilani et al, 2004), la hipoxia y los días de hospitalización en BA-VRS (Bermejo-Martin et al, 2007). En este estudio hemos encontrado niveles aumentados del VEGF VEGF en aspirado nasofaríngeo (tabla 23, figura 42 y 45).

5.6 Niveles de citoquinas y quimiocinas en plasma

De forma paralela, se han estudiado los niveles plasmáticos de citoquinas y quimiocinas, para determinar la repercusión de la respuesta inflamatoria frente al VRS a nivel sistémico. Se observó una elevación significativa de IL-8 y una disminución de las concentraciones de MIP-1 α y MIP-1 β al comparar en plasma los niveles entre los lactantes con BA-VRS y el grupo control (tabla 27), siendo similares en ambos grupos los niveles del resto de citoquinas estudiadas.

Al igual que otros autores (García et al, 2012; Pitrez et al, 2004; Bermejo-Martin et al, 2007; Melendi et al, 2007; Welliver et al, 2002), no encontramos diferencias significativas en los niveles de citoquinas en aspirado nasal o plasma, en función de la escala de gravedad o la necesidad de O₂, salvo para la quimiocina MIP 1 β (tabla 25 y 30), que estaba significativamente descendida en sangre en los pacientes con BA que precisaron oxigenoterapia o presentaban una puntuación en la escala WDF, gravedad moderada-grave. Por ello, se considera que podría estar justificada la sustitución de las escalas clínicas clásicas, que tienen cierto grado de subjetividad en la valoración de la gravedad de la BA e incluir en cambio algún método clínico más objetivo, como es la medición de la SatcO₂ de forma sistemática.

El descenso de los niveles plasmáticos de MIP-1 β podría indicar una migración de los macrófagos por leucodiapédesis desde el capilar alveolar hacia la mucosa de la vía aérea. Un mayor consumo de este marcador a nivel de mucosa local provocaría un descenso en sangre.

Bont et al, 1999, observaron niveles plasmáticos elevados de IL-8 en pacientes graves que requieren VM (Bont et al, 1999), mientras que en otros estudios se encuentra una correlación inversa entre los niveles de MIP-1 α , y la SatcO₂ y los requerimientos de O₂ (García et al, 2012; Garofalo et al, 2001, Welliver et al, 2002). No obstante no queda claro si ello repercute en la gravedad global del cuadro (escala de síntomas o días de ingreso). Por otro lado, no detectamos, a diferencia de otros autores, modificación de los niveles de IFN- γ en sangre periférica (Chen et al, 2002; Grzeoek et al, 2010).

Se obtuvo correlación significativa directa (aunque leve) entre los niveles IL-8 en aspirado nasal y en plasma e inversa (elevada en aspirado nasal y descendida en plasma) para MIP1 β (tabla 31). Esto último podría indicar activación y consumo excesivo de MIP en suero o bien migración masiva de macrófagos (principal fuente de esta

quimiocina) a las vías aéreas. En conjunto, los datos analizados sugieren que la respuesta inmunológica e inflamatoria que integran la defensa frente al VRS se circunscribe en las vías respiratorias a nivel local, y tiene escasa repercusión a nivel sistémico. Exceptuando la activación de quimiocinas por su misión de inducir la migración de células desde el torrente circulatorio hacia el compartimento afectado, como es el bronquiolo. El hecho de la existencia de inflamación a nivel local sin participación sistémica podría deberse a que la infección por VRS se delimita al epitelio respiratorio, pues raramente se aísla VRS en sangre (O'Donnell et al, 1998) o en tejidos extrapulmonares (Nadal et al, 1990; Zlateva, 2004).

6. Estrés oxidativo

6.1 Justificación del estudio de marcadores de estrés oxidativo en bronquiolitis aguda por VRS

Escasos estudios publicados hasta la fecha estudian cómo el VRS induce estrés oxidativo (EO), principalmente *in vitro* (Mochizuk et al, 2009; Hosakote et al, 2009; Hosakote et al, 2011), en medios celulares preparados (infectados con VRS) o en modelos animales (Castro et al, 2006). Sin embargo pocos son los trabajos realizados en lactantes, que hayan correlacionado los parámetros de EO con clínica en BA (Hosakote et al, 2011). En este sentido, Hosakote et al, 2012 han valorado en células epiteliales pre y post-infección por VRS los cambios de parámetros de EO con la administración de antioxidantes sintéticos.

Dada la evidencia existente del papel que desempeña el EO sistémico en patologías respiratorias, pese a desarrollarse en éstas fundamentalmente afectación local de la vía respiratoria y no sistémico (Barnes et al, 1989; Poston et al, 1992), se ha considerado de interés en este estudio la valoración del sistema defensivo antioxidante en la BA

Al estar la mucosa nasal en contacto directo con el aire y oxígeno, no es factible la valoración del EO a nivel local, por lo que se ha considerado de interés estudiar los parámetros de EO en sangre, al ser un medio validado, que constituye una importante reserva del sistema antioxidante y fiel reflejo del estado antioxidante sistémico (Van Asbeck et al, 1985; Agar et al, 1986).

6.2 Marcadores de estrés oxidativo valorados por gravedad de la bronquiolitis aguda

Los resultados de este estudio muestran que los lactantes ingresados de BA-VRS tienen cambios estadísticamente significativos en algunos de los parámetros de EO medidos en sangre. Se ha constatado un aumento en GSSG y disminución del

cociente GSH/GSSG en los lactantes con BA en comparación con el grupo control (tabla 33), sin mostrar alteraciones en otros marcadores de oxidación como LPO ni en los sistemas antioxidantes estudiados (GSH y GPx) (tabla 32).

La significación estadística se mantiene en ambos parámetros al ser estudiado por subgrupos en función de la gravedad. El ratio GSH/GSSG disminuye progresivamente con la gravedad de BA, tanto en las BA moderada-graves según la escala de WDF (tabla 33), como en los niños que precisaron oxigenoterapia (tabla 35). Mientras que el aumento de la GSSG es significativo sólo al valorarse la gravedad según la necesidad de oxigenoterapia, encontrándose elevada de forma estadísticamente significativa en las BA que precisaron la administración de O₂ frente a las que no lo requirieron (tabla 35).

6.3 Alteración de marcadores de EO a nivel sistémico en BA: ¿Significación clínica?

Aunque existen diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de EO entre los lactantes ingresados por BA y los controles, fundamentalmente en las BA al ser valorados por gravedad, no se puede afirmar que este resultado, tenga relevancia clínica, ya que la diferencias cuantitativas de dichos marcadores ha sido mínima. Por tanto dudamos del interés, como factores predictivos de gravedad en la BA, de la medición de los biomarcadores de EO a nivel sistémico, de acuerdo con nuestros resultados.

6.4 Marcadores de estrés oxidativo sistémico en Bronquiolitis Aguda-VRS

En los estudios previos, se ha evidenciado el aumento de parámetros de EO en células del epitelio respiratorio tras ser infectadas por VRS (Hosakote et al, 2012). La mayoría de las publicaciones, han estudiado cómo el VRS es capaz de inducir EO in vitro (Mochizuki et al, 2009; Hosakote et al, 2009; Hosakote et al, 2011) o en un modelo murino (Castro et al, 2006). Estos autores han demostrado que el VRS favorece el EO, porque se ha observado que origina cambios progresivos desde el inicio de la infección, con aumento en la liberación de productos de lipoperoxidación y reducción del ratio GSH/GSSG (Hosakote et al, 2009; Castro et al, 2006). La alteración en los sistemas antioxidantes ha sido demostrada en cultivo de células epiteliales infectadas por VRS, en los que se evidenciaba un aumento significativo de los productos de lipoperoxidación junto con la reducción progresiva del índice GSH/GSSG (Hosakote et al, 2009).

Hosakote et al. (2011), ha estudiado biomarcadores de EO en niños y los han correlacionado con la clínica en BA, demostrando que la disminución de enzimas

antioxidantes como SOD, CAT, Gpx y GST se correlacionaban con la gravedad de la infección por VRS.

En este estudio los parámetros de EO alterados son los que afectan al equilibrio del sistema glutatión (intercambio de reacciones entre GSH y GSSG) con el predominio de sus formas oxidadas. En condiciones normales, GSH es convertida en glutatión oxidada (GSSG) mediante la intervención de la glutatión-peroxidasa selenio-dependiente. Posteriormente la GSSG es de nuevo reducida a su forma GSH por la intervención de GSSG reductasa (GSSG-R), ambas enzimas glutatión-dependientes, son las encargadas de mantener el equilibrio en el ratio GSH/GSSG a nivel celular, de lo contrario, si se desequilibra genera EO (Al-Turk et al, 1987). Las funciones celulares son activadas/ desactivadas por el equilibrio del estado reducción-oxidación (redox) que a su vez se afecta por el ambiente que le rodea en condiciones patológicas como parece ser el caso en las infecciones virales. Tanto en pacientes adultos con síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) (Bunnell et al, 1993) como en aspirado broncoalveolar de asmáticos (Kelly et al, 1999) se ha relacionado la inflamación en la vía aérea mediada por EO con aumento de niveles en GSSG. En células del epitelio respiratorio durante la infección por VRS también se ha objetivado un desequilibrio redox tiempo-dependiente hacia formas oxidadas (con aumento de GSSG) y disminución del ratio GSH/GSSG que conduce a daño a nivel del epitelio de las vías aéreas (Mochizuki et al, 2009).

Los resultados de este estudio indican un incremento en la producción de EROS, con aumento en la oxidación de moléculas de GSH, objetivado por incrementos de los niveles de GSSG y la disminución del cociente GSH/GSSG, junto con la eficacia de los sistemas antioxidantes en la homeostasis reducción-oxidación, por la no existencia de cambios en los indicadores directos de daño oxidativo (LPO), pese al aumento de moléculas oxidadas. La importancia de la disminución hallada en el ratio GSH/GSSG radica en que supone ser el marcador precoz y específico en la alteración del equilibrio redox y de daño por EO, ya que pueden existir cambios en él sin hallar alteración en otros biomarcadores de EO (Pittaluga et al, 2006), por lo que podría ser de interés el estudio de dichos marcadores en la evolución del proceso. En este trabajo los parámetros de EO sólo se estudiaron estudiados al ingreso.

7. Vitamina D

7.1 Prevalencia del déficit de vitamina D

En nuestro trabajo hemos encontrado niveles de vitamina D significativamente más bajos en los niños ingresados por BA que en el grupo control (tabla 36 y figura 48). Los niños clasificados con BA clasificada como moderada-grave presentaron los niveles más bajos de vitamina D (tabla 37), sin embargo no existía diferencia significativa en

dicho parámetro entre las bronquiolitis leves y las moderada-graves (tabla 37, figura 49). Es de destacar que la prevalencia de la deficiencia de vitamina D en los niños ingresados por BA es mayor que lo publicado en la literatura hasta la fecha (McNally et al, 2009; Roth et al, 2007; Pludowski et al, 2014). Nuestros resultados demuestran que existe una correlación inversa significativa entre los niveles de vitamina D y la gravedad de la BA (tabla 39), lo que sugiere una posible relación entre el parámetro estudiado y la gravedad del cuadro. No obstante no se puede afirmar que este déficit de niveles de la 25(OH) D esté directamente relacionada con la gravedad o que exista una relación causal.

7.2 Relación de la vitamina D e infecciones de vías respiratorias inferiores

Se ha descrito la existencia de déficit de vitamina D en relación con una mayor incidencia de IVRI. Este hallazgo se ha confirmado desde el periodo neonatal, en un estudio que incluye a neonatos (Karatekin et al, 2007) y también en niños de hasta 18 meses (edad media de 4,2 meses), en los que se demuestra la existencia de una asociación significativa entre los niveles subóptimos de vitamina D y la mayor incidencia de IVRI durante los años de seguimiento (Roth et al, 2010). Hay trabajos que además de estudiar dicha asociación, la relacionan con la gravedad de las infecciones respiratorias. En este sentido, Inamo et al, 2011, analizaron retrospectivamente a niños menores de 4 años hospitalizados por IVRI, concluyendo que niveles de 25 (OH) D < de 10 ng/ml se relacionaban con la gravedad de la IVRI.

No obstante, otros estudios publicados no encuentran asociación entre el déficit de vitamina D y las infecciones respiratorias (Roth et al, 2007; McNally et al, 2009). Roth et al, 2007, estudiaron niños ingresados por IVRI entre 1 y 25 meses (media de 13.3 meses), observando que no existían diferencias significativas en la prevalencia de insuficiencia de vitamina D entre los casos y los controles. McNally et al, 2009, valoraron niños menores de 5 años ingresados por IVRI, y aunque no encontraron diferencias entre los niveles de vitamina D de los casos de IVRI frente al grupo control, sí observaron que los casos que precisaron ingreso en la UCIP tenían déficit de vitamina D, por lo que en este estudio se sugiere como posible parámetro que influye en la gravedad de la IVRI.

Belderbos et al, 2011, analizaron los niveles de vitamina D en sangre de cordón umbilical en una cohorte de recién nacidos, que fueron seguidos durante el primer año de vida. Demostraron que los que presentaban niveles de vitamina D deficientes al nacimiento tenían un riesgo más elevado de presentar IVRI durante el primer año de vida. Camargo et al, 2011, ratificaron en un trabajo de similar diseño los resultados anteriores, al observar que los niveles de vitamina D bajos en sangre de cordón se

asociaban con un riesgo aumentado de infecciones respiratorias a los 3 meses de edad y sibilancias recurrentes en los primeros años de vida. Sin embargo, recientemente ha sido publicado un trabajo en el que se apunta que la existencia de hipovitaminosis D en sangre de cordón de neonatos sanos no se asocia con un riesgo aumentado de BA en los primeros meses de vida (Shin et al, 2013).

7.3 Factores asociados al déficit de vitamina D

Analizando los niveles de vitamina D encontrados en los niños de nuestro grupo control, éstos son acordes con los obtenidos en publicaciones previas (Greer et al, 1981; McNally et al, 2009; Roth et al, 2007), especialmente si tenemos en cuenta estudios realizados en España, aunque en diferentes latitudes (Alonso et al, 2011; Gallo et al, 2013). En este sentido, además del área geográfica en la que el estudio es realizado, para valorar los niveles de vitamina D en lactantes, hay que tener en cuenta la influencia de otros factores asociados como son la edad, época del año, suplementación de vitamina D, pigmentación de la piel y el tiempo de exposición solar. Así como el uso de protector solar y tipo de alimentación recibida (Gordon et al, 2008). En este trabajo todos los lactantes incluidos tenían las mismas características ya que pertenecían al mismo hospital, se estudiaron en la misma época del año (invierno) y se trataba de casos con BA de edad similar. Se intentó que los controles fueran lactantes de edad parecida a los casos de BA. Por ello, además de la posible variabilidad genética inherente a cada sujeto incluido, se valoró como factores de interés la suplementación de vitamina D, la exposición solar y el tipo de alimentación recibida. La hipovitaminosis D en el primer año de vida se ha asociado a la alimentación con lactancia materna sin suplementación de vitamina D. En estas variables no obtuvimos diferencias entre casos y controles, por lo que las diferencias halladas en los niveles de vitamina D entre ambos grupos en este estudio, no pueden ser atribuidas a dichos factores (tabla 21).

7.4 Acción inmunomoduladora de la vitamina D

La relación de niveles bajos de vitamina D y BA, e incluso con la gravedad de BA, pone en relieve el papel que pueda desempeñar la vitamina D en la respuesta inmune, respaldado por la identificación de receptores de vitamina D (VDR) en células del sistema inmune y también en células del epitelio respiratorio (Baeke et al, 2010; Hewison, 2010).

Todas las publicaciones reseñadas, junto los resultados obtenidos en este trabajo, apoyan la importancia de los niveles de vitamina D en las IVRI. Se considera que puede ser debido a la actividad que la vitamina D parece desempeñar en la respuesta inmune innata y a que favorece acciones antimicrobianas (Hewison, 2010 y

2012). Diferentes estudios han ratificado que la vitamina D ocupa un papel principal en el desarrollo de la respuesta inmune innata mediante la estimulación de la producción de péptidos antimicrobianos tales como las catelicidinas y defensinas (Bozzetto et al, 2012; Hewison, 2012; Liu et al, 2006), que ayudarían a prevenir infecciones por bacterias y virus, como el VRS entre otros (Liu et al, 2006). De hecho se ha asociado la existencia de niveles bajos de la catelicidina hCAP-18 en niños menores de 2 años hospitalizados por BA-VRS, asociándose con la gravedad del cuadro (Mansbach et al, 2012).

En concreto, frente a VRS, recientemente se ha descrito la existencia de SNPs en genes relativos a la respuesta innata, que incluirían al receptor de vitamina D, y predecirían la susceptibilidad en los sujetos portadores a padecer BA-VRS (Janssen et al, 2007; McNally et al, 2013; Stoppelenburg et al, 2014). También han sido descritas variantes genéticas de la proteína de unión de la vitamina D que influirían en la función intracrina y endocrina de la vitamina D (Hansdottir et al, 2010; Hewison, 2010). Por otro lado, Randolph et al, 2014, han sugerido que existen haplotipos de la proteína de unión de la vitamina D (VDBP, globulina GC) que aumentarían el riesgo de BA-VRS, en concreto el haplotipo GC1 que este generaría menor disponibilidad de vitamina D libre.

7.5 Niveles adecuados de vitamina D

Aunque se ha señalado la importancia de mantener una concentración plasmática de vitamina D superior a 30 ng/ml, incluso para las acciones no esqueléticas de la vitamina (Henry, 2011; Holick, 2007; Hollis 2010), actualmente el nivel considerado óptimo para la vitamina D no está claro, ni existen puntos de corte universalmente aceptados para considerar niveles mínimos de vitamina D necesarios para el correcto desarrollo de su función en el sistema inmune. El Instituto de Medicina de Estados Unidos ha establecido como niveles de vitamina D suficientes a valores > 20 ng/ml (50 nmol/l) para el metabolismo calcio-fósforo y el desarrollo de su actividad inmunológica, concluyendo que no existe de momento evidencia para recomendar activamente la suplementación de la vitamina D por encima de dicho valor (Ross et al, 2011). No obstante, la guía de práctica clínica y consenso publicada por la Sociedad de Endocrinología de Estados Unidos (Holick et al, 2011) así como la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) (Braegger et al, 2013)., define la deficiencia de vitamina D como niveles de 25(OH) D menores de 20 ng/ml (50 nmol/L) y la insuficiencia a los valores entre 21 y 29 ng/ml (52.5 a 72.5 nmol/L), recomendando niveles de 25 OHD superiores a 30 ng/ml para la salud ósea y del sistema inmune.

7.6 Niveles bajos de vitamina D: ¿causa o consecuencia de la infección respiratoria?

El sentido de la relación entre BA y niveles bajos de vitamina D encontrados en este estudio es una cuestión que queda sin respuesta. No se puede afirmar que exista una relación causal, ni tampoco que sea un efecto propio de la infección. Una hipótesis que explicaría la existencia de déficit de vitamina D en BA sería la existencia de una predisposición previa en lactantes susceptibles a dicha patología, en los que existirían niveles subóptimos de vitamina D desde el nacimiento, hipótesis apoyada por recientes publicaciones (Belderbos et al, 2011; Camargo et al, 2011). Otra hipótesis para justificar los niveles bajos de vitamina D es que sería consumida durante la infección, dada la acción antimicrobiana atribuida a la vitamina D, y por tanto el hallazgo sería consecuencia de la BA.

7.7 Suplementación de la vitamina D

Se ha establecido que dada la alta prevalencia de hipovitaminosis D en los niños ingresados por BA, y de acuerdo con las últimas guías de práctica clínica publicadas por la Sociedad de Endocrinología de Estados Unidos y la ESPGHAN, es recomendable la suplementación con vitamina D 400 UI/ día a los lactantes menores de un año, y 600 UI/día a los niños mayores de 1 año, y de esta forma mantener unos niveles óptimos de vitamina D, superiores a 30 ng/ml (Holick et al, 2011; Braegger et al, 2013).

En el momento actual los estudios realizados no han arrojado resultados concluyentes, en cuanto a la necesidad de suplementar de forma generalizada a los lactantes. Es la medida que se supone que es la más eficiente para asegurar unos niveles adecuados de vitamina D mediante la suplementación sistemática. Por ello, debe ser apoyada así como la promoción de una correcta educación sanitaria a la población respecto a establecer una dieta y tiempo de exposición solar adecuados durante la infancia.

VI.CONCLUSIONES

VI. Conclusiones

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral permite extraer las siguientes conclusiones:

- 1- En los lactantes ingresado por BA-VRS, en el aspirado nasal los niveles de las citoquinas y quimiocinas estudiados, ajustados por la edad, están significativamente elevados.
- 2- Al valorar la gravedad de BA-VRS por la necesidad de oxigenoterapia, en el aspirado nasal existen diferencias significativas en los niveles de IL-6 y MIP-1 β , estando estos parámetros elevados en los lactantes que requirieron oxigenoterapia. El cociente IL4/ FN γ , representativo de la relación entre las respuestas Th1/Th2, esta descendido en el grupo con BA-VRS, lo que parece indicar la existencia de un predominio de la respuesta Th1 en BA-VRS.
- 3- En plasma sanguíneo, al comparar las citoquinas y quimiocinas proinflamatorias en los lactantes con BA-VRS con el grupo control, se detectó elevación significativa de IL-8 y disminución de MIP-1 α y MIP-1 β , siendo los niveles del resto de citoquinas similares en ambos grupos.
- 4- Los niveles plasmáticos de MIP-1 β se encontraron significativamente disminuidos en los pacientes que precisaron oxigenoterapia o presentaban al ingreso una puntuación en la escala de WDF moderada-grave, con respecto a formas de BA leves y a lactantes sanos del grupo control.
- 5- No se encontró correlación significativa entre los niveles de citoquinas medidos en aspirado nasal y plasma. Se objetivo una correlación directa para IL-8, mientras que para MIP-1 α y MIP-1 β se halló una correlación inversa elevadas en aspirado nasal y descendidas en plasma
- 6- Al analizar en plasma el estrés oxidativo en relación con la gravedad de BA en el escala de WDF, solo resultó significativo el cociente GSH/GSSG, que esta significativamente disminuido en los casos de BA-VRS. Siendo mayor la disminución en los casos moderados graves.
- 7- Al estudiar el estrés oxidativo por la necesidad de oxigenoterapia al ingreso en BA-VRS se encontró GSSG significativamente elevado en los lactantes que precisaron oxigenoterapia. El cociente GSH/GSSG continuó estando disminuido en los casos de BA-VRS más graves.
- 8- Los niveles de 25(OH) D en los casos con BA que requirieron ingreso son significativamente más inferiores que en los lactantes sanos del grupo control. La prevalencia de niveles sub-óptimos de vitamina D en el grupo de BA fue muy elevada.
- 9- Al considerar la serie de BA se encontró una correlación significativa inversa entre los niveles séricos de 25(OH) D y la gravedad de la BA, de forma que

VI. Conclusiones

por cada punto que aumenta la puntuación de la escala WDF, la 25(OH) D disminuyó un promedio de 5.56 ng/ml, una vez ajustado por el resto de las variables estudiadas.

VII.RESUMEN

Introducción.

La bronquiolitis aguda (BA) es la infección respiratoria aguda de las respiratorias inferiores más frecuente en los primeros años de la vida, constituyendo la principal causa de ingreso hospitalario en lactantes durante los meses de otoño-invierno.

El virus respiratorio sincitial (VRS), como agente etiológico, ha infectado a prácticamente toda la población infantil a los 2 años de edad. En la mayoría se manifiesta sólo con afectación de las vías respiratorias superiores, aunque en el 30% de los casos produce infección de vías respiratorias bajas (BA), de ellas entre el 1-5% precisan ingreso hospitalario (5-16% de éstos precisan ingreso en cuidados intensivos), con una mortalidad estimada del 1 % en niños sanos y del 3-5 % si existe enfermedad cardíaca, pulmonar u otras patologías de base.

Actualmente se desconoce por qué un grupo diferenciado de niños desarrolla la infección de forma más grave, aunque en la mayoría de estos pacientes aparentemente no existen factores de riesgo para que cursen con una mayor severidad. Por ello en este trabajo se han estudiado diferentes parámetros relacionados con la respuesta inmunológica-inflamatoria y éstos a su vez con la gravedad del proceso:

-Citoquinas-quimiocinas. En los niños con BA se produce una respuesta inflamatoria tras la entrada del virus en las células epiteliales de la mucosa de las vías respiratorias. Estas producen diversas citoquinas y quimiocinas entre otros mediadores inmunológicos que regulan la respuesta inflamatoria local frente a la infección aguda, con el reclutamiento y la activación de neutrófilos y células mononucleares. Se ha sugerido que el equilibrio en la producción de citoquinas/ quimiocinas de las 2 subclases de linfocitos T helper (Th 1 y Th2) podría alterarse induciendo una respuesta inmune que podría relacionarse con la gravedad de la enfermedad.

-Biomarcadores de estrés oxidativo. Se ha publicado que el VRS induce estrés oxidativo con daño celular como consecuencia de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y defensas antioxidantes celulares e incluso induce especies reactivas de oxígeno, requeridas para la expresión de citoquinas.

-Vitamina D. Ha sido sugerido que la disminución de los niveles de vitamina D (25(OH) D) podría predisponer a una mayor incidencia de infecciones respiratorias de la vía aérea superior e inferior. Asimismo la 1-25 OH vitamina D tiene acción inmunorreguladora y puede influir en la respuesta inmune a la infección viral por sus propiedad antimicrobiana como ha sido recientemente publicado.

Contenido de la investigación

En el presente estudio se incluyeron todos los niños ingresados por BA, sin antecedentes personales de interés, durante la temporada epidémica de 2009-2010 en

VII. Resumen

el Hospital universitario Reina Sofía de Córdoba, Durante el mismo período se reclutaron una serie de niños sanos de similar edad. Al ingreso se recogieron los datos clínicos de interés mediante una entrevista clínica con los padres que incluyó antecedentes personales, familiares así como clínica de presentación y duración del cuadro clínico. Se evaluó la gravedad de la bronquiolitis mediante la aplicación de la escala Wood-Downes modificada por Ferrés y la necesidad de oxigenoterapia en las primeras 24 horas del ingreso, estableciéndose grupos de gravedad para analizar los parámetros estudiados.

Resultados.

- Existe un predominio relativo de la respuesta Th1 por las citoquinas estudiadas en secreción nasal, con la ratio IL4/ IFN γ descendida en comparación con los controles (0.02 ± 0.005 vs 2.57 ± 7.41 respectivamente; p: 0,009). De los marcadores de inflamación plasmáticos sólo los niveles de IL-8 estaban aumentados ($1,12 \pm 0,66$ vs $2,15 \pm 2,09$; p: 0,047) y los de MIP-1 α y MIP-1 β descendidos ($2,82 \pm 1,47$ vs $1,90 \pm 1,67$; p: 0.017 y $626,46 \pm 445,84$ vs $443,88 \pm 303,6$; p: 0.002 respectivamente) en comparación con el grupo control. El MIP-1 β se encontraba descendido en niños con score moderado-grave y los que precisaron oxígeno (O₂).

- El ratio GSH/ GSSG estaba disminuido comparado con el grupo control, existiendo diferencias estadísticamente significativas en relación con la gravedad de la enfermedad ($0,58 \pm 0,03$ vs $0,54 \pm 0,04$ vs $0,50 \pm 0,05$; p<0.001).

- Los niveles de vitamina D eran deficientes en comparación con los controles (38.2 (26.1; 48) vs 29.9 (21.4; 37.5); p= 0.022), y aunque no existían diferencias estadísticamente significativas en subgrupos de gravedad, los niños con bronquiolitis moderada-grave presentaron los niveles más bajos.

Conclusiones

Se produce un aumento significativo de IFN- γ en relación con el aumento de IL-4 en el exudado nasal de los lactantes con BA-VRS, por lo que parece existir un relativo predominio de la respuesta Th1 en este grupo. A nivel de exudado nasal existe un aumento de IL-6 y MIP-1 β relacionado con la necesidad de O₂ en los lactantes con BA-VRS. En el grupo de BA-VRS no se detecta respuesta inflamatoria a nivel sistémico. Con respecto al estudio del estrés oxidativo en las BA-VRS, se detecta en los pacientes más graves un menor ratio GSH/GSSG. Se han evidenciado niveles significativamente más bajos de vitamina D en los lactantes ingresados por BA al compararlos con el grupo control sin patología respiratoria.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. Bibliografía

Aberle JH, Aberle SW, Dworzak MN, Mandl CW, Rebhandl W, Vollnhofer G, Kundi M, Popow-Kraupp T. Reduced interferon-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells of infants with severe respiratory syncytial virus disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1263-8.

Adam L, Bouvier M, Jones T.L. Nitric oxide modulates beta -adrenergic receptor palmitoylation and signaling. *J. Biol. Chem.* 1999 274, 26337–26343.

Adams JS, Chen H, Chun R, Ren S, Wu S, Gacad M, Nguyen L, Ride J, Liu P, Modlin R, Hewison M. Substrate and enzyme trafficking as a means of regulating 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis and action: the human innate immune response. *J Bone Miner Res.* 2007;22 :V20-4.

Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105, 121-126.

Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis.* 2007 1;44:904-10.

Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, TivelJung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:12891-6.

Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Biol Med* 2000; 28: 463–499.

Aloia JF, Patel M, Dimaano R, Li-Ng M, Talwar SA, Mikhail M, Pollack S, Yeh JK. Vitamin D intake to attain a desired serum 25-hydroxyvitamin D concentration. *Am J Clin Nutr.* 2008 ;87:1952-8.

Alonso Fernández J, Roine I, Vasquez A, Cáneo M. 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;16:81-90.

Alonso MA, Prieto ML. Profilaxis con vitamina D. Recomendaciones durante la lactancia. *An Pediatr Contin* 2010; 8 : 212-6.

Al-Shehri MA, Sadeq A, Quli K. Bronchiolitis in Abha, Southwest Saudi Arabia: viral etiology and predictors for hospital admission. *West Afr J Med.* 2005;24:299---304.

Amat, F Henquell, C Verdan, M Roszyk, L Mulliez, A Labbé, A. Predicting the severity of acute bronchiolitis in infants: Should we use a clinical score or a biomarker?. *Journal of medical virology.* 2013; 9999: 1-9.

American Academy of Pediatrics (AAP) Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics.* 2006;118:1774–93. 88.

American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. Reassessment of the indications for ribavirin therapy in Respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics.* 1996; 97:137–40.

VIII. Bibliografía

American Academy of Pediatrics. Sección 3: Resúmenes de enfermedades infecciosas: Gripe. En: Pickerin LK, Baker CJ, Long SS, McMillan JA, Dirs. Red Book: Enfermedades infecciosas en Pediatría. 27ªed. Editorial Médica Panamericana: Madrid; 2007: 406-417.

Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*. 2008; 20;372:1107-19.

Antunes H, Rodrigues H, Silva N. Etiology of bronchiolitis in a hospitalized pediatric population: Prospective multicenter study. *J Clin Virol* 2010; 48:134-6.

Arneil GC. Nutritional rickets in children in Glasgow. *Proc Nutr Soc* 1975; 34: 101-9.

Arora B, Mahajan P, Zidan MA, Sethuraman U. Nasopharyngeal airway pressures in bronchiolitis patients treated with high-flow nasal cannula oxygen therapy. *Pediatr Emerg Care* 2012; 28:1179.

Awomoyi AA, Rallabhandi P, Pollin TI, Lorenz E, Sztejn MB, Boukhvalova MS, Hemming VG, Blanco JC, Vogel SN. Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children. *J Immunol*. 2007; 1;179:3171-7.

Bacharier LB, Guilbert TW, Zeiger RS, Strunk RC, Morgan WJ, Lemanske RF Jr, Moss M, Szefer SJ, Krawiec M, Boehmer S, Mauger D, Taussig LM, Martinez FD. Patient characteristics associated with improved outcomes with use of an inhaled corticosteroid in preschool children at risk for asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123:1077-82, 1082.e1-5.

Bacharier LB, Cohen R, Schweiger T, Yin-Declue H, Christie C, Zheng J, Castro M. Determinants of asthma after severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 130, 91-100.

Bachrach VRG, Schwarz E, Bachrach LR. Breastfeeding and the risk of hospitalization for respiratory disease in infancy: a meta-analysis. *Archives of pediatrics adolescent medicine*. 2003; 157, 237-243.

Bajcetic M, Ilic K, Singh NM, Novakovic I, Vukotic M, Nedeljkovic S, Simeunovic S. Cardiovascular risk factors and blood pressure in a primary care unit: Yugoslav Study of the Precursors of Atherosclerosis in School Children (YUSAD). *Exp Clin Cardiol*. 2006 Summer; 11:89-93

Bajcetic M, Jelisavcic M, Mitrovic J, Divac N, Simeunovic S, Samardzic R, Gorodischer R. Off label and unlicensed drugs use in paediatric cardiology. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005; 61:75-9.

Balaguer Santamaría A, Buñuel Álvarez JC, González de Dios J. El suero salino hipertónico nebulizado puede disminuir la duración del ingreso hospitalario en lactantes con bronquiolitis aguda. *Evid Pediatr* 2009; 5:5.

VIII. Bibliografía

Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Panizzolo C, Zanin ME, Zuin R, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 1;174:975-81.

Braegger C, Campoy C, Colomb V, Decsi T, Domellof M, Fewtrell M, Hojsak I, Mihatsch W, Molgaard C, Shamir R, Turck D, van Goudoever J; ESPGHAN Committee on Nutrition. Vitamin D in the healthy European paediatric population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;56:692-701

Belderbos, M. E Houben, M. L Wilbrink, B Lentjes, E Bloemen, E. M Kimpen, J. L Bont, L. Cord blood vitamin D deficiency is associated with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatrics.* 2011; 127, e1513-e1520.

Bendelja K, Gagro A, Bace A, Lokar-Kolbas R, Krsulovic-Hresic V, Drazenovic V, Mlinaric-Galinovic G, Rabatic S. Predominant type-2 response in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection demonstrated by cytokine flow cytometry. *Clin Exp Immunol.* 2000 ;121:332-8.

Bennett BL, Garofalo RP, Cron SG, Hosakote YM, Atmar RL, Macias CG, Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2007; 195:1532-40.

Bentur L, Shoseyov D, Feigenbaum D, Gorichovsky Y, Bibi H. Dexamethasone inhalations in RSV bronchiolitis: a double-blind, placebo-controlled study. *Acta Paediatr.* 2005;94:866–71.

Bermejo-Martin JF, Bernardo D, Dominguez-Gil M, Alonso A, Garcia-Arevalo MC, Pino M, de Lejarazu RO, Eiros JM, Ardura J, León AJ, Garrote JA, Resino S, Blanco-Quiros A, Muñoz-Fernández MA, Arranz E. Interleukin (IL)-1beta, IL-6 and IL-8 in nasal secretions: a common role for innate immunity in viral bronchial infection in infants? *Br J Biomed Sci.* 2006;63:173-5.

Bermejo-Martin JF, Garcia-Arevalo MC, Alonso A, De Lejarazu RO, Pino M, Resino S, Tenorio A, Bernardo D, Leon AJ, Garrote JA, Ardura J, Dominguez-Gil M, Eiros JM, Blanco-Quiros A, Munoz-Fernandez MA, Kelvin DJ, Arranz E. Persistence of proinflammatory response after severe respiratory syncytial virus disease in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 ;119:1547-50.

Bermejo-Martin JF, Garcia-Arevalo MC, De Lejarazu RO, Ardura J, Eiros JM, Alonso A, Blanco-Quiros A. Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children. *European cytokine network.* 2007; 18, 162-167.

Bhalla AK, Amento EP, Serog B, Glimcher LH. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. *J Immunol.* 1984; 133:1748–1754.

Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:26–34.

VIII. Bibliografía

Bilde DD, Nemanic MK, Whitney JO, Elias PW. Neonatal human foreskin keratinocytes produce 1,25-dihydroxyvitamin D. *Biochemistry* 1986;25:1545-1548.

Binkley N, Ramamurthy R, Krueger D. Low vitamin D status: Definition, prevalence, consequences, and correction. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2010; 39: 287-301.

Bisgaard H, Flores-Nunez A, Goh A, Azimi P, Halkas A, Malice MP, Marchal JL, Dass SB, Reiss TF, Knorr BA. Study of montelukast for the treatment of respiratory symptoms of post-respiratory syncytial virus bronchiolitis in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 15;178:854-60.

Bjornson CL, Mitchell I. Gender differences in asthma in childhood and adolescence. *J Gend Specif Med*. 2000;3:57-61.

Blanco A, Arranz E, Garrote JA. Luz solar, vitamina D y tuberculosis. *Bol Pediatr*. 2009; 49: 220-226.

Blanco JCG, Boukhalova MS, Shirey KA, Prince GA, Vogel SN. New Insights for Development of a Safe and Protective RSV Vaccine. *Hum Vaccin*. 2010 27; 6: 482-492.

Boezen HM, Jansen DF, Postma DS. Sex and gender differences in lung development and their clinical significance. *Clin Chest Med*. 2004 ;25:237-45.

Boldyrev A. Discrimination between apoptosis and necrosis of neurons under oxidative stress. *Biochemistry (Mosc)* 2000;65: 834-42

Bonillo Perales A, Díez Delgado Rubio J, Ortega Montes A, Infante Márquez P, Jimenez Liria M, Batllés Garrido J. Comparación con el ImpactRSV Study Group. Antecedentes perinatales y hospitalización por bronquiolitis. *An Esp Pediatr* 2000; 53: 527-32.

Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WMC, Brus F, Draaisma JTM, 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: 1518-1523.

Bont L, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Vught AJ, Kimpen JL. Monocyte interleukin-12 production is inversely related to duration of respiratory failure in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2000 ;181:1772-5.

Bont L, Van Aalderen WMC, Kimpen JLL. Long-term consequence of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Paed Resp Rev* 2000; 1: 221-227.

Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha, 25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol*. 2001; 167:4974-4980.

Boyce TG, Mellen BG, Mitchel EF, Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Ped Infect Dis J* 2006; 25: 410-4.

Brandt CD, Kim HW, Vargosko AJ, Jeffries BC, Arrobio JO, Rindge B, Infections in 18.000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I.

VIII. Bibliografía

Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *Am J Epidemiol* 1969;90:484-500.

Breese C. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001; 344:1917-1926.

Brehm JM, Celedón JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, Laskey D, Sylvia JS, Hollis BW, Weiss ST, Litonjua AA. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 1;179:765-71.

Bressan S, Balzani M, Krauss B, High-flow nasal cannula oxygen for bronchiolitis in a pediatric ward: a pilot study. *Eur J Pediatr* 2013; 172:1649.

Bronchiolitis Guideline, Cincinnati Children's Hospital Medical Center. Evidence based clinical practice guideline for medical management of bronchiolitis in infants year of age or less presenting with a first time episode. Cincinnati: Cincinnati Children's Hospital Medical Center;2005. Disponible en: <http://www.cincinnatichildrens.org/NR/rdonlyres/0B7B99D7-DB3E-4186-B2FC-71539E23421E/0/bronchiolitisguideline.pdf>.

Brooks AM, McBride JT, McConnochie KM, Aviram M, Long C, Hall CB. Predicting deterioration in previously healthy infants hospitalized with respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics*. 1999; 104:463-7.

Buck, R. H Cordle, C. T Thomas, D. J Winship, T. R Schaller, J. P Dugle, J. E. Longitudinal study of intracellular T cell cytokine production in infants compared to adults. *Clinical Experimental Immunology*. 2002;128, 490-497.

Burr ML. Antioxidants and cancer. *J Human Nutr Dietetics* 1994;7:409-16.

Bush A, Thomson AH. Acute bronchiolitis. *BMJ: British Medical Journal*. 2007;335: 1037.

Busse WW. Respiratory infections: their role in airway responsiveness and the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 671-683.

Cade A, Brownlee KG, Conway SP, Haigh D, Short A, Brown J. Randomised placebo controlled trial of nebulised Corticosteroids in acute respiratory syncytial viral bronchiolitis. *Arch Dis Child*.2000;82:126-30.

Calogero C, Sly PD. Acute viral bronchiolitis: to treat or not to treat-that is the question. *J Pediatr*.2007;151:235-7.

Calvo Reya C, García García ML, Casas Flecha I, Martín del Valle F, Centeno Jiménez M, Pérez-Breña P. Infecciones por virus de la gripe en menores de dos años. *An Pediatr (Barc)* 2005;63:22-8.

Camargo CA, Ingham T, Wickens K, Thadhani R, Silvers KM, Epton MJ, Crane J.. Cord-blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma. *Pediatrics*, 127, e180-e187.

VIII. Bibliografía

Cambonie G, Milesi C, Jaber S, Amsallem F, Barbotte E, Picaud JC, Nasal continuous positive airway pressure decreases respiratory muscles overload in young infants with severe acute viral bronchiolitis. *Intensive CareMed*.2008;34:1865—72.

Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, Holick MF, Grant WB, Madronich S, Garland CF, Giovannucci E. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect*. 2006 ;134:1129-40.

Cano J, Zabaleta C, De la Torre E, Yep GA, Melendi JM, Sánchez M. Pre and postnatal tobacco exposure and bronchiolitis. *An Pediatr(Barc)*.2003;58:115—20.

Caramori, G Papi, A . Oxidants and asthma. *Thorax* 2004, 59, 170—173.

Carbonell Estrany X, Quero J. Hospitalization rates for respiratory syncytial virus infection in premature infants born during two consecutive seasons. *Pediatr Infect Dis J*. 2002; 20: 874-9.

Carlberg, I Mannervik, B. Glutathione reductase. *Methods in enzymology* 1984; 113, 484-490.

Carlsen KH, Larsen S, Bjerve O, Leegaard J. Acute bronchiolitis: predisposing factors and characterization of infants at risk. *Pediatr Pulmonol* 1987; 3: 153-60.

Carroll KN, Gebretsadik T, Griffin MR, Dupont WD, Mitchel EF, WuP, Maternal asthma and maternal smoking are associated with increased risk of bronchiolitis during infancy. *Pediatrics*.2007;119:1104---12.

Casola A, Burger N, Liu T, Jamaluddin M, Brasier AR, Garofalo RP. Oxidant tone regulates RANTES gene transcription in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus: role in viral-induced interferon regulatory factor activation. *J Biol Chem* 276: 19715–19722, 2001.

Castro, S. M A. Guerrero-Plata, G. Suarez-Real, P. A. Adegboyega, G. N. Colasurdo, A. M. Khan, R. P. Garofalo, and A. Casola, 2006, Antioxidant treatment ameliorates respiratory syncytial virus-induced disease and lung inflammation: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 174, p. 1361-9.

Chanock RM, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agents: Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* 1957; 66: 281-90.

Chatzimichael A, Tsalkidis A, Cassimos D, Gardikis S, Tripsianis G, Deftereos S, The role of breastfeeding and passive smoking on the development of severe bronchiolitis in infants. *Minerva Pediatr*. 2007;59:199-206.

Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol*. 2007; 179:1634–1647

Cherry JD. Acute bronchitis. En: Feigin RD, Cherry JD, editors. *Textbook of pediatric infectious diseases*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998; p. 242-4.

VIII. Bibliografía

Chesney RW, Zelikovic I. The metabolism of vitamin D and the renal handling of calcium and phosphate. In *Metabolic bone disease in children*. Ed Castelis and Finberg 1990;p:43-70.

Chiba Y, Minagawa T, Mito K. Effect of breast-feeding on responses of systemic interferon and virus-specific lymphocyte transformation in infants with respiratory syncytial virus infection. *J Med Virol* 1987;21:7-14.

Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Deguchi T, Sugiyama K, Azuma E, Sakurai M. CD4+ and CD8+ cell cytokine profiles in neonates, older children, and adults: increasing T helper type 1 and T cytotoxic type 1 cell populations with age. *Cell Immunol*. 1998 1;183:149-56.

Chlebowski RT. Vitamin D and breast cancer: interpreting current evidence. *Breast Cancer Res*. 2011 16;13:217.

Cho HY F, Imani L, Miller-DeGraff D, Walters G A, Melendi M, Yamamoto FP, Polack M, Kleeberger S. Antiviral activity of Nrf2 in a murine model of respiratory syncytial virus disease: *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 179, p. 138-50.

Choi EH, Lee HJ, Yoo T, Chanock SJ. A common haplotype of interleukin-4 gene IL4 is associated with severe respiratory syncytial virus disease in Korean children. *J Infect Dis*. 2002 1;186 :1207-11.

Chung HL, Kim WT, Kim JK, Choi EJ, Lee JH, Lee GH, Kim SG. Relationship between atopic status and nasal interleukin 10 and 11 levels in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005; 94: 267-272.

Cohen SH. Cytokine profile data. *Immunol Today* 2000; 21:199.

Collado F. Bronquiolitis aguda. *An Esp Pediatr* 1985; 23: 445-7.

Colom AJ, Teper AM, Vollmer WM, Diette G B. Risk factors for the development of bronchiolitis obliterans in children with bronchiolitis. *Thorax* 2006;61:503–506.

Comhair, S.A Bhatena, P.R Dweik, R.A Kavuru, M Erzurum, S.C . Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. *Lancet* 2000 355, 624.

Corneli HM, Zorc JJ, Holubkov R, Bregstein JS, Brown KM, Mahajan P, Kuppermann N. Bronchiolitis Study Group for the Pediatric Emergency Applied Research Network. Bronchiolitis: Clinical characteristics associated with hospitalization and length of stay. *Pediatr Emerg Care*.2012;. 28:99–103.

Corneli HM, Zorc JJ, Mahajan P, Shaw KN, Holubkov R, Reeves SD, A multicenter, randomized, controlled trial of Dexamethasone for bronchiolitis. *N Engl J Med*.2007;357:331–9.

VIII. Bibliografía

Cortijo, J Marti-Cabrera, M de la Asuncion, J.G Pallardo, F.V Esteras, A Bruseghini, L Vina, J Morcillo, E.J Contraction of human airways by oxidative stress protection by N-acetylcysteine. *Free Radical Biol. Med.* 1999. 27, 392–400.

Crespo M. Bronquiolitis del lactante. En: Cruz M. *Tratado de Pediatría*. 8ª ed. Madrid: Ergon; 2001.p. 1231-1237.

Crestani E, Guerra S, Wright AL, Halonen M, Martinez FD. Parental asthma as a risk factor for the development of early skin test sensitization in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 ;113:284-90.

Cross CE, Halliwell B, Borisch ET, Pryor WA, Ames BN. Oxygen radicals and human disease. *Ann.Intern.Med* 1995;110: 526-544.

Culley F, Pennycook AM, Tregoning JS, Hussell T, Openshaw PJ. Differential chemokine expression following respiratory virus infection reflects Th1- or Th2-biased immunopathology. *J Virol* 2006;80:4521-7.

Darville T, Yamauchi T. Respiratory syncytial virus. *Paediatr Rev* 1998; 19: 56–61.

Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int.* 2005 ;16:713-6.

De Boeck K. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: clinical aspects and epidemiology. *Monaldi Arch Chest Dis* 1996; 51: 3, 210–213.

DeLuca HF. Vitamin D metabolism and function. En Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York 1979.

DeVincenzo JP. A new direction in understanding the pathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis: how real infants suffer. *J Infect Dis* 2007; 195:1084-6.

Díaz PV, Gaggero AA, Pinto RA, Mamani R, Uasapud PA, Bono MR. Levels of inflammatory cytokines and plasma cortisol in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Rev Med Chil.* 2013;141:574-81.

Díez, J Planelles, V. Vacuna frente al virus respiratorio sincitial. *Anales de Pediatría Continuada.* 2011; 9, 64-68.

Dixon DL, Griggs KM, Forsyth KD, Bersten AD. Lower interleukin-8 levels in airway aspirates from breastfed infants with acute bronchiolitis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010 ;21:e691-6.

Doelman CJA, Bast A. Oxygen radicals in lung pathology. *Free Rad Biol Med* 1990; 9: 381–400.

Domingo A, Trench V, Fasheh W, Quintilla J, Caritg J, Luaces C. Bronquiolitis: factores predictivos de la duración del ingreso hospitalario. *Pediatr Cat.* 2005;65:77–81.

Dornelles CT, Piva JP, Marostica PJ. Nutritional status, breast-feeding, and evolution of infants with acute viral bronchiolitis. *J Health Popul Nutr.* 2007;25:336---43.

VIII. Bibliografía

Downs SH, Marks GB, Sporik R, Belosouva EG, Car NG, Peat JK. Continued increase in the prevalence of asthma and atopy. *Arch Dis Child* 2001; 84: 20–23.

Dulek DE, Peebles Rs. Viruses and asthma. *Biochim Biophys Acta* 2011; 11: 1080-1090.

Dundaroz R U, Erenberk O, Turel AD, Demir E, Ozkaya M, Erel M. Oxidative and antioxidative status of children with acute bronchiolitis: *J Pediatr (Rio J)*. 2013; 89: 407-11.

Durbin JE, Johnson TR, Durbin RK, Mertz SE, Morotti RA, Peebles RS, Graham BS. The role of IFN in respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Immunol*. 2002 Mar 15;168:2944-52.

Dusser DJ, Jacoby DB, DjokicTD, Rubistein I, Borson DB, Nadel JA. Virus induces airway hyperresponsiveness to tachykinins: role of neutral endopeptidase. *J Appl Physiol* 1989; 67: 1504-11.

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289:F8–F28.

Dworski, R Roberts, L.J Murray, J.J Morrow, J.D Hartert, T.V Sheller, J.R . Assessment of oxidant stress in allergic asthma by measurement of the major urinary metabolite of F2-isoprostane, 15-F2t-IsoP \dot{Z} 8-iso-PGF2 α .. *Clin. Exp. Allergy* 2001, 31, 387–390.

Dworski, R. Oxidant stress in asthma. *Thorax* 2000 55, S51–S53.

Earley, M. C Vogt, R. F Shapiro, H. M Mandy, F. F Kellar, K. L Bellisario, R ... Hannon, W. H. Report from a workshop on multianalyte microsphere assays. *Cytometry*. 2002; 50: 239-242.

Erdelmeier I, Gérard-Monnier D, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals: mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res Toxicol*, 1998, 11: 1184-1194.

Empey KM, Orend JG, Peebles RS Jr, Egaña L, Norris KA, Oury TD, Kolls JK. Stimulation of immature lung macrophages with intranasal interferon gamma in a novel neonatal mouse model of respiratory syncytial virus infection. *Plos One*. 2012;7:e40499.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radial Biol Med* 1992;13:341-90.

Everard ML. Current pharmacological treatments for bronchiolitis are useless. The case for the pro's. *Paediatr Respir Rev*. 2006;7: S98–100.

Faber TE, Groen H, Welfing M, Jansen KJ, Bont LJ. Specific increase in local IL-17 production during recovery from primary RSV bronchiolitis. *J Med Virol*. 2012; 84:1084-8.

VIII. Bibliografía

Feltes TF, Cabalka AK, Meissner HC, Piazza FM, Carlin DA, Top FH. Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease. *J Pediatr.* 2003;143:532–40.

Fernández P, Trenholme A, Abarca K, Griffin MP, Hultquist M, Harris B, Losonsky GA; Motavizumab Study Group. A phase 2, randomized, double-blind safety and pharmacokinetic assessment of respiratory syncytial virus (RSV) prophylaxis with motavizumab and palivizumab administered in the same season. *BMC Pediatr.* 2010 3;10:38.

Ferrés, J. Terapia inhalatoria en el lactante. *An Esp Pediatr.* 1992; 36:160-3.

Fetchick DA, Bertolini DR, Saring ES. Production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by human T cell lymphotropic virus-I-transformed lymphocytes. *J Clin Invest* 1986;78 :592-596.

Fitzpatrick , A. M. , W. G. Teague , F. Holguin , M. Yeh , and L. A. Brown .. Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe asthma: evidence for oxidant stress. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009 123 : 146–152 e8.

Fjaerli HO, Bukholm G, Skjaeret C, Holden M, Nakstad B. Cord blood gene expression in infants hospitalized with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2007 1;196:394-404.

Flohé, L Günzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*, 1984; 105, 114.

Flores P, Guimarães J, Videira Amaral JM. Th1 and th2 cytokine expression in nasopharyngeal secretions during acute bronchiolitis in children younger than two years. *Allergol Immunopathol.* 2011;39:3-9.

Fogarty A, Britton J. The role of diet in the aetiology of asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 615–627.

Folkerts, G Kloek, J Muijsers, B.R Nijkamp, F.P 2001. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 251–262.

Forton JT, Rowlands K, Rockett K, Hanchard N, Herbert M, Kwiatkowski DP, Hull J. Genetic association study for RSV bronchiolitis in infancy at the 5q31 cytokine cluster. *Thorax.* 2009 ;64:345-52.

Fox GF, Everard ML, Marsh MJ, Milner AD. Randomised controlled trial of budesonide for the prevention of post-bronchiolitis wheezing. *Arch Dis Child.* 1999;80:343–7.

Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am J Med* 1994;97: 5S-13S.

Freishtat RJ, Iqbal SF, Pillai DK, Klein CJ, Ryan LM, Benton AS, Teach SJ. High prevalence of vitamin D deficiency among inner-city African American youth with asthma in Washington, DC. *J Pediatr.* 2010 ;156:948-52.

VIII. Bibliografía

Freymuth F, Vabret A, Dina J, Cuvillon-Nimal D, Lubin C, Vaudecrane A, Guillois b, Gouarin S, Les virus des bronchiolites aiguës. *Arch Pediatr* 2010;17:1192-201.

Gadomski AM, Brower M. Bronchodilators for bronchiolitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 : CD001266.

Garcia C, Soriano-Fallas A, Lozano J, Leos N, Gomez AM, Ramilo O, Decreased innate immune cytokine responses correlate with disease severity in children with respiratory syncytial virus and human rhinovirus bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31:86-9.

García ML, Calvo Rey C, Quevedo Teruel S, Martínez Pérez M, Sánchez Ortega F, Martín del Valle F, Radiografía de tórax en la bronquiolitis: ¿es siempre necesaria? *An Pediatr* 2004;61: 219 – 219.

García ML, Ordobás Gabin M, Calvo Reya C, González AlvarezM, Aguilar Ruiz J, Arregui Sierra A. Viral infection of the lower respiratory tract in hospitalized infants: etiology, clinical features and risk factors. *An Esp Pediatr*. 2001;55:101---7

García ML, Calvo C, Falcón A, Pozo F, Pérez-Breña P, De Cea JM, Casas I. Role of emerging respiratory viruses in children with severe acute wheezing. *Pediatr Pulmonol*. 2010 ;45:585-91.

García ML, Calvo C, Pérez-Breña P, De Cea JM, Acosta B, Casas I. Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Pediatr Pulmonol*. 2006 ;41:863-71.

Garenne M, Ronsmans C, Campbell H. The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries. *World Health Stat Q* 1992; 45: 180-91.

Garner SS, Wiest DB, Stevens CE, Habib DM. Effect of heliox on albuterol delivery by metered-dose inhaler in pediatric in vitro models of mechanical ventilation. *Pharmacotherapy*. 2006 ;26:1396-402.

Garofalo RP, Haeberle H. Epithelial regulation of innate immunity to respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23:581-5.

Garofalo RP, Hintz KH, Hill V, Patti J, Ogra PL, Welliver RC Sr. A comparison of epidemiologic and immunologic features of bronchiolitis caused by influenza virus and respiratory syncytial virus. *J Med Virol*. 2005 ;75:282-9.

Garofalo RP, Kolli D, Casola A. Respiratory syncytial virus infection: mechanisms of redox control and novel therapeutic opportunities: *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18: 186-217.

Gartner LM, Greer FR. Prevention of rickets and vitamin D deficiency: new guidelines for vitamin D intake. *Pediatrics* 2003;111:908–10.

VIII. Bibliografía

Gdalevich M, Mimouni D, Mimouni M. Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospectives studies. *J Pediatr* 2001; 139:261-66.

Gentile DA, Doyle WJ, Zeevi A, Howe-Adams J, Kapadia S, Trecki J, Skoner DP. Cytokine gene polymorphisms moderate illness severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *Hum Immunol.* 2003;64:338-44.

Gern JE, Brooks GD, Meyer P, Chang A, Shen K, Evans MD, Tisler C, Dasilva D, Roberg KA, Mikus LD, Rosenthal LA, Kirk CJ, Shult PA, Bhattacharya A, Li Z, Gangnon R, Lemanske RF Jr. Bidirectional interactions between viral respiratory illnesses and cytokine responses in the first year of life. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:72-8.

Gill MA, Palucka AK, Barton T, Ghaffar F, Jafri H, Banchereau J, Ramilo O. 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 1;191:1105-15.

Gill MA, Welliver RC. Motavizumab for the prevention of respiratory syncytial virus infection in infants. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 ;9:1335-45.

Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA Jr. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med.* 2009 ;169:384-90.

González de Dios J, Ochoa Sangrador C y Grupo de Revisión del Proyecto aBREVIADO. Conferencia de Consenso sobre bronquiolitis aguda (III): Diagnóstico en la bronquiolitis aguda. Revisión de la evidencia científica. *An Pediatr* 2010; 72 : 221.e1-221.e33.

González de Dios J, Ochoa Sangrador C y Grupo de Revisión del Proyecto aBREVIADO. Conferencia de Consenso sobre bronquiolitis aguda (I): metodología y recomendaciones. *An Pediatr* 2010; 72 : 221.e1-221.e33.

González de Dios J, Ochoa Sangrador C y Grupo de Revisión del Proyecto aBREVIADO. Conferencia de Consenso sobre bronquiolitis aguda (IV): tratamiento de la bronquiolitis aguda. Revisión de la evidencia científica. *An Pediatr* 2010; 72 : 285.e1-285.e42.

González de Dios J, Ochoa Sangrador C y Grupo de Revisión del Proyecto aBREVIADO. Conferencia de Consenso sobre bronquiolitis aguda (V): Prevención de la bronquiolitis aguda. Revisión de la evidencia científica. *An Pediatr (Barc).* 2010;72:353.e1–353.e26.

Gordon CM, Feldman HA, Sinclair L, Williams AL, Kleinman PK, Perez-Rossello J, Cox JE. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy infants and toddlers. *Archives of pediatrics adolescent medicine.* 2008; 162: 505-512.

Gray TK, Lester GE, Lorenc RS. Evidence for extrarenal 1-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D 3 in pregnancy. *Science* 1979;204:131 1-1313.

VIII. Bibliografía

Groothuis, J. R Nishida, H. Prevention of respiratory syncytial virus infections in high-risk infants by monoclonal antibody (palivizumab). *Pediatrics international* 2002; 44: 235-241.

Groves JT. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr. Opin. Chem. Biol* 1999; 3: 226–235.

Gupta A, Bush A, Hawrylowicz C, Saglani S. Vitamin D and asthma in children. *Paediatric respiratory reviews*. 2012;13, 236-243.

Gurkan FY, Atamer A, Ece Y, Kocyigit H, Tuzun M, Mete M. Relationship among serum selenium levels, lipid peroxidation, and acute bronchiolitis in infancy: *Biol Trace Elem Res*.2004; 100:97-104.

Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995 ;41:1819-28.

Halken S, Host A, Nilsson L, Taudorf E. Passive smoking as a risk factor for development of obstructive respiratory disease and allergic sensitization. *Allergy* 1995;50:97-105.

Halliwell B, Aeschbach R Loliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1995 ;33:601-17.

Halliwell B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathol Biol (Paris)*. 1996;44:6-13.

Handforth J, Friedland JS, Sharland M. Basic epidemiology and immunopathology of RSV in children. *Paediatric Respiratory Reviews* 2000; 1, 210–214.

Handforth J, Sharland M, Friedland JS. Prevention of respiratory syncytial virus infection in infants: Palivizumab is effective but too expensive, and vaccines are unavailable as yet. *BMJ: British Medical Journal*.2004; 328: 1026.

Hartling L, Fernandes RM, Bialy L. Steroids and bronchodilators for acute bronchiolitis in the first two years of life: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2011; 342:d1714.

Hassantoufighi A, Oglesbee M, Richter BW, Prince GA, Hemming V, Niewiesk S, Eichelberger MC. Respiratory syncytial virus replication is prolonged by a concomitant allergic response. *Clin Exp Immunol*. 2007 ;148:218-29.

Haynes LM1, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol*. 2001;75:10730-7.

Heaney RP, Armas LA, Shary JR, Bell NH, Binkley N, Hollis BW. 25-Hydroxylation of vitamin D3: relation to circulating vitamin D3 under various input conditions. *Am J Clin Nutr*. 2008 ;87:1738-42.

Heikkinen T, Valkonen H, Lehtonen L, Vainionpaa R, Ruuskanen O. Hospital admission of high risk infants for respiratory syncytial virus infection: implications for palivizumab prophylaxis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*.2005;90:F64–8.

VIII. Bibliografía

Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 ;114:671-6.

Henderson A. Vitamin D and the breastfed infant. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 2005; 34 : 367-372.

Hervás D, Reina J, Yañez A, Del Valle JM, Figuerola J, Hervás JA. Epidemiology of hospitalization for acute bronchiolitis in children: differences between RSV and non-RSV bronchiolitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:1975---81.

Hess AF, Unger LJ. The cure of infantile rickets by artificial light and sunlight. *JAMA* 1921; 77: 39-41.

Hess DR, Acosta FL, Ritz RH, Kacmarek RM, Camargo CA Jr. The effect of heliox on nebulizer function using a beta-agonist bronchodilator. *Chest.* 1999;115:184-9.

Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinology and metabolism clinics of North America.* 2010; 39, 365.

Hoebee B, Rietveld E, Bont L, Oosten M, Hodemaekers HM, Nagelkerke NJ, Neijens HJ, Kimpen JL, Kimman TG. Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms. *J Infect Dis.* 2003 1;187:2-11.

Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol.* 1991;133:1135---51.

Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson S, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:193-204.

Holgate ST. The inflammation-repair cycle in asthma: the pivotal role of the airway epithelium. *Clin Exp Allergy* 1998;28:97-103.

Holgate ST. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 2011;242:205-19.

Holgate ST. Rhinoviruses in the pathogenesis of asthma: the bronchial epithelium as a major disease target. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 118: p. 587-90.

Holick MF, Adonis JS. Vitamin D metabolism and biological function. In *Metabolic bone disease and clinically related disorders.* Avioli Krane 2nd ed. Ed. WB Saunders Company. 1990; p: 155-195.

Holick MF, Feldman D. Photobiology of vitamin D. *Vitamin D* 1997; 33-39.

Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D

VIII. Bibliografía

deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96:1911-30.

Horwitz MS. Adenoviruses. En: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2001; p. 2301-26.

Hosakote YM, Komaravelli N, Mautemps T, Liu RP, Garofalo RP, Casola A. Antioxidant mimetics modulate oxidative stress and cellular signaling in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303: L991-1000.

Hosakote YM, Jantzi PD, Esham DL, Spratt H, Kurosky A, Casola A, Garofalo RP. Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis: *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 1550-60.

Hosakote YM, Liu T, Castro SM, Garofalo RP, Casola A. Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes: *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 41: 348-57.

Huang SH, Cao XJ, Liu W, Shi XY, Wei W. Inhibitory effect of melatonin on lung oxidative stress induced by respiratory syncytial virus infection in mice: *J Pineal Res* 2010; 48:109-16.

Hulsmann AR, Raatgeep HR, den Hollander JC, Stijnen T, Saxena PR, Kerrebijn KF, de Jongste JC. Oxidative epithelial damage produces hyperresponsiveness of human peripheral airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994 149, 519–525.

Hussell T, Pennycook A, Openshaw J. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology. *Eur J Immunol.* 2001; 31: 2566.

Inamo Y, Hasegawa M, Saito K, Hayashi R, Ishikawa T, Yoshino Y, Hashimoto K, Fuchigami T. Serum vitamin D concentrations and associated severity of acute lower respiratory tract infections in Japanese hospitalized children. *Pediatr Int.* 2011 ;53:199-201.

Indukuri H, Castro SM, Liao SM, Feeney LA, Dorsch M, Coyle AJ, Garofalo RP, Brasier AR, Casola A. Ikkepsilon regulates viral-induced interferon regulatory factor-3 activation via a redox-sensitive pathway. *Virology* 353: 155–165, 2006.

Jackson DJ, Lemanske RF Jr. The role of respiratory virus infections in childhood asthma inception. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2010;30:513-22.

Jacobs JD, Foster M, Wan J, Pershad J. 7% hypertonic saline in acute bronchiolitis: a randomized controlled trial. *Pediatrics* 2014; 133:e8.

Janssen R, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers HM, Ermers M, Doornbos G, Hoebee B. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *Journal of Infectious Diseases* 2007;196, 826-834.

VIII. Bibliografía

Jartti T, Kuusipalo H, Vuorinen T, Söderlund-Venermo M, Allander T, Waris M, Hartiala J, Ruuskanen O. Allergic sensitization is associated with rhinovirus-, but not other virus-, induced wheezing in children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21:1008-14.

Jiménez-Jorge S, Ledesma J, León I, Segovia VF, Simón F, de Mateo Ontañón S. Vigilancia de la gripe en España. Evolución de la gripe pandémica por AnH1N1 desde la semana 20/2009 hasta la semana 20/2010. *Boletín epidemiológico semanal* 2010; 18: 137-144.

Jones G, Horst R, Carter G, Makin HLJ. Contemporary diagnosis and treatment of vitamin D-related disorders. *J Bone Miner Res.* 2007 ;22:V11-5.

Jones LL, Hashim A, McKeever T, Cook DG, Britton J, Leonardi-Bee J. Parental and household smoking and the increased risk of bronchitis, bronchiolitis and other lower respiratory infections in infancy: systematic review and meta-analysis. *Respir Res.* 2011;12:5.

Juntti H, Osterlund P, Kokkonen J, Dunder T, Renko M, Pokka T, Julkunen I, Uhari M. Cytokine responses in cord blood predict the severity of later respiratory syncytial virus infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 ;124:52-58.e1-2.

Kajosaari M, Syvanen P, Forars M, Juntunen-Backman K. Inhaled corticosteroids during and after respiratory syncytial virus-bronchiolitis may decrease subsequent asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2000;11:198–202.

Karatekin G, Kaya A, Salihoğlu O, Balci H, Nuhoglu A. Association of subclinical vitamin D deficiency in newborns with acute lower respiratory infection and their mothers. *Eur J Clin Nutr.* 2009 ;63:473-7.

Karron RA. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. En: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, editores. *Vaccines.* 5th edition. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2008. p 1283-94.

Karulin AY, Hesse MD, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. Single-cytokine-producing CD4 memory cells predominate in type 1 and type 2 immunity. *J Immunol.* 2000 15;164:1862-72.

Katsumata U, Miura M, Ichinose M, Oxygen radicals produce airway constriction and hyperresponsiveness in anesthetized cats. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1158–1161.

Kellar KL, Douglass JP. Multiplexed microsphere-based flow cytometric immunoassays for human cytokines. *Journal of immunological methods* 2003; 279, 277-285.

Kellar KL, Kalwar RR, Dubois KA, Crouse D, Chafin WD, Kane BE. Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. *Cytometry* 2001; 45, 27-36.

Kim CK, Choi J, Callaway Z, Kim HB, Chung JY, Koh YY, Shin BM. Clinical and epidemiological comparison of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in Seoul, Korea, 2003-2008. *Korean Med Sci.* 2010;25:342-7.

VIII. Bibliografía

Kjellman N. Natural course of asthma and allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5:13-8.

Kneyber MC, Moons KG, de Groot R, Moll HA. Predictors of a normal chest X ray in respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Pulmonol.*2001;31:277–83.

Kneyber MC, van Woensel JB, Uijtendaal E, Uiterwaal CS, Kimpen JL; Dutch Antibiotics in RSV Trial (DART) Research Group. Azithromycin does not improve disease course in hospitalized infants with respiratory syncytial virus (RSV) lower respiratory tract disease: a randomized equivalence trial. *Pediatr Pulmonol.* 2008.

Koeffler HP, Amatruda T, Ikekawa N, Kobayashi Y, DeLuca HF. Induction of macrophage differentiation of human normal and leukemic myeloid stem cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its fluorinated analogues. *Cancer Res* 1984; 44: 5624-28.

Koehoorn M, Karr CJ, Demers PA, Lencar C, Tamburic L, Brauer M. Descriptive epidemiological features of bronchiolitis in a population-based cohort. *Pediatrics.* 2008;122:1196-203.

Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin SO. Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:965-9.

Kotaniemi-Syrjänen A, Vainionpää R, Reijonen M, Waris M, Korhonen K, Korppi M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy: the first sign of childhood asthma?. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 : 66-71.

Kramer U, Lemmen CH, Behrendt H, The effect of environmental tobacco smoke on eczema and allergic sensitization in children. *Br J Dermatol* 2004; 150:111-8.

Kresfelder TL, Janssen R, Bont L, Venter M. Confirmation of an association between single nucleotide polymorphisms in the VDR gene with respiratory syncytial virus related disease in South African children. *Journal of medical virology*, 2011: 83, 1834-1840.

Krishna MT, Madden J, Teran LM, Biscione GL, Lau LC, Withers NJ, Sandstrom T, Mudway I, Kelly FJ, Walls A, Frew AJ, Holgate ST. Effects of 0.2 ppm ozone on biomarkers of inflammation in bronchoalveolar lavage fluid and bronchial mucosa of healthy subjects. *Eur. Respir. J.* 1998;11: 1294–1300.

Kristjansson S, Bjarnarson SP, Wennergren G, Palsdottir AH, Arnadottir T, Haraldsson A, Jonsdottir I Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses during the first 3 months of life promote a local TH2-like response. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 ;116:805-11.

Kumar J, Muntner P, Kaskel FJ, Hailpern SM, Melamed ML. Prevalence and associations of 25-hydroxyvitamin D deficiency in US children: NHANES 2001–2004. *Pediatrics*, 2009; 124, e362-e370.

Kusel MM, de Klerk NH, Holt PG, Keadze T, Johnston SL, Sly PD. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J.* 2006 ;25:680-6.

VIII. Bibliografía

Kusel MM, de Klerk NH, Kebabze T, Vohma V, Holt PG, Johnston SL, Sly PD. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 ;119:1105-10.

Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang M L, Cent A, Corey L. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J Clin Microbiol* 2006;44:2382–8.

L'Abbé, M. R Fischer, P. W. Automated assay of superoxide dismutase in blood. *Methods in enzymology* 1990; 186, 232-237.

Laham FR, Trott AA, Bennett BL, Kozinetz CA, Jewell AM, Garofalo RP, Piedra PA. LDH concentration in nasal-wash fluid as a biochemical predictor of bronchiolitis severity. *Pediatrics*. 2010;125:e225-33.

Lanctôt KL, Masoud ST, Paes BA, Tarride JE, Chiu A, Hui C, Francis PL, Oh PI. The cost-effectiveness of palivizumab for respiratory syncytial virus prophylaxis in premature infants with a gestational age of 32-35 weeks: a Canadian-based analysis. *Curr Med Res Opin*. 2008;24:3223-37.

Landau LI. Current pharmacological treatments for bronchiolitis are useless. The case for the con's. *Paediatr Respir Rev*. 2006;7:S101–3.

Larsen GL, Colasurdo GN. Neural control mechanisms within airways: disruption by respiratory syncytial virus. *J Pediatr* 1999; 135: 21-7.

Lázaro y de Mercado P, Figueras Aloy J, Doménech Martínez E, Echániz Urcelay I, Closa Monasterolo R, Wood Wood MA, Fitch Warner K. The efficiency (cost-effectiveness) of palivizumab as prophylaxis against respiratory syncytial virus infection in premature infants with a gestational age of 32-35 weeks in Spain. *An Pediatr (Barc)*. 2006 ;65:316-24.

Leader S, Kohlasek K. Recent trends in severe respiratory syncytial virus (RVS) among US infants, 1997 to 2000. *J Pediatr* 2003; 143: S127-32.

Lee CG, Yoon HJ, Zhu Z, Link H, Wang Z, Gwaltney JM. Respiratory syncytial virus stimulation of vascular endothelial cell growth Factor/Vascular permeability factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:662-9.

Leerbeck E, Sondergaard H. The total content of vitamin D in human milk and cow's milk. *Br J Nutr*. 1980; 44 : 7-12.

Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SI, Warner JO. Type 1 and Type 2 Cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 633-9.

Lemanske RF, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Zhanhai L, Shult PA. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116 : 571-7.

VIII. Bibliografía

Levine DA, Platt SL, Dayan PS, Macias CG, Zorc JJ, Krief W. Risk of serious bacterial infection in Young febrile infants with respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*. 2004;113:1728–34.

Levitz R1, Wattier R, Phillips P, Solomon A, Lawler J, Lazar I, Weibel C, Kahn JS. Induction of IL-6 and CCL5 (RANTES) in human respiratory epithelial (A549) cells by clinical isolates of respiratory syncytial virus is strain specific. *Virology*. 2012;109:190-9.

Levy BT, Graber MA. Respiratory syncytial virus infection in infants and young children. *J Fam Pract* 1997; 45: 6, 473–481.

Liet JM, Millotte B, Tucci M, Laflamme S, Hutchison J, Creery D, ; Canadian Critical Care Trials Group. Noninvasive therapy with helium-oxygen for severe bronchiolitis. *J Pediatr*. 2005 ;147:812-7.

Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays*. 2004;26:21-8.

Linneberg A, Simonsen JB, Petersen J, Stensballe LG, Benn CS. Differential effects of risk factors on infant wheeze and atopic dermatitis emphasize a different etiology. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:184–9.

Liu PT, Modlin RL. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol*. 2008 ;20:371-6

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* 279: 2461–2469, 2004.

Lo CW, Paris PW, Clemens TL. Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. *Am J Clin Nutr* 1985;42:644-649.

López-Guinea A, Casado Flores J, Martín Sobrino MA, Espinola Docio B, De la Calle Cabrera T, Serrano A. Bronquiolitis grave. Epidemiología y evolución de 284 pacientes. *An Pediatr* 2007; 67: 116-22.

Lorente F, Laffond E, Moreno E, Dávila I. Infección vírica y asma: mecanismos inmunológicos. *Allergol et Immunopathol* 2001; 29: 126-151

Lowther SA, Shay DK, Holman RC, Clarke MJ, Kaufman SF, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among American Indian and Alaska Native children. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19:11-17.

Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998 12;338 :436-45.

Macartney KK, Gorelick MH, Manning ML, Hodinka RL, Bell LM. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the cost-effectiveness and cost-benefit of infection control. *Pediatrics*. 2000;106:520–6.

Mackie PL, Joannidis PA, Beattie J. Evaluation of an acute point-of-care system screening for respiratory syncytial virus infection. *J Hosp Infect* .2001;48:66–71.

VIII. Bibliografía

MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 2001 19; 429:195-207.

Maldonado AM, Witowski EM, Torres CV, Díaz FM, Taranilla AG, Sabini L, Lorio FB, Panighel SR. Niveles de interferón gamma en niños asmáticos con antecedentes de bronquiolitis y su correlación con otros parámetros de alergia. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* 2006; 37: 52-62.

Malmström K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Sarna S, Lindahl H, Kajosaari M, Turpeinen M, Saglani S, Bush A, Haahtela T, Jeffery PK, Mäkelä MJ. Lung function, airway remodelling and inflammation in symptomatic infants: outcome at 3 years. *Thorax.* 2011 ;66:157-62.

Mandelberg A, Amirav I. Hypertonic saline or high volume normal saline for viral bronchiolitis: mechanisms and rationale. *Pediatr Pulmonol.* 2010;45:36-40.

Mansbach JM, Piedra PA, Borregaard N, Martineau AR, Neuman MI, Espinola JA, Camargo CA Jr. Serum cathelicidin level is associated with viral etiology and severity of bronchiolitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2012; 130: 1007.

Marcinkowska E. A run for a membrane vitamin D receptor. *Biol Signals Recept* 2001; 10:341–349.

Martínez FD, Morgan WJ, Wright AL, Holberg CJ, Taussing LM. Group Health Medical Associates Personnel. Initial airway function is a risk factor for recurrent respiratory illnesses during the first three years of life. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:321-326.

Martínez FD, Morgan WJ, Wright AL, Holberg CJ, Taussing LM. Group Health Medical Associates Personnel. Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants. *N Engl J Med* 1988; 319:1112-1117.

Martínez FD, Taussig LM, Morgan WJ. Infants with upper respiratory illnesses have significant reductions in maximal expiratory flow. *Pediatr Pulmonol* 1990; 9: 91-95.

Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995;332:133-8.

Martinez FD. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics.* 2002 ;109:362-7.

Martinez FD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J.* 2003 ;22:S76-82.

Martinez FD. Toward asthma prevention--does all that really matters happen before we learn to read? *N Engl J Med* 2003; 349:1473-5.

Martinón-Torres F, Rodríguez Núñez A, Martinón Sánchez J. Bronquiolitis y adrenalina: revisando las evidencias. *An Esp Pediatr.* 2002;56:363–4.

Martinón-Torres F, Rodríguez-Núñez A, Martinón-Sánchez J M. Heliox therapy in infants with acute bronchiolitis. *Pediatrics.* 2002;109:68–73.

VIII. Bibliografía

Martinón-Torres F, Rodríguez-Núñez A, Martinón-Sánchez JM. Nasal continuous positive airway pressure with heliox versus air oxygen in infants with acute bronchiolitis: a crossover study. *Pediatrics*. 2008 ;121:e1190-5.

Massaro AF, Mehta S, Lilly CM, Kobzik L, Reilly JJ, Drazen JM, Elevated nitric oxide concentrations in isolated lower airway gas of asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1996; 153: 1510–1514.

Matheu V, Bäck O, Mondoc E, Issazadeh-Navikas S. Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 ;112:585-92.

Maxwell, C. S Carbone, E. T Wood, R. J. Better newborn vitamin D status lowers RSV-associated bronchiolitis in infants. *Nutrition reviews* 2012; 70: 548-552.

McConnochie KM. Bronchiolitis: What's in the name? *Am J Dis Child* 1983; 137: 806.

McNally JD, Leis K, Matheson LA, Karuananyake C, Sankaran K, Rosenberg AM. Vitamin D deficiency in young children with severe acute lower respiratory infection. *Pediatr Pulmonol*. 2009 ;44:981-8.

McNally J, Sampson M, Matheson LA, Hutton B, Little J. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and severe RSV bronchiolitis: A systematic review and meta-analysis. *Pediatric pulmonology*. 2013; 9:1-10

McNamara PS, Flanagan BF, Selby AM, Hart CA, Smyth RL. Pro- and anti-inflammatory responses in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur Respir J*. 2004;23:106-12.

McNamara PS, Smyth RL. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *British Medical Bulletin* 2002; 61: 13-28.

McNamara PS, Flanagan BF, Hart CA, Smyth RL. Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Journal of Infectious Diseases* 2005; 191, 1225-1232.

Meerhoff TJ, Fleming D, Smith A, Mosnier A, van Gageldonk-Lafeber AB, Paget WJ and the EISS RSV Task Group. Surveillance recommendations based on an exploratory analysis of respiratory syncytial virus reports derived from the European Influenza Surveillance System. *BMC Infect Dis* 2006;6:128.

Meissner HC, Long SS. Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*, 2003; 112, 1447-1452.

Mejías A, Chávez-Bueno S, Raynor MB, Connolly J, Kiener PA, Jafri HA, Ramilo O. Motavizumab, A Neutralizing Anti-Respiratory Syncytial Virus (Rsv) Monoclonal Antibody Significantly Modifies The Local And Systemic Cytokine Responses Induced By Rsv In The Mouse Model. *Virology Journal* 2007, 4:109.

VIII. Bibliografía

Mejías A, Dimo B, Suarez NM, García C, Suarez-Arrabal MC, Jartti T, Blanckenship D, Jordan-Villegas A, Ardura MI, Xu Z, Banchereau J, Chaussabel D, Ramilo O. Whole blood gene expression profiles to assess pathogenesis and disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *Plos Med.* 2013; 10 : e1001549.

Melendi GA, Laham FR, Monsalvo AC, Casellas JM, Israele V, Polack NR, Kleeberger SR, Polack FP. Cytokine profiles in the respiratory tract during primary infection with human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, or influenza virus in infants. *Pediatrics.* 2007 ;120:e410-5.

Mella C, Suarez-Arrabal MC, Lopez S, Stephens J, Fernandez S, Hall MW, Ramilo O, Mejías A. Innate immune dysfunction is associated with enhanced disease severity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2013 15; 207 : 564-73.

Milési C, Baleine J, Matecki S, Is treatment with a high flow nasal cannula effective in acute viral bronchiolitis? A physiologic study. *Intensive Care Med* 2013; 39:1088.

Miller EK, Edwards KM, Weinberg GA, Iwane MK, Griffin MR, Hall CB, A novel group of rhinoviruses is associated with asthma hospitalizations. *J Allergy Clin Immunol* 2009, 123:98-104.

Miller EK, Williams JV, Gebretsadik T, Carroll KN, Dupont WD, Mohamed YA, Host and viral factors associated with severity of human rhinovirus-associated infant respiratory tract illness. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:883---91.

Miller JF. Change in IFN- γ producing capacity in early life and exposure to environmental microbes. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1049-51.

Misra M, Pacaud D, Petryck A, Ferrez Collet-Solberg P, Happy M. Vitamin D deficiency in children and its management: Review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics* 2008; 122 : 398-417.

Mochizuki, H. M. Todokoro, and H. Arakawa, 2009. RS virus-induced inflammation and the intracellular glutathione redox state in cultured human airway epithelial cells: *Inflammation*, v. 32, p. 252-64.

Moler FW, Ohmit SE. Severity of illness models for respiratory syncytial virus-associated hospitalization. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:1234-40.

Montuschi, P, Kharitonov, S.A, Ciabattini, G, Corradi, M, van Rensen, L, Geddes, D.M, Hodson, M.E, Barnes, P.J 2000. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 55, 205-209.

Morgan WJ, Martínez FD. Risk factors developing wheezing and asthma in childhood. *Pediatr Clin North Am* 1992; 39:1185-1203.

Moro MR, Bonville CA, Suryadevara M, Cummings E, Faddoul D, Kobayaa H, Branigan PJ, Domachowske JB. Clinical features, adenovirus types, and local production of inflammatory mediators in adenovirus infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 ;28:376-80.

VIII. Bibliografía

Morris JA, Blunt RE, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92:544-50.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986 1;136:2348-57.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73.

Muhe L, Lulseged S, Mason KE, Simoes EA. Case-control study of the role of nutritional rickets in the risk of developing pneumonia in Ethiopian children. *Lancet* 1997;349:1801-4.

Murray CS, Poletti G, Keadze T, Morris J, Woodcock A, Johnston SL, Custovic A. Study of modifiable risk factors for asthma exacerbations: virus infection and allergen exposure increase the risk of asthma hospital admissions in children. *Thorax.* 2006 ;61:376-82.

Najada AS, Habashneh MS, Khader M. The frequency of nutritional rickets among hospitalized infants and its relation to respiratory diseases. *J Trop Pediatr* 2004;50:364-8.

Nandedkar, D. Weihrauch, H. Xu, Y. Shi, T. Feroah, W. Hutchins, D. A. Rickaby, N. Duzgunes, C. A. Hillery, K. S. Konduri, K. A. Pritchard, Jr. D-4F, an apoA-1 mimetic, decreases airway hyperresponsiveness, inflammation, and oxidative stress in a murine model of asthma *J Lipid Res.* 2011; 52: 499–508.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Viral culture* 2004; Proposed standard M41.

National Guideline Clearinghouse (NGC). *Guideline Synthesis. Prevention, diagnosis and treatment of pediatric bronchiolitis.* Disponible en: <http://www.guideline.gov/Compare/comparison.aspx?file=BRONCHIOLITIS1.inc>.

Nazarian S, St Peter JV, Boston RC, Jones SA, Mariash CN. Vitamin D3 supplementation improves insulin sensitivity in subjects with impaired fasting glucose. *Transl Res.* 2011;158:276-81.

Nijkamp FP, Folkerst G. Nitric oxide and bronchial reactivity. *Clin Exp Allergy* 1994;24:905-914.

Noble V, Murray M, Webb MS, Alexander J, Swarbick AS, Milner AD. Respiratory status and allergy nine to 10 years after acute bronchiolitis. *Arch Dis Child* 1997;76:315-9.

Noma T, Mori A, Yoshizawa I. Induction of allergen-specific IL-2 responsiveness of lymphocytes after respiratory syncytial virus infection and prediction of onset of recurrent wheezing and bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1996 ;98:816-26.

VIII. Bibliografía

Oberg F, Botlin J, Nilsson K. Functional antagonisms between vitamin-D3 and retinoic acid in the regulation of CD14 and CD23 expression during monocytic differentiation of U-937 cells. *J. Immunol.*1993; 150:3487–3495.

Ochoa Sangrador C, Castro Rodríguez JA. Los corticoides no son eficaces en la bronquiolitis aguda. *Evid Pediatr* 2007;3:91.

Oddy WH, de Klerk NH, Sly PD, Holt PG. The effects of respiratory infections, atopy and breastfeeding on childhood asthma. *Eur Respir J* 2002;19:899-905.

Oddy WH, Holt PG, Sly PD. Association between breastfeeding and asthma in 6 year old children: findings of a prospective birth cohort study. *BMJ* 1999; 319:815-19.

Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev.* 2004; 5 Suppl A:S119-26.

Ochoa Sangrador C, González de Dios J y Grupo de Revisión del Proyecto aBREVIADO. Conferencia de Consenso sobre bronquiolitis aguda (VI): Pronóstico en la bronquiolitis aguda. Revisión de la evidencia científica. *An Pediatr* 2010; 72 : 354.e1-e34.

Olesen R, Wejse C, Velez DR, Bisseye C, Sodemann M, Aaby P, Rabna P, Worwui A, Chapman H, Diatta M, Adegbola RA, Hill PC, Østergaard L, Williams SM, Sirugo G. DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans. *Genes Immun.* 2007 ;8:456-67.

Omen GS, Goodman GE, Thornquist MD. Effects of combination of beta carotene and Vit. A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;334:1150-5.

Oñoro G, Pérez Suárez E, Iglesias Bouzas MI, Serrano A, Martínez De Azagra A, García-Teresa MA, Casado Flores J. Bronquiolitis grave. Cambios epidemiológicos y de soporte respiratorio. *An Pediatr* 2011 ;74:371-6.

Oñoro G, Pérez Suárez E, Iglesias Bouzas MI, Serrano A, MartínezDe Azagra A, Severe bronchiolitis. Changes in epidemiology and respiratory support. *An Pediatr (Barc).* 2011;74:371-6.

Opavsky MA, Stephens D, Wang EE. Testing models predicting severity of respiratory syncytial virus infection on the PICNIC RSV database. *Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada. Arch Pediatr Adolesc Med.*1995; 149:1217–20.

Openshaw PM, Tregoning JS. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:541-55.

Owen S, Pearson D, Suarez-Mendez V, O'Driscoll R, Woodcock A. Evidence of free-radical activity in asthma. *N. Engl. J. Med.* 1991; 325, 586–587.

Packer L. Vitamin E is nature's master antioxidant. *Sci Am Sci Med* 1994;1:54-63.

VIII. Bibliografía

Pala P, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Metcalfe C, Sigurs N, Openshaw PJ. Enhanced IL-4 responses in children with a history of respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy. *Eur Respir J.* 2002 ;20:376-82.

Panozzo CA, Stockman LJ, Curns AT, Anderson LJ. Use of respiratory syncytial virus surveillance data to optimize the timing of immunoprophylaxis. *Pediatrics.* 2010; 126:e116-23.

Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsoia M. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 165: 1285-1289.

Papenburg J, Boivin G. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2010; 20: 245-260.

Papoff P, Moretti C, Cangiano G, Bonci E, Roggini M, Pierangeli A. Incidence and predisposing factors for severe disease in previously healthy term infants experiencing their first episode of bronchiolitis. *Acta Paediatr.* 2011;100:e17-23

Paredi, P, Kharitonov, S.A, Barnes, P.J 2000. Elevation of exhaled ethane concentration in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1450–1454.

Paricio Talayero JM, Lizán-García M, Otero Puime A, Benlloch Muncharaz MJ, Beseler Soto B, Sánchez-Palomares M, Santos Serrano L, Rivera LL. Full breastfeeding and hospitalization as a result of infections in the first year of life. *Pediatrics.* 2006;118:e92-9.

Park EA. The etiology of rickets. *Physiol Rev* 1923; 3: 106-63.

Parrott RH. Viral respiratory tract illnesses in children. *Bull WHO* 1963;39:629-48.

Pazdiora P, Svobodova S, Fuchsova R, Kucera R, Prazakova M, Vrzalova J, Narsanska A, Strakova M, Treskova I, Pecen L, Treska V, Holubec L Jr, Pesek M, Finek J, Topolcan O. Vitamin d in colorectal, breast, prostate and lung cancer: a pilot study. *Anticancer Res.* 2011 ;31:3619-21.

Pérez Tarazona S, Alfonso Diego J, Amat Madramany A, Chofre Escrihuela L, Lucas Sáez E, Bou Monterde R. Incidence of wheezing and associated risk factors in the first 6 months of life of a cohort in Valencia (Spain). *An Pediatr.* 2010; 72:19-29.

Piedimonte G, Rodríguez MM, King KA, McLean S, Jiang X. Respiratory syncytial virus upregulates expression of the substance P receptor in rats lung. *Am J Physiol* 1999; 277: L831-840.

Pierrot-Deseilligny C. Clinical implications of a possible role of vitamin D in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2009; 256: 1468–1479.

Pinto RA, Arredondo SM, Bono MR, Gaggero AA, Díaz PV. T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol. *Pediatrics.* 2006 ;117:e878-86.

VIII. Bibliografía

Piñero Fernández JA, Alfayate Migueléz S, Menasalvas Ruiz A, Salvador García C, Moreno Docón A, Sánchez-Solís de Querol M. Epidemiology, clinical features and medical interventions in children hospitalized for bronchiolitis. *An Pediatr (Barc)*. 2012;77:391-6.

Pisacane A, Graziano L, Zona G, Granata G, Dolezalova H, Cafiero M, Breast feeding and acute lower respiratory infection. *Acta Paediatr*. 1994;83:714-718.

Pitrez PMC, Machado DC, Jones MH, Andrade F, Camozzato C, Stein RT. Th-1 and Th-2 cytokine production in infants with virus-associated wheezing. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 51-54.

Pitrez PMC, 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. *Annals of Allergy, Asthma Immunology* 2004; 92:659-662.

Plint AC, Johnson DW, Patel H, Wiebe N, Correll R, Brant R, Mitton C, Gouin S, Bhatt M, Joubert G, Black KJ, Turner T, Whitehouse S, Klassen TP; Pediatric Emergency Research Canada (PERC). Epinephrine and dexamethasone in children with bronchiolitis. *N Engl J Med*. 2009, 360:2079-89.

Pludowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, Carter G, Chlebna-Sokół D, Czech-Kowalska J, Dębski R, Decsi T, Dobrzańska A, Franek E, Głuszko P, Grant WB, Holick MF, Yankovskaya L, Konstantynowicz J, Książyk JB, Księżopolska-Orłowska K, Lewiński A, Litwin M, Lohner S, Lorenc RS, Lukaszkiwicz J, Marcinowska-Suchowierska E, Milewicz A, Misiorowski W, Nowicki M, Povoroznyuk V, Rozentryt P, Rudenka E, Shoefeld Y, Socha P, Solnica B, Szalecki M, Tałałaj M, Varbiro S, Żmijewski MA. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. *Endokrynol Pol*. 2013;64:319-27.

Pludowski P, Grant WB, Bhattoa HP, Bayer M, Povoroznyuk V, Rudenka E, et al. Vitamin D Status in Central Europe. *Int J Endocrinol*. 2014; 2014:589587

Poole KE, Loveridge N, Barker PJ. Reduced vitamin D in acute stroke. *Stroke* 2006; 37:243-5.

Poston RN, Chanez P, Lacoste JW, Lichtfield T, Lee TH, Bousquet J. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration in asthmatic bronchi. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:918-21.

Prais D, Schonfeld T, Amir J. Admission to the intensive care unit for respiratory syncytial virus bronchiolitis: a national survey before palivizumab use. *Pediatrics* 2003; 112:548-52.

Prehn JL, Fagan DL, Jordan SC, Adams JS. Potentiation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood*. 1992; 80 : 2811-6.

VIII. Bibliografía

Prieto Martín A, Barbarroja Escudero J, Monserrat Sanz J, Alvarez-Mon Soto M. Regulación y desarrollo de la respuesta inmune. *Medicine* 2005; 9: 2189-98.

Protonotariou E, Malamitsi-Puchner A, Rizos D, Papagianni B, Moira E, Sarandakou A, Botsis D. Age-related differentiations of Th1/Th2 cytokines in newborns infants. *Mediators Inflamm.* 2004; 13 : 89-92.

Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science.* 1983 16;221:1181-3.

Pukelsheim K, Stoeger T, Kutschke D, Ganguly K, Wjst M. Cytokine profiles in asthma families depend on age and phenotype. *PLoS One.* 2010 13;5:e14299, 1-11.

Pullan CR, Hey EN. Wheezing, asthma, and pulmonary dysfunction 10 years after infection with respiratory syncytial virus in infancy. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1982 5; 284:1665-9.

Purcell K, Fergie J. Concurrent serious bacterial infections in 2396 infants and children hospitalized with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2002;156:322-4.

Purcell K, Fergie J. Concurrent serious bacterial infections in 912 infants and children hospitalized for treatment of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 23: 267-9.

Purcell K, Fergie J. Lack of usefulness of an abnormal white blood cell count for predicting a concurrent serious bacterial infection in infants and young children hospitalized with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26:311-5.

Puthothu B, Bierbaum S, Kopp MV, Forster J, Heinze J, Weckmann M, Krueger M, Heinzmann A. Association of TNF-alpha with severe respiratory syncytial virus infection and bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20:157-63.

Rahman I, MacNee W. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1996;51:348-50.

Rajakumar K. Vitamin D, cod-liver oil, sunlight, and rickets: a historical perspective. *Pediatrics.* 2003 ;112:e132-5.

Rand KH, Rampersaud H, Houck HJ. Comparison of two multiplex methods for detection of respiratory viruses: FilmArray RP and xTAG RVP. *Journal of clinical microbiology* 2011; 49: 2449-2453.

Randolph AG, Yip WK, Falkenstein-Hagander K, Weiss ST, Janssen R, Keisling S, et al. Vitamin D-binding protein haplotype is associated with hospitalization for RSV bronchiolitis. *Clin Exp Allergy.* 2014;44:231-7.

VIII. Bibliografía

Randolph AG, Reder L, Englund JA. Risk of bacterial infection in previously healthy respiratory syncytial virus-infected young children admitted to the intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J.* 2004; 23:990–4.

Reilly PM, Bulkley GB. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br J Surg* 1990;77:1324-5.

Reina J, Ballesteros F, Mesquida X, Galmes M, Ferres F, Ruiz De Gopegui E. Bronchiolitis caused by influenza type A virus. An emerging infectious disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2001 ;19:467-70.

Reina J, Ferres F, Gutiérrez O, Ruiz de Gopegui E, González-Cárdenas M. Estudio de las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias por adenovirus en una población infantil (1997-2003). *An Pediatr (Barc)* 2004; 61: 137 – 142.

Reina J, Gonzalez Gardena sM, Ruiz de Gopegu iE Padilla E, Ballesteros F, Mari M, Prospective evaluation of a dot-blot enzyme immunoassay (Directigen RSV) for the antigenic detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates of paediatric patients. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:967–71.

Renzi PM, Turgeon JP, Yang JP, Drblik SP, Marcotte JE, Pedneault L, Spier S. Cellular immunity is activated and a TH-2 response is associated with early wheezing in infants after bronchiolitis. *J Pediatr.* 1997 ;130:584-93.

Reyes M, Eriksson M, Bennet R, Hedlund KO, Ehrnst A. Regular pattern of respiratory syncytial virus and rotavirus infections and relation to weather in Stockholm, 1984-1993. *Clin Microbiol Infect.* 1997 ;3:640-646.

Ricciardolo FLM, Timmers MC, Geppetti P, van Schadewijk WA, Sont J, de Gouw HW, van Krieken JH, Hiemstra PS, Sterk PJ. Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001, 108, 198–204.

Ricciardolo, F.L.M Sterk, P.J Gaston, B Folkerts, G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol. Rev.* 2004, 84, 731–765.

Richter H, Seddon P. Early nebulized budesonide in the treatment of bronchiolitis and the prevention of postbronchiolitic wheezing. *J Pediatr.*1998;132:849–53.

Rigby WF, Stacy T, Fanger MW. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J Clin Invest* 1984;74:1451–1455.

Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 1992 30;326:298-304.

Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 2001;30:36-44.

Rodríguez R. Bronquiolitis. Actualización. *Acta Pediatr Esp* 2006; 64: 316-22.

VIII. Bibliografía

Rojo JC, Ruiz-Contreras J, Fernández MB, Marín MA, Folgueira L. Influenza-related hospitalizations in children younger than three years of age. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25:596-601.

Román M, Calhoun WJ, Hinton KI, Avendaño LF, Simon V, Escobar AM, Gaggero A, Díaz P. Respiratory Syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 190-195.

Román M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendaño LF, Simon V, Escobar AM, Gaggero A, Díaz PV. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 ;156:190-5.

Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Shapses SA. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 2011;96, 53-58.

Roth D, Caulfield L, Ezzati M, Black R. Acute lower respiratory infections in childhood: opportunities for reducing the global burden through nutritional interventions. *Bull World Health Organ*. 2008 ; 86: 356–364.

Roth DE, Jones AB, Prosser C, Robinson JL, Vohra S. Vitamin D receptor polymorphisms and the risk of acute lower respiratory tract infection in early childhood. *J Infect Dis*. 2008 1;197:676-80.

Roth DE, Jones AB, Prosser C, Robinson JL, Vohra S. Vitamin D status is not associated with the risk of hospitalization for acute bronchiolitis in early childhood. *Eur J Clin Nutr*. 2009 ;63:297-9.

Roth DE, Shah R, Black RE, Baqui AH. Vitamin D status and acute lower respiratory infection in early childhood in Sylhet, Bangladesh. *Acta Paediatrica* 2010; 99, 389-393.

Russell W, Chesney MD. Vitamin D and the magic mountain: The anti-infectious role of the vitamin. *J pediatr* 2010; 156 : 698-703.

Rutigliano JA, Graham BS. Prolonged production of TNF-alpha exacerbates illness during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol*. 2004 1;173:3408-17.

Ruuskanen O, Meurman O, Akusjarvi G. Adenoviruses. En: Richmond D, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical Virology*. New York: Churchill Livingstone, 1997; p. 525-47.

Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate*. 2005;88:228-36.

Schaub B, Lauener R, von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 ;117:969-77.

Schauber J, Dorschner RA, Coda AB. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2007;117:803.

VIII. Bibliografía

Schauber J, Dorschner RA, Yamasaki K. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology* 2006;118:509.

Schauer U, Hoffjan S, Bittscheidt J, Köchling A, Hemmis S, Bongartz S, Stephan V. RSV bronchiolitis and risk of wheeze and allergic sensitisation in the first year of life. *Eur Respir J*. 2002;20:1277-83.

Schildgen O, Müller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B, Simon A. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections?. *Clin Microbiol Rev*. 2008 ; 21:291-304.

Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Antioxidant therapy. *Crit Care Med* 1993; 21: 92-100.

Shin YH, Yu J, Kim KW, Ahn K, Hong SA, Lee E, et al. Association between cord blood 25-hydroxyvitamin D concentrations and respiratory tract infections in the first 6 months of age in a Korean population: a birth cohort study (COCOA). *Korean J Pediatr*. 2013; 56:439-45.

Schuh S, Lalani A, Allen U, Manson D, Babyn P, Stephens D. Evaluation of the utility of radiography in acute bronchiolitis. *J Pediatr*.2007;150: 429–33.

Schuh S. Update on management of bronchiolitis. *Current Opinion in Pediatrics* 2011; 23:110-114.

Schuurhof A, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers H, van Houwelingen HC, Kimman TG, Hoebee B, Kimpen JL, Janssen R. Interleukin-9 polymorphism in infants with respiratory syncytial virus infection: an opposite effect in boys and girls. *Pediatr Pulmonol*. 2010; 45:608-13.

Searing DA, Donald MD, Leung YM. Vitamin D in Atopic Dermatitis, Asthma and Allergic Diseases. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010 ; 30: 397–409.

Seltzer J, Bigby BG, Stulbarg M, Holtzman MJ, Nadel JA, Ueki IF, Leikauf GD, Goetzl EJ, Boushey H., A03-induced change in bronchial reactivity to methacholine and airway inflammation in humans. *J. Appl. Physiol*.1986; 60: 1321–1326.

Semple MG, Taylor-Robinson DC, Lane S, Smyth RL. Household tobacco smoke and admission weight predict severe bronchiolitis in infants independent of deprivation: prospective cohort study. *PLoS One*. 2011;6:e224-225.

Shaw KN, Bell LM, Sherman NH. Outpatient assessment of infants with bronchiolitis. *Am J Dis Child*. 1991; 145:151–5.

Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, MD, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* 1999; 282: 1440-1446.

VIII. Bibliografía

Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B, Robinson PD, Sigurbergsson F, Bjarnason R, Gustafsson PM. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax*. 2010 ; 65:1045-52.

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.

Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, Kjellman B. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 15;171:137-41.

Sigurs N. A cohort of children hospitalised with acute RSV bronchiolitis: impact on later respiratory disease. *Paediatr Respir Rev*. 2002 ;3:177-83.

Silverman MN, Miller AH, Biron CA, Pearce BD. Characterization of an interleukin-6- and adrenocorticotropin-dependent, immune-to-adrenal pathway during viral infection. *Endocrinology*. 2004; 145:3580-9.

Simó Nebot M, Claret Teruel G, Luaces Cubells C, Estrada Sabadell MD , Pou Fernández J. Guía de práctica clínica sobre la bronquiolitis aguda: recomendaciones para la práctica clínica. *An Pediatr* 2010;73:208.e1–208.e10.

Simões EA, Carbonell-Estrany X, Fullarton JR, Rossi GA, Barberi I, Lanari M; European RSV Risk Factor Study Group. European risk factors' model to predict hospitalization of premature infants born 33-35 weeks' gestational age with respiratory syncytial virus: validation with Italian data. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011;24:152-7.

Simões EA. Respiratory syncytial virus infection. *The lancet* 1999; 354: 847-52.

Sims DG, Gardner PS, Weightman D, Turner MV, Soothill JF. Atopy does not predispose to RSV bronchiolitis or postbronchiolitis wheezing. *Br Med J Clin Res Ed* 1981; 282: 2086-8.

Singh AM, Moore PE, Gern JE, Lemanske RF Jr, Hartert TV. Bronchiolitis to asthma: a review and call for studies of gene-virus interactions in asthma causation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 15;175:108-19.

Skjerven HO, Hunderi JO, Brüggmann-Pieper SK, Racemic adrenaline and inhalation strategies in acute bronchiolitis. *N Engl J Med* 2013; 368:2286.

Sly PD, Kusel M, Holt PG. Do early-life viral infections cause asthma?. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 ;125:1202-5; ;43:142-9.

Smit LA, Bouzigon E, Pin I, Siroux V, Monier F, Aschard H, Bousquet J, Gormand F, Just J, Le Moual N, Nadif R, Scheinmann P, Vervloet D, Lathrop M, Demenais F, Kauffmann F; EGEA Cooperative Group. 17q21 variants modify the association between early respiratory infections and asthma. *Eur Respir J*. 2010 ;36:57-64.

VIII. Bibliografía

Smyth RL. The airway epithelium in health and disease: "calm on the surface, paddling furiously underneath". *Thorax*. 2009; 64:277-8.

Somech R, Tal G, Gilad E, Mandelberg A, Tal A, Dalal I. Epidemiologic, socioeconomic, and clinical factors associated with severity of respiratory syncytial virus infection in previously healthy infants. *Clin Pediatr*. 2006;45: 621-7.

Stark JM, Busse WW. Respiratory virus infection and airway hyperreactivity in children. *Pediatr Allergy Immunol* 1991;2:95-110.

Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285:E433-7.

Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, Wright AL, Martinez FD. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet*. 1999 14; 354:541-5.

Stepanik TM, Ewing DD. Isolation of glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase of human erythrocytes. *J Biochem Biophys* 1993;20:157-69.

Stoppelenburg AJ, von Hegedus JH, Huis in't Veld R, Bont L, Boes M. Defective control of vitamin D receptor-mediated epithelial STAT1 signalling predisposes to severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Pathol*. 2014;232:57-64.

Stringer DM, Sellers EA, Burr LL, Taylor CG. Altered plasma adipokines and markers of oxidative stress suggest increased risk of cardiovascular disease in First Nation youth with obesity or type 2 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. 2009 ;10:269-77.

Sullivan SS, Rosen CJ, Halteman WA, Chen TC, Holick MF. Adolescent girls in Maine are at risk for vitamin D insufficiency. *Journal of the American Dietetic Association* 2005; 105, 971-974.

Tahan F, Ozcan A, Koc N. Clarithromycin in the treatment of RSV bronchiolitis: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Eur Respir J*. 2007;29:91-7.

Taussig L, Wright A, Holberg C, Halonen M, Morgan W, Martinez F. Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to the present. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 661-75.

Taussig LM, Wright AL, Morgan WJ, Harrison HR, Ray CG. The Tucson Children's Respiratory Study. I. Design and implementation of a prospective study of acute and chronic respiratory illness in children. *Am J Epidemiol*. 1989 ; 129 :1219-31.

Team BG. Cincinnati Children's Hospital Medical Center. Evidence based clinical practice guideline for medical management of bronchiolitis in infants 1 year of age or less presenting with a first time episode. 2012; Guideline 1.

Tepper RS, Morgan WJ, Cota K, Wright A, Taussig LM. GHMA pediatricians. Physiologic growth and development of the lung during the first year of life. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:513-519.

VIII. Bibliografía

Teramoto S, Shu CY, Ouchi Y, Fukuchi Y. Increased spontaneous production and generation of superoxide anion by blood neutrophils in patients with asthma. *J. Asthma* 1996. 33, 149–155.

The IMpact-RSV Study Group. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics*. 1998;102:531–7.

Thia LP, McKenzie SA, Blyth TP, Minasian CC, Kozłowska WJ, Carr SB. Randomised controlled trial of nasal continuous positive airways pressure (CPAP) in bronchiolitis. *Arch Dis Child*. 2008;93: 45–7.

Thien R, Baier K, Pietschmann P, Peterlik M, Willheim M. Interactions of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 with IL-12 and IL-4 on cytokine expression of human T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 ;116:683-9.

Thorburn K, Van Saene H. Pulmonary bacterial infection in children ventilated for severe respiratory syncytial virus bronchiolitis is common. *Intensive Care Med*. 2007;33:565.

Tosaki A, Droy-Lefaix MI, Pali L, Das DK. Effects of SOD, catalase and a novel antiarrhythmic drug; EGB 761 on reperfusion induced arrhythmias in isolated rat hearts. *Free Radic Biol Med* 1993;14:361-70.

Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:241-9.

Tratado de Neumología Infantil. Sección 5 capítulo nº 20. Infección respiratoria por virus respiratorio sincitial. En: N. Cobos, EG Pérez-Yarza, ed. Editorial Ergon Madrid 2009: 389-415.

Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: Causes, Symptoms, Virology and Immunology. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23 : 74-98.

Tripp RA, Moore D, Barskey A 4th, Jones L, Moscattiello C, Keyserling H, Anderson LJ. Peripheral blood mononuclear cells from infants hospitalized because of respiratory syncytial virus infection express T helper-1 and T helper-2 cytokines and CC chemokine messenger RNA. *J Infect Dis*. 2002 15;185:1388-94.

Tristram DA, Welliver Rc, Hogerman DA, Hidreth SW, Paradiso P. Second-year surveillance of recipients of a respiratory syncytial virus (RSV) F protein subunit vaccine, PFP-1: evaluation of antibody persistence and possible disease enhancement. *Vaccine*. 1994; 12: 551-6.

Valverde Molina J, Escribano Montaner A. Tratamiento de la Bronquiolitis: uso de adrenalina nebulizada. *An Pediatr (Barc)*. 2005;62:179–81.

van Schaik SM, Obot N, Enhorning G, Hintz K, Gross K, Hancock GE. Role of interferon gamma in the pathogenesis of primary respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice. *J Med Virol* 2000; 62:257-66.

VIII. Bibliografía

van Schaik SM, Tristram DA, Nagpal IS, Hintz KM, Welliver RC, 2nd, Welliver RC. Increased production of IFN-gamma and cysteinyl leukotrienes in virus-induced wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:630-6.

Vega-Briceño LE, Pulgar BD, Potin SM, Ferres GM, Sánchez DI . Características clínicas y epidemiológicas de la infección por virus parainfluenza en niños hospitalizados. *Rev Chil Infect* 2007; 24 : 377-383

Velasco L, Sobrino L, García M, Soler P. Vigilancia epidemiológica del virus respiratorio sincitial. Sistema de Información Microbiológica. España. Temporadas 2006-2007 y 2007-2008. *Boletín Epidemiológico Semanal* 2009;17:241-244.

Vicente D, Montes M, Cilla G, Pérez-Yarza EG, Pérez Trallero E. Hospitalization for respiratory syncytial virus in paediatric population in Spain. *Epidemiol Infect* 2003; 137: 865-70.

Vidyarani M, Selvaraj P, Jawahar MS, Narayanan PR. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 modulated cytokine response in pulmonary tuberculosis. *Cytokine* 2007; 40: 128–134.

Wainwright C, Altamirano L, Cheney M, Cheney J, Barber S, Price D, Moloney S, Kimberley A, Woolfield N, Cadzow S, Fiumara F, Wilson P, Mego S, Van deVelde D, Sanders S, O'Rourke P, Francis P. A multicenter, randomized, double-blind, controlled trial of nebulized epinephrine in infants with acute bronchiolitis. *N Engl J Med.* 2003; 349:27–35.

Walker VP, Modlin RL. The Vitamin D Connection to Pediatric Infections and Immune Function. *Pediatr Res.* 2009; 65: 106R-13R.

Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004; 173:2909.4.

Waris ME, Tsou C, Erdman DD, Zaki SR, Anderson L. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J Virol.* 1996; 70: 2852–2860.

Wayse V, Yousafzai A, Mogale K, Filteau S. Association of subclinical vitamin D deficiency with severe acute lower respiratory infection in Indian children under 5 years. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:563-7.

Weekly influenza surveillance overview. 26 ruary 2010. ECDC Surveillance Report – Week 07/2010 Influenza overview.

Wennergren G, Kristjansson S. Relationship between respiratory syncytial virus bronchiolitis and future obstructive airway diseases. *Eur Respir J* 2001;18: 1044-58.

West JB. Mecánica respiratoria. En : west JB (ed.) Fisiología respiratoria. Buenos Aires: Panamericana; 1981. P. 84-107.

VIII. Bibliografía

- White JH. Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. *Infect Immun*. 2008 ;76:3837-43.
- Willwerth BM, Harper MB, Greenes DS. Identifying hospitalized infants who have bronchiolitis and are at high risk for apnea. *Ann Emerg Med*. 2006 ;48:441-7.
- Wisdom A, Kutkowska AE, McWilliam-Leitch EC, Templeton EGK, Harvala H, Simmonds P. Genetics, Recombination and Clinical Features of Human Rhinovirus Species C (HRV-C) Infections; Interactions of HRV-C with Other Respiratory Viruses. *PLoS One*. 2009; 4: e8518.
- Witztum JI. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J* 1993;69:12-8.
- Wong JY, Moon S, Beardsmore C, O'Callaghan C, Simpson H. No objective benefit from steroids inhaled via a spacer in infants recovering from bronchiolitis. *Eur Respir J*. 2000;15:388–94.
- Wood LG, Gibson PG, Garg ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J*. 2003;21:177-86
- Wright AJ, Holberg CJ, Martínez FD, Morgan WJ, Taussing LM. Group Health Medical Associates. Breast feeding and lower respiratory tract illness in the first year of life. *BMJ* 1989;299:964-969.
- Wright AL, Holberg C, Martínez FD, Taussing LM. Group Health Medical Associates. Relationship of parental smoking to wheezing and nonwheezing lower respiratory tract illnesses in infancy. *J Pediatr* 1991;118:207-214.
- Wu W, Samoszuk M.K, Comhair SA, Thomassen MJ, Farver CF, Dweik RA, Kavuru MS, Erzurum SC, Hazen SL. Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma. *J. Clin. Invest*. 2000.105, 1455–1463.
- Young S, O'Keeffe PT, Arnott J, Landau LI. Lung function, airways responsiveness, and respiratory symptoms before and after bronchiolitis. *Arch Dis Child* 1995;72:16-24.
- Zeng M, Zhu QR, Wang XH, Yu H, Shen J. Human bocavirus in children with respiratory tract infection in Shanghai: a retrospective study. *World J Pediatr*. 2010 ;6:65-70.
- Zhang L, Irion K, Kozakewich H, Reid L, Camargo JJ, Da Silva N. Clinical course of postinfectious bronchiolitis obliterans. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29: 341-50.
- Zhang L, Mendoza-Sassi RA, Wainwright C, Klassen TP. Nebulized hypertonic saline solution for acute bronchiolitis in infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 8;:CD006458.
- Zhang P, Wang YZ, Kagan E, Bonner JC. Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. *J. Biol. Chem*. 2000, 275, 22479–22486.

VIII. Bibliografía

Zhu Q, McAuliffe JM, Patel NK, Palmer-Hill FJ, Yang CF, Liang B, Su L, Zhu W, Wachter L, Wilson S, MacGill RS, Krishnan S, McCarthy MP, Losonsky GA, Suzich JA. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. *J Infect Dis.* 2011;203:674-82.

ANEXOS

Anexo 1.

Artículo de revisión: J Torres-Borrego, G Moreno-Solís, AB Molina-Terán. Diet for the prevention of asthma and allergies in Early childhood: Much ado about something?. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012; 40 (4): 244-252.



Allergologia et immunopathologia

www.elsevier.es/ai



REVIEW

Diet for the prevention of asthma and allergies in early childhood: Much ado about something?

Javier Torres-Borrogo*, Gloria Moreno-Solís, Ana Belén Molina-Terán

Pediatric Allergy and Pneumology Unit, Pediatrics Clinical Management Unit, Reina Sofía Children's University Hospital, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004, Córdoba, Spain

Received 24 November 2011; accepted 19 December 2011
Available online 15 March 2012

KEYWORDS

Diet;
Asthma;
Allergy;
Child;
Vitamin D;
Antioxidants;
Prevention

Abstract In the last decades there has been an increase in allergic disease throughout the world, particularly in children. Attempts have been made to identify the causes of this "allergy epidemic" in environmental changes and changes in population hygiene, lifestyle, socioeconomic level, and eating habits that would exert epigenetic effects.

Dietetic hypotheses have been mainly focussed in long-chain polyunsaturated fatty acids, vitamin D, antioxidants, Mediterranean diet, and fruits, vegetables and fish consumption. Although the data suggest a certain association between diet and the development of asthma/allergy, there is no evidence that diet has an impact upon the prevalence of such diseases after early infancy. If indeed there is such an impact, it is likely to be confined to the prenatal period and the first months of life – when it is still possible to modulate the development of the respiratory, digestive and immune systems. Thus, once the most appropriate preventive measures have been defined, these should be implemented during pregnancy and lactation.

The existing scientific evidence is unable to recommend any primary preventive measure in the general population or in different population subgroups. Special or restrictive diets in pregnant or nursing women are not indicated. Exclusive breastfeeding for six months is questioned, since solid foods should begin to be introduced at around four months of age. Once the atopic process has started, no nutritional strategies have been found to be effective as secondary or tertiary preventive measures. Longitudinal studies in cohorts of pregnant women or newborn infants could help clarify these issues.

© 2011 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introduction

The aetiology of asthma and atopic diseases is multifactorial, with complex interactions between genetic and environmental factors that give rise to the resulting phenotypic manifestation of the disease. In the last 50 years there has been an increase in allergic disease throughout the

* Corresponding author.

E-mail address: javier.torres.sspa@juntadeandalucia.es
(J. Torres-Borrogo).

world, with an estimated prevalence of 40% in children,¹ giving rise to what has been referred to as an "allergy epidemic". Since it is not possible for relevant changes in the genetic profile of the population to have developed in such a short period of time, attempts have been made to identify the causes of this increase in environmental changes (infections, pollution, climate, pneumoallergen and food allergen exposure, etc.) and changes in population hygiene and eating habits, socioeconomic level and lifestyle, amongst other factors with epigenetic effects.^{2,3} Amongst these factors, special mention must be made of the dietetic changes associated with the transition from a traditional to a modern diet,⁴ in which foods are processed to allow for longer preservation, and salt, refined sugar and saturated fat consumption has increased. Besides, the modern western lifestyle is associated with sedentarism, obesity, fast food restaurants, and a decrease in the consumption of fruit and vegetables, milk (which moreover is consumed in ultra-pasteurised form), dietary fibre and foods rich in vitamins and antioxidants.⁵ The "dietetic hypothesis" has two major paradigms in the beneficial effects found amongst children who follow traditional eating habits, such as those living on farms⁶ or in families with an anthroposophic lifestyle.⁷

Attempts to apply the concept of asthma as a nosologic unit or entity have failed, because there are different disease phenotypes with different determinants. In preschool children it is particularly difficult to distinguish between an incipient allergic phenotype and wheezing due to some other cause; as a result, a European panel of pediatricians⁸ has recently recommended avoiding the diagnosis of asthma in this age group, since there is no evidence that its physiopathology is similar to that of asthma found in older children and in adults. In this context, the term "recurrent wheezing" is preferred.

Since it is presently not possible to modify the genetic factors, the development of a rational primary asthma and allergy prevention strategy must include identification of and action upon environmental factors – amongst which nutritional factors stand out. The prenatal period and the early stages of extrauterine life are crucial for establishing preventive strategies, since it is in this period of time when maturation of the immune system and of other body systems is completed. In this sense, different stimuli (nutrition, smoking, infections) can mark the newborn infant for life with an adequate Th1/Th2 cell balance, or with a predominance of Th2 activity characteristic of atopic individuals, which will favour the appearance of allergy. There is evidence in the newborn infant of a T-cell response to environmental antigens before any direct exposure to such antigens has occurred,^{9,10} starting from week 22 of gestation.¹¹

Prevention and treatment of asthma and allergy through dietetic interventions

In general, the body of evidence drawn from observational studies seeking associations between diet and asthma/allergy is small due to the limitations of these studies (Table 1). The ideal situation would be to have randomised, double-blind, placebo-controlled prospective studies, taking into account confounding factors associated

Table 1 Possible defects, biases and methodological differences of the epidemiological studies.

- Limited sample size.
- Cross-sectional design: does not reflect causal relationship.
- Differences in the variable diet: questionnaire-based consumption frequency versus serum quantifications.
- Differences in the variable result: wheezing, asthma, other allergic disorders, sensitisation.
- Differences in the timing of exposure and measurement of the result: prenatal, postnatal, infancy, adult, established asthma.
- Biases: participation, memory, reverse causality, confounding factors, auto-diagnostic factors, etc.

Table 2 Dietetic hypotheses.

- Interventions during pregnancy and lactation
- Breastfeeding
- Introduction of complementary foods
- Long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA)
- Vitamin D
- Antioxidants: vitamins A, C and E, selenium, zinc
- Folic acid
- Mediterranean diet
- Consumption of fruits and vegetables
- Fish consumption
- Milk consumption

with asthma/allergy, such as an increased socioeconomic level, which can be associated to more healthy habits and increased collaboration in studies. It must also be mentioned that the different dietetic hypotheses (Table 2) would not be valid for all population subgroups. It is in the early stages of life (pre- and postnatal) when intervention opportunities arise, due to the immaturity of the respiratory, digestive and immune systems, and it is here when the study of the relationship between diet and asthma is most interesting, since it is still possible in this critical period to modulate the growth and development of the mentioned body systems – with repercussions for the entire subsequent lifetime of the individual.

Interventions during pregnancy

Physiologically, pregnancy is characterised by Th2 cell polarisation or predominance that counters the Th1 responses that prove toxic for the placenta,¹² thereby avoiding miscarriages as a result of immune rejection. After delivery, however, a shift towards Th1 responses is observed as a consequence of successive microbial stimuli that afford protection against germs, with a lessening of the Th2 reactivity responsible for allergic processes. A number of publications¹³⁻¹⁵ have related complications during gestation and delivery to a lesser risk of rhinitis and asthma. The situation could be the opposite, however, i.e., allergic women may have fewer gestational complications, fewer miscarriages and a larger number of pregnancies^{16,17} – atopy

being more frequent in infants born to term or post-term than in premature infants.¹⁸

Different preventive interventions have been proposed to reduce the impact of asthma/allergy in infancy, such as maternal dietetic restriction during pregnancy and lactation, the encouragement of natural breastfeeding, the use of hypoallergenic formulas in children that cannot be breast-fed, and a delay in the introduction of some foods.^{19–21} Double-blind, placebo-controlled studies have shown that the avoidance of food allergens during pregnancy does not lessen the risk of allergy²²; in this sense, there is no evidence for recommending exclusion diets in pregnant women, as they are not seen to be effective and may pose a nutritional risk for the mother and foetus.²³

Supplementing pregnant women with vitamins E^{24,25} and D,^{26,27} zinc,²⁴ selenium and iron,²⁸ fish^{29,30} and apples³¹ have been suggested as protective factors against the development of asthma or allergy in the offspring. On the other hand, a longitudinal study found no association between the consumption of vegetables, fish, eggs or dairy products in pregnant women and parameters of asthma in the offspring between 1 and 8 years of age.³¹

Gestational age and birth weight

A cross-sectional study with ISAAC methodology conducted in 1138 German schoolchildren between 5 and 7 years of age recorded a directly proportional relationship between atopic sensitisation and gestational age, with similar findings between the IgE levels and body weight at birth.³² Obesity, with an important genetic burden, has been related to asthma, although it is not clear whether obesity is a mere triggering factor, a risk factor, a consequence, or whether it develops parallel to asthma.³³

Immaturity increases the theoretical risk of allergic diseases in premature subjects, which paradoxically have a lesser incidence of allergic disorders.³⁴ This tolerance could be explained by a combination between high concentrations of antigen on one hand and digestive and immune immaturity on the other.³⁵ In contrast, prematurity increased risk of non-allergic pulmonary disease as a consequence of lung and immune immaturity – with great importance on the part of infections and exposure to tobacco smoke.

Breastfeeding

A meta-analysis of prospective studies suggests that exclusive breastfeeding for at least four months is associated with a lesser rate of asthma in infancy, with a greater impact in children presenting antecedents of atopy.³⁶ However, these data could simply reflect a protective effect of breastfeeding against respiratory infections, which are the main triggering causes of wheezing in preschool children. It has also been suggested that breastfeeding prevents allergic processes only in children without antecedents of allergy, but not in those with familial atopy.³⁷ This could be explained through reverse causality: these would be children with mothers who are more aware of the protective effects of breastfeeding, and who thus prolong breastfeeding as far as possible. The use of partially hydrolysed infant formulas has only shown usefulness in preventing the

development of allergies in children at high risk (those with at least one allergic first-degree relative) – the number needed to treat in order to prevent a case of cow's milk protein allergy being 25, and such benefit moreover does not increase with extensive hydrolysates or soya formulas.³⁸

Introduction of solid foods

The ingestion of high amount of food allergen during the first year of life can promote tolerance, whilst small and intermittent doses can induce sensitisation. This questions the appropriateness of recommending exclusive breastfeeding up to six months of age³⁹ and the late introduction of solid foods.³⁴ Indeed, such measures may even prove harmful.^{40,41} In a systematic review,²¹ Tarini et al. found that delays in introducing foods other than breast milk or formulas could exert a beneficial effect upon atopic dermatitis, but not on the rest of allergic disorders or upon sensitisation to both pneumoallergens and trophoallergens, which could develop via the topical route through eczematous lesions.^{42,43}

Intestinal flora. Use of probiotics and prebiotics

Until recently, interventions designed to prevent asthma and allergy concentrated on reducing exposure to the allergen during pregnancy and lactation. Other measures, such as the use of probiotics and prebiotics, aimed to develop tolerance mechanisms through modification of the immune response of the foetus or nursing infant, whose intestine is sterile at the time of birth. Establishment of the intestinal microflora is crucial for modulating immune system maturation in the newborn infant⁴⁴ – different studies have shown qualitative and quantitative differences depending on the type of delivery involved or the presence or absence of breastfeeding.^{45–47} The intestinal microbiota of allergic children is characterised by a predominance of *Clostridium difficile*,⁴⁸ coliform strains and *Staphylococcus aureus*,⁴⁹ whilst a greater presence of *Lactobacillus* is found in non-allergic⁴⁹ and in anthroposophic infants.⁵⁰ Different studies have reported different results regarding the effects of probiotics provided in the last weeks of pregnancy and in the first few months of life, as a protective measure against allergic processes, particularly atopic dermatitis.^{51–54} On the other hand, the provision of prebiotics during the first six months of life has been shown to afford protection against allergic symptoms and infections up to two years of age.⁵⁵ However, a recent positioning document of the Nutrition Committee of the ESPGHAN does not support routine supplementing with prebiotics and probiotics in infant formulas, and underscores that the safety and efficacy data of one product are not extrapolatable to other products.⁵⁶

Long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA)

Since LC-PUFAs cannot be synthesised by the body, they must be obtained from the diet. These fatty acids are incorporated to the cell membrane phospholipids, where they exert a number of functions, including modulation of the immune and inflammatory responses. There are two major groups of LC-PUFAs: omega-3, derived from α -linolenic acid (found in

plants, soya oil and fish), and which act as the precursors of docosanoids (eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids); and omega-6, derived from linoleic acid (found in corn, soya and sunflower oils and their margarines – the consumption of which has increased in the last few decades), which act as the precursors of eicosanoids (arachidonic acid and its derivatives, i.e., prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes).

Some clinical studies have reported beneficial effects with fish oil supplementing in patients with asthma,^{57–59} whilst others have observed no such effects.^{60–62} In this context, a meta-analysis concluded that there is little evidence supporting supplementing or increasing the intake of omega-3 in the diet⁶³ as a treatment for already-established asthma in children and adults. Since atopy is established in the first months of life, intervention with omega-3 once the allergic process has already become established may be too late to secure benefits. Early exposure to omega-3 may modify the Th1/Th2 profile – higher concentrations of docosanoids and IgA being observed in the milk of nursing women who received omega-3 supplements during pregnancy,⁶⁴ together with higher serum levels of interferon-gamma (IFN- γ)⁶⁵ in their offspring. In the CAMP study, fish oil or placebo supplementing was carried out in children at risk of developing asthma from six months of age. A resulting decrease was observed in the prevalence of wheezing, nocturnal cough or the use of bronchodilators at 18 months,⁶⁶ with no influence upon sensitisation to foods or atopic dermatitis. This protective effect in turn disappeared over follow-up after three and five years.⁶⁷

In an excellent review, Sala-Vila et al.⁶⁸ detected numerous inconsistencies in the studies evaluating atopy risk in relation to the LC-PUFA in nursing infants' serum samples and composition of breast milk from atopic mothers, concluding that it is not possible to establish a clear idea of the role and composition of LC-PUFAs in asthma and allergy based on the existing information. These discrepancies were influenced by the designs of the studies included in the meta-analysis. Overall, the data do not support the pre-existing idea that consumption and high levels of omega-6 and low levels of omega-3 are associated with atopy. On the other hand, emphasis is placed on the importance of the balance between both types of fatty acid, since despite individually some arachidonic acid derivatives may have inflammatory effects, their global action is of an anti-inflammatory nature.⁶⁸

Vitamin D

It has been suggested that the increase in the prevalence of asthma in the western world is a consequence of vitamin D deficiency⁶⁹ due to lesser exposure to sunlight. The immune modulating action of vitamin D is known,⁷⁰ and the immune cells have activating receptors and enzymes for this vitamin.⁷¹ A series of cohorts involving newborn infants have reported an association between vitamin D deficiency before birth and in the first months of life and an increased risk of recurrent wheezing, asthma and allergic rhinitis^{26,27,72} in infancy. This could be attributed to an alteration in the response to viral infections⁷³ – vitamin D having been shown to induce antimicrobial peptides, including cathelicidin, in

vitro.^{74,75} In addition, there is a lesser incidence of influenza in schoolchildren who receive supplements of vitamin D³⁷⁶ – this effect being greater amongst asthmatics. Likewise, a protective association has been described between maternal vitamin D consumption during pregnancy and a lesser risk of developing wheezing in the first years of life,²⁷ as well as asthma and allergic sensitisations in the future.²⁶ Furthermore, in asthmatics, the provision of vitamin D could reduce the number and severity of the exacerbations,^{77–79} with suggested positive effects upon the corticosteroid action routes.⁸⁰ Thus, vitamin D would exert primary preventive effects (avoiding the development of wheezing-asthma), secondary preventive effects (reducing disease severity in asthmatics), and also tertiary preventive effects (improving the response to corticosteroid treatment).

In contrast, other authors suggest that an excessive provision of Vitamin D could induce an exaggerated Th2 response, thereby favouring allergic sensitisations.^{81,82} In one study, vitamin D supplementing during the first year of life was associated to an increased risk of atopy, rhinitis and asthma at 31 years of age,⁸³ although this study did not control for maternal vitamin D levels, possible confounding factors, or memory bias.

Antioxidants

An association has been suggested between asthma and a diet poor in exogenous antioxidants^{84,85} such as vitamins A, C and E, and oligoelements such as zinc and selenium – which favour the production of IFN- γ and can attenuate the respiratory epithelial damage caused by free radicals. In 2010, a meta-analysis reported the intake of vitamins A, C and E to be significantly lower in patients with asthma, particularly amongst those with more serious disease.⁸⁶ Previously, another meta-analysis failed to obtain evidence that antioxidant intake influences the risk of asthma.⁸⁷ The existing evidence on the beneficial effects of antioxidants, vegetables and the Mediterranean diet is weak, but suggests protection against wheezing and asthma, particularly when applied to pregnant women,⁸⁸ thanks to the optimisation of lung development⁸⁹ and the palliation of oxidative damage in this critical period. The biological mechanisms by which these elements may influence childhood asthma could be independent of antioxidant activity, since they are not observed with all of the mentioned elements, and are also recorded with substances lacking antioxidant effects.⁴

Vitamin A

Vitamin A (retinol) exerts dual antioxidant action and protective anti-infection effects upon the respiratory tract.⁹⁰ Children with high serum carotene levels have been found to be less likely to develop asthma^{91,92} – significant differences being observed in the concentrations of vitamin A between asthmatics and healthy controls.⁹³ In addition, the consumption of vitamins A and C at levels below the recommended daily amounts is associated with a significantly higher prevalence of wheezing in the first years of life and asthma,⁸⁶ and it has even been reported that the severity of asthma is inversely correlated to the blood levels of vitamin A.⁹¹ In contrast, it has not been possible to show that maternal

supplementing with beta-carotenes is associated to a lesser risk of wheezing in the first years of life.³¹

Vitamin E

Vitamin E (α -tocopherol) is a first-order antioxidant in that it prevents the oxidation of LC-PUFAs and proteins. Moreover, it exerts immune actions by promoting Th1 responses and inhibiting Th2 differentiation.^{94,95} Maternal levels of vitamin E are a determinant factor for foetal growth, and for lung development and maturation.⁹⁶ In this sense, there is a significant correlation between prenatal vitamin E intake and a reduction of wheezing in the first two years of life.^{25,97} Nutritional studies suggest a relationship between oxidative stress and bronchial inflammation; as a result, supplements of vitamin E in asthmatics could help lessen the symptoms⁹⁸ and improve lung function.^{99,100}

Vitamin C

Vitamin C (ascorbic acid) is a water-soluble antioxidant found in the airway epithelia and alveoli which is able to attenuate the oxidative damage caused by inhalatory agents, infections or cellular inflammation. In the context of the NHANES III study,⁹² measurements were made of the serum concentrations of vitamins in children between 6–17 years old. The bivariate analysis showed the diagnosis of asthma to be associated to lower levels of vitamin C, alpha- and beta-carotene, and beta-cryptoxanthin. However, after adjusting the results for possible confounding factors, only vitamin C and alpha-carotene continued to show statistical significance in the resulting logistic regression analysis. It has not been possible to show that an extra intake of vitamin C in pregnant women is able to reduce the risk of posterior wheezing in their offspring,^{25,97} although an inverse proportional relationship has been described between vitamin C intake and the risk of wheezing,¹⁰¹ bronchial hyperresponsiveness^{102,103} and FEV1 values.^{104,105} Despite these findings, two Cochrane reviews concluded that no generalised positive effect can be established, and that there is not enough evidence to support vitamin C supplementing in the treatment of established bronchial asthma.^{106,107}

Folic acid

Folic acid participates in nucleotide synthesis, cell division and differentiation, and in DNA methylation, and as such is a key element in foetal development. Some authors¹⁰⁸ have described an inverse proportional relationship between folic acid concentrations and the presence of wheezing, atopy and IgE levels in 8083 subjects over two years of age. In contrast, other investigators have related folic acid to negative effects, with the observation of an increased frequency of respiratory and allergic disease in the offspring of women who received folate supplements during pregnancy^{109,110} – this possibly being linked to an increased risk of respiratory infections during the first months of life.

Oligoelements

Selenium

The role of selenium, acting as coenzyme of glutathione peroxidase, is subject to controversy, for although elevated selenium levels during pregnancy and in umbilical cord blood are associated to a decreased risk of early wheezing in the first two years of life,¹¹¹ no such effects are seen at five years of age.¹¹² Other studies in turn have reported an association between selenium levels and a decrease in the prevalence of asthma,¹¹³ fewer respiratory symptoms,¹¹⁴ and improved lung function.¹⁰⁰

Zinc

Zinc intervenes in the metabolism of superoxide dismutase (SOD) and vitamin E. Zinc levels in the hair of wheezing children have been found to be significantly lower than in the controls.¹¹⁵ Although there have been reports of its beneficial effects when supplied during pregnancy²⁵ and in the first years of life,¹¹⁶ the evidence supporting such a recommendation is still weak.

Milk

A number of studies have described that a frequent consumption of dairy products amongst pre-school children results in a lesser risk of asthma symptoms in these children.^{117,118} It is debatable whether this effect is linked to the LC-PUFA contents of milk, in which case it would only be valid for whole and scantily processed milk¹¹⁹ and butter,¹²⁰ but not for skimmed milk products.

Despite the widespread belief that milk and its products increase airway mucus production; there is no convincing explanation for such an effect. In 2005, a review¹²¹ concluded that those individuals with this prior conviction reported perceived changes in mucus production after consuming milk, in contrast to those who did not share this belief. In a double-blind study, the “believers” detected the same increase in secretions both after consuming milk and after consuming a soya beverage with the same organoleptic properties – a situation that could be explained in terms of greater saliva production and thickening.¹²² It can be concluded that this belief has no scientific basis, and that there is no evidence in support of restricting or avoiding dairy products in asthmatic individuals.

Mediterranean diet. Fruit, vegetables, fish, and olive oil

The Mediterranean diet and frequent fruit consumption in children and pregnant women is associated with a lesser risk of wheezing, asthma and allergy.^{123–127} Willers et al.³¹ recorded beneficial effects of apple consumption (but not with total fruit intake) during pregnancy in wheezing and asthma at five years of age. Specific studies addressing concrete foods therefore would be advisable (different fruit species belong to different botanical families with different biological properties). It has been suggested

that the consumption of potentially allergenic foods during pregnancy increases the transplacental or transamniotic transmission risk of sensitisation^{128,129} to trophoallergens and pneumoallergens.¹³⁰ In adults, the consumption of whole grain bread has been shown to exert a protective effect against asthma,¹³¹ although it cannot be ruled out that such consumption, in the same way as with fruit, might be a confounding factor associated to other healthy lifestyle factors.

The evidence on the effect of fish consumption during pregnancy in relation to allergy/asthma is inconclusive – some studies reporting a favourable effect,^{29,30,130} whilst others report no effect,³¹ or protective action against atopic dermatitis but not against the rest of allergic disorders.¹³² On the other hand, from week 30 of pregnancy, a Danish study comparing olive oil versus fish oil capsule supplementing found the offspring of the women in the latter group to have a lesser risk of asthma – although this same effect was observed in a third non-intervened control group.¹³³

Conclusions

Following this review of the relationship between diet and asthma-atopy in the first years of life, we can conclude that the nutritional factors responsible for the increase in these diseases are not clear. The discrepancies observed by the different studies are largely attributable to methodological differences (Table 1).

Although the dietetic hypotheses are promising, and there are partial findings associating diet to the development of asthma or allergy, there is no evidence that any food or type of diet has an impact upon the prevalence of asthma after early infancy. If indeed there is such an impact, it is likely to be confined to the window of opportunity during the prenatal stage and the first months of life – a critical period when it is still possible to modulate the growth and development of the respiratory, digestive and immune systems, with repercussions for the rest of life. Thus, once the most appropriate preventive measures have been defined, these should be implemented early, during pregnancy and lactation. A possible explanation for the discrepancy between the hypothetical protective effect of certain substances and the absence of effect found in some studies involving supplements of these nutrients may be that such effects are only obtained in situations of deficiency.

Although the data suggest a certain association between diet and the development of asthma, the existing scientific evidence is unable to recommend any primary preventive measure in the general population or in specific population subgroups. Special or restrictive diets in pregnant or nursing women are not indicated. Exclusive breastfeeding for six months is questioned, since solid foods should begin to be introduced at around four months of age. Once the atopic process has started, no nutritional strategies have been found to be effective as secondary or tertiary preventive measures. Longitudinal studies involving dietetic interventions in cohorts of pregnant women or newborn infants could help clarify these issues.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Gupta R, Sheikh A, Strachan DP, Anderson HR. Burden of allergic disease in the UK: secondary analyses of national databases. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:520–6.
- Torres-Borrego J, Molina-Teran AB, Montes-Mendoza C. Prevalence and associated factors of allergic rhinitis and atopic dermatitis in children. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2008;36:90–100.
- Batlles-Garrido J, Torres-Borrego J, Rubí-Ruiz T, Bonillo-Perales A, Gonzalez-Jiménez Y, Momblán De Cabo J, et al. Prevalence and factors linked to atopy in 10-and 11-year-old children in Almería. Spain. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2010;38:13–9.
- Allan K, Devereux G. Diet and asthma: nutrition implications from prevention to treatment. *J Am Diet Assoc*. 2011;111:258–68.
- Greene LS. Asthma, oxidant stress, and diet. *Nutrition*. 1999;15:899–907.
- Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*. 2001;358:1129–33.
- Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet*. 1999;353:1485–8.
- Brand PL, Baraldi E, Bisgaard H, Boner AL, Castro-Rodriguez JA, Custovic A, et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. *Eur Respir J*. 2008;32:1096–110.
- Piccinni MP, Mecacci F, Sampognaro S, Manetti R, Parronchi P, Maggi E, et al. Aeroallergen contact in utero during fetal life. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;102:301–3.
- Szefalusi Z, Nentwich I, Gerstmayr M, Jost E, Todoran L, Gratzl R, et al. Prenatal allergen contact with milk proteins. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:28–35.
- Jones AC, Miles EA, Warner JO, Colwell BM, Bryant TN, Warner JA. Fetal peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to mitogenic and allergenic stimuli during gestation. *Pediatr Allergy Immunol*. 1996;7:109–16.
- Holt PG, Macaubas C, Sly PD. Strategic targets for primary prevention of allergic disease in childhood. *Allergy*. 1998;53:72–6.
- Annesi-Maesano I, Moreau D, Strachan D. In utero and perinatal complications preceding asthma. *Allergy*. 2001;56:491–7.
- Nafstad P, Magnus P, Jaakkola JJ. Risk of childhood asthma and allergic rhinitis in relation to pregnancy complications. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:867–73.
- Nafstad P, Samuelsen SO, Irgens LM, Bjerkedal T. Pregnancy complications and the risk of asthma among Norwegian born between 1967 and 1993. *Eur J Epidemiol*. 2003;18:755–61.
- Braback L, Hedberg A. Perinatal risk factors for atopic disease in conscripts. *Clin Exp Allergy*. 1998;28:936–42.
- Nilsson L, Kjellman NI, Lofman O, Bjorksten B. Parity among atopic and non-atopic mothers. *Pediatr Allergy Immunol*. 1997;8:134–6.
- Siltanen M, Kajosaari M, Pohjavuori M, Savilahti E. Prematurity at birth reduces the long-term risk of atopy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:229–34.
- Arshad SH. Primary prevention of asthma and allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:3–14 [quiz 5].
- Arshad SH. Allergen avoidance and prevention of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004;4:119–23.

21. Tarini BA, Carroll AE, Sox CM, Christakis DA. Systematic review of the relationship between early introduction of solid foods to infants and the development of allergic disease. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2006;160:502–7.
22. Kramer MS. Maternal antigen avoidance during pregnancy for prevention of atopic disease in women at high risk. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;CD000133.
23. Salvatore S, Keymolen K, Hauser B, Vandenplas Y. Intervention during pregnancy and allergic disease in the offspring. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16:558–66.
24. Devereux G, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, Harbour PJ, et al. Low maternal vitamin E intake during pregnancy is associated with asthma in 5-year-old children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:499–507.
25. Litonjua AA, Rifas-Shiman SL, Ly NP, Tantisira KG, Rich-Edwards JW, Camargo Jr CA, et al. Maternal antioxidant intake in pregnancy and wheezing illnesses in children at 2 y of age. *Am J Clin Nutr.* 2006;84:903–11.
26. Devereux G, Litonjua AA, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:853–9.
27. Camargo Jr CA, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, Rich-Edwards JW, Weiss ST, Gold DR, et al. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:788–95.
28. Shaheen SO, Newson RB, Henderson AJ, Emmett PM, Sherriff A, Cooke M. Umbilical cord trace elements and minerals and risk of early childhood wheezing and eczema. *Eur Respir J.* 2004;24:292–7.
29. Salam MT, Li YF, Langholz B, Gilliland FD. Maternal fish consumption during pregnancy and risk of early childhood asthma. *J Asthma.* 2005;42:513–8.
30. Romieu I, Torrent M, Garcia-Esteban R, Ferrer C, Ribas-Fito N, Anto JM, et al. Maternal fish intake during pregnancy and atopy and asthma in infancy. *Clin Exp Allergy.* 2007;37:518–25.
31. Willers SM, Wijga AH, Brunekreef B, Kerkhof M, Gerritsen J, Hoekstra MO, et al. Maternal food consumption during pregnancy and the longitudinal development of childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:124–31.
32. Bolte G, Schmidt M, Maziak W, Keil U, Nasca P, von Mutius E, et al. The relation of markers of fetal growth with asthma, allergies and serum immunoglobulin E levels in children at age 5–7 years. *Clin Exp Allergy.* 2004;34:381–8.
33. Shore SA. Obesity and asthma: possible mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:1087–93.
34. Liem JJ, Kozyrskyj AL, Huq SI, Becker AB. The risk of developing food allergy in premature or low-birth-weight children. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119:1203–9.
35. Strid J, Thomson M, Hourihane J, Kimber I, Strobel S. A novel model of sensitization and oral tolerance to peanut protein. *Immunology.* 2004;113:293–303.
36. Gdalevich M, Mimouni D, Mimouni M. Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies. *J Pediatr.* 2001;139:261–6.
37. Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM, Martinez FD. Factors influencing the relation of infant feeding to asthma and recurrent wheeze in childhood. *Thorax.* 2001;56:192–7.
38. Osborn DA, Sinn JK. The Cochrane Library and dietary prevention of allergic disease and food hypersensitivity in children: an umbrella review. *Evid Based Child Health.* 2007;2:541–52, doi:10.1002/ebch.153 [Published online in Wiley InterScience www.interscience.wiley.com].
39. Zeiger RS. Food allergen avoidance in the prevention of food allergy in infants and children. *Pediatrics.* 2003;111:1662–71.
40. Burks AW. Early peanut consumption: postpone or promote? *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:424–5.
41. Tarini B. Delayed introduction of solids does not decrease the incidence of asthma or allergic rhinitis. *J Pediatr.* 2008;153:440.
42. Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:1331–6.
43. Fox AT, Sasieni P, du Toit G, Syed H, Lack G. Household peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:417–23.
44. Björkstén B. The intrauterine and postnatal environments. *J Allergy Clin Immunology.* 1999;104:1119–27.
45. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006;118:511–21.
46. Negele K, Heinrich J, Borte M, von Berg A, Schaaf B, Lehmann I, et al. Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004;15:48–54.
47. Laubereau B, Filipiak-Pittroff B, von Berg A, Grubl A, Reinhardt D, Wichmann HE, et al. Caesarean section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis, and sensitisation during the first year of life. *Arch Dis Child.* 2004;89:993–7.
48. Woodcock A, Moradi M, Smillie FI, Murray CS, Burnie JP, Custovic A. *Clostridium difficile*, atopy and wheeze during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol.* 2002;13:357–60.
49. Björkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:342–6.
50. Alm JS, Swartz J, Björkstén B, Engstrand L, Engström J, Kühn I, et al. An antroposopic lifestyle and intestinal microflora in infancy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2002;13:402–11.
51. Isolauri E. Dietary modification of atopic disease: use of probiotics in the prevention of atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2004;4:270–5.
52. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2001;357:1076–9.
53. Kalliomaki MA, Isolauri E. Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2004;24:739–52 [viii].
54. Weston S, Halbert AR, Richmond P, Prescott SL. Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child.* 2005;90:892–7.
55. Arslanoglu S, Moro GE, Schmitt J, Tandoi L, Rizzardi S, Boehm G. Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life. *J Nutr.* 2008;138:1091–5.
56. Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, Kolacek S, Mihatsch W, Moreno L, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;52:238–50.
57. Arm JP, Horton CE, Spur BW, Mencia-Huerta JM, Lee TH. The effects of dietary supplementation with fish oil lipids on the airways response to inhaled allergen in bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1989;139:1395–400.
58. Okamoto M, Mitsunobu F, Ashida K, Mifune T, Hosaki Y, Tsugeno H, et al. Effects of supplementation with n-3 fatty acids compared with n-6 fatty acids on bronchial asthma. *Intern Med.* 2000;39:107–11.
59. Nagakura T, Matsuda S, Shichijyo K, Sugimoto H, Hata K. Dietary supplementation with fish oil rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in children with bronchial asthma. *Eur Respir J.* 2000;16:861–5.
60. Stenius-Aarniala B, Aro A, Hakulinen A, Ahola I, Seppala E, Vapaatalo H. Evening primrose oil and fish oil are ineffective

- as supplementary treatment of bronchial asthma. *Ann Allergy*. 1989;62:534-7.
61. Hodge L, Salome CM, Hughes JM, Liu-Brennan D, Rimmer J, Allman M, et al. Effect of dietary intake of omega-3 and omega-6 fatty acids on severity of asthma in children. *Eur Respir J*. 1998;11:361-5.
 62. Thien FC, Mencia-Huerta JM, Lee TH. Dietary fish oil effects on seasonal hay fever and asthma in pollen-sensitive subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:1138-43.
 63. Thien FCK, De Luca S, Woods RK, Abramson MJ. Dietary marine fatty acids (fish oil) for asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002. Art. No.: CD001283, doi:10.1002/14651858.CD001283
 64. Dunstan JA, Roper J, Mitoulas L, Hartmann PE, Simmer K, Prescott SL. The effect of supplementation with fish oil during pregnancy on breast milk immunoglobulin A, soluble CD14, cytokine levels and fatty acid composition. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1237-42.
 65. Lauritzen L, Kjaer TM, Fruekilde MB, Michaelsen KF, Frokiaer H. Fish oil supplementation of lactating mothers affects cytokine production in 2 1/2-year-old children. *Lipids*. 2005;40:669-76.
 66. Mhrshahi S, Peat JK, Webb K, Oddy W, Marks GB, Mellis CM. Effect of omega-3 fatty acid concentrations in plasma on symptoms of asthma at 18 months of age. *Pediatr Allergy Immunol*. 2004;15:517-22.
 67. Peat JK, Mhrshahi S, Kemp AS, Marks GB, Tovey ER, Webb K, et al. Three-year outcomes of dietary fatty acid modification and house dust mite reduction in the childhood asthma prevention study. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:807-13.
 68. Sala-Vila A, Miles EA, Calder PC. Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:1432-50.
 69. Litonjua AA. Childhood asthma may be a consequence of vitamin D deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9:202-7.
 70. Binkley N, Ramamurthy R, Krueger D. Low vitamin D status: definition, prevalence, consequences, and correction. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39:287-301.
 71. Baeke F, Korf H, Overbergh L, van Etten E, Verstuyf A, Gysemans C, et al. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121:221-7.
 72. Erkkola M, Kaila M, Nwaru BI, Kronberg-Kippila C, Ahonen S, Nevalainen J, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy is inversely associated with asthma and allergic rhinitis in 5-year-old children. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:875-82.
 73. Walker VP, Modlin RL. The vitamin D connection to pediatric infections and immune function. *Pediatr Res*. 2009;65:106R-13R.
 74. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006;311:1770-3.
 75. Hata TR, Kotol P, Jackson M, Nguyen M, Paik A, Udall D, et al. Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:829-31.
 76. Urashima M, Segawa T, Okazaki M, Kurihara M, Wada Y, Ida H. Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr*. 2010;91:1255-60.
 77. Brehm JM, Celedon JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:765-71.
 78. White JH. Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. *Infect Immun*. 2008;76:3837-43.
 79. McNally JD, Leis K, Matheson LA, Karuananyake C, Sankaran K, Rosenberg AM. Vitamin D deficiency in young children with severe acute lower respiratory infection. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44:981-8.
 80. Searing DA, Zhang Y, Murphy JR, Hauk PJ, Goleva E, Leung DY. Decreased serum vitamin D levels in children with asthma and asthma with corticosteroid use. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:995-1000.
 81. Matheu V, Back O, Mondoc E, Issazadeh-Navikas S. Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:585-92.
 82. Jirapongsanuruk O, Melamed I, Leung DY. Additive immunosuppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and corticosteroids on TH1, but not TH2, responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:981-5.
 83. Hyponen E, Sovio U, Wjst M, Patel S, Pekkanen J, Hartikainen AL, et al. Infant vitamin D status and asthma conditions in adulthood: northern Finland birth cohort 1966. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1037:84-95.
 84. Monteleone CASA. Nutrition and asthma. *Arch Intern Med*. 1997;157:23-34.
 85. Riccioni G, Bucciarelli T, Mancini B, Di Ilio C, Della Vecchia R, D'Orazio N. Plasma lycopene and antioxidant vitamins in asthma: the PLAVA study. *J Asthma*. 2007;44:429-32.
 86. Allen S, Britton JR, Leonardi-Bee JA. Association between antioxidant vitamins and asthma outcome measures: systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2009;64:610-9.
 87. Gao J, Gao X, Li W, Zhu Y, Thompson PJ. Observational studies on the effect of dietary antioxidants on asthma: a meta-analysis. *Respirology*. 2008;13:528-36.
 88. Nurmatov U, Devereux G, Sheikh A. Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:724-33.
 89. Devereux G, Seaton A. Diet as a risk factor for asthma and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:1109-17 [quiz 18].
 90. Mizuno Y, Furusho T, Yoshida A, Nakamura H, Matsuura T, Eto Y. Serum vitamin A concentrations in asthmatic children in Japan. *Pediatr Int*. 2006;48:261-4.
 91. Arora P, Kumar V, Batra S. Vitamin A status in children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002;13:223-6.
 92. Harik-Khan RI, Muller DC, Wise RA. Serum vitamin levels and the risk of asthma in children. *Am J Epidemiol*. 2004;159:351-7.
 93. Al Senaidy AM. Serum vitamin A and beta-carotene levels in children with asthma. *J Asthma*. 2009;46:699-702.
 94. Reiter E, Jiang Q, Christen S. Anti-inflammatory properties of alpha- and gamma-tocopherol. *Mol Aspects Med*. 2007;28:668-91.
 95. Li-Weber M, Giaisi M, Treiber MK, Krammer PH. Vitamin E inhibits IL-4 gene expression in peripheral blood T cells. *Eur J Immunol*. 2002;32:2401-8.
 96. Turner SW, Campbell D, Smith N, Craig LC, McNeill G, Forbes SH, et al. Associations between fetal size, maternal {alpha}-tocopherol and childhood asthma. *Thorax*. 2010;65:391-7.
 97. Martindale S, McNeill G, Devereux G, Campbell D, Russell G, Seaton A. Antioxidant intake in pregnancy in relation to wheeze and eczema in the first two years of life. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:121-8.
 98. Riccioni G, Barbara M, Bucciarelli T, di Ilio C, D'Orazio N. Antioxidant vitamin supplementation in asthma. *Ann Clin Lab Sci*. 2007;37:96-101.
 99. Schunemann HJ, Grant BJ, Freudenheim JL, Muti P, Browne RW, Drake JA, et al. The relation of serum levels of antioxidant vitamins C and E, retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:1246-55.

100. Hu G, Cassano PA. Antioxidant nutrients and pulmonary function: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Am J Epidemiol*. 2000;151:975–81.
101. Bodner GGD, Brown K, Little J, Ross S, Seaton A. Antioxidant intake and adult-onset wheeze: a case-control study. *Eur Respir J Abnorm Child Psychol*. 1999;13:22–30.
102. Lessons A, Devereux G. Diet, allergy and wheezy illness: lessons from adults. *Pediatr Allergy Immunol*. 2000;11 Suppl. 13:37–40.
103. Soutar ASA, Brown K. Bronchial reactivity and dietary antioxidants. *Thorax*. 1997;52:166–70.
104. Britton JRPI, Richards HA, Knox AJ, Wisniewski AF, Lewis SA. Dietary antioxidant vitamin intake and lung function in the general population. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:1383–7.
105. Gilliland FD, Berhane KT, Li YF, Gauderman WJ, McConnell R, Peters J. Children's lung function and antioxidant vitamin, fruit, juice, and vegetable intake. *Am J Epidemiol*. 2003;158:576–84.
106. Kaur B, Rowe BH, Arnold E. Vitamin C supplementation for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;CD000993.
107. Kaur BRB, Ram FS. Vitamin C supplementation for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;4:CD000993.
108. Matsui EC, Matsui W. Higher serum folate levels are associated with a lower risk of atopy and wheeze. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:1253–9 [e2].
109. Haberg SE, London SJ, Stigum H, Nafstad P, Nystad W. Folic acid supplements in pregnancy and early childhood respiratory health. *Arch Dis Child*. 2009;94:180–4.
110. Whitrow MJ, Moore VM, Rumbold AR, Davies MJ. Effect of supplement folic acid in pregnancy on childhood asthma: a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol*. 2009;170:1486–93.
111. Hoffmann PR. Selenium and asthma: a complex relationship. *Allergy*. 2008;63:854–6.
112. Devereux G, McNeill G, Newman G, Turner S, Craig L, Martin-dale S, et al. Early childhood wheezing symptoms in relation to plasma selenium in pregnant mothers and neonates. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:1000–8.
113. Rubin RN, Navon L, Cassano PA. Relationship of serum antioxidants to asthma prevalence in youth. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:393–8.
114. Shaheen SO, Sterne JA, Thompson RL, Songhurst CE, Margetts BM, Burney PG. Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1823–8.
115. Tahan F, Karakukcu C. Zinc status in infantile wheezing. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41:630–4.
116. De Luca G, Olivieri F, Melotti G, Aiello G, Lubrano L, Boner AL. Fetal and early postnatal life roots of asthma. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010;23 Suppl. 3:80–3.
117. Wijga AH, Smit HA, Kerkhof M, de Jongste JC, Gerritsen J, Neijens HJ, et al. Association of consumption of products containing milk fat with reduced asthma risk in pre-school children: the PIAMA birth cohort study. *Thorax*. 2003;58:567–72.
118. Karmaus W, Fussman C. Consumption of milk fat and reduced asthma risk in pre-school children. *Thorax*. 2004;59:725 [author reply – 6].
119. Von Ehrenstein OS, Von Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:187–93.
120. von Mutius E, Weiland SK, Duhme H, Keil U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet*. 1998;351:862–6.
121. Wuthrich B, Schmid A, Walther B, Sieber R. Milk consumption does not lead to mucus production or occurrence of asthma. *J Am Coll Nutr*. 2005;24:547S–55S.
122. Pinnock CB, Arney WK. The milk-mucus belief: sensory analysis comparing cow's milk and a soy placebo. *Appetite*. 1993;20:61–70.
123. Okoko BJ, Burney PG, Newson RB, Potts JF, Shaheen SO. Childhood asthma and fruit consumption. *Eur Respir J*. 2007;29:1161–8.
124. de Batlle J, Garcia-Aymerich J, Barraza-Villarreal A, Anto JM, Romieu I. Mediterranean diet is associated with reduced asthma and rhinitis in Mexican children. *Allergy*. 2008;63:1310–6.
125. Chatzi L, Torrent M, Romieu I, Garcia-Esteban R, Ferrer C, Vioque J, et al. Mediterranean diet in pregnancy is protective for wheeze and atopy in childhood. *Thorax*. 2008;63:507–13.
126. Chatzi L, Torrent M, Romieu I, Garcia-Esteban R, Ferrer C, Vioque J, et al. Diet, wheeze, and atopy in school children in Menorca, Spain. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18:480–5.
127. Chatzi L, Apostolaki G, Bibakis I, Skypala I, Bibaki-Liakou V, Tzanakis N, et al. Protective effect of fruits, vegetables and the Mediterranean diet on asthma and allergies among children in Crete. *Thorax*. 2007;62:677–83.
128. Szepefalusi Z, Loibichler C, Pichler J, Reisenberger K, Ebner C, Urbanek R. Direct evidence for transplacental allergen transfer. *Pediatr Res*. 2000;48:404–7.
129. Holloway JA, Warner JH, Vance GH, Diaper ND, Warner JA, Jones CA. Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood. *Lancet*. 2000;356:1900–2.
130. Sausenthaler S, Koletzko S, Schaaf B, Lehmann I, Borte M, Herbarth O, et al. Maternal diet during pregnancy in relation to eczema and allergic sensitization in the offspring at 2 y of age. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:530–7.
131. Thompson LU. Antioxidants and hormone-mediated health benefits of whole grains. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1994;34:473–97.
132. Willers SM, Devereux G, Craig LC, McNeill G, Wijga AH, Abou El-Magd W, et al. Maternal food consumption during pregnancy and asthma, respiratory and atopic symptoms in 5-year-old children. *Thorax*. 2007;62:773–9.
133. Olsen SF, Osterdal ML, Salvig JD, Mortensen LM, Rytter D, Secher NJ, et al. Fish oil intake compared with olive oil intake in late pregnancy and asthma in the offspring: 16 y of registry-based follow-up from a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:167–75.

Anexo 2.

Article title: ANALYSIS OF THE LOCAL AND SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN INFANTS HOSPITALIZED DUE TO RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS BRONCHIOLITIS

Reference: ALLER602

Journal title: *Allergologia et Immunopathologia*

Corresponding author: Dr.Med. JAVIER TORRES-BORREGO

First author: Dr. Gloria Moreno-Solís

Received at Elsevier: 30 Apr 2014

DOI information: 10.1016/j.aller.2014.02.002

Manuscript Number:

Title: ANALYSIS OF THE LOCAL AND SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN
INFANTS HOSPITALIZED DUE TO RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS BRONCHIOLITIS

Article Type: Original Articles

Keywords: Th1, Th2, cytokines, chemokines, interleukines, macrophage
inflammatory proteins 1- α and 1- β RSV, acute bronchiolitis, infants,
nasopharyngeal secretions, hospitalization, severity, oxygen therapy.

Corresponding Author: Dr.Med. JAVIER TORRES-BORREGO, M.D., Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Hospital Universitario Reina
Sofía.

First Author: Gloria Moreno-Solís, M.D.

Order of Authors: Gloria Moreno-Solís, M.D.; JAVIER TORRES-BORREGO,
M.D., Ph.D.; María José De la Torre Aguilar, M.D.; Fernando Fernández
Gutierrez, M.D.; Ph.D.; Francisco Jesús Llorente Cantarero; Juan Luis
Pérez Navero, M.D.; Ph.D.

Abstract: Background:respiratory syncytial virus acute bronchiolitis
(RSV-AB) is a mayor cause of hospital admission among our infants.
The immune and inflammatory mechanisms involved in the RSV-AB and
factors influencing severity have not been clearly established,
though an imbalanced Th1 and Th2 response seems to be crucial.
Objectives:To assess the local and systemic inflammatory response in
RSVAB.

To find a possible marker of clinical severity and/or oxygen
requirements.

Patients and methods:levels of 9 cytokines were measured in
nasopharyngeal aspirate (NPA) and peripheral blood (PB) of 45 infants
with RSV-AB and 27 peer controls, including IFN γ , TNF α , VEGF and
interleukins 4, 6 and 10, and chemokines (IL-8 and macrophage
inflammatory proteins 1- α and 1- β)

Results:The levels of the analyzed cytokines and chemokines were
significantly higher in the NPA of RSV-AB group, with a decrease in
IL-
4/IFN γ ratio. IL-6 and MIP-1 β levels in NPA were directly correlated
to
oxygen therapy. PB showed an increase in IL-8 and a decrease in MIP-
1 α
and MIP-1 β in the RSV-AB group (only MIP-1 β associated to the need
for
oxygen therapy). No correlation was found between cytokines and
chemokines levels in NPA and PB.

Conclusions:This study shows that RSV triggers an inflammatory
response
fundamentally at the respiratory level, with scant systemic
repercussion.

This local response is characterized by an increase in Th1 and Th2
cytokines, though with a relative predominance of Th1. The
determination

upon patient admission of IL-6 and MIP-1 β levels in NPA, and of MIP-
1 β in PB could help predict severe forms and the need for
oxygenotherapy.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

First page

ANALYSIS OF THE LOCAL AND SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN INFANTS HOSPITALIZED DUE TO RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS BRONCHIOLITIS

Authors:

Gloria Moreno-Solís, Javier Torres-Borrego*, María José de la Torre, Fernando Fernández-Gutiérrez, Francisco Jesús Llorente Cantarero, Juan Luis Pérez-Navero

Pediatric Pneumology and Allergy Unit. Pediatrics Clinical Management Unit.
Reina Sofía Children's University Hospital
Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 – Córdoba (Spain)

*Corresponding author

The authors declare that they have no conflicts of interest in relation to this article.

***Manuscript**

ANALYSIS OF THE LOCAL AND SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN INFANTS ADMITTED DUE TO RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS BRONCHIOLITIS

ABSTRACT

Background: Acute bronchiolitis due to respiratory syncytial virus (RSV-AB) is the leading cause of hospital admission among infants in the autumn-winter months in our setting, and gives rise to wheezing after the infectious process. The immune and inflammatory mechanisms involved in the response to RSV and the factors influencing the severity of the condition have not been clearly established, though an imbalanced Th₁ and Th₂ response appears to play a key role.

Objectives: A study is made of the local and systemic inflammatory response profile in RSV-AB, the correlation between the two types of response, and the possible existence of a marker of clinical severity and/or oxygen therapy requirements.

Patients and methods: Measurements were made of the levels of 9 cytokines (interferon-gamma (IFN γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukins (ILs) 4, 6 and 10) and chemokines (IL-8 and macrophage inflammatory proteins (MIPs) 1-alpha and 1-beta) in nasopharyngeal aspirate (NPA) and peripheral blood (PB) upon admission among 45 infants with RSV-AB and 27 healthy infants as controls.

Results: The levels of the analyzed cytokines and chemokines were significantly higher in the NPA of infants with RSV-AB, with a decrease in IL-4/IFN γ ratio, versus the control group. The levels of IL-6 and MIP-1 β in NPA were directly correlated to the oxygen therapy needs during admission. In turn, PB showed an increase in IL-8 and a decrease in MIP-1 α and MIP-1 β in the patients with RSV-AB; only the latter chemokine was associated to the need for oxygen therapy. No correlation was found between the levels of cytokines and chemokines in NPA and PB.

Conclusions: The present study shows RSV triggers an inflammatory response fundamentally at the respiratory level, with scant systemic repercussion. This local response is characterized by an increase in Th₁ and Th₂ cytokines, though with a relative predominance of Th₁ activity. The determination upon patient admission of IL-6 and MIP-1 β levels in NPA, and of MIP-1 β in PB could help predict more severe forms of RSV-AB and the need for oxygen therapy.

Key words: Th1, Th2, cytokines, chemokines, RSV, acute bronchiolitis, infants, nasopharyngeal secretions, hospitalization, severity, oxygen therapy.

*** Manuscript**

ANALYSIS OF THE LOCAL AND SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN INFANTS ADMITTED DUE TO BRONCHIOLITIS PRODUCED BY RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

INTRODUCTION

The airway inflammation observed in acute bronchiolitis due to respiratory syncytial virus (RSV-AB) is encompassed within a complex local response involving the participation of dendritic cells, lymphocytes, macrophages and particularly polymorphonuclear cells¹. These cells sequentially release cytokines, chemokines, proteases, reactive oxygen species (ROS) and other mediators during the evolution of acute bronchiolitis (AB)². The existing data regarding the cytokine profile involved in the response to RSV are inconclusive³⁻⁶.

The severity of AB has been associated with an imbalance in the production of cytokines on the part of the T helper cell subpopulations (Th1 and Th2)^{7,8}. The Th1 cytokines include particularly interferon-gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF α), which promote the host immune response to intracellular pathogens. The Th2 lymphocytes in turn produce interleukins 4 (IL-4), 5 (IL-5), 13 (IL-13), 10 (IL-10) and 16 (IL-16), chemokines such as interleukin 8 (IL-8 / CXCL8), and macrophage inflammatory proteins (MIPs) 1 α (MIP-1 α / CCL3) and 1 β (MIP-1 β), which are seen to increase in situations of inflammation and/or allergy. The inflammatory response to RSV has fundamentally been investigated in respiratory samples such as nasal secretions and bronchoalveolar lavage (BAL), while the results obtained in peripheral blood (PB) are subject to controversy^{4,9,10}. Some authors have observed a prevalence of Th2 cytokines^{9,11}, while others have reported a prevalence of Th1 cytokines¹² or a mixed Th1-Th2 inflammatory response^{3,13}. These discrepancies reflect the enormous complexity of the immune regulatory mechanisms that precisely modulate the balance between inflammatory and antiinflammatory response.

The clinical manifestations of bronchiolitis are essentially of a respiratory nature with little systemic expression. This suggests that the inflammatory and immune responses to RSV are confined to the airway with a scant generalized inflammatory response, and explains the discrepancies between the levels of inflammatory markers measured at the respiratory level and in blood.

Since bronchiolitis is a potentially serious condition leading to hospital admission in infants during epidemic periods, and is associated with wheezing for years after the infectious process, it would be interesting to identify biomarkers that are easy to measure, at both the respiratory level ¹⁴⁻¹⁶ and in PB ¹⁷, and useful for diagnosing and predicting the course of the disease.

In this context, the primary aim of the present case-control study is to analyze cytokine and chemokine levels in nasopharyngeal aspirate (NPA) and PB, with a view to respectively assessing the local and systemic response to AB in infants with RSV-AB, compared with healthy controls. As secondary objectives, the study aims to evaluate the correlation between local and systemic responses to RSV, and explore possible predictors of disease severity and need for oxygen therapy.

METHODS

• Participants and study design

Forty-five infants aged 1-11 months and admitted to the Department of Pediatrics of Reina Sofía Children's University Hospital (Córdoba, Spain) with a first episode of acute bronchiolitis caused by RSV were recruited from 1st December 2010 to 31st March 2011. The inclusion criteria were a prodromal history consistent with viral upper respiratory tract infection (cough, coryza, rhinorrhea), increased respiratory effort (tachypnea, intercostal retractions or use of accessory muscles) and / or abnormal auscultation findings (wheezing or crackles). Patients were excluded from the study in the presence of one or more of the following: symptoms for longer than 5 days, premature birth (gestational age < 37 weeks), low weight (< P10) or overweight (> P85), a history of chronic or congenital diseases of the lungs, heart or nervous system, immune deficiency or previous treatment with palivizumab or corticosteroids. Infants with RSV-negative bronchiolitis were likewise excluded.

The control group comprised 27 healthy infants under 12 months of age, without respiratory tract illness during the last 30 days or any history of hospital admission due to bronchiolitis or wheezing, and recruited during the same period as the bronchiolitis group. These infants came from the Department of Surgery, where a preoperative study, including blood tests, was indicated for elective surgery. The study protocol was previously approved by the local Ethics Committee.

At the time of enrollment, the parents or legal guardians were asked to sign the informed consent form and to answer questions referred to demographic

characteristics and the presence of risk factors associated with bronchiolitis, including exposure to tobacco smoke, familial atopy, atopic dermatitis and breastfeeding history.

- **Severity assessment**

The severity of bronchiolitis was assessed upon admission and daily during hospitalization by two investigators, using a modified severity score for bronchiolitis¹⁸ that includes wheezing / crackles, intercostal retraction, respiratory frequency, heart rate and cyanosis - moderate to severe disease being defined as a score of 4 or greater, in order to divide the patients into two severity subgroups. Simultaneously, the RSV-AB group was subdivided depending on the oxygen needs during hospital admission. Oxygen therapy was indicated in the case of persistent SatO₂ ≤ 92%.

- **Samples collection**

Samples were collected on the first day after admission. After instilling 3 ml of saline solution in each nostril, NPA were collected in a sterile mucous trap applying mild suction. The samples were centrifuged and the supernatant was divided into aliquots. Blood samples were subsequently collected using an indwelling venous line to draw a 3-ml sample into a tube containing EDTA. After centrifugation at 3500 g for 10 minutes, plasma and the buffy coat were removed into different Eppendorf tubes. The serum and NPA supernatant samples were then frozen at -82°C until cytokine analysis.

- **Cytokine/chemokine analysis**

Biomarkers were measured in NPA and plasma samples with a Luminex[®] xMAP[™] multiplexing system using Labscan[™] 100 technology and LINCOplex assay kits, based on the use of fluorescently-dyed beads conjugated with monoclonal antibodies specific for 9 target cytokines and chemokines: IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN γ , vascular endothelial growth factor (VEGF), IL-8 (CXCL8), MIP-1 α (CCL3), and MIP-1 β .

Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) or median (interquartile range) for quantitative variables, while qualitative variables were reported as absolute and relative frequencies. In all cases statistical significance was considered for $p < 0.05$ with two-tailed contrasts.

Normal data distribution was assessed by the Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of variances was estimated using the Levene test. Comparisons of means between groups in the case of continuous variables with a normal distribution were carried out with the Student t-test for unpaired samples, while the Mann-Whitney U-test was used for variables with a non-normal distribution. Categorical data were analyzed using the chi-squared test or Fisher exact test.

Since there were differences in the mean age of the patients with bronchiolitis and the controls, the two groups were compared using analysis of covariance (ANCOVA) adjusted for age, and Sidack's correction. Correlations between variables were assessed using Spearman's rho analysis. The Statistical Package for Social Science (PASW Statistic 18; SPSS, Chicago, IL, USA) was used throughout.

RESULTS

Forty-five infants with RSV-AB were included in the study (17 mild and 28 moderate-severe cases according to the severity score definition of < 4 or ≥ 5 , respectively) along with 27 controls. Twenty-one infants (47%) required oxygen therapy during admission. The baseline characteristics of the infants included in the study are shown in Table 1. There were no differences in terms of sex, type of feeding or exposure to tobacco smoke between the groups. The only significant difference between them corresponded to age and, consequently, body weight.

CYTOKINE AND CHEMOKINE LEVELS IN NASOPHARYNGEAL ASPIRATE

After adjusting for age, the cytokine and chemokine levels were seen to be significantly increased in NPA of the infants admitted with RSV-AB. The analysis of subgroups revealed no differences in the respiratory levels of cytokines and chemokines according to the severity of bronchiolitis, though significant IL-6 and MIP-1 β elevations were recorded in NPA of those infants with AB requiring oxygen versus those who did not require oxygen therapy (Fig. 1).

The IL-4/IFN γ ratio (indicative of Th1/Th2 response) in the bronchiolitis group was significantly reduced with respect to the control group (0.02 ± 0.005 vs 2.57 ± 7.41 , respectively; $p=0.009$). There were no differences in IL-4/IFN γ ratio according to the severity score (mild: 0.026 ± 0.006 vs moderate-severe: 0.027 ± 0.006 ; $p=1$) or oxygen requirements (without O $_2$: 0.026 ± 0.002 vs with O $_2$: 0.027 ± 0.004 ; $p=0.996$)(Table 2).

CYTOKINE AND CHEMOKINE LEVELS IN PLASMA

Plasma measurements showed a significant increase in IL-8 and a decrease in the concentrations of chemokines MIP-1 α and MIP-1 β (Table 3) among the infants with VRS-AB. The concentrations of the rest of cytokines were similar in both groups. There were no significant differences in cytokine and chemokine levels according to either the severity score or the need for oxygen, except in the case of MIP-1 β , which was significantly lower in patients requiring oxygen therapy or with a moderate-severe severity score versus the mild presentations and controls (AB with O₂: 365.4 \pm 240.9 pg/ml; VRS-AB with severity score \geq 4: 415.2 \pm 283.7 pg/ml, vs control: 626.49 \pm 445.8 pg/ml; p=0.002 and p=0.006, respectively).

CORRELATION BETWEEN CYTOKINE AND CHEMOKINE LEVELS IN NPA AND PLASMA

No significant correlation was observed between the cytokine levels measured in NPA and plasma, though significant associations were noted between the chemokine concentrations in plasma and respiratory secretions, with a direct correlation in the case of IL-8 and an inverse correlation (elevated in NPA and diminished in plasma) in the case of MIP-1 α and MIP-1 β (Table 4).

DISCUSSION

The pathogenesis of RSV-AB is characterized by the combination of direct cytopathic action of the virus upon the bronchial mucosa and the associated complex local inflammatory reaction, with the sequential release of cytokines, chemokines, proteases and reactive oxygen species, among other mediators². A number of studies^{15, 19-21} have found the levels of cytokines and chemokines in NPA to show a good correlation with the concentrations found in bronchoalveolar lavage (BAL). This observation, and the fact that nasopharyngeal aspiration is easy and noninvasive, define NPA as the samples of choice for studying airway inflammation in acute bronchiolitis.

In the present study all the cytokines and chemokines analyzed in infants admitted due to RSV-AB were found to be increased in NPA, though without differences between subgroups according to the severity score. In contrast, significant IL-6 and MIP-1 β elevations were observed in NPA among those infants with AB requiring oxygen therapy. This finding, and the detection of very low plasma concentrations of cytokines and discrete modifications in chemokines, suggest that the immune and inflammatory response to RSV occurs at a local level

within the airway, with scant systemic repercussion, as has been previously reported²².

Controversy persists regarding the cytokine profile generated in response to RSV infection – the existing data being inconclusive in this respect³⁻⁶. There have been reports of a predominance of Th2 cytokines^{9,11}, of Th1 cytokines¹², and of a mixed Th1-Th2 response pattern^{3,13}. These discrepancies may be due to factors dependent upon the design of the studies, such as the severity score used, the characteristics of the infants (age, need for admission or oxygen therapy), the timing of sample collection, or the possible influence of comorbidities^{23,24}. Another aspect to be taken into account is the possible influence of environmental factors such as tobacco smoke²⁵ and genetic parameters²⁶⁻²⁸ upon the production of cytokines and chemokines.

In the present study, although we observed elevations of all the cytokines in NPA, the IL-4/IFN γ ratio was significantly lowered among the infants with RSV-AB, thus indicating a relative predominance of Th1 responses in this patient group versus the controls. Other authors have published similar results^{12,29}. However, these data are in contrast to the observations of other investigators such as Legg et al.⁴, who recorded a predominance of Th2 responses (increased IL-4/IFN γ ratio) in infants that developed AB versus those which only presented upper airway RSV infection. In turn, Bermejo-Martín et al.³⁰ observed a relative predominance of Th2 responses to RSV on comparing different Th1 and Th2 cytokine ratios other than IL-4/IFN γ in infants with AB. A differentiating element in our study with respect to the above commented publications is the fact that the latter included bronchiolitis patients of older age. This might indicate that the Th2 responses increase with age³¹, and underscores the relevance of a relative predominance of Th1 responses in younger infants, since these may constitute the main response to RSV infection in such patients. Although the mean age of the RSV-AB patients in our study was under 6 months, the age of the controls was slightly greater, since infants requiring admission due to bronchiolitis tend to be comparatively younger. On the other hand, the ethical problems associated with the conduction of studies with healthy infants^{5,7,15,30} also causes the control group to be older than the bronchiolitis group. In any case, our statistical analysis was adjusted for age in order to avoid any possible influence of this parameter upon the results obtained.

The pathogenesis of AB may be characterized by an exaggerated inflammatory response mediated by Th1 cytokines³² that would prevail over the control mechanisms designed to correct excessive inflammation. Studies with murine models have evidenced the dual role of IFN γ , which on one hand limits

viral replication and counters the action of Th2 cytokines, and on the other is associated with airway obstruction³³ secondary to stimulation of the innate immune response and inhibition of the adaptive response – generating inflammation with acute and chronic bronchial damage, and allowing recurrent viral infection³⁴ by evading the memory defense response.

There is also controversy as to whether^{29,35-37} or not²⁰ the cytokine profile varies according to the infective virus involved. In order to avoid this confusion factor, we only included previously healthy infants born to term and admitted to a single hospital center due to AB with positive RSV antigen titers, during the same epidemic period, and with sampling performed within the first 24 hours after admission.

In coincidence with other authors^{20,38,39}, we found the severity of bronchiolitis to be more closely correlated to chemokine elevations than to cytokine increments, since we only recorded a significant correlation between the need for oxygen therapy during admission and an increase in IL-6 and MIP-1 β levels in NPA. Garcia et al.²⁰ found a correlation between the oxygen needs and the MIP-1 α (direct) and IFN γ (inverse) levels. Similar findings have been reported by Semple et al.¹⁵, though it is not clear whether this has an impact upon the global severity of the condition (symptoms score or days of admission). In any case, these data must be interpreted with caution, since the first of the aforementioned studies did not analyze the severity parameters (oxygen therapy and duration of admission) according to patient age, despite the inclusion of infants under two years of age. In turn, in the second study, the patients requiring oxygen therapy were older than those who did not. Once again, age appears to be a determining factor in the analysis of cytokine levels.

The above findings are in contrast to those of Bennet et al.⁴⁰, who recorded an inverse correlation between the levels of IL-6, MIP-1 β , IL-8 and IL-10 in NPA and the severity of AB, suggesting that they act as protective factors against hypoxia. However, this study included infants with AB due to RSV and other viruses which could produce different cytokine release profiles.

We also recorded increased levels of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in NPA, though without significant differences according to the need for oxygen therapy or the severity score. RSV and hypoxia are potent inducers of VEGF⁴¹, which stimulates angiogenesis in the inflammatory zone, as well as macrophage and granulocyte chemotaxis, and increases the permeability of the bronchiolar respiratory epithelium.

We analyzed cytokines and chemokines in parallel in plasma to assess the systemic repercussions of the inflammatory response to RSV. Very low cytokine and chemokine levels were found (with the exception of MIP-1 β), thereby indicating a scant systemic response to the virus. No significant differences in the levels of cytokines were observed with respect to the controls, though in contrast the chemokines revealed increased IL-8 and lowered MIP-1 α and MIP-1 β concentrations in the infants with VRS-AB. This could be the result of the migration of macrophages (the main producers of MIP) through leukodiapedesis from the capillaries towards the airway mucosa, where an increased local consumption of MIP-1 α and MIP-1 β would result in a decrease in their plasma levels. On comparing the plasma levels of these chemokines according to the severity score, we only found a significant decrease in MIP-1 β in the patients with AB requiring oxygen therapy or with a moderate-severe disease score, compared with mild VRS-AB. The findings at the respiratory level²⁰ and in peripheral blood⁴² suggest that the MIP-1 β production capacity could be related to the pathogenesis of the disease.

We observed no modification of the IFN γ levels in peripheral blood among the infants with VRS-AB, thus supporting the idea that the infection and subsequent inflammation generated by RSV are limited to the respiratory epithelium, since RSV is rarely isolated from blood⁴⁴ or extrapulmonary tissues^{45,46}. Other authors have reported increased⁷ or diminished plasma IFN γ levels^{5,17,43}. These contrasting observations among studies could be explained by the methodological differences referred to above.

In coincidence with other investigators^{22,30,39}, we found no association between the levels of each cytokine in NPA and in plasma. In contrast, we observed a significant (but weak) association between the levels of chemokines in plasma and in respiratory secretions. Specifically, a direct correlation was recorded in the case of IL-8, and an inverse correlation in the case of MIP-1 α and MIP-1 β (elevated in NPA and diminished in plasma). This supports the existence of two almost independent compartments in the immune and inflammatory response to RSV, interconnected by chemokines. The latter constitute key elements whose activation induces migration of the cells from the bloodstream towards the affected compartment, i.e., the bronchioles.

In any potentially serious condition such as bronchiolitis, it is of interest to identify potential prognostic indicators. In this context, we recorded an increase in IL-6 and MIP-1 β in NPA and a decrease in MIP-1 β in plasma among infants with AB requiring oxygen therapy during admission - though we found no correlation

with the bronchiolitis severity score. We therefore consider it interesting to reorientate the assessment of AB severity, adding more objective measures such as transcutaneous oxygen saturation to the clinical scores, which are characterized by a certain subjectiveness.

The major strength of our study is the fact that the number of participants was obtained from among all the patients admitted due to AB with positive RSV testing in the same epidemic period and in a single hospital center. A limitation of the study is the small size of the sample and thus of the subgroups, due to the ethical limitations in recruiting the control group. This explains the case / control ratio of 1.6 / 1.

Overall, the data obtained indicate that the immune and inflammatory responses to RSV infection are essentially circumscribed to the airway, with a nonspecific elevation of all the biomarkers measured in nasopharyngeal aspirate, though with a relative predominance of the Th1 response. In contrast, with the exception of the activation of chemokines, few inflammatory repercussions were recorded at a systemic level.

The finding of an elevation of IL-6 and MIP-1 β in respiratory secretions and of a decrease in plasma MIP-1 β associated with the need for oxygen therapy and / or increased severity of VRS-AB define these molecules as potential markers of disease severity or at least of hypoxemia. Consequently, the determination of these biomarkers in NPA and/or serum could be considered in clinical practice. Further multicenter and prospective trials are required to clarify these issues.

Acknowledgements

This study was supported in part by a grant from the Spanish Society of Pediatric Pneumology (SENP) in 2010.

Table (if other format than MS Word)

Table 1. Demographic characteristics of the infants with RSV-AB and controls.

	Control (n= 27)	Bronchiolitis (n=45)	p
Age (months)	4.33±2.76	2.34±1.58	0.001
Males	15 (53.6%)	24 (52.2%)	0.549
Breastfeeding	20 (71.4%)	36 (78.3%)	0.347
Parental smoking	14 (50)	23 (50%)	1
Family history of atopic disease	8 (26%)	23 (50%)	0.091
Weight	6.68±1.65	5.6±1.16	0.004
Siblings n (%)	24 (85.7%)	30 (65.2%)	0.064

Qualitative variables are expressed as absolutes frequencies (percentages) and continuous variable as the mean ± SD. Chi-squared, Fisher's exact and Mann-Whitney U tests were used to determine differences between groups. $p \leq 0.05$ was considered to be significant.

Table 2. Plasma concentrations (pg/ml) of chemokines and cytokines in infants with RSV-AB and controls.

IFN γ : interferon-gamma; IL-6: interleukin-6; IL-8: interleukin-8; IL-10: interleukin-10; MIP-1 α : macrophage inflammatory protein-alpha; MIP-1 β : macrophage inflammatory protein-beta; TNF α : tumor necrosis factor-alpha

Statistical significance between control and bronchiolitis groups on applying ANCOVA (analysis of covariance) after adjusting for age. Data are expressed as the mean \pm SEM.

Plasma levels (pg/ml)	Control (N=27)	Bronchiolitis (N=45)	p
IFNγ	1.38 \pm 3.5	1.32 \pm 1.43	0.827
IL-6	3.54 \pm 5.95	11.22 \pm 27.51	0.262
IL-8	1.12 \pm 0.66	2.15 \pm 2.09	0.047
IL-10	1.80 \pm 2.95	3.31 \pm 4.20	0.213
MIP-1α	2.82 \pm 1.47	1.90 \pm 1.67	0.017
MIP-1β	626.49 \pm 445.84	443.88 \pm 303.6	0.002
TNFα	1.33 \pm 1.59	1.37 \pm 1.13	0.826

Table 3. Correlation between cytokine levels in nasal secretions and plasma.

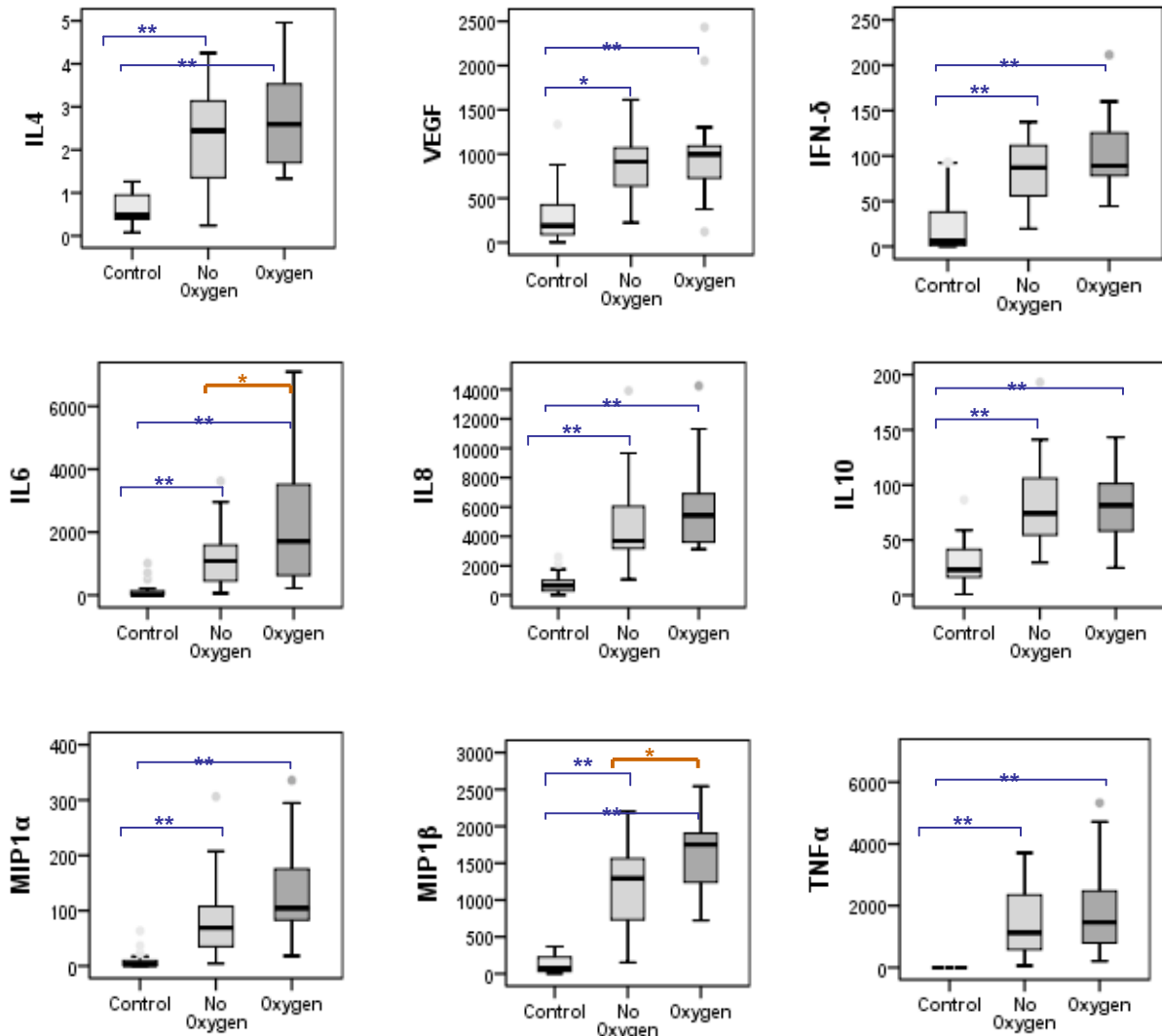
IFN γ : interferon-gamma; IL-6: interleukin-6; IL-8: interleukin-8; IL-10: interleukin-10;
MIP-1:Macrophage inflammatory protein-1;TNF α :tumor necrosis factor-alpha.

r: Spearman's rho coefficient

Variable	r (N=72)	p
IFNγ	0.02	0.876
IL-6	0.147	0.255
IL-8	0.370	0.003
IL-10	0.251	0.056
MIP-1α	-0.364	0.004
MIP-1β	-0.303	0.017
TNFα	-0.069	0.662

Figure

Figure 1. Cytokines and chemokines levels (pg/ml) in NPA of healthy controls (N=27) and infants with RSV-AB (N=45) classified according to oxygen requirements. Statistical significance between control and bronchiolitis groups on applying ANCOVA (analysis of covariance) after adjusting for age. Data are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$



IL-4: interleukin 4 VEGF: vascular endothelial growth factor

IFN δ : interferon-gamma

IL-6: interleukin-6 IL-8: interleukin-8 IL-10: interleukin-10

MIP-1 α : macrophage inflammatory protein-alpha

MIP-1 β : macrophage inflammatory protein-beta

TNF α : tumor necrosis factor-alpha

REFERENCES

1. Everard ML, Swarbrick A, Wraitham M, McIntyre J, Dunkley C, James PD, et al. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child* 1994; 71:428-32.
2. McNamara PS, Flanagan BF, Hart CA, Smyth RL. Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005; 191:1225-32.
3. Hussell T, Spender LC, Georgiou A, O'Garra A, Openshaw PJ. Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1996; 77 (Pt 10):2447-55.
4. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:633-9.
5. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JT, et al. Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur Respir J* 1999; 14:144-9.
6. Lemanske RF, Jr. Does respiratory syncytial viral-induced bronchiolitis result from helper T cell type 1/type 2 cytokine imbalance? *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:625-7.
7. Chen ZM, Mao JH, Du LZ, Tang YM. Association of cytokine responses with disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *Acta Paediatr* 2002; 91:914-22.
8. McNamara PS, Flanagan BF, Selby AM, Hart CA, Smyth RL. Pro- and anti-inflammatory responses in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur Respir J* 2004; 23:106-12.
9. Bendelja K, Gagro A, Bace A, Lokar-Kolbas R, Krsulovic-Hresic V, Drazenovic V, et al. Predominant type-2 response in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection demonstrated by cytokine flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:332-8.
10. Pinto RA, Arredondo SM, Bono MR, Gaggero AA, Diaz PV. T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol. *Pediatrics* 2006; 117:e878-86.
11. Roman M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendano LF, Simon V, Escobar AM, et al. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:190-5.
12. Brandenburg AH, Kleinjan A, van Het Land B, Moll HA, Timmerman HH, de Swart RL, et al. Type 1-like immune response is found in children with respiratory

- syncytial virus infection regardless of clinical severity. *J Med Virol* 2000; 62:267-77.
13. Mobbs KJ, Smyth RL, O'Hea U, Ashby D, Ritson P, Hart CA. Cytokines in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 2002; 33:449-52.
 14. Laham FR, Trott AA, Bennett BL, Kozinetz CA, Jewell AM, Garofalo RP, et al. LDH concentration in nasal-wash fluid as a biochemical predictor of bronchiolitis severity. *Pediatrics* 2010; 125:e225-33.
 15. Semple MG, Dankert HM, Ebrahimi B, Correia JB, Booth JA, Stewart JP, et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infants is associated with reduced airway interferon gamma and substance P. *PLoS One* 2007; 2:e1038.
 16. Rosenberg HF, Domachowske JB. Inflammatory responses to respiratory syncytial virus (RSV) infection and the development of immunomodulatory pharmacotherapeutics. *Curr Med Chem* 2012; 19:1424-31.
 17. Grzeoek E, Koltan S, Debski R, Wysocki M, Gruszka M, Kubicka M, et al. Concentrations of IL-15, IL-18, IFN-gamma and activity of CD4(+), CD8(+) and NK cells at admission in children with viral bronchiolitis. *Exp Ther Med* 2010; 1:873-7.
 18. Ferrer J. Comparison of two nebulized treatments in wheezing infants. *Eur Respir J*, 1988;1 (suppl) 306.
 19. Byeon JH, Lee JC, Choi IS, Yoo Y, Park SH, Choung JT. Comparison of cytokine responses in nasopharyngeal aspirates from children with viral lower respiratory tract infections. *Acta Paediatr* 2009; 98:725-30.
 20. Garcia C, Soriano-Fallas A, Lozano J, Leos N, Gomez AM, Ramilo O, et al. Decreased innate immune cytokine responses correlate with disease severity in children with respiratory syncytial virus and human rhinovirus bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31:86-9.
 21. Joshi P, Kakakios A, Jayasekera J, Isaacs D. A comparison of IL-2 levels in nasopharyngeal and endotracheal aspirates of babies with respiratory syncytial viral bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:618-20.
 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. Boyce TG, Mellen BG, Mitchel EF, Jr., Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. *J Pediatr* 2000; 137:865-70.

24. Kristensen K, Stensballe LG, Bjerre J, Roth D, Fisker N, Kongstad T, et al. Risk factors for respiratory syncytial virus hospitalisation in children with heart disease. *Arch Dis Child* 2009; 94:785-9.
25. Bradley JP, Bacharier LB, Bonfiglio J, Schechtman KB, Strunk R, Storch G, et al. Severity of respiratory syncytial virus bronchiolitis is affected by cigarette smoke exposure and atopy. *Pediatrics* 2005; 115:e7-14.
26. Hoebee B, Rietveld E, Bont L, Oosten M, Hodemaekers HM, Nagelkerke NJ, et al. Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms. *J Infect Dis* 2003; 187:2-11.
27. Puthothu B, Krueger M, Forster J, Heinze J, Weckmann M, Heinzmann A. Interleukin (IL)-18 polymorphism 133C/G is associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26:1094-8.
28. 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.
29. Flores P, Guimaraes J, Videira Amaral JM. Th1 and th2 cytokine expression in nasopharyngeal secretions during acute bronchiolitis in children younger than two years old. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2011; 39:3-9.
30. Bermejo-Martin JF, Garcia-Arevalo MC, De Lejarazu RO, Ardura J, Eiros JM, Alonso A, et al. Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children. *Eur Cytokine Netw* 2007; 18:162-7.
31. Buck RH, Cordle CT, Thomas DJ, Winship TR, Schaller JP, Dugle JE. Longitudinal study of intracellular T cell cytokine production in infants compared to adults. *Clin Exp Immunol* 2002; 128:490-7.
32. van Schaik SM, Tristram DA, Nagpal IS, Hintz KM, Welliver RC, 2nd, Welliver RC. Increased production of IFN-gamma and cysteinyl leukotrienes in virus-induced wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:630-6.
33. van Schaik SM, Obot N, Enhorning G, Hintz K, Gross K, Hancock GE, et al. Role of interferon gamma in the pathogenesis of primary respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice. *J Med Virol* 2000; 62:257-66.
34. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001:1618-23.
35. Laham FR, Israele V, Casellas JM, Garcia AM, Lac Prugent CM, Hoffman SJ, et al. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with

- human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *J Infect Dis* 2004; 189:2047-56.
36. Guerrero-Plata A, Casola A, Garofalo RP. Human metapneumovirus induces a profile of lung cytokines distinct from that of respiratory syncytial virus. *J Virol* 2005; 79:14992-7.
 37. Melendi GA, Laham FR, Monsalvo AC, Casellas JM, Israele V, Polack NR, et al. Cytokine profiles in the respiratory tract during primary infection with human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, or influenza virus in infants. *Pediatrics* 2007; 120:e410-5.
 38. Garofalo RP, Patti J, Hintz KA, Hill V, Ogra PL, Welliver RC. Macrophage inflammatory protein-1alpha (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2001; 184:393-9.
 39. Welliver RC, Garofalo RP, Ogra PL. Beta-chemokines, but neither T helper type 1 nor T helper type 2 cytokines, correlate with severity of illness during respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:457-61.
 40. Bennett BL, Garofalo RP, Cron SG, Hosakote YM, Atmar RL, Macias CG, et al. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2007; 195:1532-40.
 41. Lee CG, Yoon HJ, Zhu Z, Link H, Wang Z, Gwaltney JM, et al. Respiratory syncytial virus stimulation of vascular endothelial cell growth Factor/Vascular permeability factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:662-9.
 42. Mella C, Suarez-Arrabal MC, Lopez S, Stephens J, Fernandez S, Hall MW, et al. Innate Immune Dysfunction is Associated with Enhanced Disease Severity In Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *J Infect Dis* 2013; 207:564-73.
 43. Hassan MA, Eldin AM, Ahmed MM. T - helper2 /T - helper1 imbalance in respiratory syncytial virus bronchiolitis in relation to disease severity and outcome. *Egypt J Immunol* 2008; 15:153-60.
 44. O'Donnell DR, McGarvey MJ, Tully JM, Balfour-Lynn IM, Openshaw PJ. Respiratory syncytial virus RNA in cells from the peripheral blood during acute infection. *J Pediatr* 1998; 133:272-4.
 45. Nadal D, Wunderli W, Meurmann O, Briner J, Hirsig J. Isolation of respiratory syncytial virus from liver tissue and extrahepatic biliary atresia material. *Scand J Infect Dis* 1990; 22:91-3.
 46. Zlateva KT, Van Ranst M. Detection of subgroup B respiratory syncytial virus in the cerebrospinal fluid of a patient with respiratory syncytial virus pneumonia. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23:1065-6.

VIII.Anexos

Anexo 1. Informe de aprobación del estudio por el Comité Local de Investigación Clínica y bioética del HURS.



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Hospital Universitario Reina Sofía

Ref. 1.590

INFORME COMITÉ LOCAL DE ENSAYOS CLÍNICOS

Gregorio Jurado Cáliz, Secretario del Comité Local de Ensayos Clínicos del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, del que es presidente D. José Luis Barranco Quintana

CERTIFICA

Que la comisión permanente del Comité Local de ensayos Clínicos ha analizado y evaluado con fecha del 12/01/10, la solicitud del proyecto de investigación: "Utilidad de la determinación de parámetros proinflamatorios y de oxidación como factor pronóstico en bronquiolitis aguda", cuya actividad investigadora corresponde al Dr. Javier Torres Berrego, del Servicio de Pediatría, del Hospital U. Reina Sofía.

En vista del mismo, el Comité Local de Ensayos clínicos en su reunión del 27/01/10, (acta nº 179, de fecha 27/01/10; referencia 1590), ha dado el visto bueno al presente estudio, entendiendo que dicho estudio cumple los requisitos metodológicos necesarios, se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos y, que es viable en todos sus términos, por lo que se considera adecuado que se lleve a fin el citado estudio.

Lo que firmo en Córdoba, a 28 de enero de 2010

EL SECRETARIO CLEC

Vº Bº EL PRESIDENTE CLEC

Fdo.: Gregorio Jurado Cáliz

Fdo. José Luis Barranco Quintana

COMITE ETICO INVESTIGACION CLINICA
HOSPITAL "REINA SOFIA"
CORDOBA

VIII.Anexos

Anexo 2. Hoja informativa y consentimiento informado

Estimados padres:

Un grupo de pediatras del H.U. Reina Sofía, pertenecientes a las Unidades de Lactantes y Neumología y Alergia Pediátricas, estamos realizando un estudio en pacientes que ingresan con el diagnóstico de bronquiolitis aguda entre los meses de diciembre 2009 y marzo 2010. Básicamente consiste en estudiar biomarcadores en las secreciones respiratorias y sangre.

Por ello, le solicitamos la participación de usted y su hijo-a en este estudio, que incluye los siguientes apartados:

- Entrevista clínica, en la que se le preguntarán datos acerca de los síntomas respiratorios presentados por su hijo-a desde el nacimiento y los días antes a su ingreso actual.
- Exploración física, incluyendo auscultación cardiorrespiratoria, peso, talla y signos de dificultad respiratoria.
- Toma de muestras de aspirado nasofaríngeo para detección de virus respiratorios. Consiste en realizar un lavado con suero fisiológico por las fosas nasales y después aspirar las secreciones resultantes. No es nada agresivo y se le realiza de forma rutinaria a todos los niños con bronquiolitis, de forma similar a como usted lo haría en su domicilio.
- Toma de muestras de sangre, para determinación de estudio de sistema inmunológico así como marcadores anti y proinflamatorios implicados.
- El tratamiento y seguimiento de su hijo-a será el habitual, ajustado al protocolo del Hospital, es decir, no existirá ningún cambio por el mero hecho de autorizar su participación en este estudio.

De acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos clínicos que se le requieren, son los necesarios para cubrir los objetivos del estudio. La información clínica obtenida será siempre anónima, es decir, en ninguno de los informes de resultado del estudio aparecerá el nombre de su hijo-a o representado legal.

Por todo ello, le agradecemos que autorice la participación de su hijo en este estudio.

Dr. Javier Torres Borrego

Unidad de Alergia y Neumología Infantil

Servicio de Pediatría. H.U. Reina Sofía

Dr Fernando Fernández Gutierrez

Unidad Lactantes

Servicio de Pediatría. H.U. Reina Sofía

Dr. J.Luis Pérez-Navero

Jefe Servicio de Pediatría

H.U. Reina Sofía

VIII.Anexos

CONSENTIMIENTO INFORMADO.

“UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE CITOCINAS COMO FACTOR PRONÓSTICO EN BRONQUIOLITIS AGUDA”

D/D^a _____
como (señalar lo que proceda) madre/ padre / tutor legal de

Declaro que:

- He recibido del Dr./Dra. _____ información suficiente y en términos comprensibles sobre las finalidades de este estudio, así como la hoja informativa sobre las finalidades y los detalles del estudio.
- He podido realizar las preguntas al respecto y he obtenido respuestas satisfactorias para las mismas.
- Autorizo a mi hijo/a - representado/a legal a participar en este estudio.

Comprendo que la participación de mi representado en este estudio es voluntaria y que en todo momento podrá abandonar el mismo sin tener que dar explicaciones, y que ello no supondrá en un deterioro en la atención que recibe mi hijo o yo mismo-a.

Y firmo este consentimiento informado en Córdoba a ____ de _____ de 2009

Firma del padre/madre/tutor

Firma del investigador

Anexo 3.

VIII. Anexos

Anexo 3. Hoja de recogida de datos

ANÁLISIS PROSPECTIVO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS QUE PRESENTAN BRONQUIOLITIS DURANTE LOS MESES DE DICIEMBRE 2009 – MARZO 2010.

ANTECEDENTES PERSONALES

1. **Epóca del año (ingreso):** 1= diciembre 2= enero 3= febrero 4= marzo
2. **Fecha nacimiento** ___/___/___ 3. **Edad:** _____ meses
4. **Sexo:** 1= hombre 2= mujer
5. **Semana gestacional nac:** _____ semanas
6. **Peso nacimiento:** _____ gramos
7. **Lactancia materna:** 0= No 1= Sí.....Tiempo: _____ días
8. **Administración de vitamina D:** 0= No 1= si...Tiempo: _____ días, Dosis _____
9. **Dermatitis atópica:** 0= No 1= Sí
10. **Tabaquismo materno:** 0= No 1= Sí 11. **Fumadores en familia:** 0= No 1= padre 2= madre 3=ambos N° cigarrillos/ día 1= <10 2= 10-20 3= >20
12. **Asistencia a guardería:** 0= No 1= Sí

N° en estudio/ identificación:

N° de contacto: 1. _____
2. _____

- **ANTECEDENTES FAMILIARES (primer grado)**

1. **N° de hermanos:** 0= ninguno 1= mayor/es en edad escolar/guardería 2= menores
2. **Atopia familiar** 0= No 1= dermatitis atópica 2= asma ó rinoconjuntivitis en padres/hermanos
3. **Enfermedades autoinmunes:** 0= No 1= Si

- **CLÍNICA DE PRESENTACIÓN-GRAVEDAD Y EXPLORACIÓN FÍSICA**

CVA / tos / febrícula / sibilancias / disnea / rechazo alim ó vómitos / nosocomial

1. **Tiempo de evolución del cuadro (en horas):** _____ h
2. **Score de Wood-Downes:** _____ puntos
3. **Peso actual:** _____ gramos Perc _____ 4. **Talla actual:** _____ cms Perc _____
5. **Tiempo de estancia hospitalaria:** _____ días
6. **Tiempo de administración de O₂:** _____ días
7. **Tiempo de saturación < 94%:** _____ días

Parámetros clínicos	Ingreso (1er día)	3er día	5º día	7º día
Sat. O ₂ %				
Sibilancias				
Tiraje				
FREC. respiratoria				
FREC. cardiaca				
Cianosis				

Tiraje: 0= No / 1= subcostal ó intercostal / 2= supraclavicular ó aleteo nasal / 3= todo lo anterior.

Sibilancias: 1= espiratorias / 2= inspiratorias / 3= espiratorias + inspiratorias

