

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD I + D ASOCIADA AL CNB-CSIC

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA
INMUNITARIA-INFLAMATORIA SISTÉMICA A LA
INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA. ANÁLISIS DEL
PATRÓN DE RESPUESTA EN PACIENTES
ASMÁTICOS**

TESIS DOCTORAL

María Josefina Giuffrida Villa

ALCALÁ DE HENARES, 2011

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD I+D ASOCIADA AL CNB-CSIC



**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA
INMUNITARIA-INFLAMATORIA SISTÉMICA A LA
INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA. ANÁLISIS DEL
PATRÓN DE RESPUESTA EN PACIENTES
ASMÁTICOS**

TESIS DOCTORAL

María Josefina Giuffrida Villa

DIRECTORES DE TESIS

Melchor Álvarez de Mon Soto,
Catedrático de Medicina,
Universidad de Alcalá.

Nereida Josefina Valero Cedeño
Catedrático de Medicina,
Universidad del Zulia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al profesor Melchor Álvarez D'Mon por su orientación en la realización del presente trabajo.

Mi especial agradecimiento a la profesora Nereida Valero por su amistad, orientación y asesoramiento para la realización de este trabajo.

A la profesora MeryBell Maldonado, cuya valiosa colaboración ha permitido llevar a cabo el procedimiento metodológico que dio origen a este trabajo.

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ).

Mi agradecimiento a la Lic. Luz Marina, por colaborar en el mantenimiento de las células que fueron utilizadas en el procesamiento de las muestras.

Agradezco a las Lcdas. Jenifer Gotera (MgSc) y Alisbeth Mavárez (MgSc), y al Lcdo. John Bermúdez, por su colaboración en el montaje experimental y sobre todo, en la recolección de las muestras.

Agradezco a todo el personal del Laboratorio del Instituto de Investigaciones Clínicas que colaboró de una u otra forma en la realización de los análisis experimentales, por que sin ellos no hubiera sido posible concluir este trabajo.

A la ilustre Universidad del Zulia, por proporcionarme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A todos, muchísimas gracias.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS....

DEDICATORIA

Doy gracias a Dios, por ser mi fortaleza, porque sin su presencia nunca hubiera logrado la paz y la paciencia que ahora tengo para trabajar con entusiasmo. Sobre todo, le agradezco por el don de la vida, sin la cual, no habría podido cosechar ni uno solo de mis éxitos.

A mis padres, por su apoyo y porque fueron siempre pilares fundamentales en mi desarrollo profesional. Y dedico esta tesis muy especialmente a la memoria de mi viejo querido, porque se que desde donde estás, estarás compartiendo mi triunfo “Te amo viejito lindo”.

Mi inmensa gratitud a toda mi familia, y muy especialmente a mi esposo Eugenio por su amor y comprensión, y por su valiosa colaboración en todo lo que tengo que emprender; y por último, y no por eso menos importantes, mi dedicatoria especial a mis tres hijos: Eugenio, María Eugenia y María Claudia, por sus sonrisas en mis momentos de inquietud, por el cariño, su colaboración; y sobre todo, por su paciente espera de un tiempo libre para brindarles.

ÍNDICE

| CONTENIDO | Página |
|---|---------------|
| Abreviaturas. | |
| Summary. | |
| I.- Introducción. | |
| I.1. Infección Respiratoria Aguda. Concepto y aspectos epidemiológicos y clínicos. | 1 |
| I.2. Etiología de las IRA's. | 4 |
| I.3. Asma. Concepto y aspectos epidemiológicos y clínicos. | 7 |
| I.4. Asociación de asma e infección. | 11 |
| I.5. Citoquinas. Concepto, clasificación y actividad biológica. | 14 |
| I.5.1. Respuesta inmunitaria mediada por citoquinas en pacientes asmáticos. | 23 |
| I.6. Respuesta inmunitaria mediadas por citoquinas en las infecciones microbianas. | 26 |
| I.6.1. Respuesta inmunológica mediada por citoquinas en las infecciones respiratorias de etiología viral. | 27 |
| I.6.1.1. Respuesta inmunitaria contra infecciones virales respiratorias. | 30 |
| I.6.2. Respuesta inmunitaria mediada por citoquinas en las infecciones respiratorias de etiología bacteriana. | 35 |
| I.6.2.1. Inmunidad frente a bacterias en pacientes con asmáticos | 40 |
| I.7. Aspectos patogénicos de la respuesta celular en las infecciones virales. | 41 |
| II.- Hipótesis y Objetivos. | 44 |
| III.- Materiales y Métodos. | |
| III.1. Población en estudio. | 47 |

| | |
|--|----|
| III.2. Protocolo de seguimiento. | 47 |
| III.3. Criterios de inclusión. | 48 |
| III.4. Criterios de exclusión. | 50 |
| III.5. Recolección de las muestras. | 51 |
| III.5.1. Exudado faringeo, Lavado Nasofaríngeo. | 51 |
| III.5.2. Muestra de sangre periférica | 51 |
| III.6. Procedimientos experimentales. | 52 |
| III.6.1. Análisis virológico. | 52 |
| III.6.1.1. Aislamiento viral e identificación por inmunofluorescencia directa en cultivo de células HEP-2 | 52 |
| III.6.2. Cultivo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) | 54 |
| III.6.3. Determinación de proteínas. | 56 |
| III.6.4. Análisis bacteriológico. | 56 |
| III.6.5. Cuantificación de IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-5, IL-8, MCP-1 y RANTES. | 57 |
| III.6.6. Análisis de rutina y pruebas adicionales. | 58 |
| III.7. Análisis estadístico. | 59 |
| IV. Resultados. | |
| IV.1. Formas clínicas de IRA, agente etiológico y asma en los pacientes evaluados IV.1. Formas clínicas de IRA, agente etiológico y asma en los pacientes evaluados. | 61 |
| IV.1.1. Frecuencia de IRAs o formas clínicas de la infección. | 61 |
| IV.1.2. Frecuencia de agentes etiológicos. | 62 |
| IV.1.2.1. Frecuencia de agentes virales en las muestras de los pacientes evaluados. | 62 |
| IV.1.2.2. Frecuencia de infecciones bacterianas en las muestras de los pacientes evaluados. | 63 |
| IV.1.3. Agentes infecciosos según el tipo de IRA. | 64 |

| | |
|---|----|
| IV.1.3.1. Tipo de agente viral en pacientes con los diferentes tipos de IRA's. | 64 |
| IV.1.3.2. Agente bacteriano en pacientes con diferentes tipos de IRA's. | 65 |
| IV.1.4. Porcentaje de asmáticos y no asmáticos en el estudio | 65 |
| IV.1.4.1. Distribución de IRA's según condición de asmáticos | 66 |
| IV.1.4.2. Tipo de agente etiológico en pacientes asmáticos y no asmáticos. | 67 |
| IV.1.4.2.1 Agentes virales según condición de asmáticos. | 68 |
| IV.1.4.2.2. Agentes bacterianos según condición de asmáticos. | 69 |
| IV.2. Perfil de citoquinas en pacientes asmáticos y no asmáticos con IRA de etiología viral y/o bacteriana. | 69 |
| IV.2.1. Concentración sérica de citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α . | 70 |
| IV.2.1.1. Citoquinas proinflamatorias según tipo de IRA. | 70 |
| IV.2.1.2. Citoquinas proinflamatorias según el agente microbiano. | 71 |
| IV.2.1.3. Tipo de agente microbiano según tipo de IRA (neumonía y bronquitis). | 73 |
| IV.2.1.4. Citoquinas proinflamatorias en pacientes asmáticos vs no asmáticos. | 75 |
| IV.2.1.4.1. Citoquinas proinflamatorias en pacientes asmáticos vs no asmáticos según tipos de IRA (neumonía y bronquitis). | 75 |
| IV.2.1.4.2. Concentración de citoquinas proinflamatorias en pacientes con asma y no asmáticos, según tipo de agente causal. | 77 |
| IV.2.1.4.3. Concentración de citoquinas proinflamatorias en pacientes con IRA viral, bacteriana y mixta, según | |

| | |
|--|-----|
| presencia o no de asma. | 79 |
| IV.2.2. Concentración circulante de citoquinas Th2: IL-4 e IL-5. | 82 |
| IV.2.2.1. Concentración circulante de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5) según el tipo de IRA. | 82 |
| IV.2.2.2. Citoquinas Th2 (IL-4 e IL-5) y tipo de agente microbiano. | 83 |
| IV.2.2.3. Concentración sérica de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5) en pacientes con IRA (neumonía y bronquitis) según agente microbiano. | 85 |
| IV.2.2.4. Concentración de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5) y asma | 87 |
| IV.2.2.4.1. Variaciones en la concentración de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-5) en pacientes asmáticos y no asmáticos según tipo de IRA. | 88 |
| IV.2.2.4.2. Variaciones en las concentraciones séricas de citoquinasTh2 (IL-4 e IL-5) en pacientes asmáticos y no asmáticos atendiendo al tipo de infección (viral, bacteriana y mixta). | 90 |
| IV.2.2.4.3. Variación en la concentración sérica de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5) en pacientes con IRA viral, bacteriana y mixta según presencia o no de asma. | 92 |
| IV.2.2.5. Correlación IL-4, IL-5 e IgE sérica. | 95 |
| IV.2.3. Concentración sérica de quimioquinas MCP-1, IL-8 y RANTES. | 95 |
| IV.2.3.1. Variación de las concentraciones séricas de las quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) según tipo de IRA's. | 95 |
| IV.2.3.2. Variación de las quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) según el tipo de agente microbiano. | 97 |
| IV.2.3.3. Concentración sérica de las quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) en pacientes con IRA (neumonía y bronquitis) según tipo de agente microbiano. | 99 |
| IV.2.3.4. Concentración serica de las quimioquinas (IL-8, MCP- | 101 |

| | |
|---|-----|
| 1 y RANTES) en pacientes asmáticos y no asmáticos. | |
| IV.2.3.4.1. Concentración serica de las quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) en pacientes con asma o no, según tipo de IRA (neumonía y bronquitis). | 102 |
| IV.2.3.4.2. Concentración serica de las quimioquinas IL-8, MCP-1 y RANTES, en pacientes con asma o no, según tipo agente microbiano. | 105 |
| IV.2.3.4.3. Concentración serica de las quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) en pacientes con IRA viral, bacteriana y mixta, según presencia o no de asma. | 107 |
| IV.3. Análisis del efecto inductor de producción de citoquinas por virus en cultivos de monocitos procedentes de sujetos sanos. | 110 |
| IV.3.1. Concentración de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α en monocitos inoculados con virus. | 110 |
| IV.3.2. Concentración de citoquinas Th2: IL-4 e IL-5 en monocitos cultivados con virus. | 111 |
| IV.3.3. Concentración de las quimioquinas MCP-1, IL-8 y RANTES en monocitos cultivados con virus. | 112 |
| V. Discusión. | |
| V.1. Epidemiología de las infecciones respiratorias. | 115 |
| V.2. IRA, agente infeccioso y asma en las variaciones de la respuesta a citoquinas. | 121 |
| V.2.1. Citoquinas proinflamatorias. | 121 |
| V.2.2. Citoquinas del patrón Th2 (IL-4, IL-5). | 125 |
| V.2.3. Quimioquinas: IL-8, MCP-1 y RANTES. | 127 |
| V.3. Efecto inductor de los virus aislados de los pacientes sobre la producción de citoquinas en cultivos de células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos. | 130 |

| | |
|--------------------|-----|
| VI. Conclusiones. | 135 |
| VII. Bibliografía. | 137 |
| VIII. Anexos. | 154 |

ABREVIATURAS

CAM: Complejo de ataque a la membrana.

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

CSF: Factor estimulante de colônias

EF: Exudado faríngeo

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción.

ENA: factor quimioattractante de neutrófilos derivado del epitelio.

GCP: Proteínas quimiotáctica de granulocitos.

GM-CSF: Factor estimulante de colonia granulocito monocito

Hep-2: Línea celular de carcinoma laríngeo

HLA: Antígeno leucocitario humano

HRB: Hiperreactividad bronquial

ICAM: intracelular adhesion molecule-1 o moléculas de adhesión intercelular

IFD: Inmunofluorescencia directa

IFN α y β : Interferón alfa y beta

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

INH: Instituto nacional de Higiene

ITRS: Infección del tracto respiratorio superior

Ji²: Ji cuadrado

LAK: Lymphokine-activated Killer

LBA: Lavado bronquialveolar

LNS: Lavado nasofaríngeo

LPS: Lipopolisacárido bacteriano

MBL: Lectina de unión a manosa

MCP: Proteína inflamatoria de macrófago

M-CSF: Factor estimulante de colonias monocíticas

MHC: Major Histocompatibility Complex

MIG: Monocina inducida por IFN γ

MIP-1 α : Macrófago inflammatory protein

ml: Mililitros

n: Número de muestras

NK: Natural killer

PBS: Buffer fosfato Salino

PF: Factor plaquetario,

RANTES: regulated on activation normal T-cell expressed and secreted

Rpm: revoluciones por minuto

SDF: Factor derivados del estroma

SFB: Suero fetal bovino

TCA-3: Quimioquina C-C (dos cisteínas no separadas por otro aminoácido)

TCD8: Linfocitos T citotóxicos

TCD4: Linfocitos T colaboradores o T *helper*

Th1: Linfocitos T helper tipo 1.

Th2: Linfocitos T helper tipo 2

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

U/ml: Unidades por mililitro

UFP: Unidades formadoras de placas

VCAM: Vascular Cell Adhesión Molecule

VLA: Very Late Antigen

VSR: Virus Sincitial Respiratorio

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF THE IMMUNE-INFLAMMATORY RESPONSE TO SYSTEMIC ACUTE RESPIRATORY INFECTION. ANALYSIS OF THE PATTERN OF RESPONSE IN ASTHMA PATIENTS

Among the postulated mechanisms inducing asthma, the viruses are triggers, especially the child population for which there is abundant research on the immune mechanisms involved in this response, but, the immunological mechanisms associated with asthma in adults with viral Acute Respiratory Infection (ARI) and co-infection (mixed infection: viral and bacterial), have not yet been well established. Therefore, the objective of the present study was, to measure serum proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α), Th2 (IL-4, IL-5) and chemokines (IL-8, MCP-1 and RANTES) in individuals with ARI (viral and mixed infections), so as to determine the cytokines pattern involved in this response. In addition, it seeks to explain the systemic response of the virus in vitro, using cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

For the study 43 individuals were selected from 161 who attended the various clinics in the city centers with symptoms suggestive of ARI. The subjects were adult asthmatic and non asthmatic with IRA of not more than 5 days of evolution, without distinction of sex, and ages 18 to 65 years, who were not receiving antibiotic treatment and/or steroid. 10 healthy patients uninfected were used as control population. Samples of nasopharyngeal wash and throat swabs were used to detect viruses and/or bacteria, and serum samples to measure cytokine by ELISA; the cytokines were also measured in PBMC cultures prepared from whole blood from healthy subjects. The results were analyzed by ANOVA using Bonferroni's post test.

There is a systemic response, with elevated circulating levels of IL-1 β and TNF α , which is not determined by the location of the bronchial alveolar infection, and is more intense in the viral cause. There is a systemic response with elevated serum levels of IL-4 and IL-5 which is not determined by the location of the bronchial alveolar or by the nature of viral or bacterial infections.

The intensity and pattern of systemic response with elevated IL-1 β , TNF α , IL-4 and IL-5 in patients with ARI, were not so lightly biologically modified by the patient's asthmatic condition.

There was a systemic response with elevated circulating levels of chemokines MCP-1 and RANTES, and normality of the IL-8, which occurs selectively in patients with asthma, and preferably, with a viral infection.

The inoculation of the causal virus IRAs to cultures of mononuclear cells, induced the production of cytokines IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-5 and selectively chemokine MCP-1, without a demonstrable IL-8 and RANTES.

Our data demonstrate that the ARI's has a significant impact at the systemic inflammatory immune system. It should be noted that the patients included in our study did not fulfill criteria of severity to require hospitalization, and none had a complication caused during the treatment phase, and there was no mortality. Therefore, this impact is evident even in patients with acute non-serious infection. It is also interesting to note that the biological characteristics of the systemic impact have certain features related to the etiological factor, being more intense in the viral infection. Our status also shows that the virus causing the IRA are responsible for causing an intense activation of PBMC with increased production of cytokines and chemokines analyzed in vivo. Therefore, the aforementioned more intense systemic response in ARI caused by infection may be a step for the viral particles to go into peripheral blood.

The relevance of the host response does not seem that was significantly influenced by the condition of being asthmatic. That is, the stimulus intensity capable of causing disease is an immune response/inflammatory systemic similar in asthmatics and non-asthmatic Th2 conditioning overcoming the possible operating in those.

The intensity of the systemic response and production of mediators, can lead to the development of new therapeutic strategies that inhibit these molecules and reduce their overall impact.

Key words: *Acute respiratory infection, asthma, cytokines, pneumonia, bronchitis*

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Infección Respiratoria Aguda. Concepto y aspectos epidemiológicos y clínicos.

Las enfermedades agudas del aparato respiratorio se presentan en su inmensa mayoría como infecciones, por lo que en la actualidad se prefiere referirse a ellas como infecciones respiratorias agudas (IRA's) (Abreu, 1999). Las IRA's son un complejo y heterogéneo grupo de enfermedades causadas por diversos agentes (virales, bacterianos y otros) que afectan cualquier punto de las vías respiratorias, y sus entidades nosológicas se describen de acuerdo con el lugar donde predominen los síntomas (tos, rinorrea, obstrucción nasal, odinofagia, otalgia, disfonía, respiración ruidosa y dificultad respiratoria), suele cursar durante un periodo no mayor a 15 días, y pueden estar o no acompañadas de fiebre (Abreu, 1999; Batista y Feal, 1998; Riverón et al., 1999).

Aunque no existe un consenso en cuanto al sitio anatómico que separa las IRA's en altas y bajas, se acepta como IRA's a todas aquellas patologías que afectan el tracto respiratorio desde la faringe proximal (incluyendo la región sub-glótica) hasta los pulmones. La sintomatología se puede localizar en vías respiratorias altas en forma aislada o como parte de una enfermedad sistémica general afectando vías respiratorias bajas y parénquima pulmonar (McIntosh, 1999). Algunas literaturas han clasificado a las IRA's como altas cuando involucra las vías respiratorias altas como la otitis, la rinosinusitis, la faringoamigdalitis, y en segundo lugar están las IRA's bajas entre las que se describen el síndrome Croup, traquobronquitis, bronquilitis y neumonías.

Estas IRA's pueden adquirirse en forma intra o extra hospitalarias. Por ejemplo, la Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC), se define como aquella que se presenta en pacientes no hospitalizados en los siete días previos al diagnóstico, o durante las primeras 48 horas de ingreso en pacientes hospitalizados (Pérez et al., 2007).

La mayor parte de las IRA tienen lugar de forma epidémica, y en su etiología se invocan especialmente, los virus respiratorios: rinovirus, adenovirus, influenza, parainfluenza, etc., aunque también juegan un papel fundamental algunas bacterias y otros microorganismos (**Mulholland y Weber, 1998**). La importancia de las IRA's en la población de adolescentes y adultos jóvenes y de mediana edad se ven reflejadas en el ausentismo en los centros de trabajo y de estudio (**Bloch et al., 1981**).

Las IRA's se mantienen como un grupo de afecciones con una alta morbilidad y baja mortalidad, y constituyen una de las principales causas de muerte a nivel mundial principalmente en países en vías de desarrollo. Las mismas representan un motivo frecuente de incapacidad laboral y escolar con las consecuentes pérdidas económicas que ello representa. Se dice que estas afecciones- conjuntamente con las diarreas y la malnutrición- encabezan las principales causas de muerte entre los niños en los países subdesarrollados. Representa también una alta morbilidad y mortalidad en mayores de 60 años, especialmente en países donde no se recibe una adecuada atención médica (**Batista y Cañisares, 1988**).

No parecen existir diferencias en la incidencia de IRA's entre países subdesarrollados con respecto a los desarrollados, sin embargo, la frecuencia y severidad clínica de infecciones agudas, así como el índice de mortalidad, difieren en cuanto a que es excesivamente elevado en los países subdesarrollados (**INEGI, 2000; Rosete et al., 2002**). Entre tanto el mundo desarrollado ha logrado reducir la mortalidad por IRA, en los países en vías de desarrollo prevalecen varios factores de riesgo que contribuyen a mantener ese problema en dichas naciones (**Batista y Cañisares, 1988**).

En América, las IRA se ubican entre las primeras cinco causas de defunción de niños menores de 5 años, y representan la causa principal de enfermedad y consulta a los servicios de salud, por lo que la prevención y el control de las mismas se encuentran dentro de las metas de la Cumbre Mundial a favor de la infancia (**Beaver et al., 2000**).

En Venezuela, las IRA's son las responsables de más de 2 millones de consultas al año en los servicios del Ministerio de Sanidad y Desarrollo Social (MSDS), representando el 13,03% de la morbilidad general. Dentro de estas, la amigdalitis representa el 32%, la otitis el 21%, la rinofaringitis agudas el 20%, la bronquitis el 14% y la faringitis el 13% para el año 1999 (**Ministerio de Salud, 2005**). Las neumonías ocupan el quinto lugar de consultas por enfermedades infecciosas detrás de infecciones del tracto respiratorio superior (ITRS), diarrea y fiebre según el boletín epidemiológico No 24 del año 2010 del MPPS. Las NAC ocupan la 9na causa de muerte con una tasa de 8,4 por 100.000 habitantes, y es la primera causa de mortalidad entre las infecciones. El mayor índice de neumonías corresponde al grupo etario comprendido entre los 25-44 años (**MPPS, 2010**).

Las enfermedades respiratorias como la influenza y la neumonía en Venezuela ocupan los diez primeros lugares de muerte diagnosticada en individuos según la información suministrada por la Dirección de información Social y Estadística del MSDS – Venezuela (**MPPS, 2007**). En el mundo estas enfermedades respiratorias se encuentran ocupando los cinco primeros lugares como causantes de morbilidad y mortalidad (**Gutiérrez-Ramírez et al., 2007**) Es importante resaltar que existe un subregistro de las infecciones virales respiratorias, lo que hace difícil determinar las cifras oficiales de infectados. No obstante, los cuadros respiratorios a repetición tanto en niños como en adultos que no responden a tratamientos, han conllevado a pensar que los virus pudieran ser los agentes etiológicos de gran cantidad de patologías respiratorias que se presentan en nuestro medio (**Ministerio de Salud, 2005**). Para el año 2005, fecha hasta la cual está disponible el boletín epidemiológico del Ministerio de Salud (**2005**), reporta entre las enfermedades de denuncia obligatoria en Venezuela a las IRA's, las cuales ocupan el primer lugar con un 59,79%, donde los casos de neumonía ocupan un porcentaje de 3% para la fecha.

En Venezuela, durante los años de 1995 a 2006, la morbilidad por neumonía para mayores de 5 años fue de 833×10^5 para 2005 con letalidad de 1,1 %. La influenza y neumonía se posicionan entre los primeros puestos de muerte para todas

las edades, la influenza sola representa menos del 1 %. Las tasas de mortalidad disminuyen hasta 10×10^5 para 2005, tendencia muy marcada en los menores de 1 año y para los mayores de 65 años. La mortalidad con aumento leve durante los meses de lluvia y frío. Los adultos mayores comprenden más del 57 % de las muertes, los varones tienen tasas mayores. Se observaron variaciones importantes entre las tasas específicas por estados (Risquez y Echezuria, 2009).

I.2. Etiología de las IRA's.

El 95% de los casos de IRA son de origen viral, pero a las complicaciones otitis media y neumonía se agrega la etiología bacteriana. El 30% de las muertes por neumonías son de etiología bacteriana, 1% viral y el resto es de etiología desconocida (Risquez y Echezuria, 2009).

A nivel mundial, las investigaciones sugieren que los principales microorganismos virales causantes de afecciones respiratorias son virus sincicial respiratorio (VSR), parainfluenza, influenza y adenovirus (Wendt y Hertz, 1995). Los tres primeros son virus de ARN de la familia *paramixoviridae* (VSR y parainfluenza) y *orthomixoviridae* (influenza), y el adenovirus, es un virus de ADN de la familia *Adenoviridae* (Rosete et al., 2002); mientras que, los agentes bacterianos más frecuentes son: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

Si bien se ha postulado que en países en vías de desarrollo la etiología bacteriana es predominante, en un estudio multicéntrico internacional coordinado por el Comité de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Internacional (*Board on Science and Technology for International Development*) de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, se determinó que la etiología viral está presente en mayor proporción que la bacteriana, variando los porcentajes de identificación viral según el país entre 17% y el 44% de IRA. De los cuales, el virus de influenza A y B, el VSR

seguido de los adenovirus y los parainfluenza 1 y 3 son los aislados, de los anteriores el VSR e influenza cobran importancia debido a la severidad de la enfermedad que producen y a la alta transmisibilidad (Beaver et al., 2000; McIntosh, 1999).

Las estadísticas sobre infecciones virales del tracto respiratorio bajo y alto tanto en infantes como en adultos en nuestro país se desconocen, primero porque en la mayoría de los casos no se reportan a los organismos competentes, y por otra parte, debido a que las infecciones respiratorias de etiología viral en la mayoría de los casos, no se diagnostican. En Venezuela existen pocos reportes sobre la etiología viral de este tipo de afecciones respiratorias; sin embargo, el boletín epidemiológico semanal de la Dirección de epidemiología y análisis estratégico de la Dirección de vigilancia epidemiológica de Venezuela (Ministerio de Salud, 2005), reporta para el año 2005: 2,70% casos de influenza, 1,87% de casos con adenovirus y 0,27% con parainfluenza, las muestras reportadas provenían de diferentes estados del país incluyendo el Estado Zulia.

El programa mundial de control de las IRA's de la OMS (Merson, 1989) está restringido a la infancia por la gran prioridad que constituyen los menores de 5 Años, como grupo de alto riesgo para esas enfermedades. Las IRA's son una causa importante de morbilidad y mortalidad en niños en el mundo. Hasta 70% de las infecciones del tracto respiratorio superior son de etiología viral. En 2005, la OMS estimó una mortalidad en niños menores de 5 años de 10.6 millones, 10% por neumonía (Wong-Chew et al., 2010). Por consiguiente, es poco frecuente que se aborde este problema de salud en los adultos como asunto principal, excepto cuando se van a dirigir acciones para evitar pérdidas de la productividad en los grandes centros de trabajo y también para controlar la mortalidad en los ancianos, los que resultan grandemente afectados por las alzas epidémicas debidas a agentes virales, sobre todo, los de la influenza, que se complican con gran frecuencia con infecciones bacterianas que resultan fatales en un grupo de estos enfermos (Miller, 1982).

Las afecciones causadas por virus respiratorios han sido tradicionalmente divididas en varios síndromes, que van desde el tracto respiratorio superior hasta las estructuras pulmonares, los cuales se han descrito como: resfriado o catarro común, faringitis o faringoamigdalitis, croup (laringotraqueobronquitis), traqueítis, bronquitis, bronquiolitis y neumonía (**Baptista y Cañisares, 1988**).

Las infecciones a las cuales han estado más frecuentemente asociados algunos de los virus conocidos hasta ahora, son bronquiolitis y neumonía con implicaciones del VSR, el crup con parainfluenza, tranquebronquiolitis con influenza, el adenovirus ha sido asociado en menor proporción a cada uno de los cuadros anteriores (**Rosete et al., 2002**).

Reina et al. (2004) sostienen que las infecciones por adenovirus son muy prevalentes en la edad infantil según estudios epidemiológicos realizados en España. En Chile, las estadísticas señalan al VSR y al adenovirus como los principales causantes de IRA del tracto respiratorio inferior (**Palomino et al., 2004**).

Es conveniente aclarar, que aún cuando no se conoce la prevalencia de infecciones respiratorias de origen viral en Venezuela, estudios locales realizados en Maracaibo, Estado Zulia en Venezuela ha reportado la presencia del VSR en una población adulta asmática (**Valero et al., 2005, Valero et al., 2009**). Por su parte, en el boletín epidemiológico emitido por el Instituto Nacional de Higiene (INH) en 1997 se reportaron 21 casos de VSR; el reporte actual arroja 18 casos en todo el país, donde el 5,56% corresponde a adenovirus (**Boletín epidemiológico del INH, 1997 y 2005**). Ninguno de estos últimos informes reportan y especifican la población involucrada.

Las IRA's están relacionadas con menor frecuencia con etiología bacteriana, las bacterias como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenza* tipo b, han sido asociados a infecciones respiratorias bajas como causa de neumonía adquirida en la comunidad. Otro agente involucrado es el *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A, considerado el patógeno principal de las faringitis aguda, así mismo se han asociado bacterias atípicas tales como *Chlamidya trachomatis* y *Mycoplasma pneumoniae*,

aún cuando no se ha establecido el papel de las mismas. *Legionella pneumophila* causa la enfermedad de Legionarios, una neumonía bacteriana, de forma esporádica en adultos, e informó de los brotes se han asociado a contaminación abastecimiento de agua en hospitales y otras instituciones. *Chlamydia pneumoniae* causa enfermedades respiratorias inferiores en una pequeña proporción de niños mayores y adultos (Enciclopedia de Salud Pública, 2011).

I.3. Asma. Concepto y aspectos epidemiológicos y clínicos.

El asma se puede definir clínicamente como una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias asociadas con un estrechamiento variable, a menudo paroxístico, de la vía aérea causado por una bronco constricción que tiene lugar en respuesta a estímulos específicos. Desde el punto de vista patológico, se producen cambios inflamatorios crónicos que se caracterizan por un infiltrado eosinofílico impulsado por los linfocitos con evidencias de hipertrofia de la célula del músculo liso, escape capilar y descamación epitelial (Greening, 2004). Algunos investigadores la definen como una enfermedad inflamatoria crónica espontánea o terapéuticamente reversible de las vías respiratorias que provoca una obstrucción episódica al flujo aéreo (Girón, 2008).

Entre otras clasificaciones, el asma puede clasificarse en asma extrínseca y asma intrínseca; así:

El asma atópica o extrínseca: generalmente es estacional y tiene un estímulo alérgico evidente como la exposición al polen, el polvo, ácaros, etc.; son causadas por agentes externos; con frecuencia se inicia en la infancia o adolescencia y el paciente presenta antecedentes familiares de enfermedades alérgicas (eccemas, rinitis, urticaria). Su incidencia es doble en el hombre que en la mujer. Asma extrínseca incluye a aquellos pacientes en los que puede demostrarse una reacción antígeno-anticuerpo como desencadenante del proceso. En general esta reacción

antígeno-anticuerpo está mediada por IgE (asma extrínseco atópico), mientras que en otros casos generalmente de origen ocupacional no puede demostrarse una reacción de hipersensibilidad tipo I de Gell y Coombs (asma extrínseca no atópico) 90% de los asmáticos son atópicos (**Peden, 2000**).

El asma no atópica o intrínseca (de causa aparentemente desconocida): los factores etiológicos son fugaces, van desde infecciones, exposición a aire frío, vapor, agentes irritantes, humo del tabaco, etc. Los pacientes no presentan antecedentes personales ni familiares de alergia; la enfermedad aparece en la edad adulta y afecta por igual a ambos sexos. No es posible detectar un antígeno concreto como causa precipitante. Suele comenzar en la vida adulta, en muchos casos se asocia con pólipos nasales, sinusitis maxilar, y/o idiosincrasia a aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos y presenta un curso crónico con frecuente necesidad de esteroides orales para su control (**Moncayo et al., 2010**).

Muchos de los pacientes con asma son atópicos, aunque una minoría tiene asma intrínseca, el asma no atópica a menudo tiene un inicio tardío y un curso lento comparado con el asma atópica (**Molina, 2006**).

En todas las formas de asma, hay evidencia que implica a los eosinófilos y mastocitos como las células efectoras de la respuesta inflamatoria, a través de su capacidad de secretar un amplio rango de mediadores preformados o nuevamente formados que actúan sobre las vías respiratorias tanto directa como indirectamente a través de los mecanismos neurales (**Molina, 2006**).

Epidemiológicamente hablando los casos de asma han estado en aumento en los últimos años. Estos casos se deben más a factores ambientales que a factores genéticos, y más en países industrializados. Se dice que el 12,1% de los niños son asmáticos (**Liu et al., 2005**). Se estima que unos 300 millones de individuos alrededor del mundo padecen esta enfermedad (**Soto y Brenes, 2006**).

En la patogenia del asma se describen dos etapas; una en la que el paciente entra de un estado sin alteración a una fase asmática y la segunda que pasa de un asma a una crisis asmática. Las crisis asmáticas se desencadenan con mayor frecuencia por un antígeno.

La fisiopatología del asma bronquial se caracteriza porque se dan algunos cambios entre los cuales destacan, el calibre de las vías respiratorias, la retracción elástica del tejido pulmonar y la relación volumen-tiempo. Debido a que el calibre de las vías respiratorias está disminuido en un asmático, esto traerá mayor resistencia al paso de aire y un flujo turbulento. La alteración de la retracción elástica del tejido pulmonar se genera debido a una disminución de la presión intrapulmonar en relación a la atmosférica. Esto produce una mayor dificultad en la salida de aire, este proceso de espiración es pasivo (Guyton y Hall, 2001).

Clínicamente, el asma se caracteriza porque el paciente presenta la triada constituida por tos, disnea y sibilancias. La tos es no productiva al inicio y es de forma quintosa. La disnea se presenta de manera paroxística y con espiración alargada. En un ataque asmático, al inicio puede existir sensación de constricción del tórax. Esto se puede acompañar de una respiración superficial. A medida que se agrava la crisis, se observa el uso de músculos accesorios de la respiración como los intercostales o esternocleidomastoideo. Acompañando esto puede darse aleteo nasal y cianosis. Esto último debido a disminución de la tensión del O₂ alveolar. Entre los hallazgos físicos, además de los ya mencionados, podemos encontrar taquipnea, una respiración ruda y audible, hiperresonancia torácica a la percusión, ruidos respiratorios ocultos a la auscultación debido a la presencia de sibilancias. A la palpación, el frémito puede estar disminuido, al igual que la expansibilidad pulmonar (Chamorro, 1999).

Los pacientes se pueden caracterizar por un tórax en carena o *pectus carinatum*, más que todo en adultos jóvenes. Algunos hallazgos extra torácicos incluyen, un *fascie* disneica, cara abotagada, cianótica, perlada de sudor, venas

cervicales prominentes y anomalías en la piel como estrías o arañas vasculares (Manresa, 2001).

El signo de gravedad de un ataque asmático es el silencio torácico. Éste se caracteriza por una ausencia de sibilancias audibles, debido a que su tono es tan agudo ocasionado por tanta estrechez que el oído humano no puede escucharlo (O'Byrne et al., 2007).

Existen cierta cantidad de factores de riesgo que inducen el asma bronquial, se podría clasificar estos en factores genéticos y ambientales. En los últimos años, ha sido difícil determinar que regiones cromosómicas y que genes están alterados en el asma, pero se conoce que esta enfermedad está asociada mucho a un componente familiar. Se ha encontrado que múltiples genes tienen influencia en esta patología (Ender et al., 2006). El asma y la atopia muestran una conglomeración entre las familias, pero la genética del asma parece ser compleja; cosa que no sorprende porque es grande el número de mediadores y moléculas inflamatorias implicadas en la enfermedad clínica (Greening, 2004). Por otra parte, el ambiente intrauterino desarrolla una respuesta inmunológica Th2 débil como resultado de la imprimación que tiene como propósito ayudar a mantener el embarazo. La exposición materna a los alérgenos puede reforzar la respuesta Th2 en grado importante, pero este fenómeno queda bajo la influencia de factores genéticos fetales (Prescott et al., 1999).

Entre los factores ambientales que inducen el asma bronquial, se encuentra la exposición al humo de tabaco, al aire contaminado, el contacto con alérgenos, las infecciones, la alimentación, la obesidad, principalmente en mujeres, factores laborales y las emociones (Ender et al., 2006, Greening, 2004).

La implicación de agentes infecciosos en la etiología del asma está amparada sobre la base de la hipótesis de la higiene, la cual propone que el asma infantil es el resultado de una disminución de la exposición a agentes infecciosos, cuando el niño está pequeño. El resultado es una persistencia del fenotipo neonatal Th2 con la

consiguiente predisposición a las enfermedades atópicas. Diversos factores pueden influir sobre la transición al fenotipo Th1: la exposición precoz o frecuente a las infecciones, la exposición precoz a los animales de granja, y el uso de antibióticos (Ponsonby et al., 1999; Von Mutius et al., 1999; Von Ehrenstein et al., 2000). Estos efectos ambientales serán dependientes de factores genéticos predisponentes acompañantes. Sin embargo, la influencia de la infección es compleja, dado que las infecciones del tracto respiratorio inferior guardan una asociación positiva con el asma, y las infecciones bacterianas pueden no tener efecto. El efecto protector parece provenir de infecciones virales que no afectan el tracto respiratorio inferior (Shahenn et al., 1996; LLi et al., 2001).

El asma es una importante carga, no sólo en términos de los costos hospitalarios tanto públicos como privados, sino también en términos de costos sociales reflejado en una menor productividad, en una menor participación en la vida familiar, etc. (Molina, 2006).

I.4. Asociación de asma e infección.

Los estudios epidemiológicos llevados a cabo hasta la fecha indican que el número de factores que participan en la patogenia del asma, es muy amplio y dependen tanto del huésped (factores genéticos) como del medio ambiente (agentes ocupacionales, exposición a contaminantes, irritantes o infecciones del tracto respiratorio).

De entre todos estos, las infecciones del tracto respiratorio tienen un doble interés, teórico y práctico. Teórico, puesto que plantean la posibilidad de que exista un asma de naturaleza infecciosa, algo que durante mucho tiempo se ha venido negando. Práctico, puesto que de ser así, es obvio que permitirá ampliar las alternativas terapéuticas en determinadas circunstancias.

El papel que juegan las infecciones respiratorias en el asma y la atopia, es en el momento actual una gran paradoja, cualquiera que sea el análisis que de esa relación se haga. El papel de las infecciones virales en las exacerbaciones de asma parece bastante claro a favor de la relación entre rinovirus y otros agentes virales en el asma (**Álvarez y Álvarez, 2007**).

Las infecciones virales respiratorias han sido involucradas en el origen y en las exacerbaciones de los síntomas del asma en una variedad de formas. Los efectos de las infecciones víricas respiratorias sobre el asma son dependientes de la edad y posiblemente también del virus. No sólo son la causa más común de sibilancias o exacerbaciones sintomáticas en pacientes con asma preexistente sino que pueden tener también una importante influencia sobre el desarrollo de asma. El papel de los virus como desencadenantes de exacerbaciones asmáticas, es en el momento actual un hecho bastante bien documentado, siendo la causa más importante de incremento de los síntomas asmáticos en niños y adultos con asma preexistente (**Duff et al. 1993; Johnston y Sears, 2006**).

Cada vez hay más indicios de que las infecciones virales están estrechamente relacionadas con sibilancias en la niñez y sugieren que la bronquiolitis grave en la primera infancia puede predisponer a asma crónica infantil; por otra parte, podría representar un marcador de individuos susceptibles. Por el contrario, las infecciones leves repetidas en los primeros años brindarían un efecto protector contra la aparición de asma o atopia mediante la desviación del sistema inmunitario hacia respuestas Th1. Sin embargo, la información relacionada con esta hipótesis no es firme en lo que a virus se refiere (**Palomino et al., 2004**).

Varios factores, como la presencia de atopia, el momento en el que se produce la exposición y la gravedad de las infecciones, interactúan en la relación entre asma e infección (**Palomino et al., 2004**).

Todavía está poco claro si la respuesta alérgica suscitada después de una infección viral es el resultado de un daño pulmonar no específico provocado por un virus o por una respuesta inmunitaria específica de éste. Al respecto, las investigaciones realizadas por **Tsitoura et al. (2000)** han asociado a la infección por influenza con sensibilización alérgica y desarrollo de asma bronquial; mientras que, estudios en ratones infectados han asociado la infección del VSR a un aumento de la respuesta Th2 (alergia) (**Barends et al., 2004**).

La relación entre las infecciones bacterianas y el asma no parece tener un vínculo tan fuerte como las infecciones virales (**Álvarez y Álvarez, 2007; Ogra, 1989**). En un estudio prospectivo en la universidad de Wisconsin se analizaron 16 pacientes que tuvieron 61 episodios de crisis de asma. De este total, 42 episodios estuvieron relacionados con infección viral y solamente uno, con infección bacteriana (**Wennergren, 1997**). Aunque hay publicaciones en adultos, algunas relativamente recientes (**Álvarez y Álvarez, 2007**), que relacionan las infecciones respiratorias bacterianas con las exacerbaciones de asma, la mayoría están basadas en la experiencia personal de los autores que indican mejoría del asma tras el tratamiento de la infección bacteriana, faltando estudios clínicos controlados que demuestren tal asociación.

Los gérmenes más frecuentes encontrados en pacientes asmáticos son: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococo beta-hemolítico*, *Staphylococcus aureus*, así como *Chlamidya pneumoniae* (**Grayston et al., 1995**). Sin embargo, estudios científicos realizados en los Ángeles, California, sostienen que pese a que la hipótesis de la higiene predice que las infecciones deberían proteger contra el asma, se debe tener en cuenta, que cada vez existen más estudios que prueban que ciertas infecciones también pueden promover el desarrollo del asma; no obstante, aún no existe una conciliación de estos hallazgos, y el papel de la inmunidad innata en este contexto parece no estar muy claro. Al respecto **Schroder et al. (2008)**, en estudios realizados *in vitro* en ratones donde pusieron a prueba si la infección bacteriana del tracto respiratorio provoca sensibilización de la vía aérea a

un antígeno inocuo encontrado en paralelo de forma de determinar la contribución de la respuesta inmunitaria innata, han concluido que la infección bacteriana de severidad moderada (pero no la grave) puede inducir una sensibilización alérgica a antígenos inertes inhalados.

Arocha y Parra (2002) reportaron una relación entre la condición de asma y el porcentaje de flora bacteriana transitoria en la orofaringe de pacientes de una ciudad de Venezuela (Maracaibo). **Gern y Lemanske (2003)** han propuesto la posibilidad de que infecciones respiratorias virales repetitivas y con ciertos patógenos intracelulares como clamidias y micoplasmas pueden causar enfermedad aguda o crónica y/o empeorar el cuadro de asma en niños.

I.5. Citoquinas. Concepto, clasificación y actividad biológica.

Las citoquinas son factores solubles no antígenos específicos producidos mayoritariamente por leucocitos que intervienen en la regulación de las células del sistema inmunológico y los procesos inflamatorios. Estas moléculas están implicadas en las respuestas frente a agentes infecciosos, pero en ocasiones pueden ser responsables de procesos patológicos. Las citoquinas incluyen a las interleuquinas (IL), linfoquinas, interferones (IFN), monocinas y quimioquinas. Las quimioquinas son proteínas implicadas en la atracción específica de los leucocitos hacia tejidos donde se está produciendo un proceso inflamatorio (**Commins et al., 2010**).

Molecularmente hablando las citoquinas son polipéptidos o glicoproteínas con un peso molecular menor de 30 kDa, aunque algunas pueden formar oligómeros de mayor peso molecular. La clonación de los genes de estas citoquinas ha permitido su producción en masa y actualmente está siendo explorada la utilidad terapéutica de la administración de citoquinas o moléculas antagonistas (anticuerpos anticitoquina,

receptores solubles) en enfermedades infecciosas, tumorales o autoinmunes (**Abbas et al., 2009**).

Las citoquinas ejercen su función actuando sobre receptores específicos de membrana y contribuyen a la activación, blastogénesis y/o diferenciación en células efectoras, regulando también otros procesos como la apoptosis, adquisición de capacidad citotóxica y la recirculación de los leucocitos (**Parham, 2006**).

Los efectos y la síntesis de las citoquinas no se limitan al sistema inmunológico, ya que se ha observado que estas moléculas pueden regular la función de las células de otros órganos y tejidos. Por otro lado, el estado funcional de las células inmunitarias es modulado por moléculas aparentemente propias de otros sistemas tales como el sistema nervioso o el endocrino (**Parham, 2006**), sugiriendo la integración global de todos ellos dentro del organismo.

La existencia de una división dicotómica entre los linfocitos Th humanos es objeto de controversia. Los estudios de los patrones de secreción de citoquinas en células individuales han demostrado que en los linfocitos humanos, sólo un pequeño porcentaje de los linfocitos encaja en las categorías Th1 y Th2 (**Kelso et al., 1991**). La mayoría de los linfocitos T cooperadores humanos presenta patrones de secreción de citoquinas que combinan la secreción de algunas citoquinas tipo 1 con la de tipo 2; por ejemplo la IL-10, una citoquina Th2 por excelencia, es producida tanto por linfocitos T productores de IL-4, como por los productores de IFN γ (**Assenmacher et al., 1994**). Es un hecho generalmente admitido que las células T que secretan IL-4 no secretan IFN γ y viceversa, pero también es cierto que en los linfocitos Th humanos existen células que secretan cualquiera de las combinaciones del resto de citoquinas según patrones de asociación aleatorios (**Kelso, 1995**). Por tanto, podemos concluir que aunque existen respuestas inmunológicas de tipo 1 y 2, éstas no se basan (al menos en la especie humana) en el predominio de clones Th1 o Th2, sino en el predominio de clones productores de IL-4 o IFN γ . Actualmente el concepto ha

evolucionado y al referirse a linfocitos humanos se denomina Th1 a los linfocitos productores de $\text{IFN}\gamma$ y Th2 a los productores de IL-4 (Goldsby et al., 2004).

Las respuestas inmunitarias dominadas por $\text{IFN}\gamma$ (Th1) estimulan a los macrófagos aumentando su potencial fagocítico microbicida y también favorecen la producción de anticuerpos de los isotipos IgG1 e IgG3 que son los de mayor capacidad para la activación del complemento y mayor afinidad por los receptores Fc de las células fagocíticas. Estas respuestas Th1 están asociadas a activación de macrófagos, inflamación y daño tisular y son esenciales en la defensa frente a bacterias intracelulares como *Mycobacterias* (Abbas et al., 2009).

Las respuestas dominadas por IL-4 (Th2) inducen la producción de niveles elevados de IgM y también de isotipos de IgG que no fijan complemento como IgG4. También favorecen el cambio de isotipo hacia la producción de IgE y la activación de eosinófilos, basófilos y mastocitos que son las células efectoras con receptores de alta afinidad para IgE. Estos mecanismos son importantes en las respuestas frente a helmintos y en las reacciones alérgicas. Las respuestas Th2 antagonizan los efectos proinflamatorios de IFN sobre los macrófagos por lo que suprimen tanto las reacciones inflamatorias agudas como las crónicas (Zhang et al., 1991).

La regulación del sistema inmunológico por las citoquinas incluye algunas como: El factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), es una proteína que existe en una forma libre y también como molécula de membrana. El $\text{TNF}\alpha$ es producido por células T activadas, mastocitos y macrófagos tras estimulación por endotoxinas bacterianas, factor estimulador de colonias de macrófago (M-CSF), $\text{IFN}\gamma$, IL-2 ó IL-15. El $\text{TNF}\alpha$ fue descrito como factor tóxico para algunas células en cultivo, y causante de necrosis hemorrágica de tumores *in vivo*. El $\text{TNF}\alpha$ es el principal mediador de la respuesta inmunitaria frente a bacterias gram negativas, el estímulo más potente para su producción son los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos. Después de la actuación por LPS, el $\text{IFN}\gamma$ regularía positivamente su síntesis (Goldsby et al., 2004; Commins et al., 2010).

El $\text{TNF}\alpha$ ejerce numerosos efectos *in vivo* que son muy dependientes de su concentración. A concentraciones bajas el $\text{TNF}\alpha$ actúa localmente como un mediador paracrino que provoca aumento de la adhesividad de las células endoteliales de los vasos, activación leucocitaria y estimulación de la producción de IL-1, IL-6 e IL-8 en los fagocitos mononucleares. También coestimula la activación de linfocitos T y B. En células del endotelio vascular y fibroblastos, estimula la producción de factores estimulantes de colonias (CSFs) y aumenta la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, Major Histocompatibility Complex) de clase I (Sullivan, 2004).

Cuando las cantidades de $\text{TNF}\alpha$ son mayores, éste actúa de modo endocrino y provoca acciones sistémicas: estimula la producción de reactantes de fase aguda por el hígado y la producción de IL-1 e IL-6 en células del endotelio vascular; activa el sistema de coagulación e induce fiebre; suprime la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea y contribuye a la inducción del estado caquéctico. En las sepsis por bacterias gram negativas se producen grandes cantidades de $\text{TNF}\alpha$ las concentraciones extremadamente elevadas de $\text{TNF}\alpha$ deprimen la contractilidad del miocardio con la consiguiente reducción de la perfusión tisular, relajan el tono del músculo liso vascular, contribuyendo a la disminución de la presión sanguínea y provocan coagulación intravascular diseminada (Parslow et al. 2002).

Sobre los monocitos el $\text{TNF}\alpha$ induce un aumento de la expresión de moléculas de clase I del MHC y liberación de IL-1, cuyas propiedades biológicas se solapan a las del $\text{TNF}\alpha$. Los linfocitos T en reposo carecen de receptores para $\text{TNF}\alpha$, que aparecen tras su estimulación antigénica. Sobre las células T activadas el $\text{TNF}\alpha$ incrementa el número de receptores para la IL-2, aumenta la proliferación y la producción de $\text{IFN}\gamma$ inducidas por la IL-2. Los linfocitos T activados secretan simultáneamente $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$. También los linfocitos B producen $\text{TNF}\alpha$ cuando son activados por el antígeno (Vasalli, 1992). En presencia de IL-2, el $\text{TNF}\alpha$ incrementa la expresión de receptores

para IL-2 en células NK (*Natural Killer*) y LAK (*Lymphokine-Activated Killer*), así como su actividad citotóxica. Parece probable la existencia de algún lazo de regulación autocrino, ya que las células NK son capaces de producir $\text{TNF}\alpha$ (Abbas et al., 2009).

La Interleuquina 1 (IL-1), ejerce una amplia gama de efectos en una extensa variedad de células. Las diferentes actividades de la IL-1 son el resultado de los efectos de dos proteínas diferentes (IL-1 α e IL-1 β) (Dinarello y Wolf, 1993). A pesar de tener menos de un 30% de homología en su secuencia aminoacídica, ambas moléculas se unen a dos receptores muy similares entre sí: IL-1RI (CDw121a) e IL-1RII (CDw121b) y tienen similares actividades biológicas. La IL-1 es segregada por muchos tipos de células, tras su estimulación por diferentes señales activadoras. Los monocitos y los macrófagos secretan IL-1 en respuesta a productos bacterianos tales como endotoxinas, inmunocomplejos, fragmentos moleculares de degradación del complemento, en particular C5a, y citoquinas, como el M-CSF (factor estimulante de colonias de monocitos), el $\text{TNF}\alpha$ y el $\text{IFN}\gamma$. Los receptores para la IL-1 se encuentran en diversos tipos celulares (Cannon et al., 1997).

La IL-1 en bajas concentraciones tiene funciones inmunoregulatoras a nivel local actuando como coestímulo para la activación de las células T, incrementando la proliferación de los linfocitos CD4 y el crecimiento y la diferenciación de células B. Además induce el aumento de su propia síntesis y la producción de otras citoquinas, tales como IL-6 e IL8 por monocitos y células endoteliales, IL-6 por los fibroblastos o la IL-2 por células T, y estimula la expresión de receptores de citoquinas en diferentes tipos celulares, incluyendo células hematopoyéticas y células T. La IL-1 durante la activación del linfocito B, actúa sinérgicamente con otras linfoquinas, favoreciendo su progresión en el ciclo celular. También actúa sobre las células endoteliales promoviendo la coagulación y la adhesión linfocitaria (Abbas et al., 2009).

A concentraciones mayores, la IL-1 ejerce una acción endocrina y provoca, a nivel sistémico, algunos de los efectos que produce el $\text{TNF}\alpha$ como la fiebre, la síntesis

de proteínas de fase aguda y la caquexia. Por otro lado, tiene efectos diferentes a los del $\text{TNF}\alpha$ dado que no produce daño tisular por sí misma y no es letal, tampoco causa necrosis hemorrágica de tumores, ni lisa células tumorales *in vitro*. Tampoco incrementa la expresión de moléculas del MHC, ni inhibe el crecimiento de las células hematopoyéticas de médula ósea sino que potencia las acciones de los CSF sobre estas células. Finalmente, la acción IL-1 es más potente que la del $\text{TNF}\alpha$ como coestimulador de la respuesta de linfocitos T. La IL-18 presenta acción proinflamatoria y muchas similitudes con la IL-1 β (Parslow et al., 2002).

La IL-1 también, induce el cambio de isotipo de Inmunoglobulina hacia la producción de IgE. La IL-4 antagoniza varios de los efectos de la IL-2 en los linfocitos B. Sobre los macrófagos inhibe la expresión de los tres tipos de receptores para la región Fc (o fracción cristalizable) de la molécula de IgG y bloquea la producción de IL-1, IL-6, IL-8 y $\text{TNF}\alpha$. Sobre los linfocitos T activados inhibe la producción de $\text{IFN}\gamma$ aumenta la capacidad lítica de los CTLs (células citolíticas o TCD8^+), y sobre las células NK (Natural Killer), induce proliferación y actividad LAK, pero antagoniza los efectos de IL-2. Estimula la producción de quimioquinas por las células endoteliales, especialmente C-C, como MCH-1, conllevando a reacciones inflamatorias ricas en eosinófilos y monocitos. Los estudios de inmunohistoquímica en eosinófilos de pacientes que presentan asma bronquial y pólipos nasales, han demostrado mRNA para IL-4 (Kips y Pauwels, 1997).

La interleuquina 4 (IL-4), es producida por linfocitos TCD4^+ activados, mastocitos activados, basófilos, eosinófilos y macrófagos. La IL-4 actúa sobre diferentes poblaciones celulares como los linfocitos B en reposo, modulando el efecto de activación subsiguiente a la interacción con el antígeno, pero no induce proliferación sobre linfocitos T, monocitos, células endoteliales y fibroblastos. También aumenta la expresión de moléculas del MHC de clase II, CD23 y CD40. Por otro lado, el aumento en la expresión de CD23 inducido por IL-4 puede inhibirse por $\text{IFN}\gamma$ (Banchereau y Ryback, 1994).

La interleuquina 5 (IL-5), es una glicoproteína producida exclusivamente por linfocitos T activados. La IL-5 estimula el crecimiento y la diferenciación de los eosinófilos y promueve su activación, que es necesaria para la respuesta inmunitaria frente a parásitos (Takatsu, 1992). Al inducir la producción y maduración de estos eosinófilos en la médula ósea, se constituyen en células hipodensas lo que las convierte en un marcador fenotípico de activación, con lo cual su potencia inflamatoria se incrementa, aumentando la capacidad de producción de leucotrienos, y de superóxido, mejorando su acción citotóxica y aumentando la sobrevivencia de las células, inhibiendo el proceso de apoptosis (Fishman et al., 1996, Ricci et al., 1997). Tiene actividad como factor de diferenciación de células B promoviendo la síntesis de inmunoglobulinas, especialmente la de IgA.

Las quimioquinas constituyen una superfamilia de pequeñas moléculas que tienen gran capacidad quimioattractante y son de estructura muy diferente a las otras citoquinas (Rollins, 1997).

Las quimioquinas poseen la capacidad de inducir la migración o quimiotaxis de numerosos tipos celulares incluyendo neutrofilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos, fibroblastos y queratinocitos.

Originalmente, las quimioquinas fueron descritas como mediadores inflamatorios producidos en sitios de infección o injuria en respuesta a estímulos inflamatorios. Las quimioquinas inflamatorias reclutan y activan leucocitos para montar una respuesta inmune e iniciar la curación de heridas. Aunque la quimiotaxis se presenta como el eje central de las quimioquinas, su función fisiológica es más compleja de lo que se describe, con muchas funciones adicionales de homeóstasis y limpieza. Estas funciones van desde el tráfico de linfocitos durante la hematopoyesis, muestreo de antígenos en los órganos linfoides secundarios, vigilancia inmunológica y el desarrollo de órganos (Moser y Loetscher, 2002). En general, las quimioquinas homeostáticas se expresan en los tejidos u órganos específicos, mientras que las

quimioquinas inflamatorias son producidas por muchos tipos de células en varias ubicaciones.

Se clasifican en tres grupos de acuerdo a la posición de las primeras dos cisteínas en la estructura primaria: 1) Grupo C-X-C en la cual la letra X es un aminoácido que separa las dos cisternas, entre ellas tenemos al factor quimioattractante de neutrófilos derivado del epitelio (ENA78) IL-8, factor derivados del estroma (SDF), proteína quimiotáctica de granulocitos (GCP-2), factor 4 plaquetario (PF-4), IP10, monocina inducida por $IFN\gamma$ (MIG) y proteína activadora de neutrófilo. 2) Grupo CC en el que las dos moléculas de cisteína se encuentran adyacentes, en este grupo se encuentran el RANTES (*Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*), MCP (proteína inflamatoria de macrófago), MIP (proteína quimioattractante de monocitos), C10, H14, TCA-3, eotaxina; y por último, 3) Grupo C en la cual se encuentra la linfotactina (Commins et al., 2010).

Todas las moléculas anteriores promueven la adhesión, la quimiotaxis y la activación de diferentes poblaciones de leucocitos, también alteran el tráfico de linfocitos como respuesta de diferentes señales pro-inflamatorias; parte de estas acciones se llevan a cabo gracias a la sobre regulación en la expresión de integrinas, estableciéndose gradientes de quimiotaxis. Todos sus efectos están mediados por la interacción con los receptores acoplados a proteína G, que pertenece a la familia de las serpentininas (Abbas et al., 2009).

Se ha descrito otro grupo denominado C-X3C, compuesto por fractalina y neurotactina (Nelson et al., 1998).

Las quimioquinas C-X-C tienen potente acción quimioattractante de neutrófilos, y algunas sobre monocitos, mientras que las de tipo C-C, poseen efectos sobre otras células como eosinófilos, basófilos, mastocitos y también sobre monocitos. El grupo C compuesto únicamente por la linfotactina, actúa específicamente sobre linfocitos. Los monocitos y los macrófagos son los principales productores de quimioquinas, los

linfocitos producen especialmente las de tipo C-C, principalmente RANTES y MIP, mientras que los eosinófilos producen MIP e IL-8, y las células epiteliales producen IL-8 y RANTES (Janeway et al., 1999). Para producir quimiotaxis de neutrófilo, la más potente es la IL-8, para eosinófilos las más activas son los RANTES, y para linfocitos T y células NK las principales son RANTES, MIP y MCP.

La interleuquina 8 (IL-8), miembro de la familia α de las quimioquinas, es producida por una amplia variedad de células (fibroblastos, hepatocitos, astrocitos), tras su estimulación con diferentes señales que incluyen a la IL-1, el TNF, la endotoxina y diferentes virus; también es producida por las plaquetas. Esta quimioquina ejerce un papel primordial en la iniciación de la respuesta inflamatoria al promover la quimiotaxis y posterior degranulación de los neutrófilos. Además, desarrolla una acción quimiotáctica sobre otras células entre las que se encuentran los linfocitos T y los basófilos. Sobre estos últimos estimula la liberación de histamina. Algunas de las acciones proinflamatorias del TNF α y la IL-1 son mediadas por la secreción de IL-8, que por tanto actúa como un mediador secundario de los procesos inflamatorios. Dentro de las quimioquinas de la familia β podemos destacar MIP-1 α que es un factor quimiotáctico para monocitos, eosinófilos, células B y NK. MIP-1 α es un mediador importante en la inflamación inducida por virus (Cook et al., 1995).

Los RANTES son unas de las quimioquinas mejor estudiadas y que juegan un papel importante en el asma bronquial; es producida por linfocitos T activados, células epiteliales y endoteliales, células dendríticas y macrófagos alveolares, su acción es potenciada por el complejo del TNF α /IL-1 β , actúa como potente quimioattractante de linfocitos Th1 y Th2 y también de células de memoria. Su acción fundamental se realiza sobre los eosinófilos, atrayéndolos y aumentando la expresión de integrinas, desencadenando su activación, estimulando la explosión respiratoria, la liberación de radicales libres y la exocitosis de su proteasas. Actúa también sobre monocitos (Churg et al., 1997) y tiene un efecto liberador de histamina actuando sobre basófilos (Nelson et al., 1998).

Otra citoquina es la IL-10, la cual es producida por linfocitos Th1 y Th2, monocitos y linfocitos B, inhibe la liberación de IL-5 dependiente de la coestimulación B7-CD28 por linfocitos en reposo, inhibiendo a las células presentadoras de antígeno y por consiguiente afecta la producción de otras citoquinas producidas por los linfocitos T, como el $IFN\alpha$ que actúa disminuyendo la respuesta Th2 en el asmático. También esta citoquina inhibe la producción de IgE mediada por liberación de $TNF\alpha$ por mastocitos y la producción de GM-CSF que actúan como factor de crecimiento de colonias de estas células, inhibiendo la activación de las mismas, mediadas por alérgenos (Abbas et al., 2009).

Por su acción de inhibición de producción de citoquinas, mediadoras de inflamación y con acción eosinopoyética (GM-CSF, IL-3 $TNF\alpha$), por células dendríticas y macrófagos alveolares, contribuye a sub regular el componente inflamatorio de la respuesta alérgica (Delves y Roitt, 1998).

I.5.1. Respuesta inmunitaria mediada por citoquinas en pacientes asmáticos.

Tanto IL-4 como IL-5 están involucradas en la patología del asma bronquial. Entre las acciones locales descritas para ellas están:

La IL-4, producida por mastocitos, linfocitos T, basófilos y eosinófilos, tiene la propiedad de cambiar el isotipo (cambio de *switch* IgG a IgE), es el factor más importante de crecimiento de linfocitos T vírgenes, que cuando son estimulados por antígenos derivan hacia la subpoblación Th2, tiene acción autocrina y paracrina, promoviendo la expansión de estas colonias de células; a su vez, estos linfocitos producen altos niveles de IL-4. Aumenta la expresión de moléculas de adhesión, especialmente de VCAM-1 (moléculas de adherencia), por parte de la células endoteliales, facilitando la migración VLA-4 (integrina de los linfocitos T que se une a

moléculas de adherencia celular de las mucosas) dependiendo de eosinófilos, linfocitos y monocitos (Fishman et al., 1996; Kips y Pauwels, 1997).

La IL-4 estimula la producción de quimioquinas por células endoteliales, especialmente de la clase C-C, como MCP-1, conllevando a reacciones inflamatorias ricas en eosinófilos y monocitos. Además, induce la expresión del receptor CD23, de baja afinidad para macrófagos y también de ICAM-I, potencia la quimiotaxis de fibroblastos y estimula la síntesis de proteínas como colágeno y fibrinectina en la matriz extracelular. En asociación con IL-9, tiene una acción potente como inductora de crecimiento de colonias de mastocitos y aumenta la expresión de moléculas de la clase II del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) en las células inmunocompetentes (Ricci et al., 1997).

Podría decirse que la IL-5 es el principal factor de crecimiento, diferenciación y activación de eosinófilos, induciendo la producción y maduración de estos en la médula ósea, convirtiéndolos en células hipodensas, lo que constituye un marcador fenotípico de activación, con lo cual su potencia inflamatoria se incrementa, aumentando la capacidad de producción de leucotrienos, de superóxido, mejorando su acción citotóxica y aumentando la sobrevivencia de las células inhibiendo el proceso de apoptosis (Fishman et al., 1996; Abbas y Pover, 1997).

Sin embargo, otras citoquinas involucradas son la IL-13 y la IL-16, la primera con homología estructural con IL-4, incluso comparte un receptor común hasta el punto que se ha considerado una duplicación del gen original de esta interleuquina. La IL-16 conocida como factor quimioattractante de linfocitos, pueden ser sintetizadas por las células epiteliales del bronquio según evidencias previas (Bandeira-Melo et al., 2002; Izuhara et al., 2007).

Sin embargo, a pesar de que son las mayormente estudiadas hasta ahora, otras citoquinas han comenzado a ser involucradas en el asma bronquial. Ensayos realizados en lavados broncoalveolares de pacientes asmáticos se han encontrado

las citoquinas $TNF\alpha$, IL- β 1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6. GM-CSF, IL-16, quimioquinas e IFN. Los lavados bronquiales de pacientes asmáticos atópicos se han encontrado un gran aumento de $TNF\alpha$, y moderado de IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 y GM-CSF (**Wirchow et al., 1995**).

Las quimioquinas en el asma promueven la migración de leucocitos desde el compartimiento vascular, hacia la pared bronquial ocurre principalmente por el establecimiento de un gradiente quimiotáctico, facilitado por la expresión de las moléculas de adhesión. Las quimioquinas juegan un papel muy importante al activar las células endoteliales y atraer linfocitos, monocitos y eosinófilos, ocasionando la acumulación de estas células en la pared bronquial.

En el asma bronquial el $TGF\beta$ desempeña un papel patogénico importante, por su capacidad de promover fibrosis sub-epitelial, induce hipertrofia e hiperplasia de glándulas mucosas, hipertrofia del músculo liso, también inhibe el crecimiento de células epiteliales y produce disminución del número de receptores β adrenérgicos en el músculo liso bronquial (**Takisawa et al., 1997**).

Recientes estudios demuestran que hay más similitudes que diferencias en las anormalidades del asma atópica y no atópica. Ambas variantes se caracterizan por la infiltración tisular de eosinófilos y linfocitos T activados y el incremento en la producción de IL-4, 5, 13, y quimioquinas CC (**Molina, 2006**).

Algunas de las citoquinas que intervienen durante el asma son el $TNF\alpha$ y la IL-1 β , estas se caracterizan por potenciar la sensibilización a aeroalergenos, aumentan la reactividad bronquial, activan células inflamatorias, actúan regulando moléculas de adhesión, aumenta la producción de citoquinas como el GM-CSF e IL-8, aumenta la expresión de la síntesis de óxido nítrico (NO) e induce síntesis de IgE.

Por método de ELISA se han encontrado en el lavado broncoalverolar (BAL) de pacientes asmáticos, las siguientes citoquinas: $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-2$, $IL-4$, $IL-5$, $IL-6$, GM-CSF, $IL-16$, quimioquinas e INF. Los Lavados bronquiales de pacientes asmáticos atópicos (Wirchow, 1995) muestran gran aumento de $TNF\alpha$, y moderado de $IL-2$, $IL-3$, $IL-4$, $IL-6$ y GM-CSF. Wirchow (1996) presenta un elegante estudio en el cual dosifica citoquinas en BAL, en pacientes con asma alérgica, como también en intrínseca, y encuentra en la primera aumento de $IL-4$ e $IL-5$ y en la segunda $IL-2$ e $IL-5$. En pacientes con asma severa se ha encontrado disminución de niveles de $IL-10$ en lavado bronquial y en cultivo de monocitos circulantes, esta interleuquina tiene un efecto supresor en producción de citoquinas que intervienen en la inflamación (Borish, 1996).

La $IL-4$ que es producida tiene un papel relevante en la estimulación y producción de quimioquinas por las células endoteliales, especialmente de la clase C-C, como MCP-1, conllevando a reacciones inflamatorias ricas en eosinófilos y monocitos.

I.6. Respuesta inmunitaria mediada por citoquinas en las infecciones microbianas

Las respuestas inmunológicas contra los microorganismos, aunque múltiples y variadas, presentan algunas características generales. La primera es que la defensa efectiva contra los microorganismos está mediada por mecanismos efectores tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. Muchos microorganismos han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir a la inmunidad innata y la protección contra ellos requiere la participación activa de la inmunidad adaptativa. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el tipo de respuesta adaptativa está determinada en gran parte por eventos ocurridos durante la respuesta innata (Parslow et al., 2002).

Los agentes infecciosos pueden diferir mucho en sus patrones de invasión y de colonización, así como en la inmunogenicidad de sus antígenos. Por lo tanto, una respuesta inmunitaria efectiva contra microorganismos distintos, puede requerir la activación de distintos tipos de mecanismos efectores tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa (Abbas et al., 2009). La supervivencia y la patogenicidad de los microorganismos en el huésped están críticamente influenciadas por su capacidad de evadir o resistir la inmunidad protectora, para lo cual ellos han desarrollado diferentes estrategias.

Otra característica en común es que en muchas infecciones el daño tisular y la enfermedad producida puede ser causada por la propia inmunidad del huésped contra el patógeno, más que por el microorganismo en sí mismo (Campbell y Butcher, 2000; Galucci y Matzinger, 2001, Janeway et al., 2001, Lipscomb, 2002).

I.6.1. Respuesta inmunitaria mediada por citoquinas en las infecciones respiratorias de etiología viral.

Los virus son microorganismos intracelulares obligados, que generalmente ingresan a las células susceptibles usando como receptores las moléculas normales de superficie celular. Por ejemplo, los *rinovirus* (virus causante del resfrío común) se unen a moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) expresadas en las células de muchos tejidos como las del epitelio respiratorio. Cuando el virus está dentro de la célula huésped, causa lesión celular por diferentes mecanismos. La replicación viral puede interferir con la síntesis proteica celular y provocar la muerte de la célula por lisis, liberándose muchas partículas virales nuevas (virus citolíticos) (Abbas et al., 2009).

Otros virus pueden causar infecciones latentes y permanecer quiescentes por largos períodos de tiempo, sin conducir a la muerte inmediata de la célula huésped.

La inmunidad contra los virus debe ser capaz de actuar en las distintas poblaciones de células infectadas (dado que distintos virus infectan distintas células). Dicho mecanismo inmunitario opera a dos niveles: previo a la invasión celular, en la etapa inicial de la infección y después de la invasión cuando los virus son inaccesibles a los anticuerpos y fagocitos (Parslow et al., 2002).

En primer lugar, durante el desarrollo de la inmunidad innata la infección viral estimula la producción, por parte de las células infectadas, de IFN tipo 1 (que comprende dos grupos serológicamente distintos, α y β). El IFN tipo 1 tiene muchas acciones biológicas. En principio inhibe la replicación viral estimulando la síntesis de enzimas celulares que interfieren con la replicación del ácido ribonucleico (ARN) o desoxirribonucleico (ADN) viral. Su acción antiviral también es ejercida sobre las células vecinas no infectadas, que quedan así protegidas de la infección. Además, el IFN tipo 1 inhibe la proliferación celular por inducción de las mismas enzimas mencionadas anteriormente y de otras que actúan inhibiendo la síntesis de aminoácidos. También aumenta el potencial lítico de las células NK cuya función principal es matar las células infectadas por virus. Por último, modula la expresión de moléculas MHC, aumentando la expresión de las moléculas MHC clase I e inhibiendo las de clase II. Así mejora la eficiencia de los linfocitos T citolíticos que reconocen antígenos extraños asociados a moléculas MHC de clase I (Goldsby et al., 2004).

En segundo lugar, las células NK lisan muchas células infectadas por virus, constituyendo esto, uno de los mecanismos efectores principales en los estadios iniciales de la infección viral. Además del IFN tipo 1, el IFN- γ , el TNF y la IL-2, aumentan el potencial lítico de estas células (Murphy et al., 2010).

La inmunidad específica contra virus está mediada tanto por mecanismos celulares como humorales. En las etapas iniciales de la infección, los anticuerpos específicos antivirales son muy importantes. Los dirigidos contra las proteínas de envoltura o de las cápsidas virales que participan en la adsorción, impiden la unión con el receptor celular y por lo tanto el ingreso a la célula susceptible; éstos son

llamados anticuerpos neutralizantes. Además, opsonizan a los virus, mejorando las funciones fagocíticas, aunque también pueden facilitar la infección de aquellas células portadoras de receptores Fc (Dörner y Radbruch, 2007). La IgA de las mucosas es importante en la neutralización de virus que ingresan al organismo por vía respiratoria, digestiva y urogenital; de hecho la inducción de inmunidad secretoria es una de las bases para el desarrollo de vacunas orales o nasales. Desafortunadamente, la vacuna oral contra la poliomielitis es una de las pocas que lo ha logrado (Goldsby et al., 2004)

La activación del complemento también puede participar de la inmunidad mediada por anticuerpos, principalmente lisando virus envueltos y promoviendo la fagocitosis. La inmunidad humoral es un componente importante de la inmunidad contra los virus, pero no es suficiente para erradicar muchas infecciones virales. Los anticuerpos tienen efecto protector, sólo en las primeras etapas de la infección viral; además, es importante destacar que su capacidad neutralizante *in vitro*, tiene poca correlación con la capacidad protectora *in vivo* y que es difícil transferir inmunidad antiviral a animales no inmunes sólo con anticuerpos purificados (Parham, 2005).

Un mecanismo fundamental de la inmunidad específica contra las infecciones virales establecidas está constituido por los linfocitos T citotóxicos, fundamentalmente los linfocitos T CD8+ que reconocen antígenos virales asociados a moléculas MHC clase I, sintetizados en el interior de las células infectadas. En este momento es importante recordar que las moléculas MHC de clase I están en la superficie de cualquier tipo celular. Para su diferenciación y activación, los linfocitos T citotóxicos requieren dos tipos de señales; la primera es el reconocimiento específico del antígeno en la célula blanco en asociación al MHC clase I y la segunda son citoquinas producidas por las células T *helper* CD4+ que reconocen antígenos virales asociados a MHC clase II (Dörner y Radbruch, 2007).

I.6.1.1. Respuesta inmunitaria contra infecciones virales respiratorias

Los pulmones y el aparato respiratorio en general, son un sistema de órganos estructural y anatómicamente complejos, que por su gran área de superficie epitelial está continuamente expuesta al medio ambiente, además de estar altamente vascularizado (**Woodland y Scott, 2005**). La patogenia de la inflamación pulmonar inducida por cualquier virus, y en especial por el VSR, es multifactorial; es decir que, además del efecto citopático directo del virus sobre el epitelio respiratorio, la inflamación mediada por mecanismos neuronales (sustancia P y neurocinina), y no neuronales (leucotrienos, prostaglandinas, etc.), y la inmunidad innata y adaptativa a través de distintos mecanismos solubles o celulares (citoquinas y células inmunitarias), desempeñan un papel primordial (**Piedimonte et al., 2004**).

Aunque una gran cantidad de infecciones virales no son mortales como lo señalan la mayoría de los estudios (**Rosete et al., 2002**), el padecimiento de este tipo de infección parece estar relacionado con una alteración de la respuesta inmunitaria que podría conllevar a hiperreactividad bronquial (HRB), a cuadros asmáticos; así como también, a neumonías y bronquiolitis como secuelas de la infección (**Roche et al., 2003; Mejías et al., 2004**). Adicionalmente se ha sugerido que algunas infecciones virales en pacientes asmáticos suelen prolongar los síntomas respiratorios (**Corne et al., 2002**), pero los mecanismos involucrados no parecen estar del todo esclarecidos.

Existen pocos trabajos dirigidos a estudiar el patrón de citoquinas local y periférico de pacientes con infecciones respiratorias producidas por diferentes tipos de virus (VSR, adenovirus, influenza, parainfluenza); entre ellos se encuentra las investigaciones realizadas por **Díaz et al. (1999)**, en sobrenadante de cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), quienes sugirieron que el adenovirus induce una respuesta Th1 que no es vista en la infección por VSR. **Bonville et al. (1999)**, han reportado en lavados nasales de pacientes con IRA del tracto superior por Adenovirus, VSR, parainfluenza e influenza concentraciones de MIP-1 α y RANTES.

Según estudios realizados por **Gern et al. (2002)**, existe una estrecha asociación entre la severidad de la enfermedad y los niveles de IL-8 en lavados nasales de pacientes infectados con rinovirus e influenza pero no con parainfluenza y VSR. Por su parte, **Fernández et al. (2005)** han señalado variaciones en el patrón de respuesta a algunas citoquinas como IFN γ , receptor TNF (sTNF-II) en la fase aguda de la infección producida por adenovirus y VSR, y afirman que estas discrepancias podrían deberse a la patología tan diferente que presentan ambos virus. Información similar han aportado las investigaciones realizadas por **Aberle et al. (2004)** quienes señalan que dependiendo de la naturaleza del patógeno viral, la infección respiratoria en los niños difiere en cuanto a la producción de IFN γ y esto podría contribuir al curso clínico de la enfermedad. Las investigaciones anteriores fueron realizadas en pacientes sin asma. Sin embargo, **Oh et al. (2002)**, evaluaron la relación entre las concentraciones de IL-6, IL-8, IL-11 e IFN γ en aspirado nasofaríngeo de niños asmáticos y no asmáticos con IRA producida por influenza y VSR.

A pesar de los avances en los estudios relacionados con esta materia, investigaciones actuales (**Pitrez et al., 2005**) siguen sosteniendo que el patrón de citoquinas Th1/Th2 en infantes de países en vías de desarrollo con cuadros respiratorios virales sigue estando poco claro, por lo que los investigadores sugieren múltiples factores involucrados en la patogénesis de este tipo de enfermedades.

A excepción del trabajo de **Fernández et al. (2005)**, no se encontraron investigaciones latinoamericanas, y podría decirse que no existen investigaciones venezolanas que hayan evaluado simultáneamente los mecanismos inmunopatogénicos mediados por citoquinas de los diferentes virus respiratorios, en pacientes adultos con IRA asmáticos y no asmáticos, evaluando un patrón amplio de citoquinas (proinflamatorias, algunas de las citoquinas de la subpoblaciones Th2 y algunas quimioquinas) como el planteado en el presente estudio.

Las investigaciones sugieren que los mecanismos inmunopatológicos de los virus son diferentes; algunos estudios han encontrado mayor frecuencia de

exacerbaciones de asma como secuelas de la infección viral, y otros sólo se limitan a la enfermedad respiratoria (Fernández et al., 2005; Yasuda et al., 2005).

La relación entre las infecciones bacterianas y el asma no parece tener un vínculo tan fuerte como las infecciones virales (Ogra, 1989). En un estudio prospectivo en la universidad de Wisconsin se analizaron 16 pacientes que tuvieron 61 episodios de crisis de asma. De este total, 42 episodios estuvieron relacionados con infección viral y solamente uno, con infección bacteriana (Wennergren, 1997).

Debido a que la inmunopatogénesis de los agentes virales respiratorios difiere según lo evidencia la literatura, a continuación se describe brevemente algunos de los mecanismos que han sido involucrados con la patología de algunos de estos virus en las infecciones respiratorias, así como su asociación con cuadros asmáticos:

Las principales células del sistema inmunitario que ejercen su acción cuando el organismo ha estado expuesto a infecciones virales son los linfocitos T citotóxicos diferenciados, estos linfocitos, ejercen su efecto antiviral por tres mecanismos:

a) Lisis de las células infectadas por liberación de gránulos que contienen, entre otras macromoléculas, una proteína formadora de poros (perforina o citolisina); **b)** estimulación de enzimas intracelulares que degradan los genomas virales; **c)** secreción de citoquinas, más específicamente IFN- γ y linfotoxina (LT), en menor grado IL-2. Aunque estas células producen citoquinas, no lo hacen en cantidades suficientes o en los tipos necesarios para generar la diferenciación completa de sus precursores en linfocitos T citolíticos activos y diferenciados; de ahí la necesidad de las citoquinas producidas por las células T *helper* CD4+ (células T colaboradoras o T *helper*) (Goldsby et al., 2004).

En algunas infecciones virales esta respuesta inmunitaria es la causante de la lesión tisular. De hecho, los individuos con deficiencias en las células T, padecen una enfermedad con menor daño hepático, pero con mayor tendencia a la cronicidad y

los inmunocompetentes padecen una enfermedad con lesiones hepáticas más severas, pero raramente se produce la enfermedad crónica (Campbell y Butcher, 2000, Galucci y Matzinger, 2001, Lipscomb 2002, Luster, 2002).

Algunos estudios realizados en muestras de secreción nasal obtenidas de pacientes con diagnóstico de IRA relacionada a VSR, sugieren que la secreción de quimioquinas inducida por el virus en las vías aéreas contribuye al daño tisular producido por neutrófilos y eosinófilos (Garofalo et al., 1992, Harrinson et al., 1999). Otras citoquinas como la IL-4, IL-6, RANTES, MIP-1 α , IL-8, y el TNF- α , se han asociado con la movilización de otras células al lugar de la infección (Sheeran et al., 1999, Jafri et al., 2004).

La inmunopatogénesis del VSR, aún no está clara del todo, no está bien definido si el VSR es el principal agente causal del asma; o si es la existencia de predisposición genética en estos pacientes lo que los predispone ante el virus VSR a desarrollar la hiperreactividad bronquial (HRB). Ciertos estudios afirman que cuando la enfermedad progresa, parece ser la respuesta inmunitaria, más que la replicación viral, la responsable de las manifestaciones clínicas y la gravedad de la infección (Mejías et al., 2004). Algunos autores sugieren la probabilidad de que la reducción en la función Th durante la infancia es la que juega un papel central en la susceptibilidad de la bronquiolitis después que los niños han sufrido una infección por VSR (Openshaw et al., 1992). Varios estudios con CMSP infectadas por VSR sugieren que el patrón de citoquinas predominante durante la infección es Th1, otros estudios sostienen que hay predominancia de la respuesta Th2, y otras tantas investigaciones sostienen que la infección por VSR estimula ambas respuestas (Chen et al., 2002; Garofalo et al., 2001, Roman et al., 1997; Van Schaik et al., 1999; Welliver y Duffy, 1993).

Parece ser que es la liberación de citoquinas como la IL-4, IL-6, RANTES, MIP-1 α , IL-8, y el TNF- α la que moviliza otras células al lugar de la infección, esto lo evidencian los estudios realizados en lavado nasofaríngeo de pacientes con infección por VSR en el cual se revelaron mayores concentraciones de RANTES, MIP-1 α , IL-6,

IL-8 e IL-10 en pacientes infectados con VSR cuando fueron comparados con los controles sin infección (Sheeran et al., 1999). Alberle et al., (2004) sugieren que la manifestación más severa de la bronquiolitis por VSR en infantes está asociada con la producción local marcadamente reducida de IFN γ en la secreción de las vías aéreas; no se han encontrado trabajos realizados en población adulta que sustenten esta hipótesis. Otros estudios recientes, realizados en muestras de lavado bronquial provenientes de ratones con neumonía e hiperreactividad producida por VSR, han encontrado aumento en la concentración de ciertas citoquinas entre las cuales destacan TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10, KC (homólogo de la IL-8), RANTES, MIG o *monokine induced by gamma-interferon* (CXCL9), MIP 1 α y la eotaxina (Jafri et al., 2004).

En la inmunopatogénesis del virus de la influenza está ampliamente caracterizada la respuesta de la IL-18 como estimulante de la su población Th1 (Van Der Sluijs et al., 2005; Liu et al., 2004, Sareneva et al., 1998; Zhang et al., 2001); igualmente para las quimioquinas RANTES, MIP-1 α , MCP3, IP-10; como de las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6, TNF α , además de los IFN α y β (Julkunen et al., 2001). Según Gern et al. (2002), existe una estrecha asociación entre la severidad de la enfermedad respiratoria con los niveles de IL-8 en pacientes infectados con rinovirus y virus de la influenza. Por otra parte, estudios *ex vivo* han evidenciado la asociación en la producción de IL-10 por este virus en la susceptibilidad a infecciones bacterianas (Van Der Sluijs et al., 2004). Otros estudios realizados en niños asmáticos y no asmáticos con infección por VSR y virus de la influenza han mostrado aumento en la concentración de IL-6 e IFN γ para los asmáticos (Oh et al., 2002); los resultados obtenidos por Tsitoura et al. (2000) señalan la asociación del virus de la influenza con un aumento de la sensibilización alérgica y de la HRB y con un aumento en el patrón de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) así como del anticuerpo IgE; por el contrario, los estudios de Gentile et al. (1999) realizados con anterioridad, apuntan a una disminución de IL-10 en los pacientes alérgicos lo que sugiere una disminución del patrón Th2 en estos individuos.

Las mayoría de las investigaciones asocian la inmunopatología del adenovirus con la producción de IL-6, TNF α e IL-1 que varían según la evolución del cuadro infeccioso (Ginsberg et al., 1991); otros involucran la participación de la IL-8 en respuesta a este agente (Alcorn et al., 2001; Booth et al. 2004; Booth y Metcalf, 1999).

Se encontraron pocos estudios tendientes a caracterizar la respuesta inmunopatogénica del virus de parinfluenza, este agente ha sido asociado a procesos inflamatorios de las vías respiratorias mediados por IL-6 e IL-8 en respuesta a TNF α (Roger et al., 2004).

I.6.2. Respuesta inmunitaria mediada por citoquinas en las infecciones respiratorias de etiología bacteriana.

La inmunidad frente a las bacterias está muy relacionada con el hecho de que dichas bacterias se repliquen en los medios intra o extracelulares, por tanto, se debe hacer una limitación entre ambos tipos de respuestas.

Las bacterias extracelulares pueden causar enfermedad por dos mecanismos distintos. El primero es la inflamación que provoca destrucción de los tejidos en el sitio de infección. Como ejemplo de esto citamos las infecciones supuradas producidas por *Staphylococcus sp.* y *Streptococcus sp* (Abbas et al., 2009).

El segundo mecanismo es la producción de toxinas con distintos efectos nocivos. La endotoxina de las bacterias gramnegativas es un potente estimulador de la producción de citoquinas y activador de los macrófagos. Muchas exotoxinas son primariamente citotóxicas, pudiendo destruir por distintos mecanismos a las células a las que se fijan. Otras interfieren con las funciones celulares esenciales, por ejemplo, la toxina diftérica inhibe la síntesis proteica bloqueando la función del factor de elongación 2, necesario para la síntesis de todos los polipéptidos. Otro ejemplo

serían algunas toxinas clostridiales como las producidas por Inmunidad innata. Los mecanismos fundamentales de la inmunidad innata operantes contra bacterias extracelulares son la fagocitosis, la respuesta inflamatoria y la activación del complemento (Murphy et al., 2010).

Los fagocitos pueden unirse a bacterias extracelulares mediante una serie de receptores. La resistencia de las bacterias a la fagocitosis y a la digestión dentro de los macrófagos, es un determinante importante de la patogenicidad y virulencia de las mismas. La activación de los fagocitos también provoca la secreción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y las interleuquinas IL-1, IL-6 e IL-8, que inducen la adhesión de neutrófilos y monocitos al endotelio vascular en el sitio de la infección, seguida por la migración, acumulación local y activación de las células inflamatorias que eliminan las bacterias. Sin embargo, la producción de grandes cantidades de citoquinas puede ser perjudicial y de hecho son responsables de algunas manifestaciones clínicas de las infecciones por bacterias extracelulares. El daño de tejidos normales adyacentes es un efecto colateral de estos mecanismos de defensa. La consecuencia más grave inducida por la secreción descontrolada de citoquinas, es el *shock* séptico que puede presentarse con coagulación intravascular diseminada, falla multiorgánica y muerte, propio de algunas infecciones por bacterias gramnegativas (desencadenado por el LPS) y grampositivas (donde el peptidoglicano y los ácidos teicoicos desencadenan efectos similares) (Golsby et al., 2004).

La activación del complemento en ausencia de anticuerpos, también tiene un rol importante en la eliminación de estas bacterias. El peptidoglicano de las paredes celulares de las bacterias grampositivas y el LPS de las paredes celulares gramnegativas, activan la vía alterna del complemento promoviendo la formación de C3 convertasa. Las bacterias que expresan manosa en su superficie, pueden unir una lectina por la lectina de unión a manosa (*Mannose-binding lectin*, MBL), homóloga a C1q, que activa el sistema de complemento por la vía de las lectinas. Como resultado de la activación de este sistema, se genera C3b que opsoniza a las bacterias y mejora su fagocitosis. Además, la activación de la cascada del

complemento podría terminar en la formación de un complejo de ataque a membranas que lisa a las bacterias (Murphy et al., 2010).

La inmunidad adaptativa o específica de las bacterias extracelulares y está mediada principalmente por la inmunidad humoral. Los polisacáridos de las paredes celulares y de las cápsulas de estos microorganismos constituyen uno de los componentes más inmunogénicos de las mismas y son el prototipo de antígeno T independiente. Dichos antígenos estimulan a las células B que generan una respuesta de inmunoglobulina (Ig) M específica, aunque también pueden generarse otros isotipos de inmunoglobulina o anticuerpos (Goldsby et al., 2004).

Probablemente sea la liberación de citoquinas la que promueva el cambio de isotipos de cadena pesada de los anticuerpos o inmunoglobulinas.

Los anticuerpos producidos contra los antígenos de superficie (polisacáridicos o proteicos) y las toxinas bacterianas, estimulan tres tipos de mecanismos efectores: Uno mediado por IgG en la cual estas opsonizan a las bacterias favoreciendo la fagocitosis; éstas se unen a los receptores Fc y presentes en los monocitos, los macrófagos y los neutrófilos. Otro mediado por IgG e IgM, donde estas neutralizan las toxinas bacterianas impidiendo que se unan a sus células blanco, promoviendo su fagocitosis. Por ejemplo, la inmunización pasiva con anticuerpos dirigidos contra la toxina tetánica, es un tratamiento que podría salvar la vida del paciente en una infección aguda por *Clostridium tetani*. En la mucosa respiratoria y gastrointestinal, la IgA secretoria tiene un rol importante en la neutralización de toxinas y en la prevención de la colonización de dichos tejidos. Y un último mecanismo mediado tanto por IgM como por IgG, en la cual ambos anticuerpos activan el sistema del complemento, que conducen a la formación, en la superficie bacteriana, de un complejo de ataque a la membrana (CAM), cuya función lítica es importante sólo para eliminar algunos microorganismos (Abbas et al., 2009).

La principal respuesta de las células T frente a las bacterias extracelulares, está mediada por los linfocitos TCD4+ que fueron activados por los antígenos bacterianos, presentados por moléculas MHC-II. Estos linfocitos actuarán como células T *helper* secretando citoquinas que estimulan la producción de anticuerpos específicos y activando las funciones fagocíticas y microbicidas de los macrófagos (Parham, 2006).

Algunas toxinas bacterianas (ej. superantígenos) pueden estimular inespecíficamente a las células T, en consecuencia se liberan grandes cantidades de citoquinas y mediadores inflamatorios que finalizan con la producción del síndrome de *shock* tóxico; ejemplo de estos superantígenos son la toxina del síndrome del *shock* tóxico por *Staphylococcus aureus* (toxina del síndrome del *shock* tóxico, TSST) y la exotoxina pirógena de *Streptococcus pyogenes* (Murphy et al., 2010).

La inflamación aguda y el *shock* (tóxico o séptico) son dos consecuencias nocivas de la defensa contra las bacterias extracelulares. Una complicación tardía de las respuestas humorales frente a infecciones bacterianas, puede ser debida a la producción de anticuerpos productores de enfermedad. Son ejemplos conocidos de este fenómeno las enfermedades postestreptocócicas, que pueden darse como secuelas de infecciones producidas por *Streptococcus pyogenes* (fiebre reumática y glomerulonefritis difusa aguda) (Abbas et al., 2009).

La inmunidad frente a bacterias intracelulares que son aquellas capaces de sobrevivir y replicarse dentro de células del huésped, como las bacterias *Mycobacterium* y *Listeria monocytogenes*, que sobreviven y se multiplican aún dentro de los fagocitos; tiene una característica particular, y es que como estas bacterias están en un nicho inaccesible a los anticuerpos circulantes, su eliminación requiere mecanismos inmunológicos distintos a los ya vistos para las bacterias extracelulares (Parham, 2006).

La inmunidad innata frente a estas bacterias intracelulares involucra la participación de mecanismos como la fagocitosis y la acción de células NK. Sin

embargo, las bacterias intracelulares son resistentes a la degradación dentro de los fagocitos mononucleares. Dicha resistencia contribuye en gran medida a que algunos patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* sean capaces de permanecer por largos períodos en el huésped, recidivar luego de curas aparentes y establecer infecciones crónicas de difícil erradicación (Murphy et al., 2010).

Por otro lado, las bacterias intracelulares inducen la activación de células NK, ya sea directamente o mediante la producción de citoquinas (específicamente IL-12) derivadas de macrófagos. Las células NK activadas IFN- γ , que es a su vez un potente activador de los macrófagos, mejorando su capacidad fagocítica y microbicida (Abbas et al., 2009).

Este proceso podrá retrasar el crecimiento de la bacteria; sin embargo, la resolución definitiva de la infección requiere de la inmunidad adaptativa. En tal sentido, se considera que las células NK son las células claves para la contención de las bacterias intracelulares mientras se desarrolla la inmunidad adaptativa (Parslow et al., 2002).

Por su parte, la principal respuesta adaptativa contra las bacterias intracelulares es la inmunidad mediada por células. Muchos antígenos proteicos de estas bacterias estimulan las respuestas de células T CD4+ y CD8+ y ambos tipos celulares contribuyen al desarrollo de inmunidad protectora contra las bacterias intracelulares. Una función efectora central para eliminar estos microorganismos es mediada por macrófagos activados por citoquinas (particularmente IFN- γ), derivadas de células Th1 activadas. Por otro lado, las células T CD8+ activadas pueden actuar como linfocitos citotóxicos sobre células infectadas, que presentan antígenos bacterianos en el contexto de MHC clase I (Murphy et al., 2010).

Las diferencias en el tipo de respuesta mediada por células T, puede explicar las distintas manifestaciones clínicas que determina la infección por un

microorganismo en individuos diferentes. En algunas situaciones, esto se ha explicado por el entorno de citoquinas secretadas en el transcurso de la respuesta, que determina la expansión de un grupo de células Th1 o Th2, que inducen mecanismos efectores distintos. Mientras una respuesta de tipo 1 favorece la inmunidad celular y determina niveles bajos de anticuerpos, una respuesta de tipo 2 determinará lo contrario (altos títulos de anticuerpos y baja inmunidad celular).

Por otro lado, como ya se mencionó, estas bacterias han desarrollado mecanismos que las hacen resistentes a la fagocitosis y que persisten por largos períodos aún en individuos con inmunidad celular efectiva. Dicha persistencia genera una estimulación antigénica crónica, que puede conducir a la formación de colecciones locales de macrófagos activados (granulomas) que rodean los microorganismos impidiendo su diseminación. La inflamación granulomatosa es una característica histológica propia de muchas infecciones producidas por micobacterias y que se asocia con necrosis y fibrosis, conduciendo a lesiones funcionales severas. Así, la respuesta inmunitaria del huésped es la causa principal de la lesión tisular y la enfermedad en muchas infecciones por bacterias intracelulares como las micobacterias (Parslow et al., 2002).

La inmunidad montada frente a este tipo de infecciones puede variar entre los individuos, siendo determinante de la progresión de la enfermedad y del pronóstico clínico (Campbell y Butcher, 2000, Galucci y Matzinger, 2001, Lipscomb 2002).

I.6.2.1. Inmunidad frente a bacterias en pacientes asmáticos.

Existen fuertes evidencias que sostienen el criterio de que los procesos bacterianos no inducen a crisis de asma bronquial. Uno de ellos se basa en que, el uso de antibióticos no se ha visto que ejerza algún cambio en la evolución de las crisis de asma y el segundo argumento consiste en que no se han asociado los episodios de sibilancia con infección por algún patógeno demostrado. Sin embargo,

esto se contradice con los resultados encontrados por **Korppi et al. (2009)**, donde en un estudio de pacientes asmáticos en crisis con evidencia de componente infeccioso, se demostró que el 63 % de ellos tenían infección bacteriana, las más frecuentes fueron: *Haemophilus influenzae* (34 %) y *Clamidia* (28 %). No obstante, ante estas contradictorias evidencias no se puede dudar que frente a pacientes asmáticos de una mala evolución por períodos prolongados, con uso frecuente y a altas dosis de esteroides, las infecciones bacterianas pudieran encontrar un medio propicio para desarrollarse. Quedaría por ver si desempeñan un papel directo o indirecto en el agravamiento de la inflamación existente en el asma bronquial (**Kraft, 2000**).

De lo anterior se deduce que los estudios sobre la respuesta sistémica inflamatoria e inmunitaria inducida por virus y/o por bacterias en pacientes asmáticos y no asmáticos con IRA son poco concluyentes.

I.7. Aspecto patogénicos de la respuesta celular en las infecciones virales.

La relación entre los cuadros respiratorios producidos por VSR y la severidad de la infección observada en pacientes hospitalizados por bronquiolitis inducida por VSR arrojó un cociente IL-4/IFN- γ en CMSP mayor en lactantes con formas graves de la enfermedad frente a un grupo control con formas leves de bronquiolitis (**Aberle et al., 1999**). Otros autores han observado que los lactantes con formas graves de bronquiolitis desarrollan una respuesta Th1-Th2 más equilibrada, que no difiere de la observada en lactantes con infección del tracto respiratorio superior únicamente, mientras que aquellos con formas leves de bronquiolitis parecían tener una respuesta predominante Th1 (**Garofalo et al., 2001**), en este mismo estudio se comparó muestras de lavados nasales de una cohorte seleccionada de infantes con bronquiolitis, frente a infección del tracto respiratorio superior diagnosticados con VSR, se obtuvo que el cociente IL-4/IFN- γ fue significativamente mayor en muestras nasofaríngeas de

lactantes con bronquiolitis por VSR frente al grupo con infección del tracto respiratorio superior (ITRS).

Las concentraciones de IFN- γ e IL-18 en CMSP fueron significativamente menores en el grupo de pacientes con bronquiolitis independientemente de la edad (Legg et al., 2003). Se ha observado también una activación de mastocitos y eosinófilos, y de IgE debido a una desviación persistente hacia una respuesta Th2 en niños con bronquiolitis (Welliver y Duffy, 1993). Algunos estudios en secreción nasal de niños con VSR, ya habían sugerido que tanto los neutrófilos como los eosinófilos contribuyen al daño tisular durante la infección (Garofalo et al., 1992); y parece ser que la participación de estas células en la respiración del huésped es debido, en parte, a la secreción de quimioquinas por las células epiteliales de las vías aéreas, inducida por los virus (Harrison et al., 1999). Contrario a lo anterior, Chen et al. (2002) no encontraron predominancia en la producción de las citoquinas de la subpoblación Th2 en la fase aguda de la bronquiolitis producida por VSR en infantes, pero si revelan un aumento del IFN γ en los pacientes cuando se compararon con los controles.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las infecciones del tracto respiratorio constituyen una patología de elevada incidencia y de marcada morbilidad e incluso mortalidad. Dentro de este amplio grupo de enfermedades infecciosas se identifican diferentes síndromes clínicos identificados en base a distintos criterios entre los que destaca: la localización anatómica preferente del proceso lesivo tisular.

La infección respiratoria no solo constituye un heterogéneo grupo de procesos patológicos en base a sus síntomas y signos, si no en relación al agente etiológico microbiológico.

Por lo tanto, su comprensión biológica exige considerar esta variabilidad, así como, la provocada por la condición del paciente que la sufre.

En el desarrollo patogénico de las infecciones respiratorias, la respuesta inmunitaria-inflamatoria constituye un elemento esencial. La intensidad y las características de esta respuesta celular y molecular condicionan de forma relevante el desarrollo de la lesión tisular local y su repercusión sistémica e incluso el propio pronóstico de la enfermedad. Dentro de esta respuesta inmunitaria las citoquinas son un grupo de proteínas extremadamente relevantes en la inducción y regulación de la respuesta inmunitaria-inflamatoria tanto a nivel sistémico como local del tejido que ha sufrido la acción directa del agente etiológico.

Es factible considerar que la diferente expresión clínica de los síndromes infecciosos respiratorios pueda asociarse a distintos patrones de alteración en las citoquinas proinflamatorias y en las implicadas en la regulación de la infiltración tisular. Además, las características del agente etiológico vírico y bacteriano a través de sus diferentes interacciones con el huésped, pueden desencadenar distintas variaciones en la producción de las citoquinas. De forma simultánea, la capacidad de respuesta del huésped como la asociada a una predisposición de respuesta Th2 similar a la encontrada en los asmáticos, pudiera también condicionar las características de la respuesta a la infección respiratoria.

La comprensión de los mecanismos biológicos subyacentes a la heterogeneidad clínica y etiológica de las infecciones respiratorias, podrá contribuir al establecimiento de nuevos racionales para el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas que contribuyan a controlar este problema de salud. Además, puede utilizarse como marcador diagnóstico de la severidad de la enfermedad. Por otra parte, conocer en mayor detalle los mecanismos de inmunopatogénesis de algunos virus e infecciones bacterianas durante las IRA's, pudiera contribuir a fomentar esfuerzos para disminuir las infecciones respiratorias de cualquier etiología en el país.

OBJETIVO GENERAL

Caracterización del patrón de citoquinas circulantes en pacientes con IRA's y su relación con el agente etiológico y expresión clínica de la enfermedad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En una población de pacientes asmáticos y no asmáticos con IRA de vías respiratorias altas y bajas, y en un grupo control sano de similar edad, se analizó:

1. Las características clínicas y etiológicas de la infección respiratoria con especial énfasis en la comparación entre pacientes asmáticos y no asmáticos.
2. Los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α , citoquinas IL-4, IL-5 (Th2) y quimioquinas IL-8, MCP-1 y RANTES.
3. Análisis del impacto sobre el sistema inmunitario-inflamatorio de los agentes etiológicos virales identificados en los pacientes, midiendo el resultado de la inoculación del virus aislado del paciente sobre la producción *in vitro* de citoquinas por células mononucleares cultivadas de sujetos normales.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Población en estudio.

Se realizó un estudio longitudinal de tipo descriptivo clínico y experimental *ex vivo* e *in vitro*.

En Venezuela y particularmente en Maracaibo, se desconoce la prevalencia de casos de infección por virus u otros microorganismos en individuos con IRA. Los pocos reportes existentes son emanados del **Boletín Epidemiológico del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (1997)**. Tomando esto como punto de partida, se recolectaron muestras de pacientes con IRA que acudieron a las diferentes consultas ambulatorias de algunos centros de salud de la región (Hospital General del Sur “Dr. Pedro Iturbe”, Policlínica Maracaibo, Clínica Falcón y la Sección de Virología del Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia). De los 161 pacientes que acudieron en el término de dos años transcurrido entre Noviembre de 2007 a Noviembre del 2009, se recolectaron muestras de 43 pacientes adultos (14 asmáticos y 29 no asmáticos), sin discriminación de sexo, en edades comprendidas entre 18 y 65 años y que presentaron síntomas compatibles de IRA del tracto respiratorio alto o bajo.

III.2. Protocolo de seguimiento

A cada paciente susceptible de ser seleccionado, se le realizó una historia clínica y una ficha de recolección de datos diseñada para la investigación de IRA (anexo 1), siguiendo el formato estándar utilizado en los Servicios de Atención Médica venezolanos seleccionados (Hospital General del Sur “Dr. Pedro Iturbe”, Policlínica Maracaibo, Clínica Falcón y la Sección de Virología del Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia).

Se incluyeron preguntas para evaluar la condición asmática del paciente, y a la vez, investigar la historia de asma y atopia familiar.

Para la medición de las citoquinas séricas, se seleccionó una población control constituida por 10 sujetos aparentemente sanos que estuvieran en un rango de edad similar al grupo de pacientes seleccionados, y que al momento de la toma de la muestra no hubiesen tenido antecedentes de infección respiratoria por los menos durante las últimas 4 semanas. Estos pacientes resultaron negativos a las pruebas virológicas y bacteriológicas realizadas, y no presentaron historia de asma.

La selección de los pacientes que constituyeron la muestra se hizo tomando los siguientes criterios

III.3. Criterios de Inclusión:

Pacientes adultos con y sin historia familiar de asma (según los criterios definidos por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH, 2007). Los pacientes debían presentar o no, los síntomas/signos cardinales característicos de asma: sibilancia, disnea, tos, opresión torácica, función pulmonar con obstrucción del flujo aéreo reversible. Y se tomaron los criterios diagnósticos utilizados para pacientes mayores de 5 años de edad, caracterizados por:

- Tres episodios de sibilancias de al menos 1 día de duración y que hayan afectado al sueño, con aceptable respuesta a tratamiento broncodilatador.
- Síntomas recurrentes o continuos relacionados con asma (tos crónica de predominio nocturno o matutino, sibilancias, disnea nocturna, fatiga o tos con el ejercicio físico, el frío o las emociones) en presencia de antecedentes personales o familiares de atopia.
- Síntomas con el ejercicio físico. Un episodio de sibilancias con una prueba de broncodilatación positiva utilizando el volumen expiratorio forzado en el primer segundo (FEV1 o *Forced Expiratory Volume*) para su determinación (la negatividad de esta prueba no excluía el diagnóstico del asma).

Los pacientes debieron presentar síntomas y signos sugestivos de IRA's del tracto respiratorio alto o bajo. El diagnóstico de IRA se realizó sobre la base de los criterios que maneja la norma de atención de personas con IRA caracterizado por:

Rinofaringitis aguda (resfriado común): congestión nasal y/o coriza hialina, estornudos, tos, dolor de garganta, cefalea y malestar general, fiebre de mayor o menor intensidad (Hernández et al., 2003).

Faringoamigdalitis: dolor de garganta, amígdalas hipertrofiadas de aspecto exudativo, eritema, cefalea, náuseas, vómitos, adenomegalias dolorosas en el cuello, lesiones y petequias en el paladar blando (Hernández et al., 2003).

Otitis media o aguda: Rinitis, tos, astenia, hiperemia/opacificación y/o abombamiento de la membrana timpánica, fiebre y otalgia (Hernández et al., 2003).

Sinusitis: Rinorrea purulenta y fiebre elevada o síntomas persistentes por más de 10 días, tos seca o expectoración nocturna (Hernández et al., 2003).

Neumonía: rinorrea acinoaladas o no de aleteo post nasal, fiebre, tos productiva, disnea, dolor torácico, crepitantes, tiraje intercostal y subcostal, hipoventilación o dificultad respiratoria, frecuencia respiratoria elevada, vómitos (Bantar y Bavestrello, 2002).

Bronquitis: fiebre, tos productiva, estridor inspiratorio, tiraje intercostal, disnea, cianosis, frecuencia respiratoria aumentada (Vázquez, 2006).

Una condición indispensable durante el curso de estas afecciones respiratorias fue que los pacientes tuvieran una evolución de menos de cinco días desde el inicio de los síntomas, debido a que después de este tiempo, la probabilidad de detectar virus por inmunofluorescencia disminuye por la declinación de la replicación viral en el lavado nasofaríngeo (LNF) (Chiparelli et al., 1988).

III.4. Criterios de Exclusión:

Los pacientes que acudieron a las consultas no debieron estar recibiendo tratamiento antibiótico y/o esteroideo al momento de la toma de la muestra por lo menos durante un periodo de 15 días a un mes antes de la misma.

Se excluyeron del estudio, pacientes que presentaron IRA del tracto respiratorio bajo y/o alto producida por hongos, con algún tipo de inmunodeficiencia diagnosticada. También se excluyeron aquellos pacientes que estuvieran recibiendo broncodilatadores, medicamentos antiinflamatorios (esteroideos o no) u otras drogas que interactúen con el sistema inmune en los seis meses previos al estudio, o que tuvieran alguna enfermedad crónica de prematuridad, displasia broncopulmonar, fibrosis quística, reflujo gastroesofágico y anomalías congénitas del pecho (**Bradley et al., 2005**). Además, se consideró la historia perinatal, alimentación, enfermedad previa e historia familiar de desórdenes atópicos (asma, eczema y alergia de categoría no específica). Enfermedades cardiovasculares (falla cardíaca congestiva, hipertensión no controlada, enfermedad coronaria, arritmia severa; diabetes mellitus, desórdenes hematopoyéticos, hepáticos o renales, desórdenes pulmonares diferentes al asma, otras infecciones bacterianas diferentes a las IRA's, enfermedades autoinmunes, historia de cáncer u otra malignidad y malnutrición.

Los pacientes fueron debidamente notificados acerca del objetivo e implicaciones de participar en el presente estudio, y todos expresaron el consentimiento informado de su participación, de manera voluntaria y por escrito (anexo 2). Todos los procedimientos realizados en humanos se rigieron por lo establecido en la Declaración de Helsinki (**Ramiro, 2004**), y en el Código de Bioética del Fondo Nacional para la Ciencia y la Tecnología de Venezuela (FONACIT) (**Briceño et al., 2002**).

III.5. Recolección de las muestras.

III.5.1. Exudado faríngeo, lavado nasofaríngeo

A los pacientes incluidos en este estudio se les tomó por duplicado, muestras de exudado faríngeo (EF) o LNF en medios especiales para detectar la presencia de algún agente microbiológico.

Una de las muestras recolectadas fueron colocadas una en un tubo con medio de transporte para estudio virológico (Hanks suplementado con suero fetal bovino), la cual se preservó a -70°C hasta su procesamiento (Valdés et al., 2003); y la otra muestra, se colocó en medio de transporte de Cary and Blair para el análisis bacteriológico (Cantoni et al., 2004), el cual se realizó de forma inmediata a la toma de la muestra.

III.5.2. Muestras de sangre periférica

Simultáneamente a la toma de las muestras respiratorias, luego de ayuno nocturno (mínimo de 8 horas) y bajo condiciones de asepsia, a cada individuo se le tomó muestra de sangre venosa periférica, mediante venipuntura, constituida por 4 ml de sangre (sin anticoagulante) a partir de la cual se obtuvo el suero para la determinación de la citoquinas. Una vez separado el suero, las muestras fueron alicuotadas y almacenadas a -70°C , hasta el momento de su procesamiento.

III.6. Procedimientos experimentales.

III.6.1. Análisis virológico.

Las muestras de LNF y EF se trataron previamente con una mezcla de antibiótico/antimicótico (1000 U/ml de penicilina, 500µg/ml de estreptomycin y 4µg/ml de anfotericina B). Posteriormente, se centrifugaron en frío durante 15 min a 1500 xg. El sobrenadante fue utilizado para el análisis viral en cultivo celular (Valero et al., 2005).

III.6.1.1. Aislamiento viral e identificación por Inmunofluorescencia directa en cultivo de células HEP-2

Para el aislamiento e identificación viral se inocularon por duplicado 200µl de sobrenadante de las muestras obtenidas después de la sonicación, en cultivos de células HEP-2 (línea celular de carcinoma laríngeo humano-protocolo 520-I) procedentes del INH (Instituto Nacional de Higiene). Estos cultivos permiten el crecimiento de virus respiratorios, y se utiliza preferentemente esta línea celular debido a su alta sensibilidad (Muñoz et al., 2008; Falsey et al., 2002). Después de una hora de adsorción, se agregaron 300µl de medio de cultivo MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y con antibiótico-antimicótico a las concentraciones descritas. Los cultivos se colocaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Cuando el efecto citopático fue evidente (96 – 120 horas), se retiró el sobrenadante del cultivo y se tomaron las células para la identificación viral. El sobrenadante se guardó a -70°C para pases sucesivos. Se utilizaron dos controles internos en cada placa, uno positivo (cepas de VSR, parainfluenza, influenza y adenovirus conocidas), y el negativo que sólo contenía medio de cultivo MEM, para la comparación de cambios morfológicos.

La detección e identificación de cada uno de los virus se hizo por la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD). Se investigó la presencia de VSR, adenovirus,

parainfluenza 1, 2 y 3 e influenza A y B (Light Diagnostics™ SimulFluor® Respiratory Screen Kit, Chemicon Internacional Temecula, CA. USA). Este kit contiene dos componentes los cuales se unieron al antígeno vírico apropiado en la muestra. El componente primario conjugado con isotiocianato de fluoresceína se unió a las células infectadas por adenovirus, influenza A, influenza B y parainfluenza 1, 2 y 3 mostrando una fluorescencia color verde manzana brillante y el secundario conjugado con rodamina, se unió al VSR coloreando las células de amarillo oro, permitiendo la discriminación del VSR de otros virus respiratorios. Las células no infectadas se observaron de color rojo pálido debido a la presencia del colorante azul de Evans como contraste.

La visualización exhaustiva del patrón de cambios morfológicos se realizó según las siguientes especificaciones:

- *VSR*: La fluorescencia es amarillo dorado, citoplasmática y asociada a sincitios. La tinción citoplasmática es a menudo punteada con inclusiones pequeñas.
- *Adenovirus*: La fluorescencia es verde manzana brillante, nuclear, citoplasmática o ambas. La tinción nuclear es uniformemente brillante, la citoplasmática es a menudo punteada.
- *Parainfluenza 1, 2 y 3*: La fluorescencia es verde manzana brillante, confinada al citoplasma, es a menudo punteada con inclusiones irregulares finas.
- *Influenza A y B*: La fluorescencia es verde manzana brillante, nuclear, citoplasmática o ambas. La tinción nuclear es uniformemente brillante, la citoplasmática es a menudo punteada con inclusiones grandes.

Se determinó una reacción de tinción positiva para cualquiera de los virus por la presencia de al menos 2 células intactas que presentaron fluorescencia específica. Un resultado negativo estuvo indicado por la ausencia de fluorescencia en un muestreo mínimo de 20 células epiteliales. Se utilizó para la visualización de las células fluorescentes un microscopio invertido con un sistema de epifluorescencia (Zeiss modelo 872E, Alemania).

El kit con el cual se realizaron las determinaciones, incluyeron 2 láminas control, uno positivo que contenía células epiteliales humanas infectada con cada virus y un control negativo de células epiteliales humanas, ambos fijados con acetona (Light Diagnostics™ Simulfluor® Respiratory Screen Kit, CHEMICON Internacional, USA). Esta técnica es muy sensible (97,8%) específica y rápida para la determinación simultánea de los virus respiratorios (Marie y Ferguson, 2000).

El procedimiento fue el siguiente:

1. Se fijaron las suspensiones celulares con acetona fría (4°C) durante 5 minutos y fueron almacenadas por no más de una semana a – 20°C.
2. Se descongelaron y se permitió tomar temperatura ambiente a todos los portaobjetos con las muestras y a los reactivos.
3. Se agregaron 50 µl del anticuerpo monoclonal (DFA reagent). Posteriormente, se incubaron por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
4. Luego se procedió a realizar un lavado de la muestra usando PBS-tween 20. Se dejó secar y se agregó el líquido de montaje, para proceder a examinar las muestras utilizando un microscopio de inmunofluorescencia (Carl Zeiss, Alemania) con objetivo de 40x con filtro azul (450 y 490 nm).

III.6.2. Cultivo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

Con el fin de analizar el efecto inmunomodulador de los agentes etiológicos virales identificados en los pacientes, se midió el efecto de la inoculación viral sobre

la producción *in vitro* de citoquinas por células mononucleares de sujetos normales cultivadas.

Para ello, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica y se midieron las concentraciones de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF α), citoquinas de la subpoblación Th2 (IL-4 e IL-5), y quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) producidas por estas células, cuando fueron infectadas por VSR, parainfluenza y adenovirus aislados de los pacientes.

Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron a partir de la sangre completa de donantes voluntarios aparentemente sanos. Para ello se utilizó centrifugación diferencial y formación de gradientes de densidad sobre una solución de Histopaque 1077[®] (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Boyum 1968; Katial et al., 1998).

Se verificó la viabilidad celular con la coloración supravital de azul tripán y se ajustó la concentración a 2×10^6 cel/ml. Las células mononucleares se resuspendieron en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino y con antibiótico-antimicótico a las concentraciones anteriormente descritas. Las muestras de suspensión celular se sembraron en platos de cultivo de veinticuatro pozos de fondo plano con un diámetro de 16 mm y se incubaron por 3 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, para permitir la adherencia de los monocitos al fondo de la placa.

Las células no adherentes fueron removidas por lavados con medio de cultivo. Se estimó una población de monocitos de aproximadamente 3×10^5 cel/pozo (Peña et al., 2007), los cuales fueron infectados con 4×10^4 Unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml) de VSR, parainfluenza, influenza y adenovirus aislados en células HEP-2 (Arnold, 2005) Esta fue calculada para producir una multiplicidad de infección de 1 (MOI:1), asumiendo que todas las células del cultivo podrían ser blanco para los virus mencionados. En el sobrenadante de estos cultivos de monocitos se

determinaron IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-5, IL-8, RANTES y MCP-1 a las 24 horas de post infección (pi).

Utilizando la técnica de IFD descrita anteriormente se confirmó la infección viral de los monocitos.

III.6.3. Determinación de proteínas.

La determinación de las proteínas por el método de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*), basado en la unión del colorante Comassie Blue G-250 a las proteínas. Las proteínas fueron medidas en los monocitos que quedaron adheridos en el fondo de la placa, los cuales fueron sometidos a un proceso de sonicación. El cálculo de la concentración se determinó a través de una curva de regresión lineal de densidad óptica vs concentración que se obtuvo con estándares de concentraciones conocidas de albúmina y que se incluyeron simultáneamente al procesamiento de las muestras. Los resultados se leyeron a 595 nm y fueron expresados en mg.

III.6.4. Análisis bacteriológico.

Para el diagnóstico de bacterias presentes en el LNF y EF las muestras se cultivaron en agar McConkey, agar sangre carnero con kanamicina y agar Gelosa Chocolate (GC). Se incubaron de 14 a 48 horas a 37°C en condiciones aeróbicas, microaerobias y anaeróbicas. Las especies bacterianas fueron identificadas según técnicas bacteriológicas convencionales (Koneman et al., 1999, Finegold et al., 1998).

III.6.5. Cuantificación de citoquinas: IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-5, IL-8, MCP-1 y RANTES.

La concentración de las citoquinas (IL-4, IL-5, TNF α , IL-1 β , IL-8, MCP-1 y RANTES), fueron determinadas por triplicado en el suero de 39 de los pacientes (por razones de disponibilidad de reactivos), así como en el sobrenadante de los cultivos de monocitos, utilizando la técnica de Inmunoensayo enzimático (ELISA) proporcionada por diferentes casas comerciales: TNF α , IL-4 e IL-5 (DIACLONE, Fleming, Francia), IL-1 β , RANTES (ALPCO Diagnostics, New York, USA), IL-8 (R & D System Minneapolis, USA), y MCP-1 (Endogen[®], Chicago, USA).

La técnica consistió en un ensayo cuantitativo de ELISA tipo sándwich, en la cual se hizo reaccionar la muestra con un anticuerpo monoclonal de captura fijado a una fase sólida, específico para la citoquina, sobre la cual se adicionó un anticuerpo monoclonal secundario biotinilado contra la citoquina. Luego de un periodo de incubación y posterior a una fase de lavado, se le agregó un complejo streptavidina-peroxidasa que se unió al anticuerpo biotinilado. Posterior al periodo de incubación y lavado, se agregó un sustrato de tetrametilbencidina (TMB). La reacción enzima-sustrato se evidenció por el desarrollo de un color cuya intensidad fue directamente proporcional a la concentración de la citoquina presente en la muestra. El cálculo de la concentración se determinó a través de una curva de regresión lineal de densidad óptica vs. Concentración que se obtuvo con estándares de concentraciones conocidas y que se incluyeron simultáneo al procesamiento de las muestras. Los resultados se leyeron a 450 nm y fueron expresados en pg/ml para suero y pg/mg de proteína en cultivos de mononucleares.

III.6.6. Análisis de rutina y pruebas adicionales.

Frotis de sangre periférica para fórmula leucocitaria y recuento leucocitario. Examen de heces para determinar parasitosis en aquellos pacientes que presentaron eosinofilia sanguínea.

Espirometría para suficiencia respiratoria y Rx de tórax (en caso de infecciones del tracto respiratorio inferior). En algunos casos se realizó Rx de senos paranasales.

Se determinaron concentraciones séricas de IgE total (para discriminar entre los pacientes atópicos y no atópicos, conjuntamente con la eosinofilia, historia familiar y examen físico del paciente). Para este ensayo se utilizó el método de ELISA tipo sándwich (CALBIOTECH INC. CBI. Spring, C.A). Las muestras de suero fueron colocadas en pozos recubiertos con anticuerpo de captura (anti-IgE). La IgE presente en el suero de los pacientes queda adherida al anticuerpo. Luego de la incubación a 37°C, se lavaron, y se añadió el conjugado anti-IgE HRP (conjugado con *horseradish peroxidase*). Luego se adicionó el substrato, desarrollándose un color cuya intensidad es proporcional a la concentración de IgE en las muestras. Éstas fueron leídas a 450 nm. Por medio de una curva estándar se obtuvo la concentración en UI/ml.

Se realizarán exámenes especiales para determinar concentraciones séricas de anti IgG contra bacterias atípicas *Legionella pneumophilla*, *Coxiella burnetti*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*. La determinación de IgG se realizó por Inmunofluorescencia Indirecta, la misma se basó en la reacción de anticuerpos IgG anti-bacterianos que se unen a antígenos que se encuentran en la superficie del potaobjetos, las inmunoglobulinas no unidas son eliminadas en el proceso de lavado. El complejo antígeno-anticuerpo es revelado mediante una anti-IgG humana marcada con isotiocianato de fluoresceína. La reacción positiva se evidenció mediante un color verda manzana nuclear y

citoplasmático de un 20 a 25% de las células, mientras que una reacción negativa, las células se observaron de color rojo (Pneumoslide IgG, VIRCELL, SL, Granda, España).

III.7. Análisis estadístico.

Los datos cuantitativos para citoquinas fueron expresados como promedio \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm DS$), y se ordenaron y analizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5,0 (San Diego, CA. USA). Las diferencias entre los diferentes grupos fueron determinadas por Análisis de Varianza (ANOVA) utilizando la post-prueba de Bonferroni's. Las variables cualitativas fueron expresadas en porcentaje (%) y valores absolutos, y analizadas por Ji^2 utilizando un test exacto de Fisher's para la asociación. Para establecer correlación entre variables, se realizó análisis de correlación de Pearson's. Se utilizó un coeficiente de confianza de 95%, y se consideró una $p < 0,05$ como estadísticamente significativa.

IV. RESULTADOS

De todos los pacientes (n=161) que acudieron a las diferentes consultas por presentar síntomas sugestivos de IRA's, sólo 43 pacientes (27%) cumplieron con los criterios de IRA, los de inclusión y no presentaban alguno de los de exclusión exigidos en el presente trabajo. Así, fue sobre la base de estos 43 pacientes que se realizó el diagnóstico viral/bacteriológico y el perfil de citoquinas que sirvió para evaluar la respuesta inmunológica-inflamatoria en pacientes asmáticos con IRA.

IV.1. Formas clínicas de IRA, agente etiológico y asma en los pacientes evaluados.

IV.1.1. Frecuencia de IRA's o formas clínicas de la infección.

La forma clínica de la IRA más frecuente encontrada en los pacientes evaluados, fue la neumonía con el 46,51% (20/43), seguida de bronquitis con un 32,56% (14/43); el resto de los casos denominados como "otros", estuvo constituido por: amigdalitis, laringotraqueitis, faringitis y rinitis constituyeron el 20,93% (9/43) (**Figura 1**).

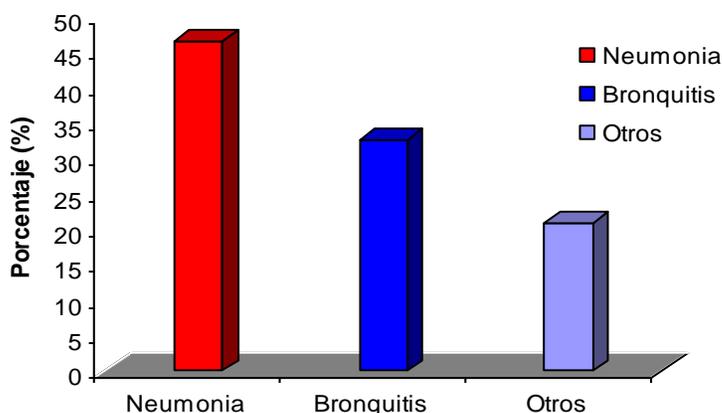


Figura 1. Frecuencia de IRA's en pacientes asmáticos y no asmáticos (neumonía n=20, bronquitis n=14, otros n=9) (n=43)

IV.1.2. Frecuencia de agentes etiológicos

Los agentes etiológicos responsables de las IRA's en nuestro estudio fueron clasificados como: infecciones virales, bacterianas y mixtas (infección viral más bacteriana). Los agentes etiológicos aislados con mayor frecuencia fueron los virus, los cuales constituyeron el 53,49% del total de agentes infecciosos (23/43), seguido por las infecciones mixtas con 27,91% (12/43); y el último lugar fue ocupado por las infecciones bacterianas (18,60%; 8/43) (**Figura 2**).

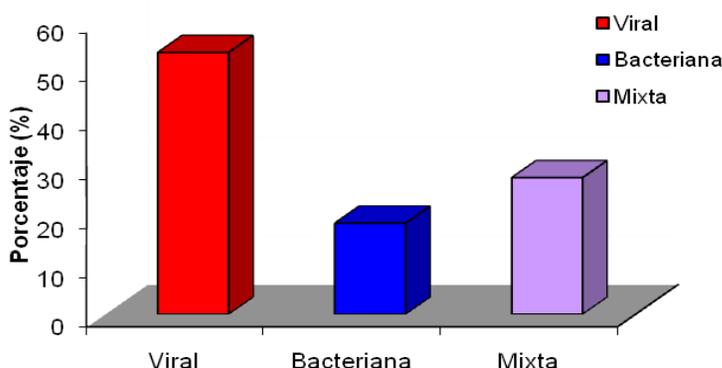


Figura 2. Frecuencia de IRA's según agente etiológico (viral n=23, bacteriano n=8, mixto n=12) (n=43)

IV.1.2.1. Frecuencia de agentes virales en las muestras de los pacientes evaluados

Los virus identificados en las muestras de los pacientes fueron: VSR, parainfluenza, adenovirus e influenza. Debido al pequeño número de muestras utilizadas para el presente estudio, se calculó el porcentaje ocupado por cada virus tomando en conjunto los virus involucrados tanto en la infección viral pura como en las coinfecciones; es decir, que se tomó para este cálculo el 81,4% (35/43). Se objetivó que el VSR constituyó el 37,21% (16/43), seguido por adenovirus con

23,26% (10/43), parainfluenza con 18,60% (8/43); y por último, el virus de la influenza con apenas 1 caso representando el 2,33% (**Figura 3**).

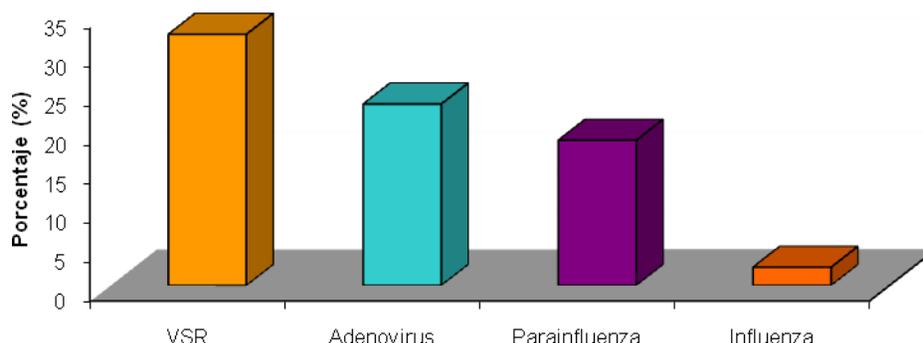


Figura 3. Porcentaje de agentes virales en el grupo total de pacientes tanto asmáticos como no asmáticos con IRA's virales y mixtas (n=43)

IV.1.2.2. Frecuencia de infecciones bacterianas en las muestras de los pacientes evaluados

También se calculó el porcentaje de agentes bacterianos aislados tanto en las infecciones bacterianas como en las mixtas; es decir, en el 46,54% (20/43) de los pacientes. Los agentes bacterianos aislados más frecuentemente fueron *Streptococcus pneumoniae* (20,93%; 9/43), *Escherichia coli* (6,98%; 3/43); *Klebsiella pneumoniae* (4,65%; 2/43); *Pseudomona aeruginosa* (2,33%; 1/43), *Staphylococcus aureus* (2,33%; 1/43), *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A (2,33%; 1/43), *Serratia marcenses* (2,33%; 1/43), bacteria no fermentadora de la glucosa (2,33%; 1/43), y 1 caso de *Legionella pneumophila* (2,33%; 1/43).

IV.1.3. Agentes infecciosos según tipo de IRA

Al discriminar el tipo de agente causal en los pacientes con neumonía, bronquitis y otros, se objetivó que los pacientes con neumonía presentaron un mayor porcentaje 30,23% (13/43) de infección viral, seguido por un 11,63% (5/43) de infección mixta; y por último, 9,3% (4/43) con infección bacteriana. Los pacientes con bronquitis tuvieron el mismo porcentaje de infección viral y mixta; es decir, 11,63% (5/43) para cada una, seguido por un 4,65% (2/43) de infecciones bacterianas. El grupo de pacientes clasificados como “otros” igual que los pacientes con neumonía, mostraron a las infecciones virales como principales agentes causales de este tipo de IRA con un 11,63% (5/43), seguido por infecciones bacterianas con un 4,65% (2/43), y por último las infecciones mixtas con un 2,33% (1/43) (**Figura 4**).

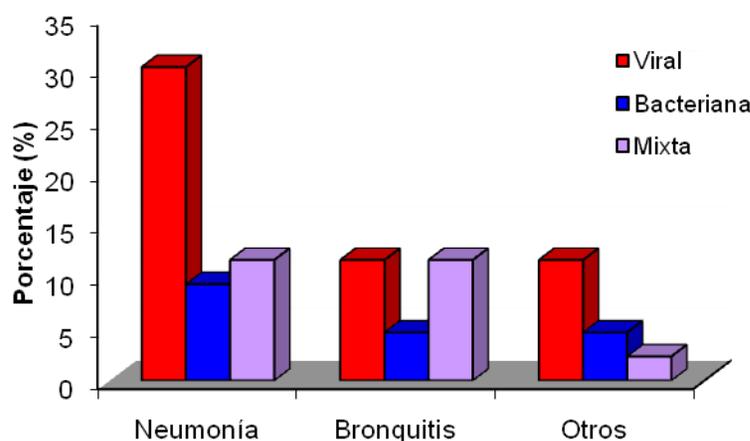


Figura 4. Porcentaje de pacientes con IRA's (neumonía, bronquitis y otros), según agente etiológico (n=43)

IV.1.3.1. Tipo de agente viral en pacientes con diferentes tipos de IRA's

En los pacientes con neumonía el VSR fue el virus aislado con mayor frecuencia con un 23,26% (10/43 casos), seguido por un parainfluenza con 18,60% (8/43), y adenovirus (2,3%; 1/43). En los pacientes con bronquitis el adenovirus fue

quien ocupó el primer lugar con un 16,28% (7/43), seguida por VSR (6,98%, 3/43). Por último, en los pacientes con las IRA's "otros" el VSR también ocupó el primer lugar de frecuencia con un 6,98% (3/43), seguido por adenovirus (4,65%, 2/43) y virus de la influenza (2,33%, 1/43).

IV.1.3.2. Agentes bacterianos en pacientes con diferentes tipos de IRA's

Los pacientes con neumonía presentaron una distribución de microorganismos bacterianos como se indica a continuación: *Streptococcus pneumoniae* (3/43; 6,98%), *Escherichia coli* (2/43, 4,65%), *Klebsiella pneumoniae* (2/43; 4,65%), *Streptococcus* beta hemolíticos (1/43, 2,33%), *Serratia marcescens* (1/43; 2,33%), bacterias no fermentadoras de la glucosa (1/43; 2,33%). En los pacientes con bronquitis el *Streptococcus pneumoniae* también ocupó el primer lugar (6/43; 13,95%), seguido por *Legionella* (1/43; 2,33%). En el grupo de pacientes con la IRA clasificada como "otros" se aislaron pocos agentes, y entre ellos se describen a la *Pseudomona aeruginosa* (1/43; 2,33%), *Escherichia coli* (1/43; 2,33%) y *Staphylococcus aureus* (1/43; 2,33%).

IV.1.4. Porcentaje de pacientes asmáticos y no asmáticos.

En los 43 pacientes evaluados se encontró que el 67,44% (29/43 casos) estuvo constituido por no asmáticos, mientras que el 32,56% (14/43 casos) presentaron asma al momento del estudio y/o historia de padecer esta enfermedad (**Figura 5**).

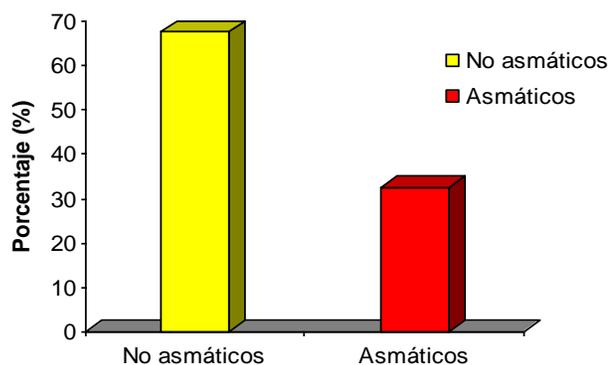


Figura 5. Frecuencia de pacientes con IRA no asmáticos (n=29) y asmáticos (n=14)

IV.1.4.1. Distribución de IRA's según condición de asmáticos.

En los tres grupos de pacientes con IRA tipo neumonía, bronquitis y otros, el mayor porcentaje de casos estuvo constituido por pacientes no asmáticos (**Figura 6**).

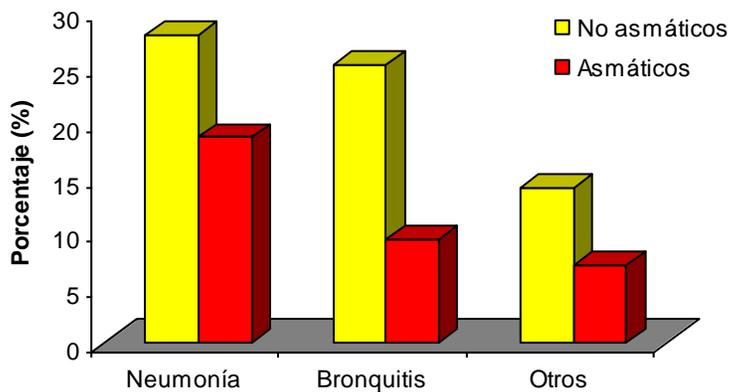


Figura 6. Frecuencia de asma en pacientes con IRA's (neumonía n=20, bronquitis n=14, otros n=9) (n=43)

Los pacientes no asmáticos con neumonía representaron el 27,90% (12/43), con bronquitis el 25,26% (10/43) y los otros tipos de IRA constituyeron el 13,95% (6/43); mientras que los pacientes asmáticos con neumonía representaron el 18,60% (8/43), con bronquitis el 9,3% (4/43) y con otras infecciones el 6,96% (3/43). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre pacientes asmáticos y no asmáticos con neumonía o bronquitis.

Sin embargo, el análisis estadístico realizado para visualizar si existían diferencias entre los tipos de IRA's dentro de cada grupo de los pacientes que presentaban o no asma; se objetivó que en el grupo de no asmáticos solamente hubo diferencias significativas ($p < 0,01$), igual diferencia estadística se observó entre los pacientes con neumonía y "otros" (**Figura 7**).

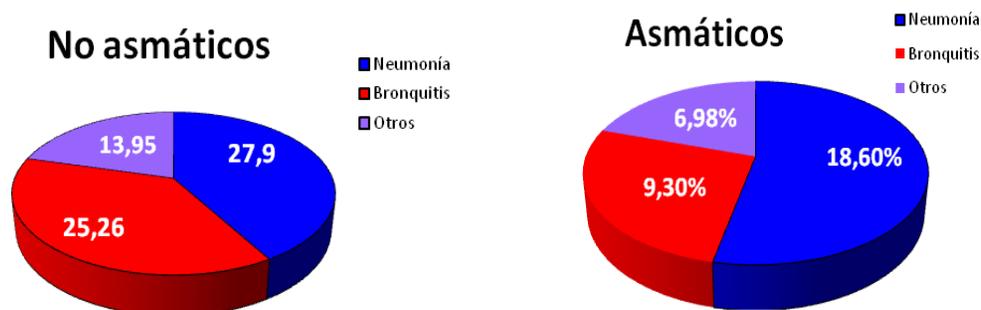


Figura 7. Frecuencia de tipo de IRA's en pacientes asmáticos (neumonía n=8, bronquitis n=4, otros n=3), y no asmáticos (neumonía n=12, bronquitis n=10, otros n=6) (n=43)

IV.1.4.2. Tipo de agente etiológico en pacientes asmáticos y no asmáticos.

Cuando se evaluó la frecuencia de asma en cada uno de los grupos de pacientes atendiendo al tipo de infección que presentaron, se observó que en los pacientes con infección bacteriana el grupo de asmáticos es más alta que los no asmáticos (11,63%, 5/43 vs 6,97%; 3/43). Los pacientes con infección viral

presentaron mayor frecuencia ($p < 0,0001$) de pacientes no asmáticos (41,86%; 18/43) que asmáticos (11,63%; 5/43), en los pacientes con infección mixta el porcentaje de no asmáticos fue de 18,60% (8/43) y el de asmáticos 9,3% (4/43) (**Figura 8**).

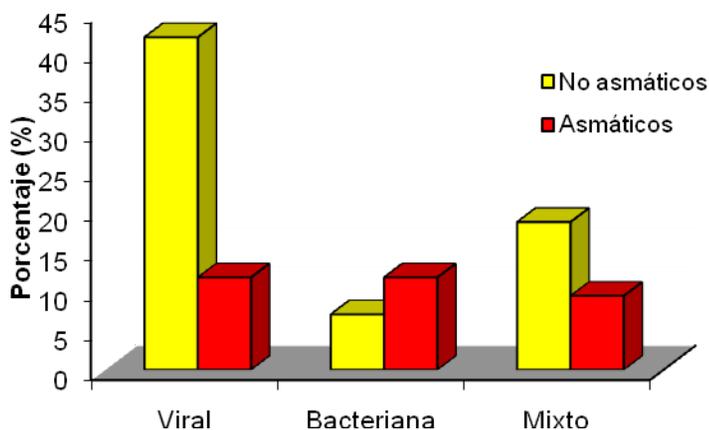


Figura 8. Porcentaje de pacientes con infección viral, bacteriana o mixta según su condición de asmáticos (n=43)

IV.1.4.2.1. Agentes virales según condición de asmáticos

La frecuencia de agentes virales considerando la condición de asmáticos identificados en las muestras de pacientes **con infección viral y mixta** (81,4%, n=35) estuvo constituido por un 23,26% (10/43) VSR; 20,93% (9/43) adenovirus, 13,95% (6/43) parainfluenza y 2,33% (1/43) virus de la influenza en pacientes no asmáticos. Y 13,95% (6/43) VSR; 4,65% (2/43) de parainfluenza y 2,33% (1/43) adenovirus en pacientes asmáticos.

IV.1.4.2.2. Agentes bacterianos según condición de asmáticos

Discriminando el tipo de infección bacteriana entre pacientes asmáticos y no asmáticos conseguimos que en esta misma población los pacientes asmáticos presentaron: 6,98% (3/43) casos con *Streptococcus pneumoniae*, 4,65% (2/43) casos de *Klebsiella pneumoniae*; y el resto fueron casos de *Pseudomona aeruginosa* (2,33%, 1/43), *Escherichia coli* (1/43; 2,33%), Bacterias no fermentadoras de la glucosa (2,33%, 1/43) y *Legionella pneumophila* (2,33%, 1/43). En la población de no asmáticos se encontraron 13,95% de *Streptococcus pneumoniae* (6/43); *Escherichia coli* (2/43; 4,65%), y el resto fueron casos únicos de *Serratia marcescens* (2,33%, 1/43); 1 caso de bacteria no fermentadora de la glucosa (2,33%, 1/43) y *Staphylococcus aureus* (2,33%, 1/43).

IV.2. Perfil de citoquinas en pacientes asmáticos y no asmáticos con IRA de etiología viral y/o bacteriana.

Debido a razones de índole económica atribuidas principalmente a la disponibilidad de reactivos en el laboratorio, no pudo efectuarse la cuantificación de citoquinas en el suero de todos los pacientes incluidos en el estudio. Dada la menor representación relativa de los pacientes asmáticos, se incluyeron a los 14 que presentaban este criterio de estratificación, y de los 29 restantes, se excluyeron 4 al azar. Además, se incluyeron para el ensayo, a 10 controles sanos (n=49).

En el presente estudio, se evaluaron en los pacientes los niveles circulantes de IL-1 β y TNF α como representantes de las denominadas citoquinas proinflamatorias; las citoquinas IL-4 e IL-5 del patrón Th2; y a las quimioquinas IL-8, MCP-1 y RANTES, implicadas en la regulación de la infiltración leucocitaria tisular inflamatoria. Se estudió esta respuesta sistémica a la infección respiratoria considerando el

agente etiológico implicado, la presencia o no de asma en los pacientes evaluados y el tipo de IRA que presentaron los pacientes.

IV.2.1. Concentración sérica de citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α .

IV.2.1.1. Citoquinas proinflamatorias según tipo de IRA

Las cifras circulantes de IL-1 β y TNF α fueron diferentes entre los pacientes con diferentes tipos de IRA cuando fueron comparados con el grupo control sano; pero no hubo diferencias significativas entre las concentraciones séricas de estas dos citoquinas entre los pacientes con neumonía, bronquitis y otros. Así, se objetivó una concentración sérica de IL-1 β (neumonía: $16,88 \pm 4,17$ pg/ml; bronquitis: $16,28 \pm 3,77$ pg/ml, y otros: $17,05 \pm 3,09$ pg/ml) y TNF α (neumonía: $78,67 \pm 22,26$ pg/ml; bronquitis: $92,78 \pm 25,34$ pg/ml, y otros: $75,91 \pm 26,51$ pg/ml) superior ($p < 0,05$) a la de la población control (IL-1 β : $9,49 \pm 0,72$ pg/ml; y TNF α : $26,26 \pm 3,01$) (**Figura 9**).

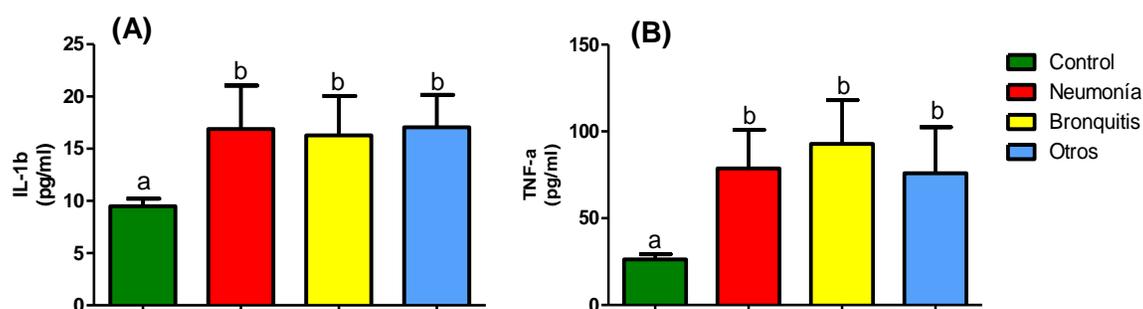


Figura 9. Variación en la concentración sérica de IL-1 β (A) y TNF α (B) según IRA's (neumonía: n=17, bronquitis: n=14 y otros: n=8). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.1.2. Citoquinas proinflamatorias según el agente microbiano

Los niveles séricos de IL-1 β y TNF α fueron diferentes entre los pacientes con IRA dependiendo del agente causal.

Se objetivó que los enfermos con infección viral ($17,02 \pm 3,14$ pg/ml) y mixta ($19,02 \pm 4,15$ pg/ml) presentaban niveles circulantes de IL-1 β significativamente superiores a los encontrados en los que padecían infección bacteriana ($13,29 \pm 2,48$ pg/ml) y en los controles sanos ($9,49 \pm 0,72$ pg/ml). No existieron diferencias significativas entre las cifras circulantes de esta citoquina en pacientes con infección viral y mixta, ni entre los que padecían infección bacteriana y controles (**Figura 10A**).

En relación a las cifras circulantes de TNF α , se observó que los tres grupos de pacientes tenían concentraciones de esta citoquina significativamente superiores a los de los controles sanos ($26,26 \pm 3,01$ pg/ml). En los enfermos con infección viral ($88,42 \pm 17,83$ pg/ml) o mixta ($98,09 \pm 19,46$ pg/ml), las cifras circulantes alcanzadas por el TNF α fueron significativamente mayores que las encontradas en los enfermos con infección bacteriana ($52,96 \pm 20,13$ pg/ml) (**Figura 10B**).

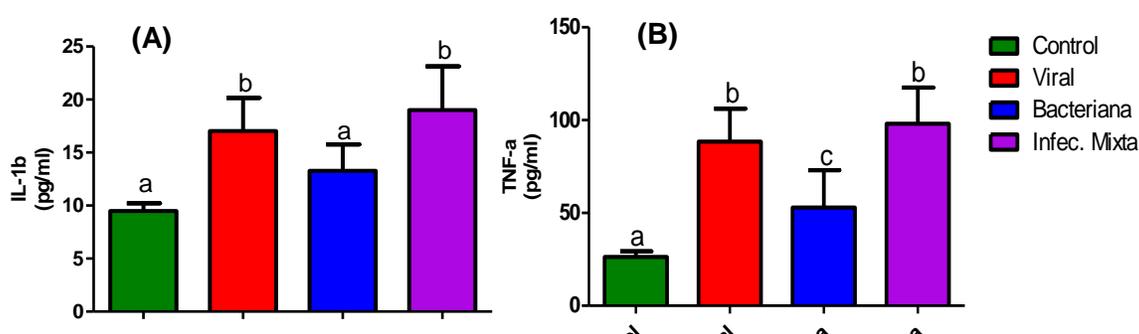


Figura 10. Variación en la concentración sérica de IL-1 β (A) y TNF α (B) en pacientes con IRA según infección: viral (n=21), bacteriana (n=8) y mixta (n=10). Control (n=10). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Para estudiar la posible inducción de diferentes niveles de citoquinas circulantes por la IRA provocada por distintos tipos de virus, se analizaron las cifras de IL-1 β y TNF α encontradas en pacientes con evidencia de infección por VSR, parainfluenza y adenovirus con independencia de la existencia o no de infección bacteriana concomitante. Así, se observó que, tanto el IL-1 β como el TNF α sufrieron un incremento sérico en los grupos de pacientes infectados con VSR (IL-1 β : 17,12 \pm 3,82 pg/ml; TNF α : 82,95 \pm 22,15 pg/ml), parainfluenza (L-1 β : 16,16 \pm 2,27 pg/ml; TNF α : 92,44 \pm 13,21 pg/ml) y adenovirus (L-1 β : 17,78 \pm 3,36 pg/ml; TNF α : 91,70 \pm 16,33 pg/ml) en la misma magnitud, cuando fueron comparados con sus respectivos grupos controles (IL-1 β : 9,49 \pm 0,72 pg/ml; TNF α : 26,26 \pm 3,01 pg/ml) (**Figura 11**).

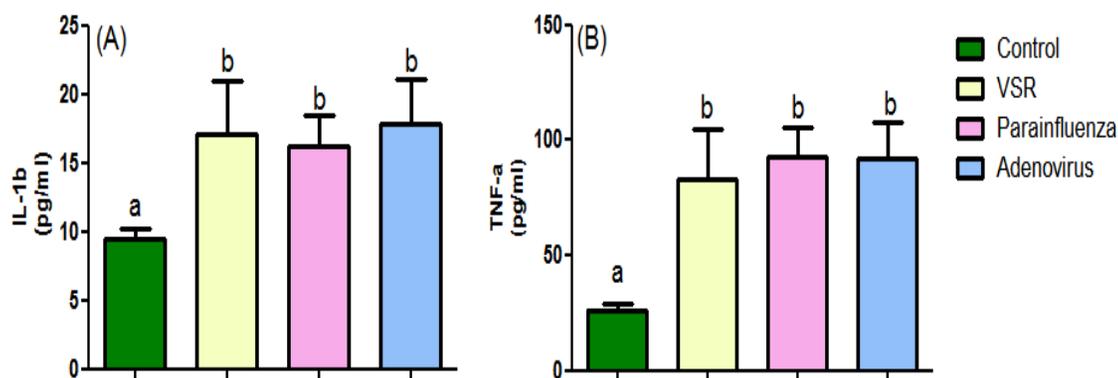


Figura 11. Variación en la concentración sérica de IL-1 β (A) y TNF α (B) en pacientes con IRA según el agente etiológico viral: VSR (n=14), parainfluenza (n=7) y adenovirus (n=9). Control (n=10). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

El virus de la influenza, apenas fue aislado en uno de los pacientes, por tanto no fue incluido en en el presente análisis.

IV.2.1.3. Tipo de agente microbiano según tipo de IRA (neumonía y bronquitis)

Pacientes con neumonía

Cuando se midió la concentración sérica de las citoquinas proinflamatorias en los pacientes con neumonía atendiendo al tipo de infección, se observó que la IL-1 β fue superior en los pacientes con infección viral ($16,37 \pm 1,04$ pg/ml) y mixta ($20,05 \pm 5,60$ pg/ml) comparada con el control ($9,49 \pm 0,72$ pg/ml). Se pueden apreciar diferencias significativas ($p < 0,05$) en la concentración de IL-1 β entre los pacientes con infección viral ($16,37 \pm 1,04$ pg/ml) vs bacteriana ($13,10 \pm 2,16$ pg/ml), y mixta ($20,05 \pm 5,60$ pg/ml) vs bacteriana (**Figura 12A**).

Por su parte, la concentración sérica del TNF α , fue superior ($p < 0,05$) a la del control ($26,26 \pm 3,01$ pg/ml) en los pacientes con infección viral ($81,69 \pm 17,53$ pg/ml), bacteriana ($58,06 \pm 19,40$ pg/ml) y mixta ($92,50 \pm 24,48$ pg/ml). La concentración de esta citoquina fue similar entre los pacientes con infección viral vs mixta, y entre viral vs bacteriana. Por su parte, similar a lo observado para IL-1 β , la concentración sérica de TNF α fue superior en los pacientes con infección mixta con respecto a la bacteriana (**Figura 12B**).

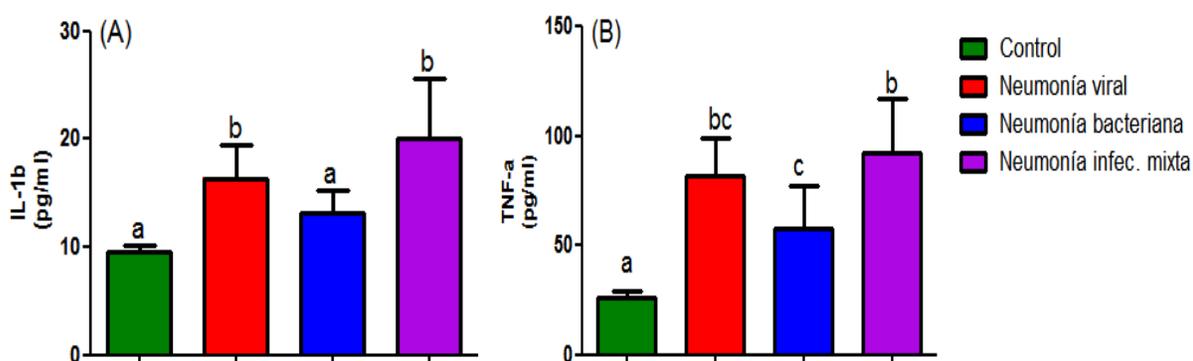


Figura 12. Variación en la concentración sérica de IL-1 β (A) y TNF α (B) en pacientes con neumonía según el tipo de agente infeccioso (viral: n=9, bacteriana: n=4, mixta: n=4). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Pacientes con bronquitis

El tipo de infección en los pacientes con **bronquitis** también provocó diferencias en los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias. Observamos la concentración de IL-1 β en los pacientes con infección viral ($17,38 \pm 3,42$ pg/ml) y mixta ($16,80 \pm 3,39$ pg/ml) fue superior ($p < 0,05$) a la del grupo control ($9,49 \pm 0,72$ pg/ml). No hubo diferencias en la concentración de esta citoquina entre los pacientes con infección viral vs bacteriana ($11,73 \pm 3,95$ pg/ml) o de estas con las infecciones mixtas (**Figura 13A**).

Los niveles de TNF α fueron superiores ($p < 0,05$) en los pacientes con infección viral ($99,76 \pm 9,88$ pg/ml) y mixta ($102,60 \pm 15,86$ pg/ml) con respecto al control ($26,26 \pm 3,01$ pg/ml). No hubo diferencias entre los pacientes con infección viral y mixta; pero si entre viral vs bacteriana ($47,34 \pm 36,15$ pg/ml) y entre mixta vs bacteriana; la concentración de TNF α fue más baja en los pacientes con infección bacteriana (**Figura 13B**).

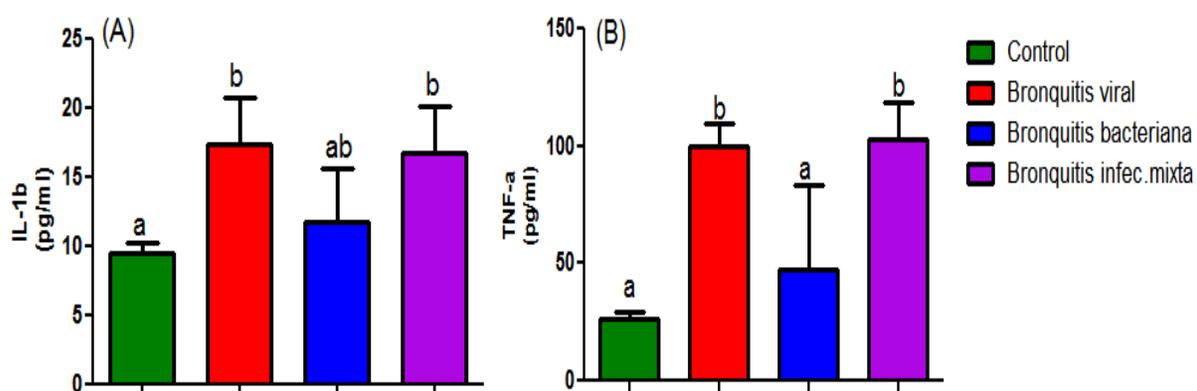


Figura 13. Variación en la concentración sérica de IL-1 β (A) y TNF α (B) en pacientes con bronquitis según el tipo de agente infeccioso (viral: n= 7; bacteriana: n= 2; mixta: n=5). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

No contamos con suficiente número de muestras para hacer este mismo análisis en los pacientes que presentaban el tipo de IRA denominada “otros”.

IV.2.1.4. Citoquinas proinflamatorias en pacientes asmáticos vs no asmáticos

Las concentraciones circulantes de IL-1 β y TNF α estuvieron incrementadas en relación al control (IL-1: $9,49 \pm 0,72$ pg/ml; TNF α : $26,26 \pm 3,02$ pg/ml) tanto en los pacientes asmáticos (IL-1 β : $17,02 \pm 4,14$ pg/ml; TNF α : $74,87 \pm 16,54$ pg/ml) como en los no asmáticos (IL-1 β : $17,51 \pm 6,05$ pg/ml; TNF α : $87,57 \pm 27,28$ pg/ml) ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre el grupo de pacientes asmáticos y no asmáticos (**Figura 14**).

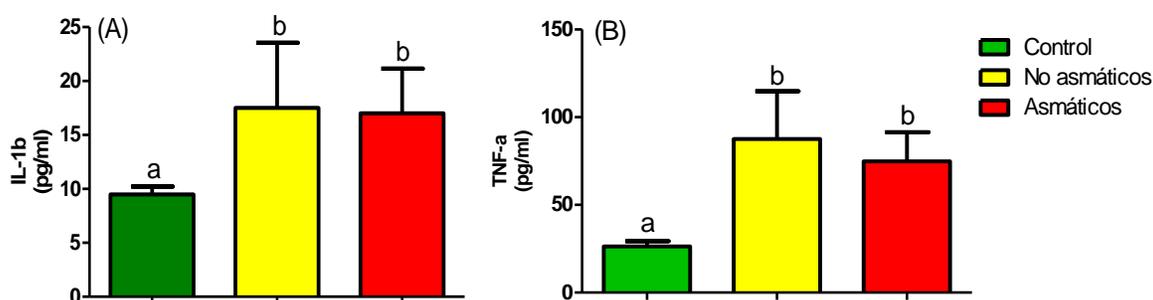


Figura 14. Variación en la concentración sérica de IL-1 β (A) y TNF α (B) en pacientes con IRA asmáticos (14) y no asmáticos (n=25). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.1.4.1. Citoquinas proinflamatorias en pacientes asmáticos vs no asmáticos según tipos de IRA (neumonía y bronquitis).

Pacientes con neumonía

Para determinar si existían diferencias en los niveles de citoquinas proinflamatorias se comparó la concentración sérica de IL-1 β y TNF α de los

pacientes asmáticos vs los no asmáticos. Se objetivó que el nivel de IL-1 β fue superior ($p < 0,05$) en los pacientes asmáticos ($17,17 \pm 3,81$ pg/ml) y no asmáticos ($16,60 \pm 4,67$ pg/ml) con en síndrome anátomo/clínico neumónico comparados con el control ($9,49 \pm 0,72$ pg/ml); y no hubo diferencias ($p > 0,05$) entre estos dos grupos (**Figura 15A**). Lo mismo se observó para la concentración de TNF α ; es decir, los pacientes asmáticos ($71,50 \pm 12,91$ pg/ml) y no asmáticos ($85,05 \pm 17,36$ pg/ml) con neumonía, exhibieron una concentración de TNF α circulante superior a la presentada por la población control ($26,26 \pm 3,01$ pg/ml), sin evidenciarse diferencias entre estos dos grupos de pacientes (**Figura 15B**).

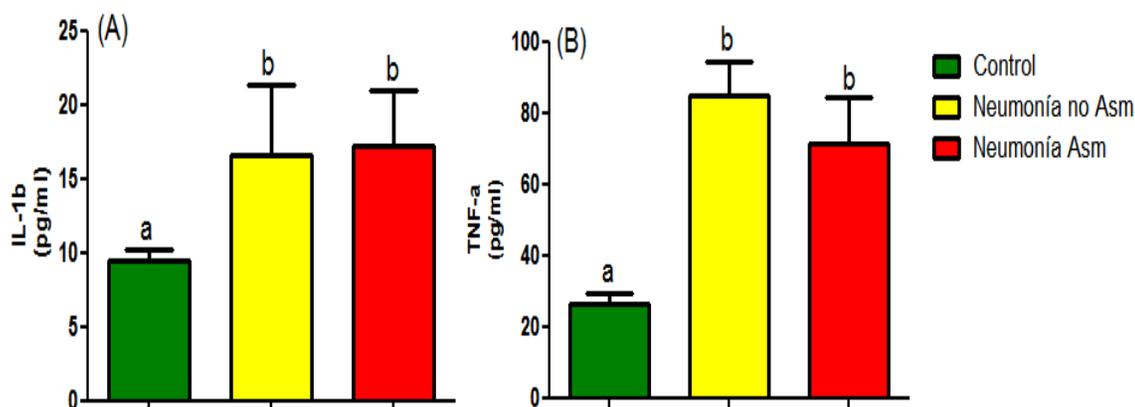


Figura 15. Variación en la concentración sérica de IL-1 β (A) y TNF α (B) en pacientes con neumonía según condición de asmáticos (asmáticos: n= 8; no asmáticos: n= 9). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Pacientes con bronquitis

En los pacientes con bronquitis también se objetivó que la concentración sérica de IL-1 β estuvo incrementada tanto los pacientes asmáticos ($15,92 \pm 6,09$ pg/ml) como no asmáticos ($16,60 \pm 3,38$ pg/ml) cuando fueron comparados con el grupo control sano ($9,49 \pm 0,72$ pg/ml), sin existir diferencias significativas entre estos dos

grupos (**Figura 16A**). Lo mismo observamos para $\text{TNF}\alpha$; es decir, tanto en los pacientes asmáticos ($92,85 \pm 18,34$ pg/ml) como no asmáticos ($100,60 \pm 13,38$ pg/ml) se encontraron niveles séricos aumentados de $\text{TNF}\alpha$ con respecto al control ($26,26 \pm 3,01$ pg/ml), pero no se observaron diferencias entre estos dos grupos de pacientes (**Figura 16B**).

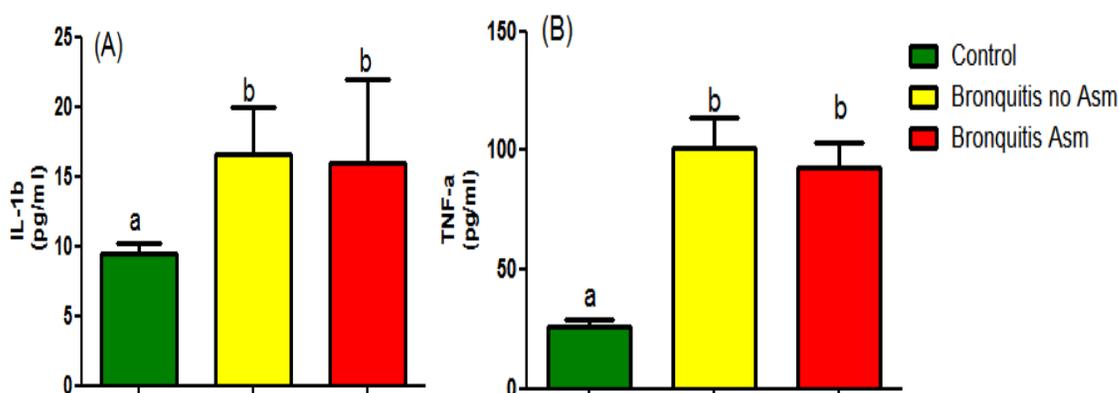


Figura 16. Variación en la concentración sérica de IL-1 β (A) y $\text{TNF}\alpha$ (B) en pacientes con bronquitis según condición de asmáticos (asmáticos: n=3; no asmáticos: n=11). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $\bar{X} \pm \text{DE}$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.1.4.2. Concentración de las citoquinas proinflamatorias en pacientes con asma y no asmáticos, según el tipo de agente causal.

Se quiso conocer como variaban las concentraciones de IL-1 β y $\text{TNF}\alpha$ en los grupos de pacientes asmáticos y no asmáticos estudiados, dependiendo del tipo de agente infeccioso causante del IRA.

IL-1 β en pacientes asmáticos vs no asmáticos según agente causal

Cualquiera fuera el tipo de agente infeccioso (viral, bacteriano y mixto), la concentración circulante de IL-1 β de los pacientes con asma y sin ella fue superior a la mostrada por el grupo control sano; sin objetivarse diferencias en la concentración de esta citoquina entre los tres tipos de agentes virales. Así, se encontró que en los pacientes no asmáticos con infección viral ($16,14 \pm 3,25$ pg/ml), bacteriana ($14,51 \pm 1,41$ pg/ml) o mixta ($16,18 \pm 3,24$ pg/ml), las concentraciones de dicha citoquina estuvieron incrementadas de forma significativa con respecto al control sano ($9,49 \pm 0,72$ pg/ml) (**Figura 17A**). Lo mismo se objetivó en el grupo de pacientes asmáticos; es decir, los pacientes con infección viral ($19,76 \pm 1,34$ pg/ml), bacteriana ($12,55 \pm 2,82$ pg/ml) y mixta ($19,86 \pm 1,51$ pg/ml) alcanzaron niveles circulantes de IL-1 β significativamente superiores al exhibido por la población control. Los pacientes con infección viral y mixta tuvieron niveles de IL-1 β superiores a los que presentaron infección bacteriana, en los cuales se observó una concentración inferior de IL-1 β (**Figura 17B**).

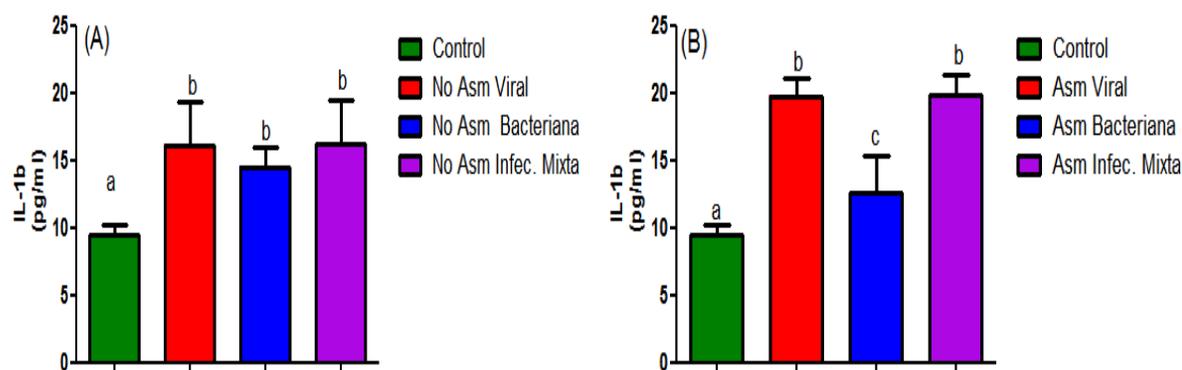


Figura 17. Variación en la concentración sérica de IL-1 β en pacientes no asmáticos (A) (virus: n=16; bacteria: n=3; mixto: n=6); y asmáticos (B) (viral: n=5; bacteriana: n= 5; mixta: n=4) con IRA según agente causal. Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

TNF α en pacientes asmáticos vs no asmáticos según agente causal

El patrón sérico observado para el TNF α fue similar al observado para IL-1 β . Tanto en pacientes asmáticos como en no asmáticos la presencia de cualquiera de los agentes etiológicos causó un incremento en la concentración de TNF α . En los pacientes no asmáticos con infección viral ($92,99 \pm 16,82$ pg/ml), bacteriana ($30,89 \pm 8,50$ pg/ml) o mixta ($104,2 \pm 17,61$ pg/ml), se encontraron concentraciones altas ($p < 0,05$) de dicha citoquina con respecto al control ($26,26 \pm 0,95$ pg/ml) (**Figura 18A**). Igualmente, el grupo de pacientes asmáticos con infección viral ($70,13 \pm 6,49$ pg/ml), bacteriana ($66,20 \pm 9,40$ pg/ml) y mixta ($90,45 \pm 21,35$ pg/ml) exhibieron una concentración incrementada ($p < 0,05$) de TNF α con respecto al grupo control (**Figura 18B**).

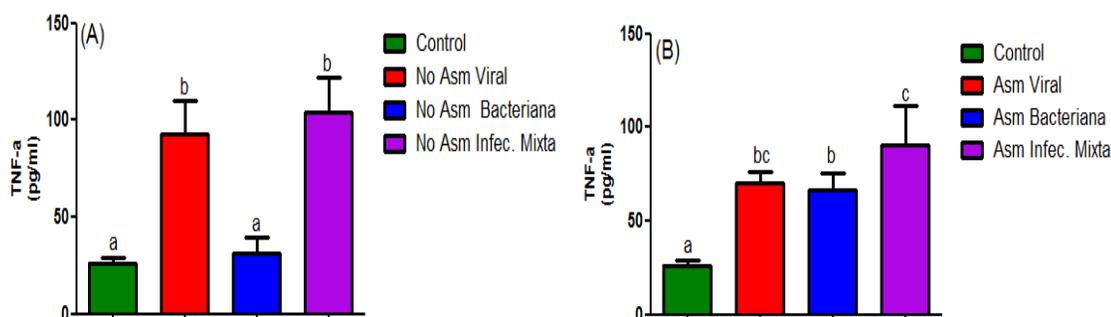


Figura 18. Variación en la concentración sérica de TNF α en pacientes no asmáticos (A) (virus n=16; bacteria n=3; mixto n=6); y asmáticos (B) (viral: n=5; bacteriana: n= 5; mixta: n=4) con IRA según agente causal. Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.1.4.3. Concentración de citoquinas proinflamatorias en pacientes con IRA viral, bacteriana y mixta según presencia o no de asma.

Para determinar si la presencia de asma en los pacientes variaba la concentración sérica de citoquinas proinflamatorias cuando los dichos pacientes

tuvieran infección viral, bacteriana o mixta, se realizó un análisis estadístico que permitió visualizar este efecto.

El grupo de pacientes con infección viral alcanzó altas concentraciones circulantes de IL-1 β y TNF α tanto cuando presentaban asma como cuando no. El nivel sérico de IL-1 β estuvo significativamente incrementado en los pacientes con asma ($19,76 \pm 1,34$ pg/ml) cuando fueron comparados con los no asmáticos ($16,29 \pm 3,09$ pg/ml), y en ambos grupos las concentraciones resultaron más altas ($p < 0,05$) que la del control ($9,49 \pm 0,72$ pg/ml) (**Figura 19A**).

Este mismo grupo de pacientes exhibió un incremento significativo en la concentración sérica de TNF α tanto en los pacientes asmáticos ($70,13 \pm 6,49$ pg/ml) como en no asmáticos ($92,99 \pm 16,82$ pg/ml) cuando fueron comparados con el grupo control sano ($26,26 \pm 3,09$ pg/ml). El nivel sérico de esta citoquina fue superior en la población no asmática que en la asmática (**Figura 19B**)

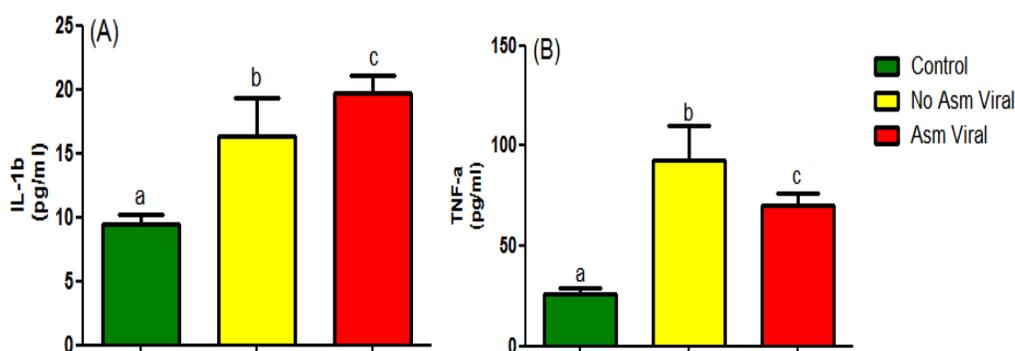


Figura 19. Variación en la concentración sérica de IL-1 β (A) y TNF α (B) en pacientes con IRA viral según su condición de asmáticos (n=5) y no asmáticos (n=16). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En los pacientes con IRA de etiología bacteriana, el nivel circulante de IL-1 β estuvo aumentado ($p < 0,05$) con relación al grupo control ($9,49 \pm 0,72$ pg/ml) tanto en

los pacientes asmáticos ($12,55 \pm 2,82$ pg/ml) como en los no asmáticos ($14,51 \pm 1,41$ pg/ml), sin observarse diferencias significativas entre estos dos grupos (**Figura 20A**).

En este mismo grupo de pacientes, el nivel circulante de $\text{TNF}\alpha$ de los asmáticos ($66,20 \pm 9,40$ pg/ml), fue superior al del control ($26,26 \pm 3,09$ pg/ml) y al de la población de no asmáticos ($30,89 \pm 8,50$ pg/ml). La concentración sérica de esta citoquina en los no asmáticos no difirió a la observada para el grupo control (**Figura 20B**).

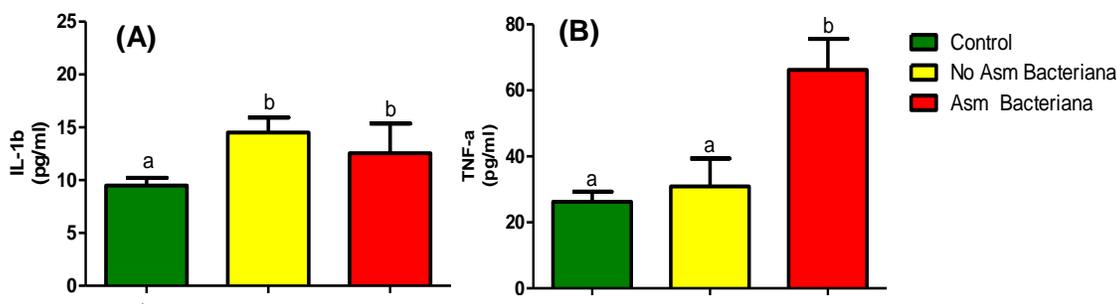


Figura 20. Variación en la concentración sérica de IL-1 β (A) y $\text{TNF}\alpha$ (B) en pacientes con IRA bacteriana según su condición de asmáticos (no asmáticos=3; asmáticos=5). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm \text{DE}$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

El grupo de pacientes con infección mixta, al igual que ocurrió con los que tenían infección viral, la concentración circulante de IL-1 β estuvo aumentada ($p < 0,05$) en relación al control ($9,49 \pm 0,72$ pg/ml) tanto en los pacientes asmáticos ($19,86 \pm 1,51$ pg/ml) como en el de no asmáticos ($18,35 \pm 5,56$ pg/ml), y no se observó diferencias entre asmáticos y no asmáticos (**Figura 21A**).

Lo mismo ocurrió con las concentraciones séricas de $\text{TNF}\alpha$; es decir, estuvieron incrementadas tanto en el grupo de asmáticos ($90,45 \pm 21,35$ pg/ml) como en el de

no asmáticos ($104,2 \pm 17,61$ pg/ml) cuando fueron cotejados con el control ($26,26 \pm 3,01$ pg/ml), y no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (**Figura 21B**).

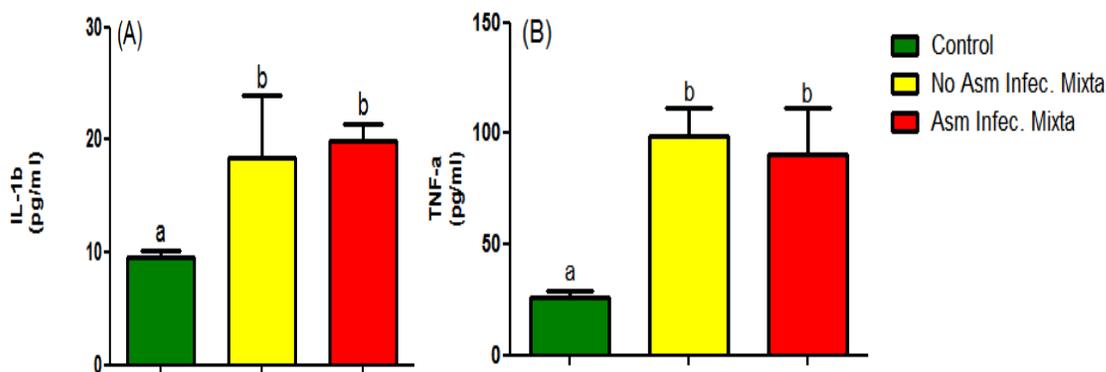


Figura 21. Variación en la concentración sérica de IL-1 β (A) y TNF α (B) en pacientes con IRA de etiología mixta según su condición de asmáticos (n de no asmáticos=6; n de asmáticos = 4). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.2. Concentración circulante de citoquinas Th2: IL-4 e IL-5.

IV.2.2.1. Concentración circulante de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5) según el tipo de IRA

Se realizó un análisis para comparar las variaciones de los niveles circulantes de citoquinas de la subpoblación Th2 según el tipo de IRA. Se observó que el padecimiento de algún tipo de IRA incrementó las concentraciones circulantes de IL-4 con respecto al control ($9,46 \pm 1,39$ pg/ml), observándose en la neumonía una concentración de $13,55 \pm 2,26$ pg/ml, en la bronquitis $13,78 \pm 2,98$ pg/ml; y, en los pacientes con entidades clínicas denominadas "otros" la concentración alcanzó $14,17 \pm 2,23$ pg/ml (**Figura 22A**).

Los niveles séricos de IL-5 en los pacientes con neumonía ($72,98 \pm 27,83$ pg/ml), bronquitis ($62,23 \pm 7,75$ pg/ml) y otros ($62,02 \pm 6,79$ pg/ml), también estuvieron incrementados con respecto al grupo control sano ($31,81 \pm 10,52$ pg/ml) (**Figura 22B**).

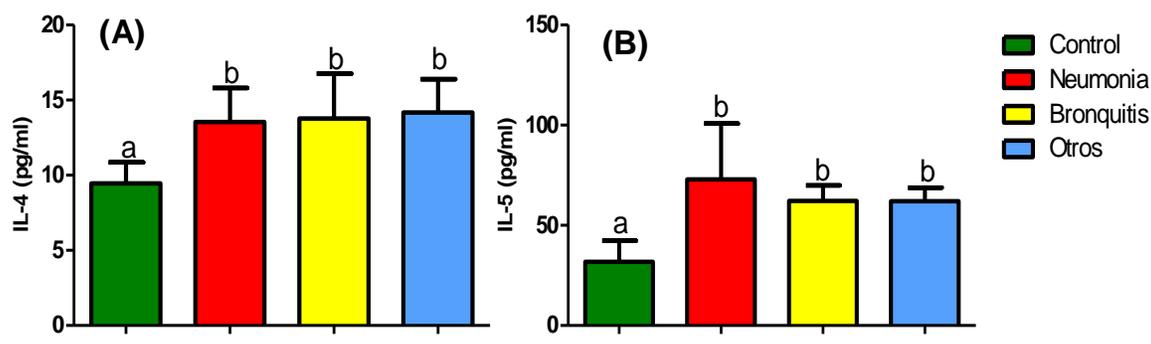


Figura 22. Variación en la concentración sérica de IL-4 (A) e IL-5 (B) en pacientes con diferentes tipos de IRA (neumonía: n=17, bronquitis: n=14 y otros: n=8). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.2.2. Citoquinas Th2 (IL-4, IL-5) y tipo de agente microbiano.

Para conocer variaciones en el patrón Th2 de citoquinas en la población estudiada, atendiendo al agente causal involucrado, se midieron las concentraciones de citoquinas IL-4 e IL-5 en los pacientes con infección viral, bacteriana y mixta.

Tanto en los pacientes con infección viral (IL-4: $13,92 \pm 2,68$ pg/ml, IL-5: $67,09 \pm 19,44$ pg/ml), como bacteriana ($14,00 \pm 2,08$ pg/ml) y mixta ($13,13 \pm$ pg/ml) los niveles séricos de IL-4 resultaron superiores ($p < 0,05$) a los del grupo control ($9,46 \pm 1,39$ pg/ml); sin diferencias entre los tipos de infección (**Figura 23A**).

Las concentraciones circulantes de IL-5 también estuvieron incrementadas con respecto al control ($31,81 \pm 10,52$ pg/ml) en los pacientes con infección viral ($67,09 \pm$

19,44 pg/ml), bacteriana (IL-5: $60,79 \pm 6,10$ pg/ml) y mixta ($77,63 \pm 32,61$ pg/ml); y tampoco se observaron diferencias entre los diferentes tipos de infección (**Figura 23B**).

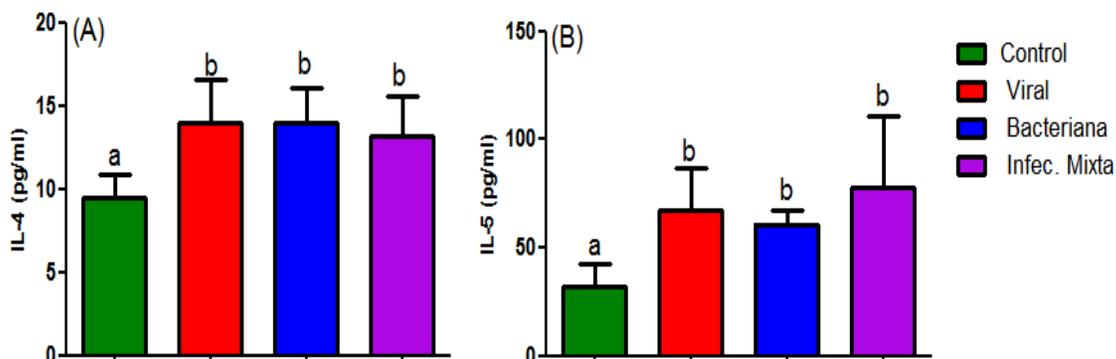


Figura 23. Variación en la concentración sérica de IL-4 (A) e IL-5 (B) en pacientes con IRA según la condición tipo de infección: viral (n=21), bacteriana (n=8) y mixta (n=10). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Para estudiar la posible inducción de diferentes niveles de citoquinas circulantes por la IRA provocada por distintos tipos de virus, se analizaron las cifras de IL-4 e IL-5 encontradas en pacientes con evidencia de infección por VSR, parainfluenza y adenovirus con independencia de la existencia o no de infección bacteriana concomitante. Así, el contenido sérico de IL-4 e IL-5 estuvo incrementado en los grupos de pacientes infectados con VSR (IL-4: $13,65 \pm 2,62$ pg/ml; IL-5: $62,20 \pm 3,17$ pg/ml), parainfluenza (L-4: $12,37 \pm 1,41$ pg/ml; IL-5: $60,39 \pm 9,01$ pg/ml) y adenovirus (IL-4: $15,05 \pm 2,83$ pg/ml; IL-5: $65,47 \pm 8,58$ pg/ml) en igual magnitud, cuando fueron comparados con el control (IL-4: $9,46 \pm 1,39$ pg/ml; IL-5: $31,81 \pm 10,52$ pg/ml), sin observarse diferencias significativas entre estos tres grupos (**Figura 24**).

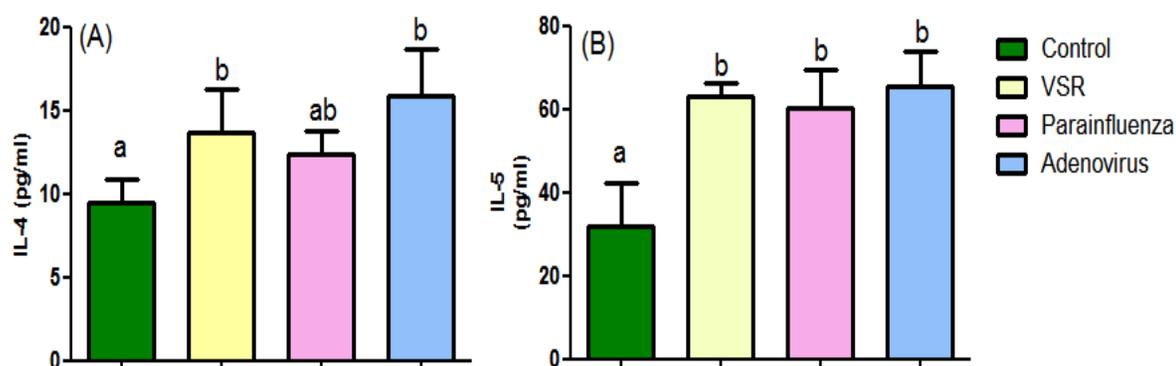


Figura 24. Variación en la concentración sérica de IL-4 (A) e IL-5 (B) en pacientes con IRA según tipo de agente etiológico viral: VSR (n=14), parainfluenza (n=7) y adenovirus (n=9). Control (n=10). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.2.3. Concentración sérica de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5) en pacientes con IRA (neumonía y bronquitis) según el agente microbiano

Pacientes con neumonía

Para evaluar como variaban los niveles de citoquinas Th2 circulantes en los pacientes con neumonía y bronquitis dependiendo de si el agente causal era viral, bacteriana o mixta; se compararon estadísticamente los tres tipos de infección en cada una de estas IRA's, y se observó que:

La concentración circulante de IL-4 en los pacientes con neumonía viral ($13,36 \pm 2,56$ pg/ml), y mixta ($14,93 \pm 2,36$ pg/ml), estuvieron aumentadas con respecto al control ($9,46 \pm 1,39$ pg/ml), no se observaron diferencias ($p > 0,05$) entre estos dos grupos, ni entre estos y los que presentaron infección bacteriana ($12,59 \pm 0,53$ pg/ml) (Figura 25A).

El nivel sérico de IL-5 también estuvo incrementado en los pacientes con neumonía viral ($71,57 \pm 27,80$ pg/ml) y mixta ($82,33 \pm 32,65$ pg/ml) cuando se compararon con el control ($31,81 \pm 10,52$ pg/ml); no se observaron otras diferencias entre el resto de los grupos; tampoco entre estos y el de infección bacteriana ($59,34 \pm 5,92$ pg/ml), no hubo diferencias entre los que presentaron infección por bacterias y los controles sanos (**Figura 25B**).

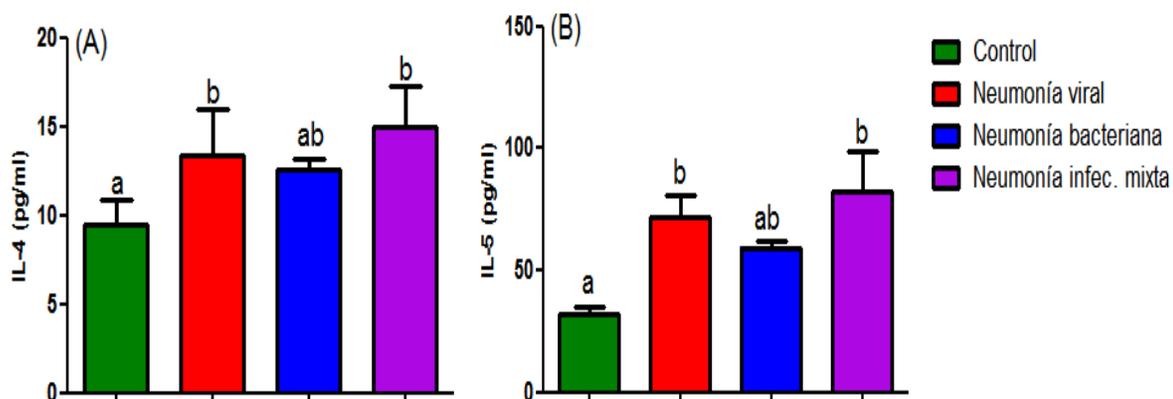


Figura 25. Variación en la concentración sérica de IL-4 (A) e IL-5 (B) en pacientes con neumonía según tipo de agente infeccioso (viral: n=9, bacteriana: n=4, mixta: n=4). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Pacientes con bronquitis

El nivel circulante de citoquina IL-4 en los pacientes con bronquitis difirió un poco a la de los pacientes con neumonía, porque sólo los pacientes con infección viral ($15,52 \pm 3,33$ pg/ml) mostraron un incremento sérico superior ($p < 0,05$) al control ($9,46 \pm 1,39$ pg/ml) y con respecto a los grupos con infección bacteriana ($13,80 \pm 1,84$ pg/ml) y mixta ($11,70 \pm 1,41$ pg/ml) (**Figura 26A**).

La concentración sérica de IL-5 en los pacientes con bronquitis estuvo incrementada ($p < 0,05$) tanto en pacientes con infección viral ($65,53 \pm 9,67$ pg/ml) como en los que tuvieron infección mixta ($59,70 \pm 0,28$ pg/ml) al compararlos con el

control ($31,81 \pm 10,52$ pg/ml) y con los pacientes con infección bacteriana ($59,34 \pm 5,92$ pg/ml), no se observaron diferencias en las concentraciones séricas de esta citoquina entre los grupos con infección viral y mixta; y tampoco entre estos y los que cursaron con infección bacteriana. Los pacientes con infección bacteriana presentaron una concentración de IL-5 igual a la del control sano (**Figura 26B**).

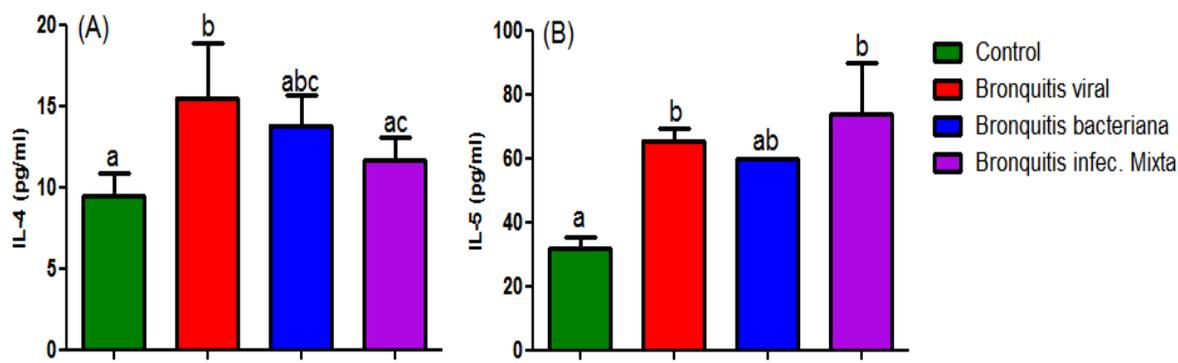


Figura 26. Variación en la concentración sérica de IL-4 (A) e IL-5 (B) en pacientes con bronquitis según tipo de agente infeccioso (viral: n= 7; bacteriana: n= 2; mixta: n=5). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.2.4. Concentración de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5) y asma

Se quiso investigar el efecto que tiene el asma sobre las concentraciones de citoquinas Th2, y se observó que, tanto los pacientes asmáticos (IL-4: $13,16 \pm 2,12$ pg/ml, IL-5: $72,81 \pm 27,78$ pg/ml) como no asmáticos (IL-4: $14,07 \pm 2,63$ pg/ml; IL-5: $65,84 \pm 18,23$ pg/ml) mostraron un incremento ($p < 0,05$) en la concentración de las citoquinas Th2 evaluadas con respecto al grupo control (IL-4: $9,46 \pm 1,39$ pg/ml; IL-5: $31,81 \pm 10,52$ pg/ml), pero no hubo diferencias entre los grupos de asmáticos y no asmáticos (**Figura 27**).

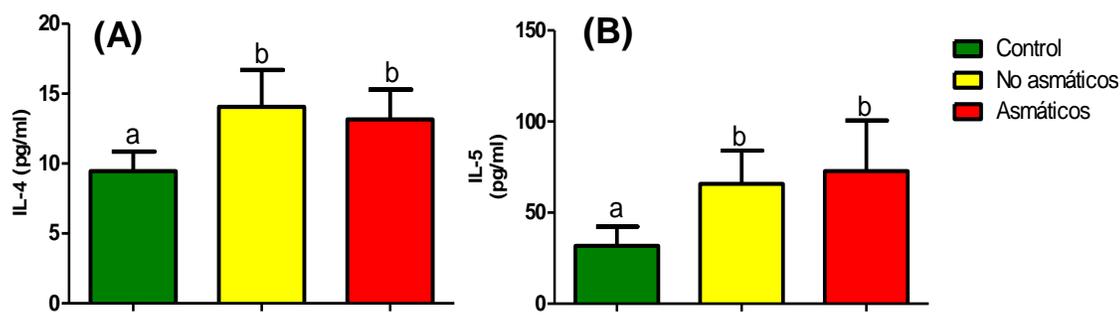


Figura 27. Variación en la concentración sérica de IL-4 (A) e IL-5 (B) en pacientes con IRA asmáticos (14) y no asmáticos (n=25). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.2.4.1. Variación de la concentración de las citoquinas Th2 (IL-4, IL-5) en pacientes asmáticos y no asmáticos según tipo de IRA

Pacientes con neumonía

Para conocer si la condición de asmático afectaba las concentración de IL-4 e IL-5 en los pacientes con neumonía y bronquitis, se evaluó este efecto, observándose que en pacientes con neumonía, tanto la condición de ser asmático ($13,11 \pm 1,58$ pg/ml) como la de no serlo ($13,93 \pm 2,77$ pg/ml), produjo un incremento en la concentración sérica significativo de IL-4 comparado con el control ($9,46 \pm 1,39$ pg/ml), y no existieron diferencias entre estos dos grupos (**Figura 28A**).

Lo mismo fue observado para las concentraciones de IL-5; es decir, los niveles séricos de esta citoquina estuvieron aumentados con respecto al control ($31,81 \pm 10,52$ pg/ml) tanto en los pacientes asmáticos ($71,12 \pm 24,38$ pg/ml) como en los que no lo eran ($71,31 \pm 28,25$ pg/ml), y no se observaron diferencias significativas entre ellos (**Figura 28B**).

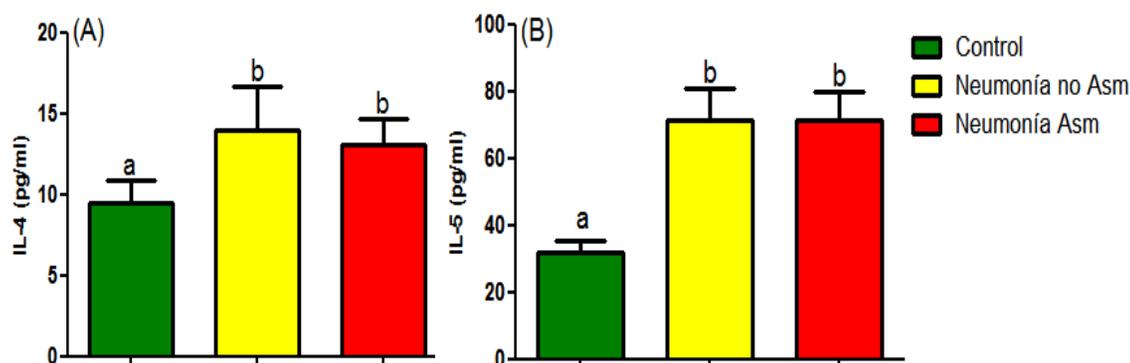


Figura 28. Variación en la concentración sérica de IL-4 (A) e IL-5 (B) en pacientes con neumonía según condición de asmáticos (asmáticos. N= 8; no asmáticos: n= 9). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Pacientes con bronquitis

Similar a lo observado en los pacientes con neumonía, los que tuvieron bronquitis también mostraron elevación sérica en la concentración de IL-4 en presencia de asma (IL-4: $1(2,54 \pm 2,73$ pg/ml; IL-5:) y en ausencia (IL-4: $14,16 \pm 3,08$ pg/ml; IL-5:) al compararlos con la población control ($9,46 \pm 1,39$ pg/ml) (**Figura 29A**). Lo mismo ocurrió para IL-5: los pacientes asmáticos ($54,907 \pm 7,69$ pg/ml) y no asmáticos ($63,66 \pm 8,44$ pg/ml) exhibieron niveles circulantes por encima de los evidenciados por la población control ($71,31 \pm 28,25$ pg/ml), sin observarse diferencias entre ambos grupos (**Figura 29B**).

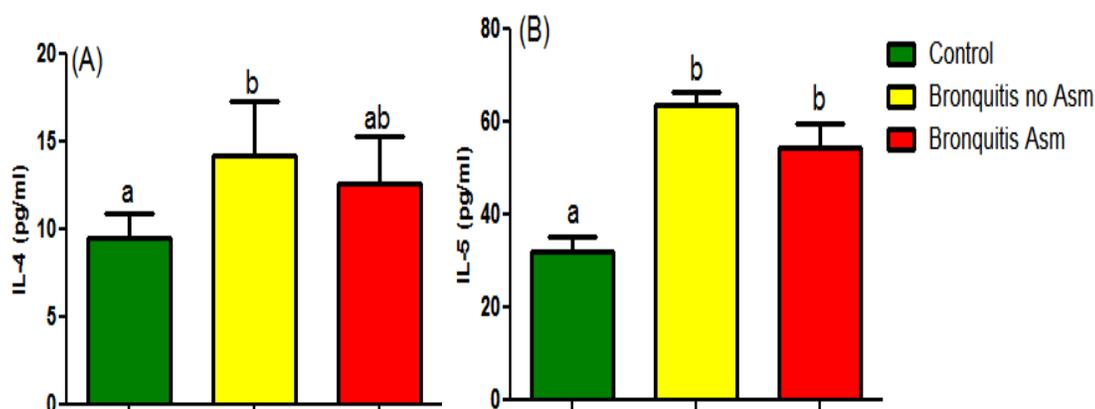


Figura 29. Variación en la concentración sérica de IL-4 (A) e IL-5 (B) en pacientes con bronquitis según condición de asmáticos (asmáticos: n=3; no asmáticos: n=11). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.2.4.2. Variaciones en la concentración sérica de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-5) en pacientes asmáticos y no asmáticos atendiendo al tipo de infección (viral, bacteriana y mixta).

Se pretendió saber como variaban las concentraciones de IL-4 e IL-5 en los grupos de pacientes asmáticos y no asmáticos estudiados, dependiendo del tipo de agente infeccioso (viral, bacteriana y mixta) involucrado como causante de la IRA en estos pacientes.

Tanto en el grupo de pacientes asmáticos como en no asmáticos el tipo de infección causó un incremento sérico de la IL-4 con respecto al control. Así se observa que los pacientes no asmáticos con infección viral ($13,75 \pm 2,59$ pg/ml), bacteriana ($14,02 \pm 2,33$ pg/ml) o mixta ($14,82 \pm 3,33$ pg/ml), tenían concentraciones más altas de IL-4 que el grupo control ($9,46 \pm 1,39$ pg/ml), no se observó diferencias significativas entre ellos (**Figura 30A**). Lo mismo fue observado en pacientes asmáticos; es decir, que tanto la presencia de infección viral ($13,22 \pm 2,49$ pg/ml), como bacteriana ($13,24 \pm 2,31$ pg/ml) y mixta ($12,89 \pm 0,30$ pg/ml) produjeron

concentraciones aumentadas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control, sin mostrar diferencias significativas entre estos tres grupos (**Figura 30B**).

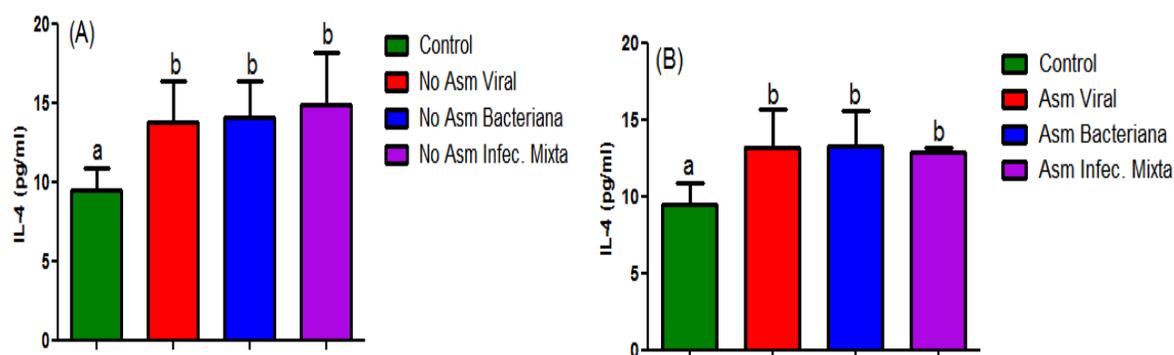


Figura 30. Variación en la concentración sérica de **IL-4** en pacientes no asmáticos (A) (virus $n=16$; bacteria $n=3$; mixto $n=6$); y asmáticos (B) (viral $n=5$; bacteriana $n=5$; mixta $n=4$) con IRA según tipo de agente infeccioso. Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Las variaciones en la concentración sérica de IL-5 en los pacientes no asmáticos estudiados fueron similares a los observados para IL-4. Esto es, tanto los pacientes con infección viral ($60,91 \pm 7,18$ pg/ml), bacteriana ($61,00 \pm 4,36$ pg/ml) o mixta ($64,96 \pm 9,13$ pg/ml) mostraron una concentración sérica de IL-5 superior a la del control ($31,81 \pm 10,52$ pg/ml), sin observarse diferencias significativas en los niveles circulantes de esta citoquina para cualquiera fuera el tipo de infección presente en el paciente (**Figura 31A**).

El nivel circulante de IL-5 en los pacientes asmáticos fue superior en los que padecían infección mixta ($95,30 \pm 44,77$ pg/ml) comparados con el control sano ($31,81 \pm 10,52$ pg/ml). No se observaron diferencias entre las concentraciones medidas en los pacientes con infección viral ($65,51 \pm 4,25$ pg/ml) y bacteriana ($67,00 \pm 6,78$ pg/ml), y entre estos dos grupos con respecto al control sano y a los pacientes con infección mixta (**Figura 31B**).

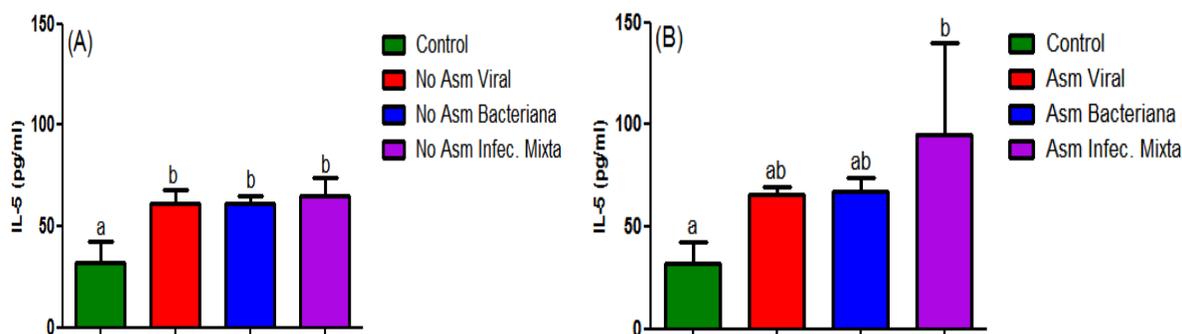


Figura 31. Variación en la concentración sérica de **IL-5** en pacientes no asmáticos (A) (virus n=16; bacteria n=3; mixto n=6); y asmáticos (B) (virus n=5; bacteria n= 5; mixto n=4) con IRA según tipo de agente infeccioso. Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.2.4.3. Variaciones en la concentración sérica de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-5) en pacientes con IRA viral, bacteriana y mixta según presencia o no de asma.

Para conocer si la presencia de asma en los pacientes con IRA viral, bacteriana o mixta producían variaciones en la concentración sérica de las citoquinas Th2, se evaluó este efecto en los pacientes y se observó que:

La presencia de asma en los pacientes produjo un incremento en la concentración circulante de IL-4 e IL-5 en relación al control y no se observaron diferencias entre ellas.

En el grupo de pacientes con infección viral, tanto la presencia de asma ($13,22 \pm 2,49$ pg/ml) como la ausencia de la misma ($14,10 \pm 2,78$ pg/ml) produjo un incremento sérico en las concentraciones de IL-4 cuando fueron comparados con los pacientes que sirvieron de control ($9,46 \pm 1,39$ pg/ml) (**Figura 32A**). Las concentraciones séricas de IL-5 en los pacientes con infección viral, también se mostraron incrementadas en relación al control, tanto en ausencia ($62,37 \pm 7,68$

pg/ml) como en presencia de asma ($65,51 \pm 4,52$ pg/ml) en los pacientes evaluados (**Figura 32B**).

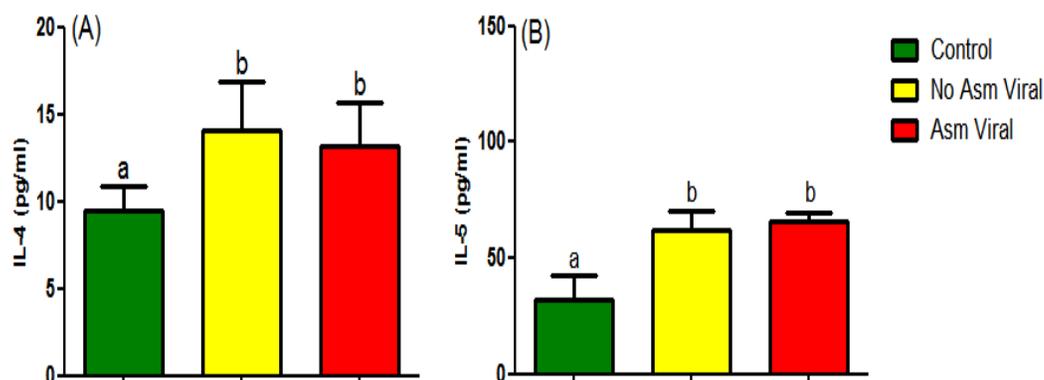


Figura 32. Variación en la concentración sérica de IL-4 (A) e IL-5 (B) en pacientes con IRA viral según condición de asmáticos (n=5) y no asmáticos (n=16). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Por su parte, se observó que los pacientes con infección bacteriana mostraron niveles séricos de IL-4 incrementados con respecto al control ($9,46 \pm 1,39$ pg/ml) tanto cuando los pacientes presentaron asma ($13,98 \pm 2,21$ pg/ml) como cuando no la presentaron ($14,02 \pm 2,33$ pg/ml), sin observarse diferencias entre ambos grupos (**Figura 33A**). La concentración de IL-5 en los pacientes varió de la misma forma, es decir, los niveles de esta citoquina estuvo aumentada con relación al control sano ($31,81 \pm 10,52$ pg/ml) tanto en los pacientes que padecían asma ($60,67 \pm 7,46$ pg/ml) como en los que no la padecían ($61,00 \pm 4,34$ pg/ml), y tampoco se observaron diferencias entre estos dos grupo (**Figura 33B**).

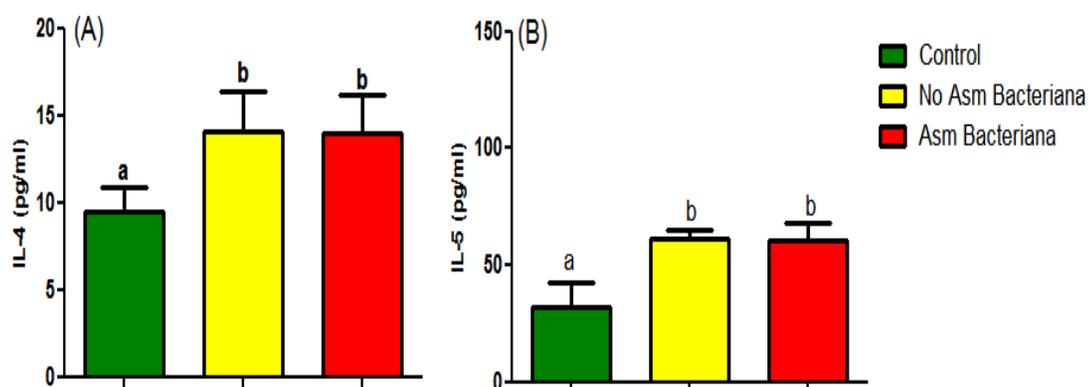


Figura 33. Variación en la concentración sérica de IL-4 (A) e IL-5 (B) en pacientes con IRA bacteriana según condición de asmáticos (no asmáticos=3; asmáticos=5). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

El grupo de pacientes con infección mixta presentó una IL-4 incrementada ($p < 0,05$) en los pacientes no asmáticos ($13,97 \pm 2,81$ pg/ml) con respecto al control ($9,46 \pm 1,39$ pg/ml), y no hubo diferencias entre el control y los asmáticos ($12,08 \pm 1,63$ pg/ml), así como tampoco se observó alguna diferencia entre asmáticos y no asmáticos (**Figura 34A**);

En este mismo grupo, el nivel sérico de IL-5 se mostró elevado tanto en pacientes asmáticos ($95,30 \pm 44,47$ pg/ml) como en no asmáticos ($63,50 \pm 9,37$ pg/ml) al compararlos con el control sano ($31,81 \pm 10,52$ pg/ml), tampoco se observaron diferencias entre asmáticos y no asmáticos (**Figura 34B**).

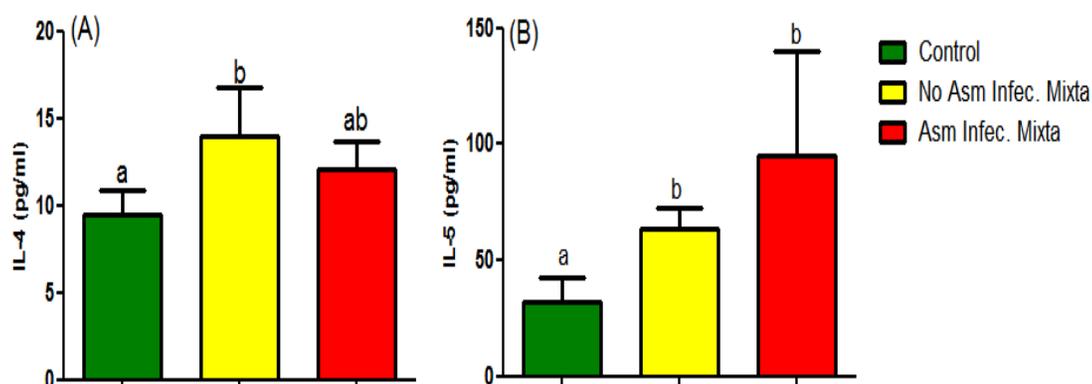


Figura 34. Variación en la concentración sérica de IL-4 (A) e IL-5 (B) en pacientes con IRA mixta según condición de asmáticos (no asmáticos=6; asmáticos = 4). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.2.2.5. Correlación IL-4, IL-5 e IgE sérica

El análisis de correlación de Pearson's reveló una correlación positiva entre IL-4 e IL-5 ($r = 0,4662$; $p < 0,0011$). No hubo ninguna correlación entre estas citoquinas y la concentración de IgE encontrada en los pacientes.

IV.2.3. Concentración sérica de las quimioquinas IL-8, MCP-1 y RANTES

IV.2.3.1. Variación en las concentraciones séricas de las quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) según tipo de IRA's

Se midió la concentración sérica de IL-8, MCP-1 y RANTES en los pacientes con neumonía, bronquitis y otros, para establecer si había diferencias en la respuesta de producción de quimioquinas circulantes atendiendo al cuadro anatómo/clínico del paciente

Observamos que sólo durante el padecimiento de neumonía el MCP-1 ($23,85 \pm 11,68$ pg/ml) y el RANTES (3090 ± 1273 pg/ml) estuvieron incrementadas ($p < 0,05$) con respecto al control (MCP-1: $13,75 \pm 2,08$ pg/ml; RANTES: $1536 \pm 235,9$ pg/ml) (Figura 35 A y B).

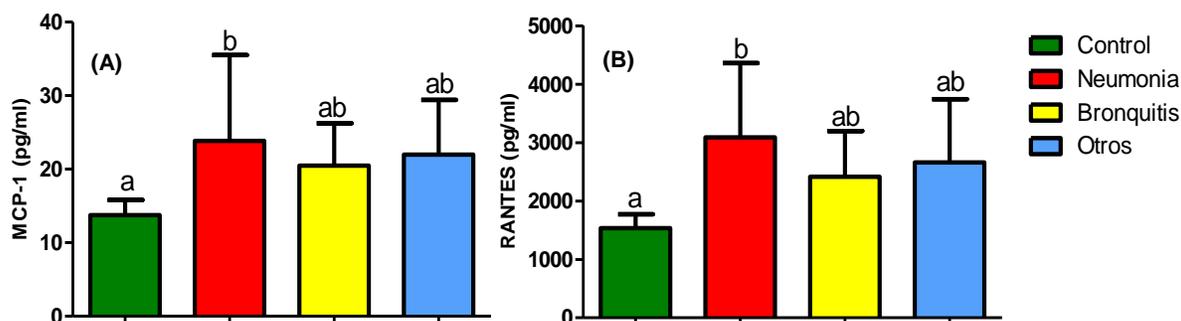


Figura 35. Variación en la concentración sérica de MCP-1 (A) y RANTES (B) en pacientes con diferentes tipos de IRA (neumonía: n=17, bronquitis: n=14 y otros: n=8). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Ni la presencia de bronquitis en los pacientes (MCP-1: $20,50 \pm 5,75$ pg/ml; RANTES: $2413 \pm 785,5$ pg/ml), ni la entidad clínica denominada "otros" (MCP-1: $21,98 \pm 7,42$ pg/ml; RANTES: 2660 ± 1082 pg/ml) aportaron diferencias estadísticas significativas en el estudio con respecto al control. Igual ocurrió para IL-8 en el cual ninguno de los tres cuadros de IRA ocasionaron alguna variación en el nivel sérico de esta quimioquina, ni entre ellos (neumonía: $85,65 \pm 78,08$ pg/ml; bronquitis: $63,80 \pm 53,41$ pg/ml; otros: $57,89 \pm 7,88$ pg/ml) ni con respecto al control ($29,55 \pm 5,81$ pg/ml).

IV.2.3.2. Variación de las quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) según el tipo de agente microbiano

Con el objeto de observar si había diferencias en la concentración circulante de quimioquinas en los pacientes evaluados, se midió y comparó el nivel de las mismas en los pacientes con infección viral, bacteriana y mixta.

Se objetivó que el nivel circulante de MCP-1 estuvo incrementado ($p < 0,05$) en los pacientes con infección viral ($25,64 \pm 13,17$ pg/ml) comparado con el control sano ($13,65 \pm 2,08$ pg/ml) (Figura 36A), no se observaron diferencias entre las concentraciones de esta quimioquina presentadas por los pacientes con infección bacteriana ($18,28 \pm 1,23$ pg/ml) o mixta ($23,15 \pm 6,84$ pg/ml) al compararlas con el grupo control, y la concentración MCP-1 en estos dos grupos tampoco difirió de la de los pacientes con infección viral (**Figura 36A**).

La concentración sérica de RANTES fue superior tanto en los pacientes con infección viral (3279 ± 1337 pg/ml) como en los pacientes con infección mixta ($2842 \pm 652,1$ pg/ml) al compararlos con el control ($1536 \pm 235,9$ pg/ml); el nivel circulante de RANTES en los pacientes con infección viral fue superior ($p < 0,05$) al mostrado por los pacientes con infección bacteriana (1840 ± 295 pg/ml), no se evidenció diferencias entre pacientes con infección viral y mixta, y entre los que tenían infección bacteriana y la población control (**Figura 36B**).

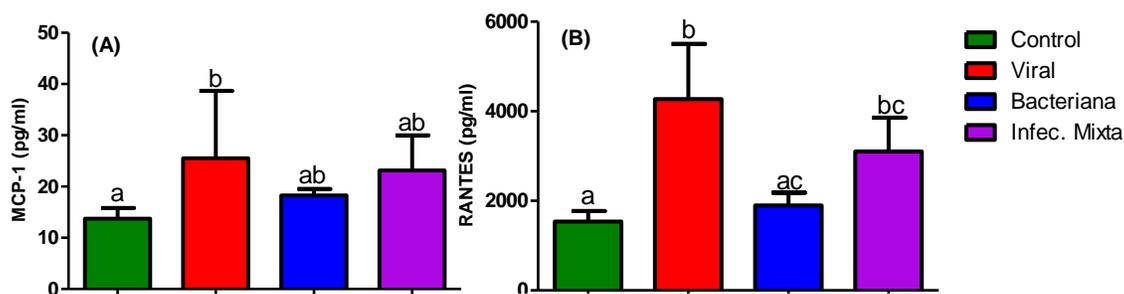


Figura 36. Variación en la concentración sérica de MCP-1 (A) y RANTES (B) en pacientes con IRA según el tipo de agente etiológico: viral (n=21), bacteriana (n=8) y mixta (n=10). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

No se observaron diferencias en el nivel sérico de IL-8 al considerar el tipo de infección cuando los pacientes presentaron infección viral ($73,58 \pm 60,30$ pg/ml), bacteriana ($57,28 \pm 10,45$ pg/ml) o mixta ($84,53 \pm 89,51$ pg/ml).

Tipo de infección viral y nivel sérico de MCP-1 y RANTES

Se pretendió conocer como el tipo de virus variaba las concentraciones de quimioquinas circulantes en los pacientes con infección viral con coinfecciones, y se observó como la presencia de infección por VSR en los pacientes, produjo un incremento sérico de MCP-1 ($29,09 \pm 15,38$ pg/ml) y RANTES ($3866,00 \pm 1122,00$ pg/ml) con respecto al control (MCP-1: $13,75 \pm 2,08$ pg/ml; RANTES: $1536,00 \pm 235,90$ pg/ml). Ni la infección por parainfluenza (MCP-1: $22,58 \pm 11,00$ pg/ml; RANTES: $2713,00 \pm 1705,00$ pg/ml), ni por adenovirus (MCP-1: $17,53 \pm 1,92$ pg/ml; RANTES: $2074,00 \pm 93,55$ pg/ml) en los pacientes ocasionaron diferencias significativas con respecto al control, así como tampoco se observaron diferencias entre las concentraciones de estas quimioquinas encontradas en los pacientes ante la presencia de los diferentes tipos de virus (**Figura 37**).

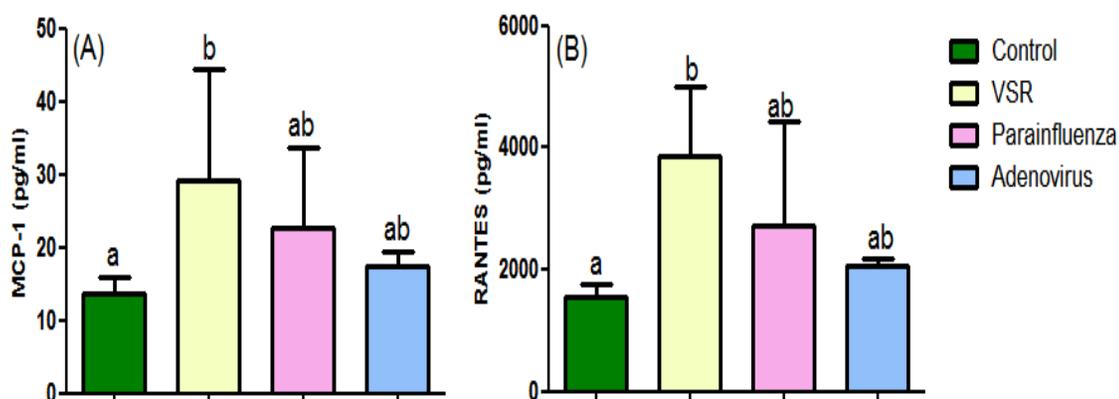


Figura 37. Variación en la concentración sérica de MCP-1 (A) y RANTES (B) en pacientes con IRA según tipo de agente infeccioso viral: VSR (n=14), parainfluenza (n=7) y adenovirus (n=9). Control (n=10). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

2.3.3. Concentración sérica de las quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) en pacientes con IRA (neumonía y bronquitis) según tipo de agente microbiano.

Se pretendió evaluar la concentración de estas quimioquinas en los pacientes con cuadros de IRA por neumonía y bronquitis cuando el agente infeccioso era un virus, una bacteria o una infección mixta.

Pacientes con neumonía

En estos pacientes la concentración circulante de MCP-1 estuvo incrementada en los que padecían infección viral ($35,43 \pm 16,95 \text{ pg/ml}$) con respecto al grupo control ($13,75 \pm 2,08 \text{ pg/ml}$) y con respecto al grupo con infección bacteriana ($17,95 \pm 1,72 \text{ pg/ml}$). La concentración sérica de MCP-1 en los pacientes con infección bacteriana o mixta ($23,15 \pm 6,83 \text{ pg/ml}$) no difirió del control ni entre ellos mismos (**Figura 38A**).

Tanto la presencia de infección viral (4272 ± 1233 pg/ml), como las infecciones mixtas ($3101 \pm 757,3$ pg/ml) ocasionaron un aumento en el nivel circulante de RANTES con respecto al control ($1536 \pm 235,9$ pg/ml). No se observaron diferencias en la concentración de RANTES entre el grupo de pacientes con infección viral y bacteriana (1896 ± 287 pg/ml), así como entre los que padecían infección bacteriana y mixta (**Figura 38B**).

Ninguna variación se observó en los niveles séricos de IL-8 en los pacientes con neumonía.

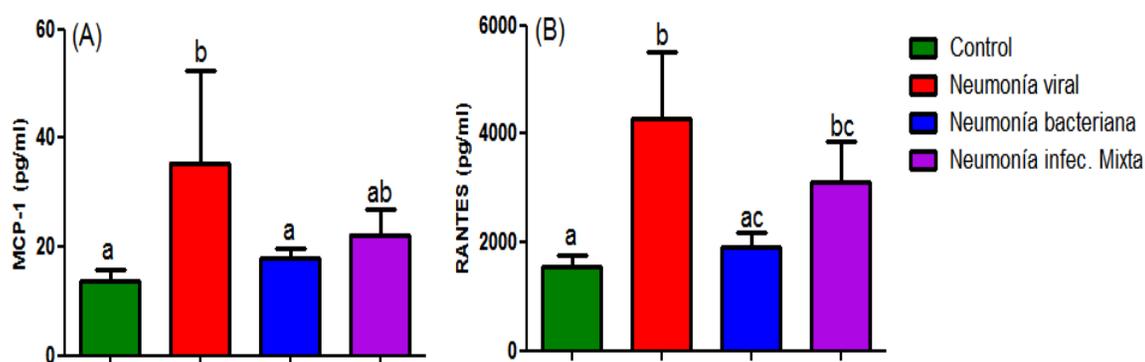


Figura 38. Variación en la concentración sérica de MCP-1 (A) y RANTES (B) en pacientes con neumonía según el tipo de agente causal (viral: n=9, bacteriano: n=4, mixta: n=4). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Pacientes con bronquitis

En los pacientes con bronquitis fue la infección mixta lo que parece haber incrementado el nivel sérico de MCP-1 ($24,14 \pm 6,19$ pg/ml) por encima ($p < 0,05$) del observado en los pacientes controles ($13,75 \pm 2,08$ pg/ml), y también cuando fueron comparados con los que padecían infección viral ($15,79 \pm 0,82$ pg/ml) y bacteriana ($17,05 \pm 0,78$ pg/ml) (**Figura 39A**).

El RANTES también se observó aumentado en estos pacientes con infección mixta ($2700 \pm 635,75$ pg/ml) comparados con el control ($1536 \pm 235,9$ pg/ml) y con los que tenían infección viral (2377 ± 1124 pg/ml) y bacteriana ($1748 \pm 338,7$ pg/ml). No hubo diferencias entre los que presentaron virus y bacterias y la población de controles sanos (**Figura 39B**).

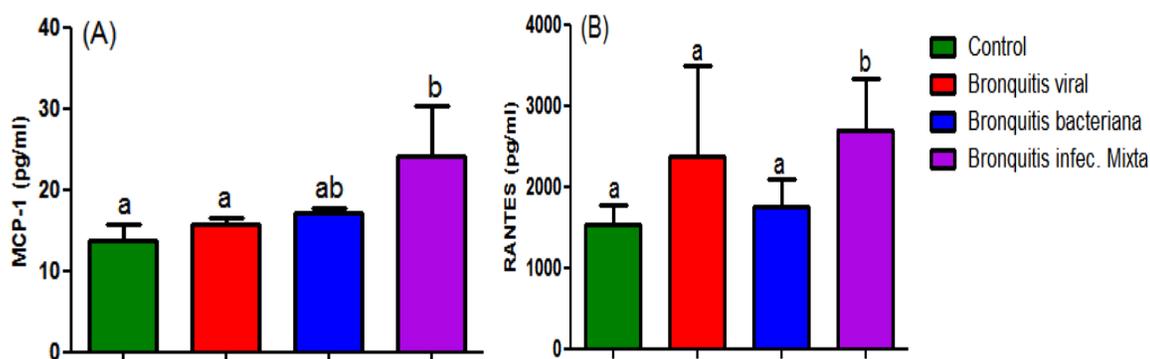


Figura 39. Variación en la concentración sérica de MCP-1 (A) y RANTES (B) en pacientes con bronquitis según el tipo de agente causal (viral: n= 7; bacteriana: n= 2; mixta: n=5). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Ninguna variación fue observada en los niveles séricos de IL-8 en los pacientes con bronquitis.

IV.2.3.4. Concentración sérica de las quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) en pacientes asmáticos y no asmáticos.

Para conocer si el asma afectaba o no las concentraciones de IL-8, MCP-1 y RANTES, se midió el nivel de estas quimioquinas en el suero de los pacientes y se compararon las variaciones existentes entre pacientes no asmáticos y asmáticos.

Se puede apreciar como en los pacientes asmáticos la concentración de MCP-1 ($28,36 \pm 10,31$ pg/ml) fue superior a la de la población control ($13,75 \pm 2,08$ pg/ml), y a la del grupo de no asmáticos ($17,32 \pm 3,48$ pg/ml), sin observarse diferencias entre este último grupo y el control (**Figura 40A**). Con relación al RANTES la observación fue similar, porque esta quimioquina estuvo incrementada en el suero de los pacientes asmáticos (3348 ± 1236 pg/ml) cuando se compararon con el control ($1536 \pm 235,9$ pg/ml) y con los pacientes no asmáticos ($2226 \pm 570,9$ pg/ml), sin observarse diferencias entre este último grupo y el control (**Figura 40B**).

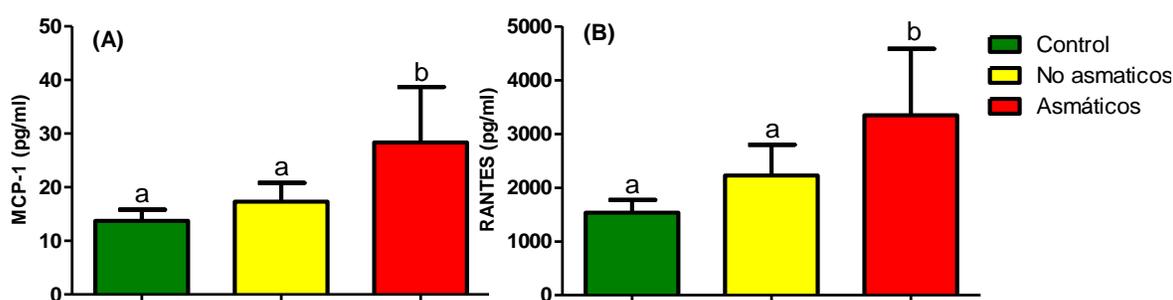


Figura 40. Variación en la concentración sérica de MCP-1 (A) y RANTES (B) en pacientes con IRA asmáticos (14) y no asmáticos (n=25). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

La presencia o no de asma en los pacientes no varió la concentración sérica de IL-8 en los pacientes con IRA del estudio.

IV.2.3.4.1. Concentración sérica de quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) en pacientes con asma o no, según tipo de IRA (neumonía y bronquitis).

Para evaluar el efecto del asma sobre la concentración sérica de las quimioquinas en los pacientes con neumonía y bronquitis, se compararon los niveles cuando los mismos padecían o no de asma.

Se objetivó que en el grupo que padecía el cuadro anátomo/clínico neumónico, el asma produjo un incremento sérico de MCP-1 ($30,46 \pm 12,37$ pg/ml) con respecto al control ($13,75 \pm 2,08$ pg/m) y al grupo de no asmáticos ($14,69 \pm 4,36$ pg/ml), esta concentración no difirió entre pacientes sin asma y controles (**Figura 41A**).

En el mismo grupo de pacientes la concentración de RANTES fue superior en los que padecían asma (3534 ± 1329 pg/ml) al compararlos con el control $1536 \pm 235,9$ pg/ml), pero no difirió al de la encontrada en los pacientes no asmáticos ($2200 \pm 487,6$ pg/ml) (**Figura 41B**).

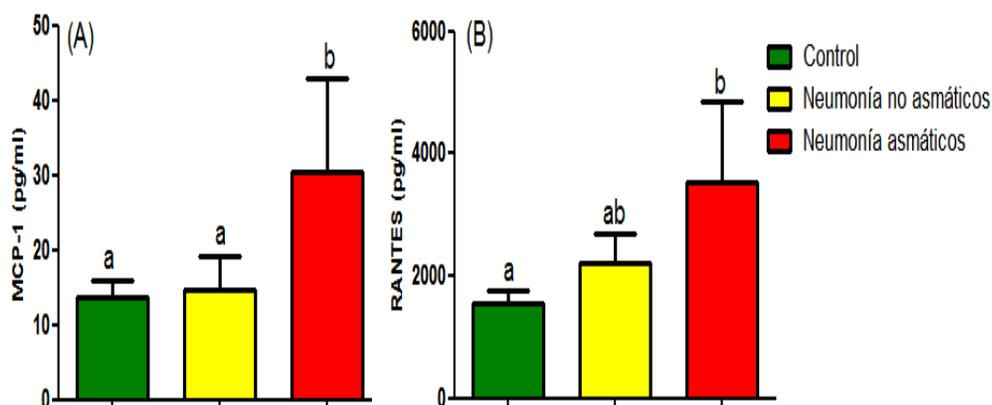


Figura 41. Variación en la concentración sérica de MCP-1 (A) y RANTES (B) en pacientes con neumonía según su condición de asmáticos (asmáticos: n= 8; no asmáticos: n= 9). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

La presencia o no de asma, no varió la concentración sérica de IL-8 en los pacientes con IRA de tipo neumonía en el estudio. Con respecto a esta citoquina se observó una concentración circulante en asmáticos de $88,69 \pm 92,62$ pg/ml, en no asmáticos $82,96 \pm 68,33$ pg/ml; y el grupo control con $29,55 \pm 5,81$.

Pacientes con bronquitis

En los pacientes con bronquitis sólo se observó un incremento significativo en la concentración de MCP-1 en los pacientes con asma ($25,96 \pm 7,30\text{pg/ml}$) cuando se compararon con el control ($13,75 \pm 2,08\text{pg/ml}$) y con el grupo de no asmáticos ($18,15 \pm 3,23\text{pg/ml}$), no se evidenciaron diferencias entre pacientes no asmáticos y controles (**Figura 42**).

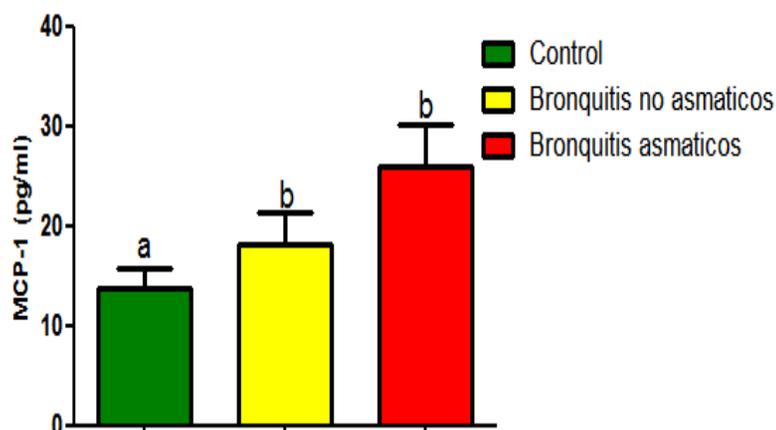


Figura 42. Variación en la concentración sérica de MCP-1 en pacientes con bronquitis según su condición de asmáticos (asmáticos: n=3; no asmáticos: n=11). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

La condición de asmático de los pacientes no provocó ninguna variación en la concentración sérica de RANTES. Así, tanto los pacientes asmáticos ($2593 \pm 1002\text{pg/ml}$) como los no asmáticos ($2336 \pm 753,3\text{pg/ml}$) mostraron una concentración de esta quimioquina que no difirió entre ellas ni con respecto a la población control.

No se observó diferencias entre la concentración sérica de IL-8 de pacientes con asma ($90,06 \pm 113,4\text{pg/ml}$) y no asmáticos ($55,92 \pm 45,92\text{pg/ml}$) comparados con el control ($29,55 \pm 5,81\text{pg/ml}$).

IV.2.3.4.2. Concentración sérica de las quimioquinas IL-8, RANTES y MCP-1, en pacientes con asma o no, según tipo de agente microbiano

Se pretendió investigar como variaban las concentraciones de IL-8, MCP-1 y RANTES en los pacientes con asma y no asmáticos cuando presentaban una infección viral, bacteriana o mixta.

Se objetivó en el grupo de pacientes no asmáticos que sólo la infección mixta ($18,74 \pm 4,92$ pg/ml) produjo un incremento significativo ($p < 0,05$) en la concentración sérica de MCP-1 con respecto al control ($13,75 \pm 2,08$ pg/ml). El nivel de esta quimioquina mostrada por los pacientes con infección mixta no difirió de los que padecían infección viral ($15,60 \pm 2,18$ pg/ml) o bacteriana ($18,17 \pm 1,47$ pg/ml), y estas últimas tampoco difirieron con respecto al grupo control (**Figura 43A**).

El grupo de pacientes asmáticos mostraron un incremento en la concentración circulante de MCP-1 tanto cuando estuvo presente la infección viral ($39,26 \pm 8,20$ pg/ml) como cuando estuvo presente la infección mixta ($29,78 \pm 1,51$ pg/ml), comparado con el control ($13,75 \pm 2,08$ pg/ml) y con los pacientes con infección bacteriana ($16,43 \pm 1,36$ pg/ml) (**Figura 43B**).

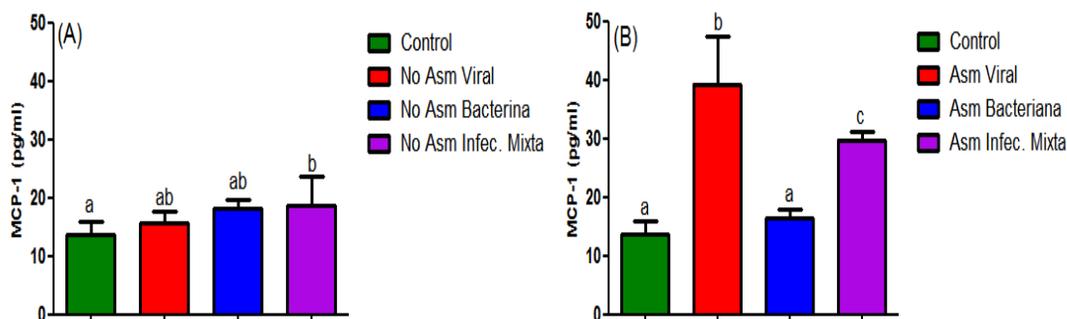


Figura 43. Variación en la concentración sérica de MCP-1 en pacientes no asmáticos (A) (virus n=16; bacteria n= 3; mixto n=6); y asmáticos (B) (virus n=5; bacteria n=5; mixto n=4) con IRA según tipo de agente causal. Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En lo que respecta a la concentración de RANTES, se objetivó como en pacientes no asmáticos la concentración de esta quimioquina fue superior en los que presentaron infección viral ($2375 \pm 689,00$ pg/ml) y mixta ($2519 \pm 98,85$ pg/ml) comparados con el control ($1536 \pm 235,90$ pg/ml), y con los que tenían infección bacteriana ($1490 \pm 19,06$ pg/ml). No se observaron diferencias entre los pacientes con infección viral y mixta, y entre los que padecían IRA bacteriana y el grupo control (**Figura 44A**).

En los pacientes asmáticos, se pudo apreciar como la concentración de RANTES estuvo aumentada ($p < 0,05$) en la población con infección viral ($4663,00 \pm 337,2$ pg/ml) y mixta ($3326,00 \pm 857,20$ pg/ml) cuando se compararon con el control y con los pacientes con infección bacteriana ($1423,00 \pm 25,50$ pg/ml). No hubo diferencias entre los que presentaron infección viral y mixta, y entre los que tenían infección bacteriana y los controles (**Figura 44B**).

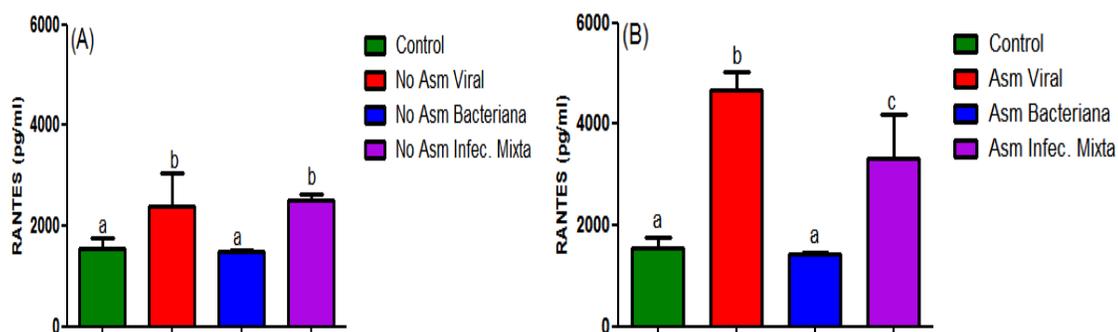


Figura 44. Variación en la concentración sérica de RANTES en pacientes no asmáticos (A) (virus n=16; bacteria n= 3; mixto n=6); y asmáticos (B) (virus n=5; bacteria n=3; mixto n=4) con IRA según tipo de agente causal. Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Ninguna diferencia fue observada en la concentración sérica de IL-8 de los pacientes con IRA viral, bacteriana y mixta asmáticos y no asmáticos, cuando fueron comparados entre ellos y con el grupo control.

IV.2.3.4.3. Concentración sérica de las quimioquinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) en pacientes con IRA viral, bacteriana y mixta según presencia o no de asma.

Con el fin de evidenciar si la presencia de asma variaba las concentraciones de las quimioquinas IL-8, MCP-1 y RANTES cuando el paciente padecía de IRA viral, bacteriana o mixta, se compararon los niveles circulantes de estas quimioquinas en los pacientes de estos tres grupos.

El asma en los pacientes con IRA viral afectó la concentración de MCP-1 y RANTES con incrementos significativos con respecto al control y al grupo de no asmáticos. El nivel circulante de MCP-1 fue superior ($p < 0,05$) en los pacientes con asma ($39,26 \pm 8,20$ pg/ml) con respecto al grupo control ($13,75 \pm 2,07$ pg/ml), y al de pacientes no asmáticos ($15,73 \pm 2,02$ pg/ml), no se observaron diferencias entre los no asmáticos y el control (**Figura 45A**).

En el grupo de pacientes asmáticos se observó un incremento ($p < 0,0001$) sérico en la concentración de RANTES ($4663 \pm 377,2$ pg/ml) con relación al control ($1536 \pm 235,9$ pg/ml) y al grupo de no asmáticos ($2291 \pm 667,3$ pg/ml). Los no asmáticos también mostraron un nivel de esta citoquina superior ($p < 0,05$) al de los del grupo control (**Figura 45B**).

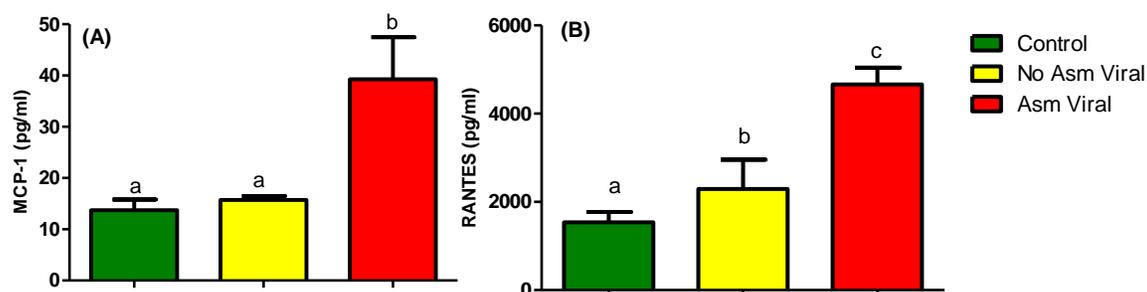


Figura 45. Variación en la concentración sérica de MCP-1 (A) y RANTES (B) en pacientes con IRA de etiología viral según su condición de asmáticos asmáticos (n=5) y no asmáticos (n=16). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Para el grupo de pacientes con infección bacteriana, el asma afectó los valores de quimioquinas séricas de la siguiente forma:

La concentración circulante de MCP-1 resultó elevada ($p < 0,05$) en pacientes con asma ($18,17 \pm 1,47 \text{ pg/ml}$) y sin ella ($18,16 \pm 1,29 \text{ pg/ml}$) cuando se compararon con el grupo control ($13,75 \pm 2,08 \text{ pg/ml}$), no hubo diferencias entre asmáticos y no asmáticos (**Figura 46A**). El RANTES sérico solo se observó incrementado en los pacientes asmáticos con infección bacteriana ($2050 \pm 71,33 \text{ pg/ml}$) en comparación con el control ($1536 \pm 235,9 \text{ pg/ml}$) y con el grupo de no asmáticos ($1490 \pm 19,06 \text{ pg/ml}$), no evidenciamos diferencias entre los pacientes no asmáticos y los controles (**Figura 46B**).

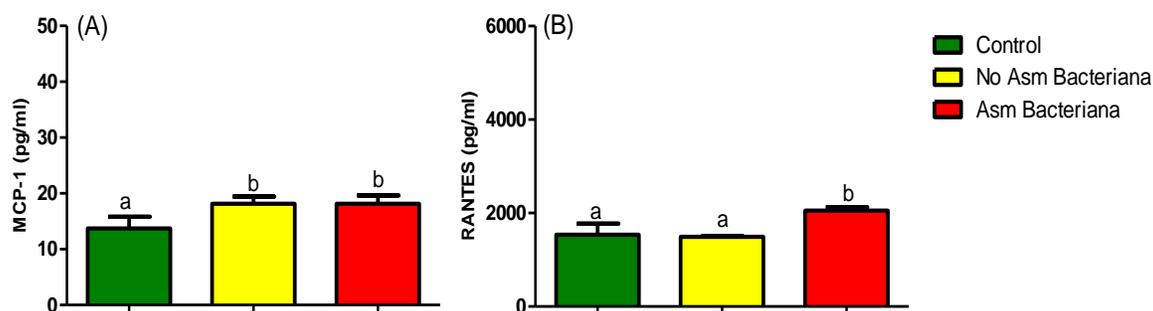


Figura 46. Variación en la concentración sérica de MCP-1 (A) y RANTES (B) en pacientes con IRA de etiología bacteriana según su condición de asmáticos (no asmáticos=3; asmáticos=5). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Cuando los pacientes tuvieron IRA provocado por infecciones mixtas o coinfecciones, se observó un incremento sérico en el nivel circulante de MCP-1 tanto en los pacientes asmáticos ($29,78 \pm 1,51 \text{ pg/ml}$) como en los que no padecían asma ($18,74 \pm 4,92 \text{ pg/ml}$) cuando fueron comparados con el control ($13,75 \pm 2,08 \text{ pg/ml}$), observándose mayor concentración en asmáticos vs los no asmáticos (**Figura 47A**).

El RANTES también mostró un nivel circulante superior en los pacientes con asma ($3326 \pm 857,2\text{pg/ml}$) y sin ella ($2519 \pm 98,85\text{pg/ml}$) cuando lo comparamos con el control ($1536 \pm 245,9\text{pg/ml}$), esta concentración de RANTES fue superior en asmáticos cuando se compararon con los no asmáticos (**Figura 47B**).

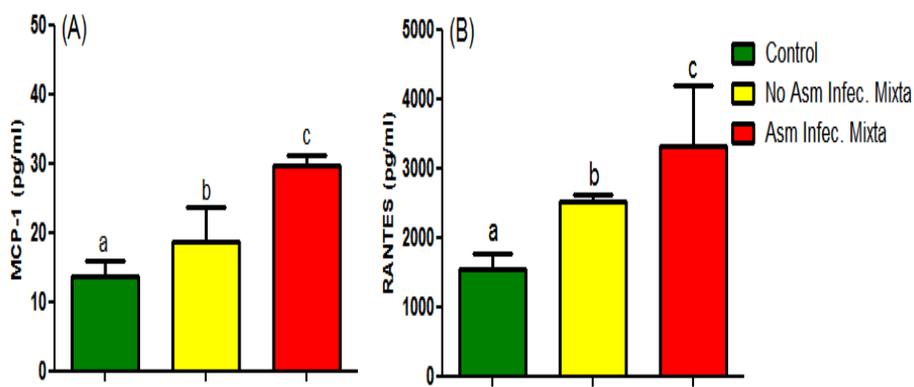


Figura 47. Variación en la concentración sérica de MCP-1 (A) y RANTES (B) en pacientes con IRA de etiología mixta según su condición de asmáticos (no asmáticos=6; asmáticos = 4). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

El asma no afectó la concentración de IL-8 para ningún tipo de infección (viral, bacteriana y mixta).

IV.3. Análisis del efecto inductor de producción de citoquinas por virus en cultivos de monocitos procedentes de sujetos sanos.

IV.3.1. Concentración de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α en monocitos inoculados con virus

Se estimó conveniente analizar la producción de citoquinas en cultivos de CMSP, para evaluar la respuesta inflamatoria mediada por la producción de citoquinas en estas células estimuladas por los virus aislados de los mismos pacientes con IRA.

Cuando se midió la concentración de IL-1 β en el sobrenadante de los cultivos de monocitos infectados con VSR, parainfluenza, y adenovirus virus, se observó que tanto VSR (1139 \pm 349,1 pg/ mg proteína) como parainfluenza (1582 \pm 485,00 pg/ mg proteína) y adenovirus (1992 \pm 650,20 pg/ mg proteína), promovieron un efecto inductor en la producción de esta citoquina que fue significativo ($p < 0,05$) con respecto al control (344,9 \pm 102,50 pg/ mg proteína). También se evidenció diferencias estadísticas significativas en la concentración de IL-1 β entre VSR y adenovirus (**Figura 48A**).

Cuando se determinó el nivel de TNF α en el sobrenadante de los cultivos de células mononucleares se pudo observar que el VSR (1835,00 \pm 653,50 pg/ mg proteína), parainfluenza (2095,00 \pm 284,50 pg/ mg proteína) y adenovirus (1813,0 \pm 344,10 pg/ mg proteína) mostraron un efecto inductor en la producción del TNF α significativamente mayor ($p < 0,05$) comparado con el control (711,9 \pm 56,20 pg/ mg proteína). En este caso, no se evidenció diferencias entre la respuesta de los diferentes virus sobre la producción de TNF α (**Figura 48B**).

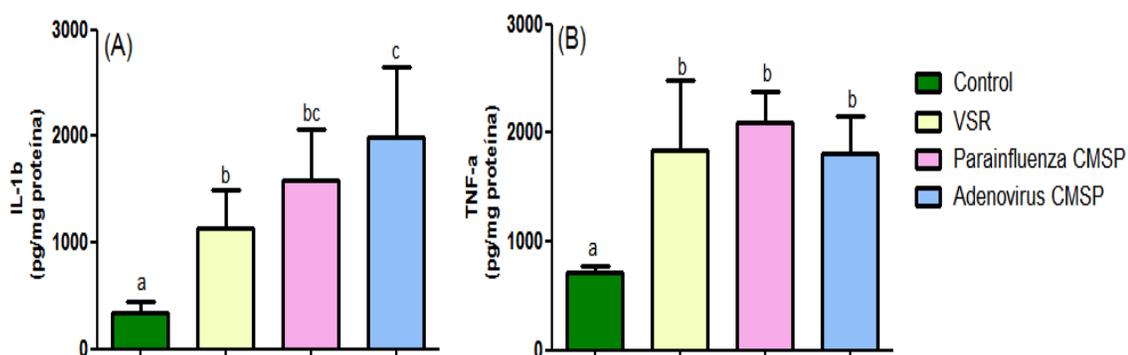


Figura 48. Efecto inductor de producción de citoquina IL-1 β (A) y TNF α (B) por los virus en cultivo de monocitos. VSR (n=14), parainfluenza (n=7), adenovirus (n=9), control (n=4). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.3.2. Concentración de las citoquinas Th2: IL-4 e IL-5 en monocitos cultivados con virus.

La concentración de IL-4 en el sobrenadante de los cultivos de monocitos se encontró aumentada con respecto al control ($35,17 \pm 10,55$ pg/ mg proteína) cuando se evaluó el efecto inductor del VSR ($88,44 \pm 9,82$ pg/ mg proteína), del parainfluenza ($90,73 \pm 12,16$ pg/ mg proteína) y de adenovirus ($81,52 \pm 14,63$ pg/ mg proteína). No se observó diferencias en la producción de esta citoquina por los diferentes virus (**Figura 49A**).

Al medir la concentración de IL-5 en el sobrenadante de CMPS, pudo objetivarse que solamente parainfluenza ($871,8 \pm 163,3$ pg/mg proteína) mostró un efecto inductor significativo ($p < 0,05$) en la producción de IL-5 con respecto al control ($426,4 \pm 122,8$ pg/ mg proteína). Las concentraciones de IL-5 medida en el sobrenadante de los cultivos inoculados con VSR ($772,3 \pm 263,6$ pg/mg proteína) y adenovirus ($802,3 \pm 170,3$ pg/ mg proteína) no evidenciaron diferencias cuando

fueron comparados con el grupo control. Tampoco en el patrón inducido por los diferentes virus (**Figura 49B**).

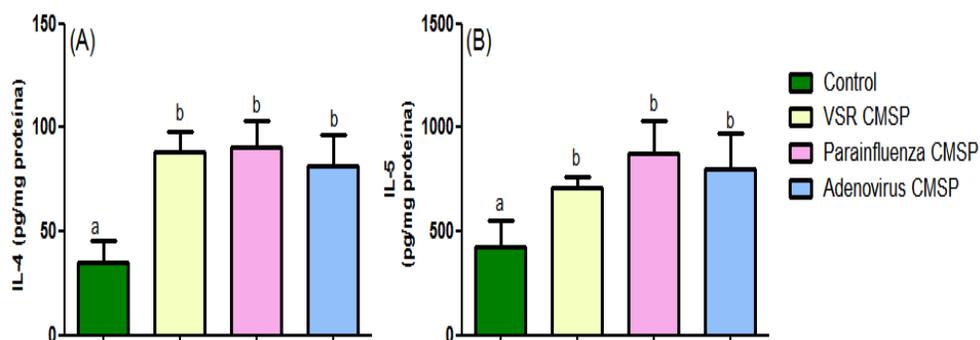


Figura 49. Efecto inductor de producción de citoquinas IL-4 (A) e IL-5 (B) por virus en células mononucleares adherentes cultivadas. VSR (n=14), parainfluenza (n=7), adenovirus (n=9), control (n=4). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

IV.3.3. Concentración de las quimioquinas MCP-1, IL-8 y RANTES en monocitos cultivados con virus

Al medirse el nivel de quimioquinas en el sobrenadante de los cultivos de células mononucleares, se pudo observar como hubo un incremento significativo ($p < 0,05$) en el poder inductor de producción de citoquinas MCP-1 por el VSR ($607,5 \pm 150,4$ pg/ mg proteína) y con parainfluenza ($559,0 \pm 149,6$ pg/ml), pero no cuando fueron realizados con adenovirus ($448,4 \pm 233,8$ pg/ mg proteína) al observarse diferencias con respecto al control ($272,1 \pm 36,85$ pg/ mg proteína) (**Figura 50**).

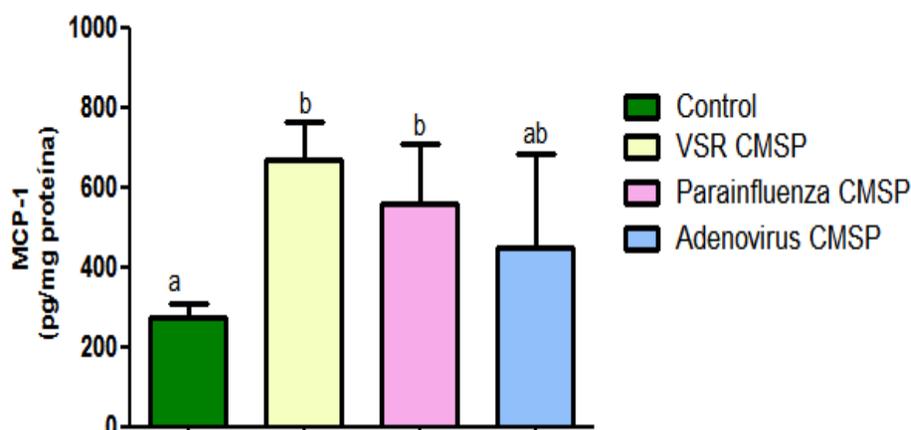


Figura 50. Efecto inductor de producción de citoquina MCP-1 por células adherentes circulantes de sujetos sanos inoculadas con virus. VSR (n=14), parainfluenza (n=7), adenovirus (n=9), control (n=4). Las concentraciones fueron determinadas por ELISA. Los datos representan $X \pm DE$ y analizadas con ANOVA y post-test de Bonferroni's. Letras diferentes entre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

No se observaron cambios en la producción de la IL-8 en cultivos con VSR ($978,0 \pm 239,4$ pg/mg proteína), parainfluenza ($1133,0 \pm 250,5$ pg/mg proteína) y adenovirus ($961,3 \pm 130,2$ pg/mg proteína) cuando se compraron con el grupo control ($648,1 \pm 164,4$ pg/mg proteína), ni tampoco entre los tipos de virus (datos no graficados).

No se observó efecto inductor en la producción de RANTES por monocitos cultivados con VSR (5227 ± 4142 pg/mg proteína), parainfluenza (4582 ± 3563 pg/mg proteína) y adenovirus ($718 \pm 123,4$ pg/mg proteína) cuando se compararon con el grupo control ($1439 \pm 139,8$ pg/mg proteína). Tampoco se observó ninguna diferencia en las concentraciones de RANTES entre los diferentes tipos de agentes virales (datos no graficados).

V. DISCUSIÓN

El desarrollo de la discusión de nuestros resultados, se realiza conforme al orden seguido en la presentación de los resultados.

V.1. Epidemiología de las infecciones respiratorias.

En Venezuela, las IRA's ocupan el primer lugar como causa de consulta médica como lo indica el boletín epidemiológico del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS, 2011). Estas patologías ocupan actualmente el 71,43% de los casos de enfermedades de mayor consulta. A pesar que la mayoría de casos reportados en el país son niños, los adultos también ocupan un porcentaje importante (25%) de esta población afectada.

En nuestro estudio se incluyeron pacientes adultos con IRA que eran asmáticos y no asmáticos. Debido al carácter traslacional del estudio con especial énfasis en la respuesta inmunitaria/inflamatoria sistémica asociada a la IRA, se seleccionaron enfermos en los que se minimizase el posible impacto de otras patologías asociadas. Se pretendió conseguir un grupo homogéneo de pacientes que no presentasen enfermedades o tratamientos que interfiriesen con el sistema inmunitario, por lo tanto, detectar el impacto de la IRA sobre el sistema de respuesta inmunitario. Así, del tamaño muestral analizado de 161 pacientes, sólo 43 (27%) reunieron los criterios de inclusión y no presentaban los de exclusión exigidos en nuestro estudio (43/161).

En relación con nuestro estudio, un aspecto relevante es el relacionado con las características biológicas del agente etiológico de las IRA's, y el patrón de afectación inflamatoria/sistémica asociado. Desde una perspectiva operativa, identificamos el agente etiológico de la IRA de nuestros pacientes, y se clasificó microbiológicamente como de origen viral, bacteriano y mixto (viral mas bacteriano). Las IRA's identificadas fueron clasificadas como neumonías, bronquitis y otros, incluyendo en este último grupo a los pacientes con IRA's de tracto respiratorio alto.

El tipo de agente microbiológico más frecuentemente encontrado como responsable de la IRA en el presente estudio fueron los virus, tanto en el grupo de asmáticos y no asmáticos; así como, en las formas clínicas de IRA (neumonía y bronquitis).

De los virus detectados en las muestras de nuestros pacientes, el VSR fue el principal agente causante de las IRA's. Estos hallazgos coinciden con estudios de **Sequeira et al. (1999)**, quienes afirman que el VSR fue el principal agente causal de las IRA's asociado a neumonía seguido por parainfluenza. Igualmente, **Bellizona et al. (2000)** en Uruguay, también describen al VSR como principal agente causal de las IRA's, pero seguido de adenovirus. Reportes mundiales coinciden en que el virus de influenza es el principal causante de neumonías, información que contrasta con los resultados de esta investigación. Igualmente, a diferencia de los actuales hallazgos, **Girón et al. (2005)**, aislaron parainfluenza, influenza y adenovirus como causantes primordiales de IRA en un estudio retrospectivo realizado en Venezuela entre 1998 a 2004. Sin embargo, en EEUU un estudio epidemiológico en adultos señaló a los agentes causales bacterianos como principales protagonistas de las neumonías agudas extrahospitalarias en adultos, señalando al *Streptococcus pneumoniae* como el principal agente causal (**Bantar et al., 2002**).

Los agentes virales como causa de neumonías extrahospitalarias está sub registrado en Venezuela, hay pocos datos epidemiológicos; sin embargo, se ha descrito que los virus influenza, parainfluenza y VSR como responsables de este tipo de neumonías, especialmente en pacientes susceptibles. Nuestros hallazgos son un poco atípicos en este aspecto, si se considera la cantidad de criterios de inclusión y exclusión utilizados, sin embargo, el número limitado de muestras, no permite concluir en relación a la frecuencia de agentes responsables de las IRA's extrahospitalarias en Venezuela, solo nos permitirá tener una idea global de la población con que se cuenta para el estudio de la respuesta inmunológica/inflamatoria producida por diferentes agentes etiológicos.

El relación a los pacientes con bronquitis del presente estudio, los virus aislados con mayor frecuencia fueron adenovirus seguido por VSR. Estos resultados coinciden con los de **Miller (1992)**, quien también afirma que el VSR y el adenovirus son los principales causantes de este tipo de infecciones. Sin embargo, **Gonzales y Sande (2000)** afirman que los virus específicos más frecuentemente asociados en orden de frecuencia con bronquitis aguda son influenza A y B, parainfluenza 3, VSR, coronavirus, adenovirus, y rinovirus. Otros investigadores también afirman que parainfluenza, VSR y adenovirus son los virus más frecuentemente aislados en los cuadros de bronquitis (**Belmonte et al., 2008**). Estos autores señalan como principal causa de bronquitis no complicada a agentes virales particularmente influenza; sin embargo, este virus fue detectado en apenas uno de los pacientes con IRA del tracto respiratorio alto.

Con respecto a la entidad clínica que denominamos “otros” (pacientes con faringitis, rinofaringitis, amigdalitis, rinitis, laringotraqueitis) en nuestro estudio, se encontró a VSR y adenovirus como causantes de estos cuadros. En una investigación realizada por **Monto y Lehmann (2001)** en hisopados provenientes de pacientes con faringitis, los autores coinciden con nuestros hallazgos.

Según podemos extraer de lo anterior, exceptuando lo observado en el grupo de pacientes clasificados como “otros”, la infección viral seguida de una infección mixta (viral más bacteriana); habla en favor del papel relevante que juegan los agentes virales en el curso de las neumonías y bronquitis. Investigaciones afirman que las IRA's suelen complicarse con sobreinfecciones bacterianas, los autores afirman que probablemente esta sea la causa de la mayor frecuencia de infección mixta que sigue a la infección viral (**Enciclopedia de Salud Pública, 2011**).

Las infecciones bacterianas ocuparon el último lugar como causante de IRA, lo cual sustenta los hallazgos que sugieren que la etiología bacteriana no juega un papel destacado en este tipo de infección. **Firman (2002)**, afirma que en la mayoría

de los casos (90%), las bronquitis agudas no complicadas presentan una causa no bacteriana.

En un resumen de múltiples estudios realizados en Europa, norteamérica y Oceanía sobre la etiología de la neumonía intra y extra hospitalaria, **Moreno y Riquelme (2005)**, describen al *Streptococcus pneumoniae* (16 – 22%), seguido por *Chlamydia pneumoniae* (14%) y en tercer lugar los virus como causa de neumonías extrahospitalarias (12%); en pacientes con neumonía intra hospitalaria los virus ocupan el segundo lugar (9,4%) después del *Streptococcus pneumoniae* (21,7%); sin embargo, es conveniente resaltar el papel relevante de los virus como agentes etiológicos responsables de las neumonías en los pacientes no hospitalizados de nuestro estudio.

Los agentes bacterianos aislados en el 18% de los pacientes, evidenciaron al *Streptococcus pneumoniae* como el primer agente causal de IRA con 31% de los casos, seguidos por *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus* beta hemolíticos. Los agentes gram negativos parecen estar asociados con alteración de los mecanismos inmunes provocados por desnutrición, cirugía y exposición a antibióticos, lo cual favorece la colonización de este tipo de bacterias en el ambiente orofaríngeo (**Rodríguez y Martínez, 2002**), factores que fueron considerados y excluidos en los pacientes incluidos en el presente trabajo.

En un estudio prospectivo realizado por **Garriste-Chevret (2002)**, se concluyó que la colonización de la orofaringe por bacterias gram negativas es un factor predisponente para el desarrollo de IRA's en el tracto respiratorio inferior. Dado los criterios utilizados para la selección de los pacientes para llevar a cabo la presente investigación podría pensarse que microorganismos como *Pseudomona aeruginosa* fueron adquiridos a través de los equipos de micronebulización utilizados para terapia respiratoria (**Maraví-Poma et al., 2000**), los cuales, en muchos centros de salud de la región son reutilizados, y los métodos de esterilización a los cuales son

sometidos, no son los más adecuados, lo cual podría estar favoreciendo la colonización faríngea de bacterias nosocomiales, de hecho el microorganismo fue detectado en uno solo de los pacientes con diagnóstico de faringitis.

Un grupo de pacientes, no fueron incluidos en este estudio debido a que presentaron negatividad tanto para el diagnóstico viral como bacteriano, probablemente debido al manejo no manifiesto del paciente con antibioticoterapia previa a la toma de muestra lo cual hizo difícil el aislamiento de agentes bacterianos; por su parte, otros virus como citomegalovirus y herpesvirus, pueden llegar a causar infección respiratoria seguida de un cuadro clínico primario, pero éstos no fueron incluidos.

Nuestros resultados aportan evidencias sobre el patrón etiológico de las IRA's en una pequeña población de Venezuela cuyas condiciones ecológicas, socioeconómicas y demográficas pudieran haber conllevado a este tipo de infección viral, que suele diagnosticarse principalmente en niños menores de 5 años y en adultos mayores de 65 años, según datos mostrados por la literatura nacional e internacional. Los principales factores de riesgo están determinados por la edad, residencia del paciente, condición social y comorbilidad. La condición socioeconómica muchas veces se convierte en un factor que influye e incidencia de enfermedades prevenibles. Al respecto se sabe que las IRA's son más frecuentes en grupos socioeconómicos bajos y en países en vías de desarrollo. El lugar geográfico y la estación del año cuando aumenta la incidencia de gripe y otras infecciones respiratorias, se produce un incremento de neumonías bacterianas secundarias.

Las IRA's virales o combinadas con bacterias también han sido detectadas en la mitad de los casos en adultos no inmunocomprometidos por **De Roux et al. (2004)**, los autores sostienen que las IRA's virales en adultos con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) podrían convertirse en un punto de partida para la comprensión cabal de la relevancia de los virus respiratorios en su etiología, pronóstico y manejo terapéutico.

Al analizar la frecuencia de agentes virales en adultos asmáticos y no asmáticos, también se encontró al VSR como el agente etiológico de mayor frecuencia en ambos grupos, seguido por adenovirus en el grupo de no asmáticos con casi igual número de casos. La presencia de VSR en adultos asmáticos también fue evidenciada por **Valero et al. (2005)** en una población venezolana de pacientes con IRA. Ciertas literaturas coinciden que el asma está asociada en adultos mayormente a rinovirus. Estudios señalan que aunque la detección y aislamiento de virus en adultos asmáticos varía ampliamente, la infección respiratoria viral es la causa más común de exacerbaciones de asma aguda (**Friedlander et al., 2005; Contoli et al., 2005**).

Otras investigaciones indican que, el asma bronquial incrementa la susceptibilidad de infecciones virales respiratorias haciendo que los individuos presenten más síntomas respiratorios combinado con reducción de la función pulmonar, evento que no se observa en individuos no infectados (**Martínez et al., 2005; Holts et al., 2005**). En este sentido, es difícil concluir que fue la infección viral lo que predispuso al asma o fue el asma de los individuos evaluados lo que los predispuso a la infección viral.

Pese a que los resultados de nuestro estudio indican que la infección bacteriana en asmáticos superó en porcentaje a la de los pacientes no asmáticos con IRA; el tamaño muestral incluido limita su posible significación. Sin embargo, hasta ahora no se han encontrado datos que enlacen la infección bacteriana con asma, y la información que existe es de mera asociación, sin haberse probado hasta ahora una relación de causalidad (**Álvarez y Álvarez, 2007**).

V.2. Respuesta inflamatoria sistémica en IRA. Asociaciones clínicas y etiológicas.

En nuestro trabajo hemos pretendido investigar el patrón e intensidad de la respuesta inflamatoria/sistémica producida por una IRA en un sujeto sin patología asociada. Los mecanismos implicados en la inducción de la respuesta inflamatoria a una infección son diversos y se relacionan con las características del germen causal, localización y carga microbiológica, y la capacidad de respuesta del huésped.

Teniendo en cuenta esas premisas, en el análisis de la respuesta del sistema inmune inflamatorio a un agente infeccioso, es importante identificar las fases de desencadenamiento y activación inmunitaria con generación de células efectoras antiinfecciosas y la infiltración del tejido afectado por las células inmunocompetentes e inflamatorias. Por lo tanto, decidimos estudiar a nivel circulante, las citoquinas IL-1 β y el TNF α , que se consideran claves en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Con el objetivo de conocer la relevancia de las características del sistema inmune del huésped, seleccionamos citoquinas marcadoras del patrón de diferenciación Th2 (IL-4 e IL-5). Finalmente, como quimioquinas extremadamente relevantes en la regulación del proceso e infiltración tisular inflamatoria, decidimos cuantificar los niveles de IL-8, el MCP-1 y el RANTES. Además, incluimos en el estudio de forma comparativa a pacientes con asma y sin ella.

V.2.1. Citoquinas proinflamatorias.

Nuestros resultados, claramente demuestran que la IRA se asocia a una intensa respuesta sistémica con elevación de los niveles circulantes de IL-1 β y TNF α . Debe señalarse que globalmente en este síndrome la intensidad de la respuesta sistémica de estas citoquinas proinflamatorias es similar en pacientes asmáticos y en lo que no lo son. Por lo que, no se puede inferir que la condición subyacente de esta patología sea determinante de la respuesta sistémica/inflamatoria.

En vista de lo anterior, se analizó la producción de IL-1 β provocada por los agentes infecciosos en los pacientes asmáticos para compararlos con los no asmáticos, y se observó que la infección viral parece tener el mayor efecto inductor en la producción de IL-1 β cuando los pacientes eran asmáticos, dado que dicha concentración estuvo incrementada en el suero de estos pacientes tanto cuando presentaron infección viral como mixta. Una respuesta similar se observó en no asmáticos. Lo anterior es indicativo de que el asma no parece determinar la respuesta inmunitaria sistémica, mediada por IL-1 β , provocada por los virus, en los pacientes con IRA.

A diferencia de los resultados obtenidos con IL-1 β , a pesar de que se observaron niveles séricos de TNF α incrementados con respecto al control normal en los pacientes asmáticos, la infección viral no provocó una producción de TNF α sérico superior a la observada en las infecciones bacterianas. Por el contrario, en pacientes no asmáticos, la infección viral se asoció a un mayor e intenso aumento de los niveles circulantes de esta citoquina con respecto a la producida por la de etiología bacteriana. Además, se cuantificaron los niveles de TNF α circulantes en pacientes asmáticos con infección viral, y fueron significativamente inferiores a los observados en los no asmáticos.

Las células epiteliales bronquiales son las dianas esenciales de infección y replicación viral. Están involucradas en la producción e inflamación de las vías aéreas con generación de la respuesta inflamatoria y la consiguiente producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y otros mediadores inmunológicos (Holgate et al., 2006). Este evento debe participar de forma crítica en la inducción de la respuesta sistémica con elevación de los niveles circulantes de IL-1 β y TNF α . Sin embargo, no es posible establecer si las células productoras de estas citoquinas son las residentes o las que infiltran el tejido inflamado bronquial y/o son células inmunitaria/inflamatorias de otras localizaciones, estimuladas por posibles partículas virales o como consecuencia de la recirculación leucocitaria. Está demostrado el

efecto tan importante que ejerce el $TNF\alpha$ en la bronquitis (**Mukhopadhyay et al., 2006**); pero, otros estudios afirman la poca participación que tiene esta citoquina en el curso de neumonías (**De Werra et al., 1997**).

El patrón diferencial de comportamiento de estas dos citoquinas en las infecciones virales en asmáticos y no asmáticos, es un hecho biológico que pone de manifiesto la relevancia del huésped en la interacción con los gérmenes y la posible anomalía de la inmunorregulación que presentan los sujetos asmáticos.

Existen estudios que sostienen que la $IL-1\beta$ sérica está incrementada en pacientes con asma alérgica (**Thomas y Chhabra, 2003**). También **Zhang et al. (2007)** hallaron $IL-1\beta$ aumentada en lavados broncoalveolares de pacientes asmáticos, y consideran que desempeña una función patogénica relevante.

Puesto que en los análisis estadísticos se utilizó el pool de virus (tanto VSR, como parainfluenza y adenovirus) para evaluar las variaciones séricas de las citoquinas proinflamatorias, quisimos investigar en los pacientes la respuesta sistémica provocada por cada virus en particular, y no se observaron diferencias en las concentraciones de las citoquinas proinflamatorias séricas. Esto indica, que la intensidad de la eficacia de la respuesta sistémica inflamatoria generada por la infección respiratoria provocada por estos virus, es similar en términos cualitativos, y no se identifican diferencias biológicas relevantes.

Yasuda et al. (2005) encontraron que los virus parainfluenza, adenovirus; así como los enterovirus identificados en un grupo de pacientes asmáticos están implicados como causantes de exacerbación del asma aguda, y en la producción de mediadores químicos que inducen inflamación y broncoespasmo. Cabe resaltar que una limitación de la presente investigación la constituyó el hecho de no contar con suficiente cantidad de muestras, para evaluar por separado la producción de

citoquinas por los diferentes virus en los grupos de asmáticos y compararlos con los no asmáticos.

En relación a las infecciones bacterianas como causas de IRA's, debe señalarse que la respuesta sistémica inflamatoria muestra un patrón diferente que el observado en los procesos virales. Se objetiva aumento de $TNF\alpha$ pero no de $IL-1\beta$. Además, los niveles observados de $TNF\alpha$ son significativamente inferiores a los cuantificados en los pacientes con procesos virales. Hay estudios que afirman que la concentración de $TNF\alpha$ e $IL-6$ se mantienen normales en pacientes con neumonía bacteriana (De Werra et al., 1997). Este comportamiento diferente, sugiere que la intensidad de la respuesta inflamatoria es distinto y desde luego, su repercusión sistémica en términos de citoquinas proinflamatorias. La causa de ese mecanismo desigual, no se puede establecer, pero se podría relacionar con diferentes patrones de activación monocitaria y linfocitaria T, así como, con su recirculación y/o paso de partículas virales o bacterianas al torrente sanguíneo. La condición de padecer asma, determina un comportamiento diferente a las infecciones virales, observándose una respuesta sistémica similar en los niveles de $IL-1\beta$, pero un marcado aumento en los de $TNF\alpha$.

Pese que investigadores afirman que la relación entre las infecciones bacterianas y el asma no parece tener un vínculo tan estrecho como las infecciones virales (Ogra, 1989), existen poco estudios donde se comparen las variaciones de las citoquinas proinflamatorias séricas en pacientes con asma que presenten las tres modalidades de infección (viral, bacterino y mixto) que se contemplaron en este estudio. En una investigación realizada por Wang et al. (1999) los autores consiguieron concentraciones de $TNF\alpha$ más altas en pacientes con neumonía bacteriana que en pacientes con VSR.

V.2.2. Citoquinas del patrón Th2 (IL-4, IL-5).

Desde una perspectiva de comprensión biológica de la respuesta inmune inflamatoria a las IRA's, es relevante estudiar no solo las citoquinas implicadas en la respuesta innata, y en el desencadenamiento de la adaptativa, si no también, las que participan en los procesos de amplificación y activación clonal y linfocitaria. Por lo tanto, decidimos estudiar los niveles séricos de citoquinas que participan en la respuesta linfocitaria adaptativa a T.

En este interés por la caracterización de la respuesta sistémica de la IRA estratificada por el tipo de agente etiológico, el síndrome anátomo/clínico establecido, consideramos relevante investigar la participación del huésped en su modulación. Por este motivo, estratificamos los pacientes por padecer o no asma. Es conocido que la condición de asmático está asociada a un patrón preferencial Th2 en estos enfermos con incremento de la IL-4 primordialmente (Barnes, 2001). Por lo tanto, era relevante conocer si la estimulación inflamatoria infecciosa de naturaleza vírica y/o bacteriana, determinaba una diferente respuesta sistémica en función del subyacente uso preferencial de la vía Th2.

Nuestros datos demuestran que los niveles circulantes de IL-4 e IL-5 aumentan significativamente durante la IRA sin detectarse diferencias significativas asociadas al agente causal, síndrome anátomo/clínico padecido, o condición de asmático.

Las investigaciones sostienen que las infecciones virales (por ejemplo con VSR) en pacientes asmáticos desvían la respuesta a Th2 mediada por IL-4 (Stanciu et al., 2005). Al respecto, Zhang et al. (2010), en un estudio realizado en esputo de adultos asmáticos infectados con agentes virales (VSR, influenza, parainfluenza), concluyeron que las exacerbaciones de asma inducidas por las infecciones virales, desvían la respuesta inmunitaria a Th2 por deterioro de la respuesta inmunitaria antivírica Th1. A pesar que la mayoría de los casos diagnosticados en nuestra investigación presentaron infección con VSR, no se evidenció esta tendencia tal vez

debido al número de muestras analizadas o al hecho de que en una respuesta sistémica la cantidad de factores involucrados pueden contribuir a las diferencias observadas con respecto a los estudios realizados por estos autores.

Existen pocos ensayos sobre medición de citoquinas séricas en adultos con IRA's con infecciones virales, bacterianas y mixtas, por lo cual, no se pudieron comparar nuestros hallazgos. Por otra parte, en nuestros ensayos no se incluyeron citoquinas representantes de la subpoblación Th1 como por ejemplo el IFN γ por razones de disponibilidad de reactivos que permitieran concluir en relación al balance Th1/Th2 que inicialmente fue uno de los objetivos de esta investigación.

Cabe destacar que los individuos asmáticos que participaron en el estudio eran atópicos identificados por historia clínica (personal y familiar), y existen estudios que afirman que los macrófagos alveolares tienen influencia sobre la producción de IL-5 en asmáticos atópicos pero no en los no atópicos (Tang et al., 1998; Pené et al., 1994), lo que pudiera explicar la respuesta Th2 en los pacientes asmáticos no tan marcada como pudiera obtenerse en casos de asma atópica; aunque existen autores que afirman que es posible conseguir niveles séricos elevados de IL-5 e IL-4 en pacientes atópicos como no atópicos con patologías respiratorias (Joseph et al., 2004). De hecho en nuestro estudio se observó una correlación positiva entre ambas citoquinas.

Varias investigaciones sugieren, que aunque la activación de los mastocitos por alergenos estimula la síntesis local de IgE, a partir de antígenos captados por los linfocitos B que promueven la liberación de citoquinas como IL-4 e IL-13; este mecanismo es importante en el asma intrínseca o no atópica donde los niveles locales de IL-4 e IL-13 también son elevados. Además, la presencia de receptores para IgE en biopsias bronquiales de pacientes con asma intrínseca, así como, la relación existente entre los niveles de IgE total y la prevalencia del asma, han llevado a postular que todas las formas de asma están en alguna medida relacionadas a la IgE (Humbert et al., 1996). No obstante esta afirmación, en el análisis de correlación estadística realizada en la presente investigación, no se visualizó correlación positiva

entre IgE con IL-4, esta última involucrada en el cambio de switch a IgE (Murphy et al., 2010); lo que pudiera sugerir que la ausencia de atopía en los pacientes estudiados explicarían la falta de incremento de IgE en los pacientes asmáticos con respecto al control (resultados no graficados).

V.2.3. Quimioquinas: MCP-1, RANTES e IL-8

En el desarrollo de nuestro trabajo consideramos también relevante el comportamiento biológico de quimioquinas implicadas en la regulación del proceso de tráfico e infiltración leucocitaria del tejido inflamado. Nuestros datos ponen de manifiesto un comportamiento no homogéneo de las quimioquinas que regulan el tráfico leucocitario de granulocitos, linfocitos y/o células monocitarias. Así, no se observa ningún impacto de la infección de la IRA en los niveles circulantes de IL-8; sin embargo, el padecer síndrome anatómico/clínico neumónico, produce un significativo incremento de MCP-1 y RANTES.

De forma interesante, y coincidente con lo observado con citoquinas proinflamatorias, la intensidad de la repercusión sistémica es mayor en los pacientes que sufren una infección viral; por lo tanto, se refuerza el carácter sistémico de los procesos infecciosos respiratorios de etiología viral. La condición de asmático también conlleva a una mayor intensidad de esta respuesta.

La forma clínica de IRA neumonía, resultó incrementar los niveles circulantes de MCP-1 y RANTES; no se observó incremento en IL-8 en el grupo de pacientes de este estudio.

La infección viral en los pacientes evaluados, podría ser una desencadenante del incremento de las quimioquinas RANTES y MCP-1 en pacientes con neumonía; mientras que en los pacientes con bronquitis el mayor incremento sérico de estas quimioquinas se observó en la población con infección mixta (coinfecciones). Este

incremento sistémico de quimioquinas ha sido descrito en pacientes pediátricos con IRA provocada por VSR (Sung et al., 2001; Patel et al., 2009). Además, se ha referido la participación de diversas quimioquinas como moléculas características del proceso patológico durante las infecciones virales, por lo que se ha establecido que éstas son directamente responsables de la inflamación típica de estos tipos de afección respiratoria (Myyou et al., 2000).

Así mismo, Roger et al. (2004) sostienen que los virus respiratorios inducen y potencian la inflamación de las vías aéreas, efecto que está relacionado con la inducción de mediadores proinflamatorios tales como IL-8 e IL-6. Esto no se evidenció en la presente investigación, en el cual no se encontraron respuestas significativas de IL-8 ni cuando se comparó a los pacientes con IRA's, con algún tipo de infección (viral, bacteriana o mixta) o con la patología asmática.

En razón de lo anterior, parece estar bien establecido el papel de las infecciones virales en el incremento de las quimioquinas séricas y nuestro estudio aporta evidencias que apoyan estos hallazgos. La importancia de los mismos, radica en que la mayoría de los estudios que se han realizado utilizan niños como población de estudio, y el establecimiento de la respuesta inmuno/inflamatoria en adultos no inmunocomprometidos no parece estar aún bien establecida.

En nuestros ensayos se objetivó como la presencia de asma en los pacientes con IRA's (neumonía y bronquitis) ocasionó un incremento sérico de MCP-1 y RANTES. Investigaciones realizadas por otros investigadores han demostrado que MCP-1 juega un papel crítico en las primeras etapas de la respuesta inflamatoria, porque además de reclutar monocitos y macrófagos en las vías respiratorias, actúa contra la corriente del proceso inflamatorio y es un fuerte candidato para regular la expresión de otras quimioquinas (Gonzalo et al., 1998); además esta citoquina ha estado involucrada en la fisiopatología del asma puesto que estudios en humanos han demostrado que el asma incrementa la expresión de MCP-1 (Souza et al., 1994; Holgate et al., 1997). Por otra parte, varios tipos de células presentes en las vías aéreas

de los asmáticos (macrófagos, células T, células del músculo liso de las vías aéreas y células epiteliales), tienen la capacidad de generar quimioquinas, entre ellas el MCP-1. Esto pudiera ser la razón del incremento del MCP-1 y RANTES sérico en los pacientes asmáticos de esta investigación, hecho que acentúa ante la presencia de infección viral.

No se encontraron estudios en adultos, pero investigaciones realizadas por **Chin-Kan et al. (2009)** en una población infantil con asma aguda y crónica coinciden con nuestros resultados cuando encontraron mayor concentración sérica de MCP-1 en pacientes asmáticos cuando fueron comparados con los controles no asmáticos; igual observación hicieron **Chan et al. (2009)** cuando compararon pacientes pediátricos con asma asintomática vs grupo control sin asma; sin embargo, estudios realizados por **Keszei et al. (2006)** en una población infantil con asma en la cual se midieron los niveles séricos de MCP-1, objetivaron una disminución en la concentración de esta citoquina en los pacientes asmáticos con relación al control; pero cuando compararon los pacientes con tratamiento para el asma con los que no lo tenían, no observaron diferencias significativas, por lo cual suponen que el tratamiento esteroideo no puede ser la causa de la menor cantidad circulante de MCP-1 en estos asmáticos. La diferencia de estos resultados con los nuestros pudiera atribuirse a la ingestión eventual de corticosteroides inhalados en los pacientes pediátricos, dado que estos medicamentos inhiben la expresión de quimioquinas, incluyendo el MCP-1 (**Nickel et al., 1999**); nuestros pacientes debido al rigurosos criterios de exclusión no estuvieron recibiendo tratamiento de este tipo durante el estudio; por otra parte, la edad de los pacientes es otro factor importante a considerar, puesto que, la respuesta inmunitaria suele diferir entre pacientes pediátricos y adultos.

Ya ha sido descrito el incremento de la concentración de RANTES en pacientes pediátricos con IRA viral causada por VSR (**Kawasaki et al., 2006**); otros autores han evidenciado incremento de IL-4, IL-5, RANTES e ICAM-1 en suero de pacientes

pediátricos con IRA viral; pero no se encontraron estudios de este tipo en población adulta.

Existen investigaciones que describen el incremento sérico de IL-8 en pacientes con asma principalmente, atópica (Shutte et al., 1997). Pese a estar demostrada la función de la IL-8 como quimioattractante de neutrófilos y a diferencia de estos autores, en el presente ensayo no se observó variación en la concentración de IL-8 cuando se evaluó la condición de asma, el tipo de infección o tipo de IRA en estos pacientes.

La morbilidad y mortalidad de las IRA's están siempre asociadas a complicaciones causadas por una respuesta exagerada de citoquinas y quimioquinas (Lam y Wong, 2006), razón por la cual, el tratamiento dirigido a la inhibición de la producción de las citoquinas y quimioquinas implicadas en la IRA's complicadas con infecciones virales o cuadros asmáticos podría contribuir a la mejora del cuadro respiratorio.

V.3. Efecto inductor de los virus aislados de los pacientes sobre la producción de citoquinas en cultivos de células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos

Los macrófagos alveolares están presentes en gran cantidad en las vías aéreas (Calhoun et al., 1994), y los monocitos circulantes son la fuente de esos macrófagos alveolares, por lo que se estimó conveniente analizar la producción de citoquinas en cultivos de células mononucleares de sangre periférica, para evaluar la respuesta inflamatoria mediada por la producción de citoquinas en estas células estimuladas por los virus aislados de los mismos pacientes con IRA.

Así, se realizó un cultivo utilizando monocitos humanos los cuales fueron inoculados o infectados con VSR, parainfluenza, influenza y adenovirus aislados de

los mismos pacientes que participaron en el estudio. Los resultados indican que independientemente del tipo de agente viral infectante, la respuesta de producción de citoquinas IL-1 β y TNF α es similar, ya que las dos citoquinas proinflamatorias observaron un incremento significativo con respecto al control. Comparando con lo obtenido a nivel sistémico, la respuesta fue similar; es decir, las concentraciones séricas de IL-1 β en los pacientes infectados con los diferentes virus estuvieron incrementadas en comparación con el control sano. A pesar que las células mononucleares de sangre periférica utilizadas para el ensayo *in vitro* de este trabajo no procedieron de los mismos pacientes evaluados, el modelo pudiera reflejar el papel relevante que juegan las células mononucleares como productoras de citoquinas proinflamatorias, lo cual explicaría el incremento de éstas durante las IRA's cuando el agente causal es un virus.

Similar a las citoquinas proinflamatorias, los diferentes virus fueron capaces de inducir la producción de IL-4 e IL-5 en los cultivos de células mononucleares *in vitro*, hallazgo que también coincide con lo observado a nivel sistémico, a excepción del virus parainfluenza que no indujo incremento sérico de IL-4 con respecto al control, el resto de los virus si lo hicieron para estas dos citoquinas. Estos hallazgos sorprenden un poco por el hecho que es conocido que las principales células productoras de IL-4 e IL-5 son los linfocitos TCD4 subpoblación Th2, los mastocitos y los basófilos. Sin embargo, habla a favor del papel que pueden tener los monocitos circulantes en la producción de estas citoquinas, sobre todo, si consideramos que estos monocitos son fuente de macrófagos alveolares a nivel pulmonar (Thacker, 1997).

Numerosos estudios han demostrado la liberación de RANTES y MCP-1 en pacientes con infección respiratoria provocada por virus (John et al., 2003; Casola et al., 2001; Noah y Becker, 2000). En los presentes ensayos, tanto VSR como parainfluenza indujeron la producción de MCP-1 en las células mononucleares de sangre periférica, entre tanto que para RANTES e IL-8 no se observó ninguna respuesta. A diferencia de estos hallazgos, estudios *in vitro* realizados por Becker et al. (1991) han demostrado que tanto las células epiteliales como los macrófagos infectados con VSR secretan

altas concentraciones de IL-8. A nivel sistémico, sólo el VSR provocó un incremento de MCP-1 y RANTES; y al igual que *in vitro*, la producción de IL-8 tampoco fue objetivada.

A diferencia de las citoquinas mencionadas anteriormente (proinflamatorias y Th2), en este caso, el modelo *in vitro* no parece sustentar la participación relevante de las células mononucleares en el proceso inflamatorio mediado por RANTES e IL-8 durante la infección viral por VSR, parainfluenza y adenovirus; pero si para MCP-1 en pacientes con infección por VSR y parainfluenza. Esto pudiera sugerir la contribución parcial de los monocitos circulantes en los niveles séricos de MCP-1, puesto que la principal producción de estas citoquinas ha sido reportada en macrófagos y células epiteliales de las vías aéreas (Becker y Soukup, 1999).

Tomado en conjunto, nuestros datos indican que la IRA tiene una relevante repercusión sistémica a nivel del sistema inmune inflamatorio. Debe señalarse que los pacientes incluidos en nuestro estudio, no presentaron criterios de severidad como para requerir el ingreso hospitalario, y ninguno presentó una complicación que lo provocase durante la fase de tratamiento, ni existió ningún caso de mortalidad. Por lo tanto, esta repercusión es evidente, incluso en pacientes con cuadros no graves. También es interesante señalar que las características biológicas de esta repercusión sistémica, presentan ciertas particularidades relacionadas con el factor etiológico, siendo más intenso en las de causa viral. Nuestro estatus, además demuestra que los virus causantes de la IRA son capaces de provocar una intensa activación de CMSP con aumento de la producción de citoquinas y quimioquinas analizadas *in vivo* en los pacientes. Por lo tanto, la mencionada mayor intensidad de respuesta sistémica en la IRA de causa infecciosa, pudiera deberse a un paso de partículas virales a sangre periférica (viremia).

La relevancia del huésped en la respuesta, no parece estar condicionada de forma significativa por la condición de ser asmático. Es decir, la intensidad del estímulo infeccioso es capaz de provocar una respuesta inmuno/inflamatoria

sistémica similar en pacientes asmáticos y no asmáticos superando el posible condicionamiento Th2 que operan en los primeros.

La intensidad de la respuesta sistémica y de la producción de mediadores, puede suponer el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que inhiban a estas moléculas y disminuyan su repercusión general.

Por otra parte, se hace relevante, complementar lo encontrado en las células mononucleares de sangre periférica de los mismos pacientes que intervienen en el estudio, para establecer un patrón de respuesta mediado por citoquinas, de forma de tener un mejor entendimiento de la fisiopatología de la infección respiratoria aguda donde participen virus, bacterias o coinfecciones (infección mixta).

VI. CONCLUSIONES

Del estudio sobre los niveles séricos de citoquinas IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-5, MCP-1, RANTES e IL-8 en pacientes con IRA de etiología viral, bacteriana o mixta, asmáticos y no asmáticos, se concluye que:

1. Se produce una respuesta sistémica con elevación de los niveles circulantes de IL-1 β y TNF α , que no está determinada por la localización bronquial o alveolar de la infección, y es más intensa en las de causa viral. Se asocia también a un incremento de los niveles séricos de IL-4 e IL-5 que no está determinada por la localización bronquial o alveolar, ni por la naturaleza vírica o bacteriana de las infecciones.
2. La intensidad y el patrón de respuesta sistémica con elevación de IL-1 β , TNF α , IL-4 e IL-5 en pacientes con IRA, no se modifica de forma biológicamente relevante por la condición de asmático del paciente.
3. Se produce una respuesta sistémica con elevación de los niveles circulantes de quimioquinas MCP-1 y RANTES, y normalidad de los IL-8, que se observa de forma selectiva en los pacientes asmáticos, y de forma preferente, en los de etiología viral de la infección.
4. La inoculación de los virus causales de la IRA's a cultivos de células mononucleares, induce la producción de citoquinas IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-5 y selectivamente de la quimioquina MCP-1, sin objetivarse la de IL-8 y RANTES.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A.K, Lichtman A.H., Pillai, S. 2009. Citoquinas en: Inmunología celular y molecular. Elsevier. 267-301.
2. Abbas Am Lichtman A, Pover J. Cytokines in : Cellular and Molecular Immunology. Ed. Saunders 1997, 250-276.
3. Aberle JH, Aberle SW, Dworzak MN, Mandl CW, Rebhandl W, Vollnhofer G. 1999. 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 – 1268.
4. Aberle JH, Aberle SW, Rbhandl W., Pracher E. Kundi M, Popow-Kraupp T. Decreased inferferon-gamma response in respiratory syncytial virus compared to other respiratory viral infection in infants. *Clin Exp Immunol.* 2004;.137(1): 146 -150.
5. Abreu Suárez G. Infecciones Respiratorias Agudas. *Rev. Cubana Med. Gen. Integr* 1999; 7 (2): 129-140.
6. Alcorn MJ, Booth JL, Coggeshall KM, Metcalf JP. Adenovirus type 7 induces interleukin-8 production via activation of extracellular regulated kinase. *Viol.* 2001; 75(14): 6450 – 6459.
7. Álvarez CF, Álvarez BF. Protocolo de patología respiratoria. Asma e infecciones. Relaciones y Controversias. *Bolt Pediatr.* 2007; 47 (Supple 2): 62-71.
8. Arocha F, Parra K. Flora Bacteriana orofaríngea en pacientes asmáticos de la Ciudad de Maracaibo, Venezuela. *Invest Clin.* 2002; 43: 145-155.
9. Arnold R., Koning W. Respiratory Syncytial Virus infection of human lung endotelial cells enhances selectively intercelular adhesión molecule-1expression. *The Journal of Immunology.* 2005; 164: 7359 – 7367.
10. Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin- 4-expressing cells. *Eur J Immunol.* 1994; 4:1097-2101.
11. Banchereau J, Ryback ME Interleukin 4. En The cytokine handbook 2nd ed Academic press, New York 1994. p 99-127.
12. Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Phoofolo M, Center DM, Cruikshank WW, Weller PF. IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling. *J Immunol.* 2002; 168(9): 4756 – 4763.
13. Bantar C, Bavestrello L. Neumonía Aguda Adquirida en la Comunidad en Adultos: Recomendaciones para el Tratamiento Antibacteriano Inicial a Partir de la Evidencia Local del Grupo de Trabajo de Sudamérica (ConsenSur). *J Chemotherapy.* 2002; 14(Supl 4):1-24
14. Barends M, de Rond LG, Dormans J, van Oosten M, Boelen A., Neiiens HJ, Osterhaus AD, Kimman TG. Respiratory syncytial virus,

- pneumonia virus of mice, and influenza A virus differently affect respiratory allergy in mice. **Clin Exp Allergy**. 2004; 34(3): 489 – 496.
15. Barnes PJ. Th2 cytokines and asthma: an introduction. **Respir Res**. 2001; 2(2): 64–65.
 16. Batista M, R, Feal Cañizales P. Las inyecciones respiratorias agudas. Un problema siempre emergente. **RESUMED**. 1988; 11(2): 63-66.
 17. Batista Moliner R, Feal Cañisares P. Las infecciones respiratorias agudas: un problema siempre emergente. **Resumed** 1998; 11(2): 63-69.
 18. Beaver, P, Jung Clifton, r, Cupp Wayne E. 2000. Microbiología Clínica. P. 300-315. 2da Edic. Salvat Editores.
 19. Becker S., Soukup JM. Airway epithelial cell-induced activation of monocytes and eosinophils in respiratory syncytial viral infection. **Immunobiology**. 1999; 201: 88-106.
 20. Becker S, Quay J, Soukup J. Cytokine (TNF, IL-6, IL-8). production by respiratory syncytial virus infected human alveolar macrophages. **J Immunol**. 1991; 147: 4307-4312.
 21. Belmonte MPI, Bernal D S, Chacón O. Bronquitis Aguda. **Rev Paceyña Med Fam**. 2008; 5(8): 79 – 83.
 22. Bloch M, Soundy J; Guzman AA. Las infecciones respiratorias agudas en el adulto. Morbilidad. Mortalidad. **Rev. Inst. Invest. Méd**. 1981, 10(1): 68-89.
 23. Boletín Epidemiológico N° 3. MSAS. Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Epidemiología. División de Epidemiología- VSR: Aislamiento según tipo en el área Metropolitana de Caracas. INH. Rafael Rangel. Jul – Dic 1996 y Enero 1997.
 24. Bonville CA, Rosenberg HF, Domachowske JB. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and RANTES are present in nasal secretions during ongoing upper respiratory tract infection. **Pediatr Allergy Immunol.** 1999; 10(1): 39 – 44.
 25. Booth JL, Coggeshall KM, Gordon BE, Metcalf JP. Adenovirus type 7 induces interleukin-8 in a lung slice model and requires activation of Erk. **J virol**. 2004; 78(8): 4156 – 4164.
 26. Booth L, Metcalf JP. Type-specific induction of interleukin-8 by adenovirus. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 1999; 21(4):521 – 527.
 27. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J et al. IL-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. **J Allergy Clin Immunol**. 1996; 97: 1288-1296
 28. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand J Clin Lab Invest**. 1968; 21(97):77.
 29. Bradley JP, Bacharier LB, Bonfiglio J, Schechtman KB, Strunk R, Stork G, Castro M. Severity of respiratory syncytial virus bronchiolitis is affected by cigarette smoke exposure and atopy. **Pediatrics**. 2005; 115(1): 7 – 14.
 30. Briceño E, Suárez E, Michelangeli C, Feliciangeli D, Otaiza E, Mendible JC, Villalón ME, Aguilera

- M, Ceballo H, Godoy J, Camilloni C. Código de Biotética y bioseguridad. Ministerio de Ciencia y Tecnología (FONACIT). Segunda Edición. 2002. Disponible en: <http://www.miproyecto.gov.ve/anexos/bioetica.pdf> (citado en feb 20 del 2011).
31. Campbell, J., Butcher E. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr. Op. Immunology*. 2000; 12: 336 – 341.
32. Calhoun WJ, Dick EC, Schwartz LB, Busse WW. A common cold virus, rhinovirus 16, potentiates inflammation after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *J Clin Invest*. 1994; 94: 2200 – 2208.
33. Cantoni LA, Giménez CA, Alaníz RB, Ugalde CB, Toloza JB, Cardoso ML, Cuns GR, Agrelo RS, Scarone VS. Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. Selección, recolección, conservación y transporte. Departamento de laboratorio clínico. Repartición microbiología. Hospital de clínicas. Facultad de Medicina. Montevideo – Uruguay. 2004. Disponible en: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/laboratorio.pdf> (citado en marzo 20 del 2011).
34. Cannon JG, Angel JB, Abad LW, Vannier E, Mileno MD, Fagioli L, Wolff SM, Komaroff AL. Interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor antagonist, and soluble interleukin-1 receptor type II secretion in chronic fatigue syndrome. *J Clin Immunol*. 1997; 17(3):253-261.
35. Casola A, Garofalo RP, Heberle H, Elliott TF, Lin R, Jamaluddin M, Brasier AR. Multiple eis regulatory elements control RANTES promoter activity in alveolar epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *J Virol*. 2001; 75: 6428-6439.
36. Chamorro G. Síntomas y Signos Cardiorrespiratorios. En: Goic A., Chamorro G., Reyes H. Semiología Medica 2ª ed. Santiago: Técnicas Mediterráneo; 1999. p. 111-132.
37. Chan CK, Kuo ML, Yeh KW, Ou LS, Chen LC, Yao TC, Huang JL. Evaluación secuencial de la proteína quimiotáctica de monocitos un suero entre Estado asintomáticos y exacerbación aguda y remisión del asma en niños. *J Asthma*. 2009; 46 (3): 225 - 228
38. Chen Z.M., Mao J.H., Du L.Z., Tang Y.M. Association of cytokine responses with disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *Acta Paediatr*. 2002; 91(9):914 – 922.
39. Chin-Kan Ch, Ming-Ling K, Kuo-Wei Y, Liang-Shiou O, Li-Chen Ch, Tsung-Chieh Y, Jing-Long H. Sequential Evaluation of Serum Monocyte Chemotactic Protein 1 Among Asymptomatic State and Acute Exacerbation and Remission of Asthma in Children. 2009, *J Asthma*. 46(3): 225 – 228.
40. Chiparelli H, Russi JC, Martorell JR, Arbiza E, Hortal M. Comparación entre la inmunofluorescencia y el ensayo inmunoenzimático para el

- diagnóstico del virus sincicial respiratorio en secreciones nasofaríngeas. *Rev Arg Microb.* 1988.; 20 (4): 201-204.
41. Churg KF. Chemokines in: Astma. Barnes PJ, Grunstein MM, Left AR, Woolcock AJ. ed Lippincott-Raven 1997. 673-679.
42. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125 (2): S53 – S72.
43. Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, Smithies O. Requirement of MIP-1 α for an inflammatory response to viral infection. *Science.* 1995; 269:1583 – 1585.
44. Contoli M, Caramori G, Mallia P, Johnston S, Papi A. Mechanisms of respiratory virus-induced asthma exacerbations. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35(2):137-145.
45. Corne JM, Marshall C, Smith S, Schreiber J, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL. Frequency, severity and duration of rhinovirus infection in asthmatic and non asthmatic individuals a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2002;. 359: 831 – 834.
46. Delves P, Roitt I (eds). 1998. Encyclopedia of Immunology. 2nd Ed. San Diego: Academic Press
47. De Roux A, Marcos MA, García E, Mensa J, Ewig S, Lode H, Torres ACh. 2004. Neumonía comunitaria viral en adultos no inmunocomprometidos. *Rev Chil Infect.* 21 (3): 232-237.
48. De Werra I, Jaccard C, Corradin SB, Chioleró R, Yersin B, Gallati H, Assicot M, Bohuon C, Baumgartner JD, Glauser MP, Heumann D Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med.* 1997; 25(4):607-13.
49. Diaz PV, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendano LF, Gaggero A., Simon V, Arredondo SM, Pinto R., Diaz A. Differential effect of respiratory syncytial virus and adenovirus on mononuclear cell cytokine responses. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(4): 1157 – 1164.
50. Dörner T, Radbruch A. Antibodies and B Cell Memory in Viral Immunity. *Immunity.* 2007; 27(3): 384-392.
51. Dinarello CA, Wolf SM, The role of Interleukin-1 in disease. *N Eng J Med.* 1993; 328: 106-13.
52. Duff AL, Porneranz ES, Gelber LE. Risk factors for acute wheezing in infants and children: Viruses, passive smoke and IgE antibodies to inhalant allergens. *Pediatrics.* 1993; 92: 535 – 540.
53. Enciclopedia de Salud Pública. Enfermedades respiratorias agudas. 2011 Disponible en: <http://translate.google.co.ve/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.enotes.com/public-health-encyclopedia/acute-respiratory-diseases> (citado en enero del 2011).
54. Ender W, Ege M, Mutius E. The Asthma epidemic. *NEJM.* 2006. (en línea). Fecha de acceso: 04 Abril

2008. Disponible en: www.content.nejm.org (citado el 04 de abril del 2008)
55. Falsey AR., Formica MA., Walsh EE. Diagnostic of respiratory syncytial virus infection: Comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. **J Clin Microbiol.** 2002; 40(3): 817- 820.
56. Fernández JA., Tapia L, Palomino MA, Larrañaga C, Pena M., Jaramillo H. Plasma interferon-gamma, interleukin-10 soluble markers of immune activation in infants with primary adenovirus (ADV) and respiratory syncytial virus (RSV) infection. **Eur Cytokine New.** 2005; 16(1): 35 – 40.
57. Finegold S., Sheperd W., Spaulding E. Manual de Diagnóstico Microbiológico. 12va. Edición. Manual Moderno. México. 1243 – 1254 p.p. 1998.
58. Firman G. Uso apropiado de antibióticos en el tratamiento de bronquitis aguda no complicada. 2002. Disponible en: <http://www.intermedicina.com/Avances/Clinica/ACL53.htm> (citado en enero 15 del 2011).
59. Fishman S, Hobbs K, Borish L. Molecular biology of cytokines in allergic diseases and asthma. **Inmunol Allogy Clin N Am** 1996;16(3):613 – 635.
60. Franco G. Faringoamigdalitis y adenoiditis. En: Reyes MA., Leal FJ, Aristizabal GD (eds). Infección y alergia respiratoria en niños. 2da. Edición Cali: Editorial XYZ. 142 – 149. 1991.
61. Friedlander SL, Busse WW. The role of rhinovirus in asthma exacerbation. **J Allergy Clin Immunol.** 2005; 16: 267-273.
62. Galucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. **Curr Op Immunology.** 2001; (13):114-9.
63. Garofalo R, Kimper JLL, Welliver RC, Ogra P. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. **J Pediatr.** 1992; 120: 28 – 32.
64. 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 – 399.
65. Garriste-Chevret M. Patogenia de las infecciones respiratorias por virus. **Rev Inst Nal Enf Res.** 2002; 54(4):239–254.
66. Gentile A, Patel A., Ollila C, Fireman P, Zeeyi A, Doyle WJ, Skoner DP. Diminished IL-10 production in subjects with allergy after infection with influenza A virus. **J Allergy Clin Immunol.** 1999; 103(6): 1045 – 1048.
67. Gern J, Lemanske X (2003) Infectious triggers of pediatric asthma. **Pediatr Clin North Am.** 2003; 50: 555-575.
68. Gern JE, Martin MS, Anklam KA, Shen K, Roberg KA, Carlson-Dakes KT, Adler K, Gilbertson-White S, Hamilton R, Shult PA, Kirk CJ, Da Silva DF, Sund SA, Kosorok MR, Lemanske RF Jr. Relationships

- among specific viral pathogens, virus-induced interleukin-8, and respiratory symptoms in infancy. ***Pediatr Allergy Immunol.*** 2002; 23(6): 386 – 393.
69. Ginsberg HS, Moldawer LL, Sehgal PB, Redington M, Kilian PL, Chanock RM, Prince GA. A mouse model for investigating the molecular pathogenesis of adenovirus pneumonia. ***Proc Natl Acad Sci USA.*** 1991. 88(5): 1651 – 1655.
70. Girón B, Hernández R, Morón D, Álvarez M, Barreto A, Cáceres B. Identificación de los virus respiratorios circulantes en Venezuela. Resumen. Jornadas Venezolanas de Microbiología. 2005.
71. Girón M, WI. 2008. 2008. Generalidades del asma bronquial. ***Rev Fac Ciencias Médicas.*** 5:56-65
72. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Inmunología. Segunda Edición, Editorial McGraw-Hill. 2004; 663 p.p.
73. Gonzales R, Sande MA. Uncomplicated acute bronchitis. ***Ann Intern Med.*** 2001; 135(9): 839 – 840.
74. Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TN, Proudfoot A, Martinez-A C, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. ***J Exp Med.*** 1998; 188:157–167.
75. Grayston JT, Kvo CC, Wang SP. Clinical findings in respiratory tract infections. Proceedings of the sixth international symposium on human chlamydial infections. 1995. New York: pp 337-401
76. Greening, A.P. 2004. Etiología del Asma. En: Asthma an Update for Latin America. Sistemas para la administración en el Asma. Science Press Brasil. Latin America Ltda. Sao Paulo. Brasil. (25pp.) 1-3.
77. Gutiérrez-Ramírez S, Molinas-Salinas GM, García Guerra JF, Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, González-Salazar F. Humo de tabaco ambiental y neumonía en niños de Monterrey, México. ***Rev Salud Publica.*** 2007; 9(1): 76 – 85.
78. Guyton A, Hall J. 2001. Ventilación Pulmonar. En: Tratado de Fisiología Médica. 10ª Edición. México D.F.: McGraw-Hill. P. 525 – 538.
79. Harker H. Resfriado común. En: Reyes MA, Leaf FJ, Aristizabal G. (eds). Infección y alergia respiratoria en el niños. 2da. Edición. Cali: Editorial KYZ, 93 – 99. 1991.
80. Hernández H S., Trejo y P JA, Reyes M H., Perez C R, Gallardo G. 2003. Guía Clínica para el tratamiento y prevención de las infecciones respiratorias agudas. ***Rev Mod IMSS.*** 41: S3 – S14
81. Harrinson AM, Conville CA, Rosenberg HF, Domachowske JB. Respiratory syncytial virus-induced chemokine expression in the lower airways: eosinophil recruitment and degranulation. ***Am J Respir Crit Care Med.*** 1999; 159: 1918 – 1924.
82. Holgate ST, Bodey KS, Janezic A, Frew AJ, Kaplan AP, Teran LM.

- Release of RANTES, MIP-1 α , and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156:1377– 1383.
83. Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Howarth PH, Haitchi HM, Babu S, Davies DE. Understanding the pathophysiology of severe asthma to generate new therapeutic opportunities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117(3): 496-506, quiz 507.
84. Holts PG. Developmental factors as determinants of risk for infections and atopy in childhood. *Eur Respir Rev.* 2005; 14: 69-73.
85. Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata I, Durham SR, Pfister R, Menz G, Barkans J, Ying S, Kay AB. High affinity IgE receptor (FcRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and non-atopic. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153; 1931-1937
86. INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Secretaría de Salud. 2000. dirección General de Estadística Informática. Estadística de Morbilidad y Mortalidad para las enfermedades. México. DGE-SSA.
87. Izuhara K, Arima K, Kanaji S, Kanaji T, Ohta Sh. IL-13 and its Signal Pathway: Promising Targets in the Development of a Therapeutic Agent for Bronchial Asthma. *Current Signal Transduction Therapy.* 2007; 2: 31-40
88. Jafri HS, Chavez-Bueno S, Mejias A, Gomez AM, Rios AM, Nassi SS, Yusuf M, Kapur P, Hardy RD, Hatfield J, Rogers BB, Krisher K, Ramilo O. Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and in mice. *J Infect Dis.* 2004; 189(10):1856 - 1865.
89. Janeway C, et al. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5th ed.: Garland Publishing; 2001.
90. Janeway, Ch. A.; Travers, P. 1999. Immunobiology. The immune system in health and disease. Second Edition. Published by current Biology. LTD. London.
91. Johnston NW, Sears MR. Asthma exacerbations. *Epidemiol Thorax.* 2006; 61:722-728.
92. Joseph J, Benedict S, Safa W, Joseph M. Serum interleukin-5 levels are elevated in mild and moderate persistent asthma irrespective of regular inhaled glucocorticoid therapy. *BMC Pulm Med.* 2004; 4: 2.
93. John AE, Berlin AA, Luckacs NW. Respiratory syncytial virus induced CCL6/RANTES contributes to exacerbation of allergic airway inflammation. *Eur J. Immunol.* 2003; 33: 1677-1685.
94. Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, Ronni T, Melen K, Matikainen S. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12(2-3): 171-80.
95. Katial RK, Sachanandani D, Pinney C, Lieberman MM. 1998. Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent host. *Clin*

- Diagnost Lab Immunol.** 1998; 5(1): 78-81.
96. Kawasaki, Y.; Hosoya, M.; Kanno, H.; Suzuki, H. Serum regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted concentrations and eosinophils in respiratory syncytial virus infection. **Pediatric Int**, 2006; 48(3): 257 – 260.
97. Kelso A, Trout AB, Maraskovsky E, Gough NM, Morris L, Pech MH, Thomsom JA: Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4+ and CD8+ T cells and clones activated in vivo and in vitro. **Immunol Rev.** 1991, 123:85-114.
98. Kelso A, Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?. **Immunology Today.** 1995; 16: 374-9.
99. Keszei M, Nagy A, Kozma GT, Radosits K, Tölgyesi G, Falus A, Szalai C. Pediatric asthmatic patients have low serum levels of monocyte chemoattractant protein-1. **J Asthma.** 2006; 43(5): 399-404.
100. Kips J, Pauwels R. Proinflammatory cytokines in: Asthma Barnes PJ, Grunstein MM, Left AR, Woolcock AJ. Ed Lippincott-Raven. 1997: 653-658.
101. Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W, Sommer H, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Tercera Edición. Buenos Aires. 1999. 909 pp.
102. Korppi M. Management of bacterial infections in children with asthma. **Expert Rev Anti Infect Ther.** 2009; 7(7): 869-877.
103. Kraft M. The role of bacterial infections in asthma. **Clin Chest Med.** 2000; 21(2):301 – 313.
104. Lam CWK, Wong CK. Cytokines and chemokines as markers of acute infection. 2006 . Disponible en: <http://www.cli-online.com/fileadmin/artimg/cytokines-and-chemokines-as-markers-of-acute-infection.pdf> (citado en octubre del 2010).
105. 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 – 639.
106. Lipscomb M, Masten B. Dendritic cells: Immune regulators in health and disease. **Physiol Rev.** 2002; (82):97-130.
107. Liu B, Hossain MJ, Dong L, Takeda K, Kimura Y. Interleukin-28 improves the early defence system against influenza virus infection y augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. **J Gen Virol.** 2004; 85 (Pt 2): 423 – 428.
108. Liu A, Spahn J, Lueng D. 2005. Asma en la infancia. En: Behnman R., Kliegman R., Jenson HI. Nelson. Tratado de Pediatría. 17ª Edición. Madrid: Elsevier; p. 760 – 774.
109. Lli S, Von Mutius E, Lau S. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. **Brit Med J.** 2001; 322: 390-395.
110. Luster A. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. **Curr. Op. Immunology** 2002; (14):129-36.

111. Manresa F..Neumonología. En: Suros J., Suros A. *Semiología Médica y Técnicas Exploratorias*. 8va. Edic. Barcelona: Masson. 2001; 63 -185.
112. Maraví-Poma E, Martínez Segura JM, Izura J, Gutiérrez A, Tihista JA.. Vigilancia y control de la neumonía asociada a ventilación mecánica. **ANALES Sis San Navarra** 2000, 23 (Supl. 2): 25-30.
113. Marie L, Ferguson D. 2000. Simulfluor Respiratory Screen For rapid detection of multiplex respiratory viruses in clinical specimens by inmunofluorescence staining. **J Clin Microbiol**. 38(2): 708 – 711.
114. Marínez FD. Heterogeneity of the association between lower respiratory illness in infancy and subsequent asthma. **Proc Am Thorac Soc**. 2005.; 2: 157-161
115. Mejías A, Chávez-Bueno S, Ríos AM, Fonseca-Atena M, Gómez AM, Jafri HS, Ramilo O. Asthma and respiratory syncytial virus. New opportunities for therapeutic intervention. **An Pediatr**. 2004;. 61:252 – 259.
116. McIntosh K. Pathogenesis of severe acute respiratory infections in developing world: respiratory syncytial viruses. **J Clinical of Microbiologic**. 1999; 6:595-500.
117. Merson MH. Acute respiratory infections. Control Programme. Summary Overview-Progress and plans. Ninth of interested parties Geneva: OMS, 22-30 Jun 1989.
118. Miller DL. Acute respiratory infections. En: *Epidemiology of disease*. London: Blackwell Scientific," 1982
119. Miller JF. The normal lung: the asis for diagnosis and treatment of pulmonary disease. Philadelphia WB Saunders Co. 41 (2): 214 – 225. 1992
120. Ministerio del Poder Popular parA la Salud. Anuario De Mortalidad 2006. Dirección General de Epidemiología. Dirección de InformaClón y Estadística de Salud. Venezuela. 2007. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc4322148/Mortalidad-en-Venezuela-Anuario-2006>
121. Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico N° 8. MSAS. Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Gerencia Sectorial de Diagnósico y Epidemiología. División de Epidemiología- Informe epidemiológico semanal de la Unidad de Epidemiología del HUC-Semana del 01 Enero al 23 de Febrero de 2005.
122. Molina R, TC. 2006. Respuesta inflamatoria en asma. *Revista Médica de la Costa*. 1(2): Disponible en: <http://www.unisimonbolivar.edu.co/digital/biomedica/index.php/RMC/article/view/18> (citado en marzo noviembre 2010).
123. Moncayo AL, Vaca M, Oviedo G, Erazo S, Quinzo I, Fiaccone RL, Chico ME, Barreto ML, Cooper PJ. Risk factors for atopic and non-atopic asthma in a rural area of Ecuador. **Thorax**, 2010; 65:409 – 416. Disponible en: thorax.bmj.com
124. Monto A.S., Lehmann D.. Acute respiratory infection (ARI) in

- children. ***Pediatric infection***. 2001; 19:373-8.
125. Moreno R., Riquelme R. Etiología de la neumonía adquirida en la comunidad en el adulto inmunocompetente. ***Rev Chil Enf Respir***. 2005; 21: 81-88
126. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. ***Nat Immunol***. 2001; 2:123-8.
127. MPPS. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Boletín Epidemiológico N° 10. 2010. Semana Epidemiológica No. 10. 06 al 12 de Marzo 2011. Año LX. URL: http://issuu.com/dr_jesusg/docs/boletin_epidemiologico_6_a_12_de_marzo_2011
128. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK Role of TNF α in pulmonary pathophysiology. ***Review. Respiratory Research*** 2006; 7:125-133. Disponible en: <http://respiratory-research.com/content/7/1/125>
129. Mulholland L, Weber M. Reconocimiento de causa y síntomas de la neumonía. ***Noticias sobre IRA***, 1998; 25 (2):3-4.
130. Muñoz M, Rosso M, Aguilar F., González-Moles M., Redondo F. NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract substance P-related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line Hep-2. ***Invest New Drugs***. 2008 ; 26(2): 111- 118.
131. Murphy K., Travers P., Walport, M. Inmunobiology Janeway's. Octava edición. Editado por McGraw Hill Interamericana Editores S.A. México DF. México. 2010. 887 pp.
132. Myyou S, Fujimura M, Kamio Y, Kurashima K, Tachibana H, Hirose T. Effect of losartan type angiotensin II receptor antagonist, on bronchial hiperresponsiveness tomethacholine in patients with bronchial asthma. ***Am J. Respir Crit Care Med***. 2000; 162:40 – 44.
133. Nelson PJ, Krensky A. Chemokines, Lymphocytes and viruses, whar goes around. ***Curr Opinion in Immunol***. 1998. 10(3): 265-270
134. Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP. Chemokines and allergic disease. ***J Allergy Clin Immunol*** 1999; 104:723–742.
135. NIH. Oational Institute of Health. US Department of Healt and Hu-an Services. National Heart, Lung and Blood Institute NatloîAl Asthma Educaton and Prevention Program Expert Panel Report 3: Guidelines for the diagnosis and Mangement of Asthma. Full Report. 427 pp. 2007. Disponible en: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.pdf> (citadO en feb del 2011).
136. Noah TL, Beckers S. Chemokines in nasal secretlons of normal adults experimentally infected with respiratorY syncytial virus. ***Clin Immunol***. 2000; 97: 45-49.
137. Ogra PL. Allergy respiratory tract infectionS and bronchial hiperreactivity. ***Pediatr Infect***, 1989; 5(8):347-52.

138. Oh JW, Lee HB, Park IK, Kang JO. Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-11, and interferon-gamma levels in nasopharyngeal aspirates from wheezing children with respiratory syncytial virus or influenza A virus infection. ***Pediatr Allergy Immunol.*** 2002; 3(5): 350 – 356.
139. OMS. Organización Mundial de la Salud. Normas de Infecciones Respiratorias Agudas. IRA. En el niño menor de cinco años para el Primer Nivel de Atención. 4ª ed. Montevideo: Ministerio de Salud Pública. 1997
140. O'Byrne P, Bateman E, Bousquet J, Clark T, Ohta K, Paggiaro P, Pederson S, Soto M, Singh R, Cheng W. Global Initiative for Asthma Global strategic for asthma Strategy and prevention (en línea). Disponible en: Fecha de acceso: www.ginasthma.org (citado en agosto 18 de 2008).
141. Openshaw PJ, Clarke SL, Record FM. Pulmonary eosinophilic response to respiratory syncytial virus infection in mice sensitized to the major surface glycoprotein G. ***International Immunology.*** 1992; 4: 493 – 500.
142. Palomino MA, Larrañaga C, Villagra E, Camacho J, Avendaño L.F. Adenovirus and respiratory syncytial virus-adenovirus mixed acute lower respiratory infections in Chilean infants. ***Pediatr Infect Dis J;*** 2004. 23: 337 -341.
143. Parham P. Inmunología. 2da Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires: Médica Panamericana. 2006; 560p.
144. Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. Inmunología básica y Clínica. 10ma edición. Editorial manual Moderno. 2002; 917 p.
145. Patel JA., Nair S, Grady J, Revai K, Viktor S, Grasier AR, Chonmaitree T. Systemic cytokine response profile associated with respiratory virus induced acute otitis media. ***Pediatric Infected Dis.*** 2009; 28:407 – 411.
146. Peden DB. Development of atopy and asthma: candidate environmental influences and important periods of exposure. ***Environ Health Perspect.*** 2000; 108 (Suppl 3): 475–482.
147. Pène J, Rivier A., Lagier B., Becker WM., Michel F.B., Bousquet J. 1994. Las diferencias en la liberación de IL-4 por PMC se relacionan con la heterogeneidad de la atopia. ***Inmunología.*** 1994; 81(2): 58 – 64.
148. Peña C, Rincón J, Pedrañez A, Viera N, Mosquera J. Chemotactic effect of melatonin on leucocytes. ***J Pineal Res.*** 2007; 43(3): 263 -269.
149. Pérez I, Gómez M, González Rico S. El diagnóstico convencional de Mycoplasma pneumoniae como agente causal de Neumonías Adquiridas en la Comunidad (NAC). ***Rev Soc Ven Microbiol Caracas*** 2007; 27(2):
150. Piedimonte G, Hegele RG, Auais A. Persistent airway inflammation alter resolution of respiratory syncytial virus infection in rats. ***Pediatr Res.*** 2004. 55: 657 – 665.
151. Pitrez PM, Machado DC, Jones MH, Andrade F, Camozzato C,

- Stein RT. Th-1 and Th-1 cytokine production in infants with virus-associated wheezing. **Braz J Med Biol Res.** 2005; 38(1): 51 – 54.
152. Ponsonby AL, Couper D, Dwyer T. Relationship between early life respiratory illness, family size over time, y the development de asthma and hay-fever: a seven year follows up study. **Thorax.** 1999; 54: 664-669.
153. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. **Lancet.** 1999; 353: 196-200.
154. Ramiro G FJ. 2004. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. (Declaración de Helsinki 1964, Tokyo 1975, Venecia 1983, Hong Kong 1989, Somerset West 1996, Edimburgo 2000). Disponible en: http://www.bioeticaweb.com/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=896 (citado en abril del 2011).
155. 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.** 2004; 61(2): 137 – 142.
156. Ricci, Matuci A, Rossi O. Pathogenetic mechanisms and genetic aspects of bronchial asthma. **ACI International.** 1997;9:5, 141-147.
157. Riverón RW, Rojo I., González P. Mortalidad por enfermedades respiratorias agudas en menores de 15 años en Cuba. **Rev. Cubana Hig. Epidemiol.** 1999; 24 (3): 279-89.
158. Riquez A, Echezuria L. Morbi-mortalidad por influenza y neumonía de los adultos en Venezuela 1995-2006. **RFM,** jun. 2009, 32 (1): 59 – 66.
159. Roche P, Lambert S, Spencer J. Surveillance of viral pathogens in Australia. **CDI.** 2003; 27:117 – 122.
160. Rodríguez C., Martínez A.M. 2002. Estudio microbilógico de muestras del tracto respiratorio. Revista Chilena de infectología. Nov. 10(3):915 – 916.
161. Roger T, Bresser P, Snoek M, van der Sluijs K, van den Berg A., Nijhuis M, Jansen HM, Lutter R. Exaggerated IL-8 and IL-6 response to TNF-alpha by parainfluenza virus type 4-infected NCI-H292 cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2004; 287(5): L1048 L1055.
162. Rollins BJ. Chemokines. **Blood.** 1997; 90(3): 909 – 928.
163. Roman M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendano LF, Simon V, Escobar AM, Gaggero A, Diaz PV. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. **Am J Respir Crit Care Med.** 1997; 156: 190 - 195.
164. Rosete DP, Archundia Sánchez CC, Cabello C, Manjarrez ME. Patogenia de las infecciones respiratorias por virus. **Rev Inst Nal Enf Resp.** 2002; 5(4): 239 – 254.

165. Sareneva T, Matikainen S, Kurimoto M, Julkunen I. Influenza A virus-induced IFN- α / β and IL-18 synergistically enhance IFN- γ gene expression in human T cells. *J Immunol.* 1998; 160(12):6032 – 6038.
166. Schroder WJ, Crother TR, Yoshikazu N, Chen Shuang, Wong MH, Yilmaz A, Slepkin A, Schulte D, Alsabeth R, Doherty TM, Peterson E, Nel AE, Arditi M. Innate immune responses during respiratory tract infection with a bacterial pathogen induce allergic airway sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 122(3): 595-602.
167. Sequeira M.A., Zerbini E., Veronessi I., Latin O., Cociglio R. 1999. Infecciones del tracto respiratorio bajo. Rev Cubana de Infectología. 6(2): 876 – 890.
168. Shahenn SO, Aaby P, Hall AJ. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet.* 1996; 347:1792-1796.
169. Sheeran P, Jafri H, Carubelli C, Saavedra J, Johnson C, Krisher K. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J.* 1999; 18:115 – 122.
170. Shutte JK, Vrugt B, Lindley IJ, Holgate ST, Bron A, Aalbers R, Djukanovic R. Free and complexed interleukin-8 in blood and bronchial mucosa in asthma. *Am J Respir Crit Care Med,* 1997; 155(6): 1877-1883.
171. Soto M, Brenes F. 2006. Global initiative for asthma. Estrategia global para el manejo y prevención del asma 2006. Disponible: www.ginasthma.org (citado en agosto 18 del 2009).
172. Sousa AR, Lane SJ, Nakhosteen JA, Yoshimura T, Lee TH, Poston RN. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10:142–147.
173. Stanciu LA, Roberts K, Papadopoulos GN, Cho S-H, Holgate ST, Coyle AJ, Johnston SL. IL-4 increases type 2, but not type 1, cytokine production in CD⁺ T cells from mild atopic asthmatics. *Respir Res.* 2005; 6(1): 67 – 67.
174. Sullivan KE. TNF and TNF α Inhibitors: Mechanisms of action Pediatric Rheumatology. Online Journal. 2004; 2(1): 7 – 22.
175. Sung RY, Hui SH, Lam CW, Yin JA. Comparison of cytokine responses in respiratory syncytial virus and influenza A infections in infants. *Eur J Pediatr.* 2001.160: 117 – 122.
176. Thacker B. La enfermedad respiratoria porcina: Un desafío constante a la rentabilidad de la producción. Anaporc. 1997; 170: 44 – 62.
177. Takatsu K Interleukin 5. *Curr Opin Immunol.* 1992; 4:299-306.
178. Takisawa H, Sato M, Ito K. The interactions of eosinophils with bronchial epithelial cells in asthma. *ACI International.* 1997; 9(5):149 – 155.

179. Tang Ch, Rolland JM, Li X, Ward Ch, Bish R, Walters H. Alveolar Macrophages from Atopic Asthmatics, But Not Atopic Nonasthmatics, Enhance Interleukin-5 Production by CD4+ T Cells. *Am. J. Respir Crit Care Med.* 1998; 157(4): 1120-1126
180. Thomas SS, Chhabras SK. A study of the serum levels of interleukin 1 beta in bronchial asthma. *J Indian Med Assoc.* 2003; 101(5): 282-286. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14575216>. (citado en enero 27 del 2011).
181. Teele DW., Klein JO, Rosner B. et al. Middle ear disease and the practice of Burden during first five years of live. *JAMA.* 1983; 249 – 1026.
182. Tsitoura DC, Kim S, Dabbagh K, Berry G, Lewis DB, Umetsu DT. Respiratory infection with influenza A virus interferes with the induction of tolerance to aeroallergens. *J Immunol* 2000; 165(6): 3484 – 3491.
183. Valdés CS, Hernández AG, Fernández SO, Ramírez OV, Herrera BA, Muñoz GG, Santos LP, Caraballo LP, Ramos AP. Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. OPM/OMS. 2003. Disponible en: http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs_ipk.pdf (citado en feb 25 del 2011).
184. Valero N, Estévez J, Arocha F, Rincón E, Añez F, Espina LM, Meleán E, Larreal Y, Maldonado M, Arias J, Añez G.. Contribución del virus sincicial respiratorio y bacterias a la presencia de asma en una población adulta. *Interciencia.* 2005; 30(6): 359 – 368.
185. Valero N, Larreal Y, Arocha F, Gotera J, Mavarez A, Bermudez J, Moran M, Maldonado M, Espina LM. Etiología viral de las infecciones respiratorias agudas. *Invest Clin.* 2009; 50(3): 359 – 368.
186. Van Der Sluijs KF, Van Elden LJ, Arens R, Nijhuis M, Schuurman R, Florquin S, Kwakkebl J, Akira S, Jansen HM, Lutter R, Van Der Poll T. Enhanced viral clearance in interleukin-18 gene-deficient mice after pulmonary infection with influenza A virus. *Immunology.* 2005; 114(1):112 – 120.
187. Van Der Sluijs KF, Van Elden LJ, Nijhuis M, Schuurman R, Pater JM, Florquin S, Goldman M, Jansen HM, Lutter R, Van der Poll. IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J Immunol.* 2004; 172(12): 7603 – 7609.
188. Van Schaik SM, Tristram DA, Nagpal IS, Hintz KM, Welliver CII, Welliver RC. Increased production of IFN-[gamma] and cysteinyl leukotrienes in virus-induced wheezing. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:630 – 636.
189. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 1992; 10: 411–452.
190. Vázquez M PS. 2006. Bronquitis aguda. Guías de Fisterra. *Cad*

- Aten Primaria.** 2006; 13: 189 – 192.
191. Von Ehrenstein OS, Von Mutius E, LLI S. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. **Clin Exp Allergy.** 2000; 30:187-193.
192. Von Mutius E, LLI S, Hirsch T. Frequency of infections and risk of asthma, atopy and airway hyperresponsiveness in children. **Eur Respir J.** 1999; 14: 4-11.
193. Wang CM, Tang RB, Chung RL, Hwang BT. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 profiles in children with pneumonia. **J Microbiol Immunol Infect.** 1999; 32(4):233 – 238.
194. Welliver RC, Duffy L. The relationship of RSV-specific immunoglobulin E antibody responses in infancy, recurrent wheezing, and pulmonary function at age 7-8 years. **Pediatr. Pulmonol.** 1993; 15:19-27.
195. Wendt CH, Hertz MI. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus infections in the immunocompromised host. **Semin Respir Infect.** 1995; 10(4): 224 – 231.
196. Wennergren G. Impact of viral infection on bronchial hyperresponsiveness. **Pediatr Allergy Immunol.** 1997; 7(Supp9):10-13.
197. Wirchow JC, Walker C, Hafner D, et al. T cell and cytokines in BAL after segmental allergen provocation in atopic asthma. **Am J Resp Crit Care Med.** 1995. 151: 960-968
198. Wirchow JC, Kruegel C, Walker C, Matthys H. Inflammatory determinants of asthma severity: Mediators and cellular changes in BAL from patients with severe asthma. **J Allergy Clin Immunol.** 1996; 98: S27 - S40.
199. Wong-Chew RM, Farfán-Quiroz R, Sánchez-Huerta JL, Nava-Frías M, Casasola-Flores J, Santos-Preciado JL. Frecuencia de virus respiratorios y características clínicas de niños que acuden a un hospital en México. **Salud Pública Méx** 2010; 52(6):528-532
200. Woodland DL, Scott I. T cell memory in the lung airways. **Proc Am Thorac Soc.** 2005; 2: 126 – 131. Disponible en: www.atsjournals.org (citado en diciembre 2010).
201. Yasuda H, Suzuki T, Zayasu K, Ishizuka S., Kubo H, Sasaki T, Nishimura H., Sekizawa K, Yamaya M. Inflammatory and bronchospastic factors in asthma exacerbations caused by upper respiratory tract infections. **Tohoku J Exp Med.** 2005; 207(2): 109 – 118.
202. Zhan, D, Xia J, Chen X. Tendencias temporales de las concentraciones de citoquinas Th1 y Th2 en esparto inducido de pacientes asmáticos durante infecciones víricas agudas de las vías respiratorias superiores. **Arch Bronconeumol.** 2010; 46 (9): 459 – 465.
203. Zhang XH, Werner-Favre C, Tang HY, Brouwers N, Bonnefoy JY, Zubler RH. IL-4-dependent IgE switch in membrane IgA-positive human B cells. **J Immunol.** 1991; 147: 3001 – 3004.

204. Zhang Y, Wang Y, Gilmore X, Xu K, Mbawuike IN. Independent and synergistic effects of interleukin-18 and interleukin-12 in augmenting cytotoxic T lymphocyte responses and IFN-gamma production in aging. **J Interferon Cytokine Res.** 2001; 21(10):843 – 850.
205. Zhang Y, Cardell L-O, Adner M. IL-1 β induces murine airway 5-HT_{2A} receptor hyperresponsiveness via a non-transcriptional MAPK - dependent mechanism. **Respirat Res.** 2007; 8:29.

VIII. ANEXOS

Anexo 1.

HISTORIA CLINICA INFECCIONES RESPIRATORIAS VIRALES

Ficha N°
Hospital
N° Historia

IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

Nombre: _____ Edad: _____
Sexo _____ Raza _____ Ocupación: _____
Dirección/Procedencia: _____
Teléfono: _____

ENFERMEDAD ACTUAL

Fecha de inicio de los síntomas: _____

SINTOMAS GENERALES Marcar con X

| | | | | | |
|--------|------------------|------------------|----------------------|---------|-----------|
| Fiebre | Malestar general | Palidez/Cianosis | Dolor osteo-muscular | Cefalea | Hiporexia |
|--------|------------------|------------------|----------------------|---------|-----------|

SINTOMAS RESPIRATORIOS

| Signos y Síntomas | Signos y Síntomas |
|-----------------------|-------------------|
| Estornudos | |
| Obstrucción nasal | |
| Rinorrea: Moco mucoso | |
| Moco Amarillo | |
| Moco Verde | |
| Prurito Nasal | |
| Dolor de Garganta | |
| Disfonia | |
| Dolor de oído | |
| Adenopatías | |

Otros Síntomas: _____

ANTECEDENTES PERSONALES

| Enfermedades | | | | Tratamiento reciente (15 días previos) | | | |
|--------------|--|---------|--|--|--|------------------|--|
| Asma | | Rinitis | | Antibióticos | | Antileucotrienos | |
| Tabaquismo | | EPOC | | Esteroides | | Antialérgicos | |

CON ANTECEDENTES DE ASMA. Actualmente en crisis : Si _____ No _____

| | | | | | |
|--------------------|-------------------|---|-------------------|--------------|---|
| Síntomas diurnos | < 1 x semana | | Actividad diaria: | Normal | |
| | > 1 x semana | | | Alterada | |
| | Todos los días | | | Muy Alterada | |
| Síntomas nocturnos | < 2 x mes | / | FEM/VEF1 | > 80% | / |
| | 3 x mes | / | | > 60% < 80% | / |
| | Todas las semanas | / | | < 60% | / |
| | Todos los días | % | Variabilidad | | % |

Otros antecedentes patológicos: _____

Anexo 1. Cont.

| ANTECEDENTES FAMILIARES | Alergia | |
|-------------------------|---------|--|
| | Asma | |

EXAMEN FÍSICO

TEMP: _____ °C T.A.: _____ mmHg FC: _____ x min FR: _____ x min
ORL: _____

TORAX:

Inspección: _____
Palpación: _____
Auscultación: _____
Percusión: _____

OTROS HALLAZGOS PERTINENTES: _____

EXAMENES DE LABORATORIO

| Hepatología Completa | Fecha | Hb | Hto. | CB | Fórmula | Plaquetas |
|----------------------|-------|----|------|----|---------|-----------|
| | | | | | | |

Otros: _____

RADIOLOGIA DEL TORAX: _____

ESPIROMETRÍA: _____

DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO:

RINOFARINGITIS _____ BRONQUIOLITIS _____ NEUMONIA _____ CRUP _____ BRONQUITIS _____
RINITIS _____ RARINGITIS _____ AMIGDALITIS _____ SINUSITIS _____ OTITIS _____ OTROS _____

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Fecha de toma de la muestra: _____

TIPO DE MUESTRA USADA: _____

METODO USADO: _____

AGENTE AISLADO: _____

Firma: _____

Anexo 2

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

En el Instituto de Investigaciones Clínica “Dr. Américo Negrette”. Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia se está realizando el proyecto de investigación titulado “Etiología viral y bacteriana de las infecciones respiratorias agudas del tracto respiratorio en pacientes del Estado Zulia” con el objetivo de aislar e identificar patógenos virales y bacterianos, asociados a enfermedades del tracto respiratorio.

Yo: _____ C.I.: _____ Nacionalidad: _____
Estado civil: _____ Domiciliado en: _____

Siendo mayor de 18 años en USO pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconveniente y riesgos relacionados con el estudio que más abajo indico, en calidad de paciente, declaro mediante la presente:

1. Haber sido informado del manera clara y sencilla, por parte del grupo de investigadores de la Sección de Virología del I.I.C. “Dr. Américo Negrette”, coordinado por el Magíster Lic. Nereida Valero de todos los aspectos relacionados al proyecto de Investigación antes mencionado.
2. Haber sido informado de que mi participación en el proyecto consiste en facilitar de manera voluntaria una muestra de sangre y lavado nasofaríngeo, las cuales serán tomadas por un personal especializado.
3. Que las muestras tomadas que acepto facilitar, así como la información que suministre, será utilizada para determinar la presencia de agentes virales y bacterianos.
4. Que de equipo de investigadores me ha garantizado absoluta confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como de cualquier información relativa a mi persona a la que tenga acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado y estoy de acuerdo en el UAO de los resultados obtenidos en el presente estudio y que mi participación en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno para mi salud.
5. Que la participación en la investigación no agravará n causará efectos colaterales efectos colaterales en la patología ya existente, por el contrario, ayudará a dilucidar mi diagnóstico permitiendo una mejor terapéutica. Cualquier pregunta o duda que yo tenga en relación con este estudio, me será respondida y aclarada oportunamente por parte del equipo de investigadores antes mencionado con quienes me puedo comunicar por el teléfono 04146362696 Lic. Jennifer Gotera y La Lic Alibeth Mavárez 04146277894, en el horario de 8:00 a.m. a 5:00 p.m.
6. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir algún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntario acuerdo: aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez, autorizar la toma de muestra para dicho trabajo de investigación.