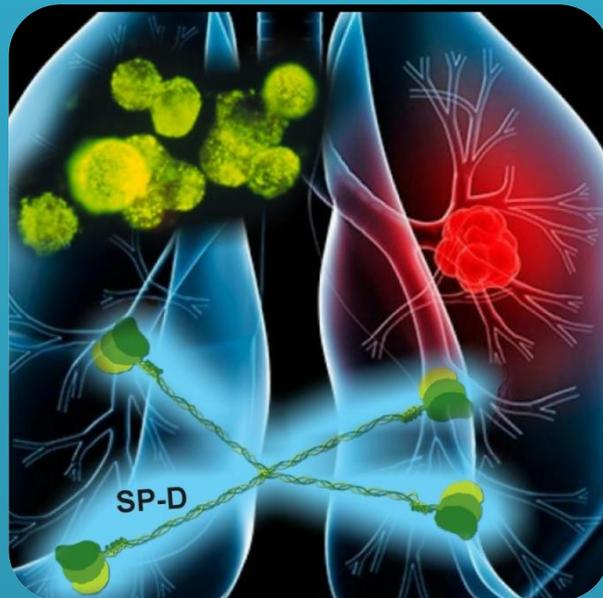




UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

VARIANTES GENÉTICAS DE LA PROTEINA
D DEL SURFACTANTE PULMONAR (SP-D):
PAPEL EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y
GRAVEDAD DE LA INFECCIÓN POR VIRUS
RESPIRATORIO SINCICIAL (VRS)

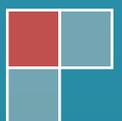
SVETLANA PAVLOVIC NESIC



Tesis doctoral presentada por Dña. Svetlana Pavlovic Nestic

Dirigida por los doctores D. Luis Peña Quintana y
D. José Carlos Rodríguez Gallego

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS



Dedicado a mi hija y mi marido

Conocer es usar y generar

Gracias Mili por tu apoyo, por animarme en todo lo que hago, por tu comprensión, paciencia, cariño, gracias por estar siempre conmigo.

Gracias Nina, por comprender que tu mamá en los últimos meses tenía un trabajo muy importante que terminar. Gracias por tus besos en los momentos difíciles, gracias por darme ánimo. Gracias por la ayuda que me has dado.

Eres una hija maravillosa.

Quisiera aprovechar estas líneas para expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible que esta tesis sea una realidad.

He tenido la suerte de contar con el apoyo, la ayuda y cariño de muchas personas que han sido fundamentales durante todo este tiempo y que de alguna manera forman parte de este trabajo.

Gracias, especialmente a mis directores de tesis, a los doctores D. Luis Peña Quintana y, D. José Carlos Rodríguez-Gallego, por su constante apoyo, dedicación y ayuda, por animarme en los momentos difíciles y sobre todo por confiar en mí. Por ofrecerme su apoyo en todo momento, por escuchar y resolver mis dudas y por corregir y mejorar minuciosamente este trabajo.

Gracias a Estefanía Herrera Ramos, gracias por tu disponibilidad, tus consejos y por el trabajo realizado.

Agradecimiento especial para mi compañera y amiga María Rosario García Luzardo, Sara, gracias por todo.

Gracias al Dr. Antonio Aguilar por su apoyo en la recogida de datos.

Quisiera agradecer al Profesor Dr.D. Pedro Saavedra Santana por su tiempo y predisposición. Por su aportación con la estadística en este proyecto.

También me gustaría agradecer a María Trujillo García y a Rosa Rodríguez Rodríguez, por llevar todos estos “tubos” al laboratorio y siempre con una sonrisa.

Gracias a Inma, Virginia y Héctor por el apoyo y el trabajo.

Gracias a todos mis compañeros, es un placer trabajar cada día en un equipo de excelentes profesionales, siempre dispuestos a ayudar.

Gracias a mis padres y mi hermano por confiar en mí.

Gracias mami, Divna-Nina, todo lo que soy te debo a ti, has sido mi mejor ejemplo y apoyo en todos estos años, en los momentos complicados pienso en tus consejos y tu cariño y todo se hace más fácil.

Muchas gracias a todos, por entender mi profesión y por estar conmigo.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ABREVIATURAS

RESEÑA HISTÓRICA

INTRODUCCIÓN	5
1.1 BASE TEÓRICA	5
1.2 VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL	6
1.2.1. Características del Virus	6
1.2.2. Epidemiología	9
1.3 BRONQUIOLITIS AGUDA	10
1.3.1. Definición	10
1.3.2. Incidencia y Clínica.....	11
1.3.3. Diagnóstico	13
1.3.4. Pruebas complementarias	14
1.3.5. Tratamiento	15
1.3.5.1. Fármacos.....	18
1.3.5.1.1. Broncodilatadores adrenérgicos	18
1.3.5.1.2. Corticoides	19

1.3.5.1.3. Anticuerpos IgG monoclonales frente a VRS (Palivizumab).....	19
1.3.5.1.4. Montelukast.....	20
1.3.6. Recidivas	21
1.3.7. Indicaciones de Profilaxis.....	21
1.4. DEFENSAS FRENTE A LA INFECCIÓN EN EL SISTEMA RESPIRATORIO.....	22
1.4.1. Inmunidad pulmonar	24
1.4.2. Inmunidad innata y surfactante pulmonar.....	24
1.4.3. Inmunidad frente al Virus Respiratorio Sincitial	28
1.4.4. Proteínas asociadas al surfactante SP-A y SP-D.....	32
1.4.4.1. Estructura y variación genética	39
1.4.4.2. Variantes <i>en SFTPD</i> y Bronquiolitis Aguda por VRS.....	48
2. HIPÓTESIS.....	51
3. OBJETIVOS.....	55
4. PACIENTES Y MÉTODOS.....	59
4.1. PACIENTES Y CONTROLES.....	59
4.1.1. Grupo I (casos)	59
4.1.2. Grupo II (controles).....	60
4.2. PROCEDIMIENTOS CLÍNICOS Y RECOGIDA DE DATOS	61
4.3. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO.....	62
4.3.1. Hemograma	62
4.3.2. Proteína C reactiva (PCR)	63

4.3.3. Detección de Virus Respiratorio Sincitial (VRS).....	63
4.3.3.1. Técnicas para detección de Virus Respiratorio Sincitial.....	64
4.4. DETERMINACIONES GENÉTICAS	65
4.4.1. Estudios de asociación genética.....	65
4.4.2. Extracción de DNA.....	67
4.4.3. Selección de polimorfismos	68
4.4.4. Técnicas de análisis molecular de los polimorfismos de <i>SFTPD</i>	69
4.5 HERRAMIENTAS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS	71
5. RESULTADOS.....	75
5.1. POBLACIÓN ESTUDIADA.....	75
5.1.1. Años de estudio, hospitalización y estacionalidad	75
5.1.2. Edad	76
5.1.3. Sexo	77
5.2. PESO AL NACIMIENTO Y EDAD GESTACIONAL	78
5.3. LACTANCIA MATERNA	78
5.4. ANTECEDENTES FAMILIARES (AF).....	79
5.5. SINTOMATOLOGÍA	80
5.5.1. Clasificación según gravedad	80
5.6. EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS	80
5.7. SIGNOS VITALES - CONSTANTES VALORADAS.....	82
5.8. TRATAMIENTO	83

5.8.1. Aerosolterapia con Salbutamol	83
5.8.2. Corticoides	83
5.9. ASOCIACIONES GENÉTICAS	84
5.9.1. ASOCIACIONES DE LAS VARIANTES EN <i>SFTPD</i> CON LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA BRONQUIOLITIS AGUDA POR VRS	84
5.9.1.1. Estudio de asociación de los polimorfismos (SNPs) de <i>SFTPD</i> con la susceptibilidad a Bronquiolitis Aguda por VRS	85
5.9.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE HAPLOTIPOS DE <i>SFTPD</i> CON LA SUSCEPTIBILIDAD A BRONQUIOLITIS AGUDA POR VRS	89
5.9.3. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS (SNPs) de <i>SFTPD</i> CON LA GRAVEDAD DE LA BRONQUIOLITIS AGUDA POR VRS	91
6. DISCUSIÓN	97
7. CONCLUSIONES	109
8. BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXO	
FICHAS DE RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Virus Respiratorio Sincitial.....	07
Figura 2. Sistema respiratorio Humano.....	22
Figura 3. Surfactante Pulmonar	24
Figura 4. Funciones múltiples de las proteínas asociadas al surfactante SPD.....	35
Figura 5. Funciones múltiples de las proteínas asociadas al surfactante SP-A.....	36
Figura 6. Molécula SP- A.....	37
Figura 7. Molécula SP- D.....	38
Figura 8. Distribución de los genes de las proteínas surfactante A1, A2 y D en brazo q del cromosoma 10	39
Figura 9. Gen <i>SFTPD</i> y mapa de polimorfismos del gen	40
Figura 10. Representación simplificada de la estructura polipeptídica de SP-D.....	43
Figura 11. Diagrama de flujo	60
Figura 12. Desequilibrio de ligamento (D^1) de <i>SFTPD</i>	66
Figura 13. Desequilibrio de ligamento (r^2) en <i>SFTPD</i>	67
Figura 14. PCR en tiempo real de los SNPs estudiados en el gen <i>SFTPD</i>	71
Figura 15. Estacionalidad de la Bronquioliits aguda (2006-2008)	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de puntuación clínica de Wood-Downs modificado.....	15
Tabla 2. Receptores de reconocimiento de patógenos.....	27
Tabla 3. SP-D y SNPs humano	42
Tabla 4. Polimorfismos no sinónimos y sus combinaciones en haplotipos.....	43
Tabla 5. Información disponible que se encuentra asociada significativamente a variantes genéticas (SNPs) y haplotipos de SP-A1; SP-A2 y SP-D en la edad pediátrica y adulta	44
Tabla 6. Población de estudio	61
Tabla 7. SNP código de ensayo.....	70
Tabla 8. Distribución de población estudiada por edad y sexo en los pacientes y controles con bronquiolitis aguda por VRS	77
Tabla 9. Antecedentes familiares (AF) y asociación con el desarrollo de bronquiolitis aguda por VRS	79
Tabla 10. Resultados analíticos en pacientes con bronquiolitis aguda por VRS y en individuos de control.....	82
Tabla 11. Signos vitales en pacientes con bronquiolitis aguda por VRS (VRS-A/VRS-B) y en individuos de control	83
Tabla 12. Frecuencias genotípicas en la población y equilibrio de Hardy-Weinberg	84
Tabla 13. Frecuencias, Asociación de SNPs de <i>SFTPD</i> con la susceptibilidad de la Bronquiolitis Aguda por VRS	86
Tabla 14. Frecuencias, Asociación SNPs de <i>SFTPD</i> con la susceptibilidad a Bronquiolitis Aguda por VRS A	87
Tabla 15. Frecuencias, Asociación SNPs de <i>SFTPD</i> con la susceptibilidad a Bronquiolitis Aguda por VRS B	88
Tabla 16. Asociaciones de haplotipos de <i>SFTPD</i> y susceptibilidad para Bronquiolitis Aguda por VRS, VRS-A y VRS-B	90

Tabla 17. Asociación genotipos con la gravedad clínica de Bronquiolitis Aguda por VRS	91
Tabla 18: SNPs y marcadores clínicos de la Bronquiolitis Aguda por infección de VRS (grupo casos).....	92
Tabla 19: SNPs y marcadores analíticos de la Bronquiolitis Aguda por infección de VRS (grupo casos).....	93

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

	INGLÉS	ESPAÑOL
CD	cluster differentiation	diferenciación cluster
CR	complement receptor	receptor del complemento
CRD	carbohydrate recognition domain	dominio de reconocimiento de carbohidratos
CTLA4	cytotoxic T- lymphocyte antigen	antígeno 4 del linfocito T citotóxico
DPPC	dipalmitoyl phosphatidylcholine	dipalmitoilfosfatidilcolina
EDTA	ethylenediaminetetra acetic acid	ácido etildiaminotetraacético
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay	inmunoensayo de absorción ligado a enzimas
gp-340	glycoprotein 340	glicoproteína 340
GWAS	genome wide association studies	estudios de asociación de genoma completo
HDN	human neutrophil defensins	defensinas producidos por neutrófilos humanos
HWE	Hardy – Weinberg equilibrium	equilibrio de Hardy – Weinberg
ILC	innate lymphoid cell	células linfoides innatas
LAIR1	leukocyte – associated Ig-like receptor 1	receptor 1 de tipo inmunoglobulina asociado al leucocito
LD	linkage disequilibrium	desequilibrio de ligamento
LPS	lipopolysaccharide	lipopolisacárido
LRP1	low density lipoprotein related protein 1	proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad
MAF	minor allele frequency	frecuencia del alelo menos frecuente
MBL	mannose-binding	lectina de unión a manosa
MD2	myeloid differentiation factor 2	factor 2 de diferenciación mioelide
MFAP4	microfibril- associated protein 4	proteína 4 asociada a microfibrilla
MPO	myeloperoxidase	mieloperoxidasa
PAMPs	pattogen-associated molecular pathern	patrones moleculares asociados a patógenos
PC	phosphatidylcholine	fosfatidilcolina
PCR	polymerase chain reacction	reacción en cadena de la polimerasa
PE	phosphatidylglycerol	fosfatidilglicerol
PI	phosphatidylinositol	fosfatidilinositol
pRDS	prematurely borninfants with respiratory distress síndrome	síndrome de dificultad respiratoria en el recién nacido prematuro
PRR	pattern-recognition receptor	receptores reconocedores de patrones
PS	phosphatidyserine	fosfatidilserina
rhSPD	recombinant human SP-D	SP-D humana recombinante
SIRP α	signal inhibitory regulatory protein alfa	Proteína de señal reguladora alfa

SNP	single nucleotide polymorphism	polimorfismos de un solo nucleótido
SP	surfactant protein	proteína surfactante
SPR210	specific 210-kDa SP-A receptor	receptor de 210kda específico para SP-A
SSP-PCR	sequence-specific primers PCR	PCR con primers de secuencia específica
TLR	Toll like receptors	receptores de membrana tipo Toll
CI	Confidence interval	Intervalo de confianza

Español

A	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
Arg	arginina
ARN	ácido ribonucleico
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
BA	bronquiolitis aguda
C	citocina
CEIC	comité ético de investigación clínica
Cys	cisteína
CHUIMI	Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil
<i>Derp</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
G	guanina
HA	hemaglutinina
HUMIC	Hospital Universitario Materno Infantil de Canarias
Ig	inmunoglobulina
ILe	isoleucina
IRA	insuficiencia respiratoria aguda
Met	metionina
N	tamaño muestral
NA	neuranimidasa
OR	odds ratio
pb	pares de bases
SDRA	Síndrome de distres respiratorio agudo
T	Timina
Thr	Treonina
Val	Valina
VRS	Virus respiratorio sincitial

Reseña Histórica

La Bronquiolitis Aguda (BA) es una enfermedad respiratoria de inicio agudo, con dificultad predominante respiratoria, y signos acompañantes de infección vírica (coriza, otitis, fiebre).

El Virus Respiratorio Sincitial (VRS) es el principal agente infeccioso de la BA. Los brotes de la enfermedad se producen en invierno o en primavera. El VRS fue descubierto en 1956, cuando Morris y cols., aislaron un nuevo virus de chimpancé en un grupo de primates que estaban enfermos con resfriado. En ese momento no se sabía que este virus podría causar infecciones respiratorias en seres humanos (Morris y cols., 1956).

Posteriormente, Chanock y Finberg, detectaron un aumento en los niveles de anticuerpos neutralizantes específicos frente al virus causante del coriza del chimpancé en niños con patología de vías respiratorias (Chanock y Finberg., 1957).

De ésta forma se vio que el nombre del agente infeccioso del coriza del chimpancé no era adecuado para este virus y desde entonces se ha denominado Virus Respiratorio Sincitial (VRS) por sus manifestaciones clínicas y de laboratorio (Chanock y cols., 1961).

En la década de los 60 del siglo pasado se descubrió una sustancia pulmonar necesaria e imprescindible para la función respiratoria normal en los recién nacidos (RN), **el surfactante pulmonar**, que evita el colapso alveolar, siendo además un componente esencial de la inmunidad innata (Gluck, 1971).

En los años 80 del siglo pasado se describió el síndrome de distrés respiratorio (pRDS) en recién nacidos prematuros (Hallman y cols., 1977).

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BASE TEÓRICA

Tradicionalmente se ha considerado que la susceptibilidad y la gravedad de las enfermedades respiratorias dependen de los factores externos, pero cada vez es más evidente que están influenciados por la variación de nuestro material genético.

La Bronquiolitis aguda (BA) es una afectación de las vías respiratorias bajas en niños menores de dos años de edad producida por una infección por virus, entre los que juega un papel importante el virus respiratorio sincitial (VRS).

Se ha demostrado que variaciones en genes codificantes de componentes del sistema inmunológico pueden aumentar la susceptibilidad a padecer diversas enfermedades como infecciones, neoplasias o enfermedades autoinmunes.

El papel del sistema inmunológico en la defensa frente a la infección se puede explicar mediante el estudio de enfermedades mendelianas monogénicas como las inmunodeficiencias primarias o congénitas.

La herencia mendeliana simple se caracteriza por individuos que presentan mutaciones poco frecuentes en un único gen o fragmento cromosómico, que cursan con manifestaciones clínicas de la enfermedad (manifestación fenotípica) y tienen una alta penetrancia.

Pero en ocasiones no se encuentra una única mutación causal en el ácido desoxirribonucleico (ADN), sino que distintas variantes pueden actuar a través de un modelo de herencia complejo de baja penetrancia. Una gran diversidad de variantes genéticas se presentan en la naturaleza y están relacionadas con la adaptación y la biodiversidad.

Además, un elemento común para la evolución y la estabilidad de las especies son las variaciones genéticas polimórficas. En concreto, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), resultado de la presencia de una base nucleótida que

puede variar en un lugar del genoma, constituyen la forma más común de variación genética.

Los SNPs son producidos por el cambio de un nucleótido (A: adenina; C: citosina; G: guanina; y T: timina) por otro y se conocen como polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, SNP, pronunciado “esnip”) o de una sola base. La mayoría son marcadores bialélicos. Se estudian a través de mapas de desequilibrio genético (LD). Analizando las relaciones entre SNPs se selecciona un número de ellos de una región, los denominados tagSNPs, que aportan la máxima información acerca de la variación genética en un gen o región genética determinada. Esto es debido a que los reordenamientos genéticos son menores cuanto más cercanas se encuentran dos regiones cromosómicas, ya que los SNPs cercanos tienden a heredarse conjuntamente en haplotipos.

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios de asociación de variantes genéticas con enfermedad. Hasta hace aproximadamente diez años se analizaban variantes genéticas por separado. Sin embargo, en los últimos años el uso de herramientas y paquetes informáticos han experimentado un gran avance y en la actualidad se tiende a realizar estudios en los que se analizan diversos tagSNP para analizar la máxima variabilidad, conocida y no conocida en un gen.

El ejemplo más avanzado son los denominados estudios de asociación genómica (GWAS, genome wide association studies).

1.2. VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL

1.2.1. Características del virus

El Virus Respiratorio Sincital (VRS) pertenece a la familia de los Paramixovirus, con partículas virales pleomórficas que inducen una característica formación de sincitios (agrupación de células) en tejidos celulares.

Tiene ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple como material genético y es el agente infeccioso más frecuente en la patología respiratoria del lactante y de la primera infancia.

No existen portadores sanos, lo que implica que todo sujeto infectado desarrollará algún tipo de sintomatología.

Se distingue entre dos tipos de VRS: VRS-A y VRS-B. El primero de ellos es más agresivo y grave, produciendo epidemias todos los años mientras que el segundo surge cada uno o dos años.

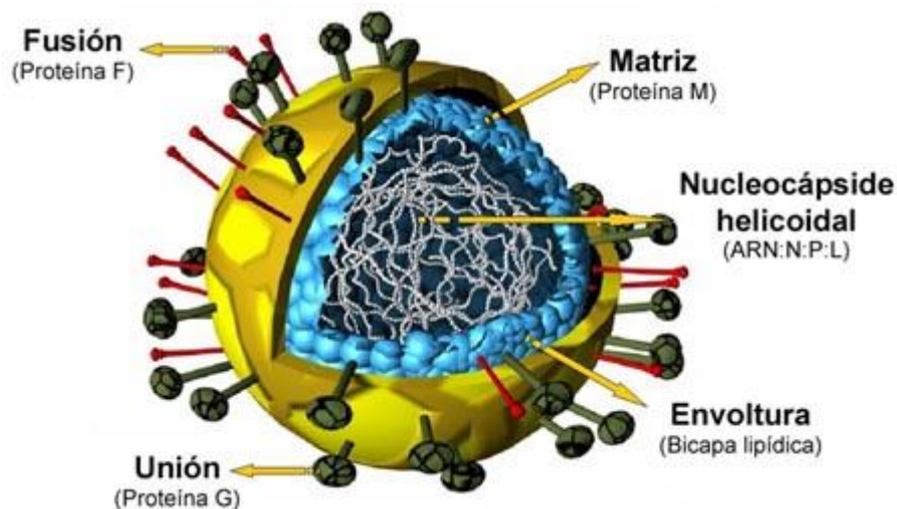


Figura 1: Virus Respiratorio Sincitial.

Tomado de:

<http://epidemiologiamolecular.com/etiologia-bronquiolitis/>

El VRS es un virus ARN (Figura 1), que tiene 4 géneros, de los cuales tres forman la subfamilia Paramixovirinae, compuesta por los Paramyxovirus, que contiene los virus parainfluenza humanos tipos 1 y 3; los Rubulavirus, que contiene los virus de la parotiditis y parainfluenza humana tipos 2 y 4, entre otros, y los Morbilivirus, donde se clasifica el virus del sarampión. El VRS pertenece al cuarto género, Pneumovirus de la subfamilia Pneumovirinae

El VRS es un virus de 120-300 nm con envoltura. Su genoma es muy simple, y consiste en una única cadena no segmentada de RNA de sentido negativo, asociada a proteínas virales formando la nucleocápside helicoidal. Al ser no segmentado no se realiza reordenamiento genético con otros virus, como sucede con los virus gripales (Glezen WP, Couch RB, 1991).

La envoltura viral es una capa bilipídica derivada de la membrana plasmática y tiene aspecto de cardo con espículas superficiales formadas por glucoproteínas transmembrana de unos 11-12 nm de longitud y separadas por 6-10 nm (Figura 1). Hasta el momento se han determinado 10 proteínas esenciales y se ha descrito la secuencia completa de los genes de la cepa A2 (Walsh E, Hall C, 1996).

El ARN viral consta de 15222 nucleótidos transcritos en 10 ARN mensajeros poliadenilados monocitrónicos, cada uno de los cuales codifica una cadena polipeptídica. Las proteínas N,-P, y L se asocian con la nucleocápside. Tres de las cinco asociadas con la envoltura F, G y SH son proteínas de superficie transmembrana glicosilada, y las otras dos -M y M2 son proteínas no glicosiladas de la matriz. Las dos proteínas restantes, NS1 y NS2, son proteínas no estructurales de virón. Las dos proteínas de superficie transmembrana glicosiladas F (fusión) y G (fijación), parecen integrar la capacidad infecciosa e interaccionan con el sistema inmune. La proteína F tiene una estructura similar a la proteína de fusión de los Paramyxovirus y consta de dos fragmentos unidos por puentes disulfuro (F1 y F2). Esta proteína inicia la penetración viral fusionando las membranas viral y celular y favorece la diseminación del virus uniendo las células infectadas a las adyacentes no infectadas para formar los sincitios característicos. La fusión eficiente necesita co-expresión de las tres proteínas de superficie F, G, y SH (Heminway y cols., 1994). La proteína G es más grande, es un glucosaminoglicano similar a la heparina y parece mediar en la fijación del virus a la célula huésped. El VRS carece de actividad de hemaglutinina y neuraminidasa (Collins y cols., 1995).

El VRS es termolábil, y soporta bastante mal el cambio de pH. A temperatura ambiente depende de la humedad. La presencia del VRS se detecta en cultivos celulares infectados por un aspecto sincitial característico. El grado de formación

del sincitio depende del tipo de cultivo celular, del espesor de la lámina de células, de la cepa, del medio, de la multiplicidad de la infección y del laboratorio.

Cuando se analiza el virus, la heterogeneidad de las cepas es mayor desde el punto de vista genético. La proteína G (fijación) presenta mayor variabilidad genética, seguida de la proteína SH. La respuesta inmunológica frente a la infección primaria por VRS presenta una re-actividad cruzada entre las proteínas F de los grupos A y B, mientras que la respuesta de anticuerpos frente a la proteína G es altamente específica de grupo e incluso de subgrupo (Bradenburg y cols., 2000).

Las cepas de ambos grupos circulan al mismo tiempo durante las epidemias, pero varían proporcionalmente entre los grupos A y B y entre los subtipos (Milinaric-Galinovic y cols., 2009).

Los análisis moleculares y genéticos de las relaciones entre las cepas que circulan al mismo tiempo y en varias regiones, demuestran que las cepas dentro de cada grupo tienen diversidad genética.

Los análisis de las proteínas G de cepas presentes a lo largo de tiempo en distintas regiones, sugieren que la inmunidad de la población podría desempeñar un papel importante en la evolución de las cepas (Cane PA, Pringle CR, 1997).

1.2.2. Epidemiología

El VRS causa entre un 50 y 70% de las bronquiolitis y afecta a más de dos tercios de lactantes en el primer año de vida. Según el estudio de Patel y cols 2007, aproximadamente un 10% de los lactantes desarrollan enfermedad de vías bajas, un 1% precisa ingreso hospitalario y algo menos del 0,1% fallece. La infección por VRS no garantiza inmunidad permanente o prolongada por lo que son posibles las re-infecciones.

El VRS presenta un patrón estacional relativamente constante con epidemias que duran de 3 a 5 meses. Estas epidemias ocurren característicamente desde finales de otoño, abarcando los meses invernales hasta el inicio de la primavera.

Se describe un intervalo corto entre picos epidémicos (7-12 meses) o intervalos largos (13-15 meses). El pico epidémico corto se asocia a mayor severidad con incremento de ingresos por bronquiolitis y neumonías.

El virus es el único agente respiratorio viral que junto con el virus de la gripe, produce infecciones respiratorias cada año (Du Prel y cols., 2009).

Según Madhi y cols. 2001, en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el virus se encuentra durante todo el año y puede tener importancia en el desarrollo de las exacerbaciones asmáticas.

En el continente africano el VRS está presente casi todo el año en los pacientes pediátricos afectados por VIH (Hussey y cols., 2000). Por diversos factores principalmente climáticos, los brotes epidémicos surgen desde estos reservorio (Stensballe y cols., 2003).

El VRS se transmite por contacto con fómites contaminados o de persona a persona (gotas gruesas), pero no por aerosolización de pequeñas partículas. Las dos principales formas de transmisión del VRS son el contacto directo por las grandes gotas de las secreciones y la autoinoculación con las manos al tocar objetos contaminados. Los ojos y la nariz son las principales puertas de entrada de la infección.

Los brotes de la infección por VRS son anuales (Figueras, Quero y Comité de Estándares, 2005).

1.3. BRONQUIOLITIS AGUDA

1.3.1. Definición

La Bronquiolitis Aguda es una enfermedad respiratoria de diagnóstico clínico, que se presenta con rinitis, dificultad respiratoria, tos, rechazo de la alimentación, irritabilidad y, en lactantes muy pequeños, apneas.

Estos hallazgos clínicos, junto con la existencia de sibilancias y/o crepitantes en la auscultación pulmonar, permiten realizar el diagnóstico. Existe una importante heterogeneidad entre países a la hora de diagnosticar la BA. El signo principal en Norteamérica es la presencia de sibilancias espiratorias, mientras que en el Reino Unido son los crepitantes.

Los criterios clásicos más aceptados son los propuestos por McConnochie, que considera BA “el primer episodio agudo de dificultad respiratoria con sibilancias, precedido por un cuadro catarral de vías respiratorias altas (rinitis, tos, con/sin fiebre), que afecta a niños menores de 2 años, aunque preferentemente se da en el primer año de vida” (McConnochie, 1993).

La presencia o no de antecedentes personales o familiares de atopia no modifican el diagnóstico de bronquiolitis; aunque es cierto que en estos lactantes (especialmente si padecen dermatitis atópica) este cuadro puede ser en realidad un primer episodio de hiperreactividad bronquial(Durani y cols.,2008).

1.3.2. Incidencia y Clínica

Su incidencia es máxima en los 6 primeros meses de vida, predominando en niños por encima de las niñas. Además, presenta mayor gravedad en los varones, ya que proporcionalmente las hembras tienen mayores vías aéreas.

Son factores de riesgo para el contagio y el desarrollo de bronquiolitis el hacinamiento, el ingreso hospitalario, tener hermanos mayores (especialmente si comparten habitación), asistencia a guardería, exposición al humo de tabaco y consumo materno de tabaco durante la gestación. La lactancia materna prolongada parece actuar como factor protector. Existe un riesgo importante de transmisión nosocomial, por lo que es fundamental el lavado de manos del personal para el contacto entre un paciente y otro.

Existe riesgo de enfermedad severa en prematuros (menores de 35 semanas), pacientes con broncodisplasia (o enfermedad pulmonar crónica), enfisema lobar, hipoplasia pulmonar, inmunodepresión, fibrosis quística,

enfermedades neuromusculares debilitantes, metabopatías, cardiopatías con repercusión hemodinámica, neonatos y lactantes menores de 2 meses.

La mortalidad global es baja en niños previamente sanos, pero aumenta considerablemente en los pacientes con las patologías de base mencionadas (García y cols., 2007).

La eliminación del virus a través de las secreciones nasofaríngeas se prolonga de 6 a 21 días desde el inicio de los síntomas e incluso más de 6 semanas en el paciente inmunodeprimido.

No existen portadores sanos de VRS, en niños mayores y adultos ocasiona cuadros pseudogripales. La inmunidad generada es relativamente corta. Pueden haber reinfecciones, que pueden producirse en semanas posteriores a la recuperación, aunque por lo general suelen darse en epidemias posteriores, siendo la tasa de reinfección por epidemia de hasta un 20%. Los anticuerpos maternos transmitidos a través de la placenta tienen algún efecto protector en el neonato, lo que explica que las infecciones graves sean infrecuentes en las primeras 4-6 semanas de vida.

Tras una bronquiolitis por VRS es frecuente la recidiva de episodios de sibilantes, hasta en un 30-80% de los lactantes que padecieron una bronquiolitis importante. La prevalencia de estas recidivas va disminuyendo hacia los 3-5 años de edad. No es fácil sin embargo, determinar "a priori" qué lactantes presentará recurrencias.

El periodo de incubación dura de 4 a 5 días, luego el virus se replica en nasofaringe y se disemina a las vías respiratorias inferiores.

Los síntomas de vías altas suelen ser tos, rinorrea, estornudos con o sin fiebre, que duran de uno a tres días; después de estos aparecen los síntomas de vías respiratorias bajas como tos más intensa, dificultad respiratoria progresiva con aparición de sibilantes, taquipnea, tiraje y dificultad más o menos intensa para la alimentación. En los casos más severos progresan la tos y la dificultad respiratoria se hace más importante, apareciendo rechazo de la alimentación, postración,

taquipnea y en algunos casos cianosis y crisis de apnea. Es el primer episodio de sibilancias tal y como se indica en la definición.

Las pausas de apnea pueden ser un síntoma inicial de bronquiolitis, especialmente en lactantes pequeños y prematuros y constituyen un factor de riesgo importante para desarrollar un cuadro grave. El VRS puede producir pausas de apnea en lactantes pequeños incluso sin signos de bronquiolitis.

En el primer mes de vida la clínica puede ser atípica, con febrícula, irritabilidad, rechazo de la alimentación y apnea central, confundándose muchas veces con sepsis.

En ocasiones puede acompañarse de complicaciones infecciosas del aparato respiratorio como otitis media (30-50%) y neumonía (15%) (Eriksson y cols., 2002).

Dada la evolución clínica de la bronquiolitis, conviene recomendar la reevaluación clínica en un plazo de 72 horas en los lactantes menores de 12 meses.

En la exploración podemos encontrarnos un tórax hiperinsuflado, taquipnea, tiraje subcostal, intercostal, supraesternal, aleteo nasal e incluso sibilancias audibles sin fonendoscopio. A la auscultación pulmonar el hallazgo más común son la espiración alargada, hipoventilación, roncus y los sibilantes de predominio espiratorio; los crepitantes finos inspiratorios y los subcrepitantes no son infrecuentes, de hecho pueden ser el principal hallazgo auscultatorio en los lactantes más pequeños.

1.3.3. Diagnóstico

Es fundamentalmente clínico, debiéndose cumplir los siguientes requisitos, siguiendo los criterios de McConnochie: edad menor de 24 meses, primer episodio y cuadro clínico mencionado previamente (McConnochie, 1993).

1.3.4. Pruebas complementarias

- La saturación de oxígeno es un signo para la predicción de hipoxemia y la valoración clínica (Tabla 1). La pulsioximetría transcutánea es un método sencillo, incruento y tiene una buena correlación con la PaO₂ sanguínea. Se recomienda su determinación en todos los pacientes con bronquiolitis (Schroeder y cols., 2004)
- La radiografía de tórax en la mayoría de pacientes no muestra alteraciones significativas, salvo el atrapamiento aéreo esperado. Puede observarse hiperinsuflación pulmonar, infiltrados peribronquiales o atelectasias laminares. En algunos estudios recientes se ha señalado que la presencia de fiebre igual o superior a 38°C y la saturación menor al 94% se asocian significativamente a la existencia de infiltrados o atelectasias (Garcia Garcia y cols., 2004).
- Hemograma, PCR, en casos con clínica moderada y/o grave (Purcell y cols., 2004).
- Identificación de virus (cultivo en lavado nasofaríngeo): Los test rápidos para detectar anticuerpos de VRS con inmunofluorescencia directa tienen una sensibilidad entre 80-90%, su principal utilidad es en casos de diagnóstico incierto (ej.; distress en cardiópata, “bronquiolitis incipientes” en pacientes de riesgo...) o para establecer medidas de aislamiento.

Los estudios microbiológicos sólo tienen utilidad epidemiológica y no son precisos para efectuar el diagnóstico que “es clínico” ni para orientar la terapia ni modificar el manejo del paciente (Reis y cols., 2008).

Tabla 1: Sistema de puntuación clínica de Wood-Downes modificado.

PUNTUACIÓN	0	1	2
Sat O ₂	≥ 95% respirando aire ambiente	92-95% respirando aire ambiente	≤ 92% respirando aire ambiente
Frecuencia respiratoria	< 50 rpm	50-60 rpm	> 60 rpm
Sibilancias espiratorias	Cortas	Toda la espiración	Inspiración y espiración o audibles sin fonendoscopio o hipoventilación
Musculatura accesoria	Ninguna o ligera intercostal	Intercostal moderada y supraesternal	Intensas, Aleteo nasal, bamboleo del tórax

Interpretación de la escala: Afectación leve: 0-3 puntos. Afectación moderada: 4-5 puntos. Afectación grave: 6 ó más puntos; rpm: Frecuencia respiratoria por minuto;

1.3.5. Tratamiento

La BA por VRS es una enfermedad autolimitada, y con frecuencia de gravedad leve/moderada, por lo que la mayoría de los niños pueden tratarse en su domicilio con medidas generales, sabiendo que la fase crítica son las primeras 48-72 horas.

No existe un tratamiento de soporte específico en el manejo de BA. Se consideran recomendaciones en la opinión de experto y en la buena práctica clínica las siguientes:

- Los pacientes con dificultad respiratoria grave y/o cianosis y/o SatO₂ < 92 deben recibir oxigenoterapia.
- Se recomienda aspirar secreciones de las vías respiratorias altas antes de las tomas, antes de valorar la gravedad y antes de cada tratamiento inhalatorio.
- Se debe valorar el estado de hidratación y la capacidad de tomar líquidos.

- Se recomienda fraccionar y/o espaciar la toma si se objetiva dificultad para la ingesta.

- La alimentación por sonda nasogástrica (SNG) puede ser una opción en los niños con riesgo de deshidratación y desnutrición.

- En los niños más grave o en los que no toleran por vía oral se recomienda canalizar una vía e hidratar por vía intravenosa.

- Se debe evitar la exposición al tabaco.

- No se recomienda el uso rutinario de salbutamol o adrenalina inhalada o nebulizada, sólo es útil en los casos que tengan una buena respuesta terapéutica y siempre valorando la relación riesgo- beneficio.

- Los corticoides inhalados no son útiles en el tratamiento de la BA. La evidencia actual indica que los glucocorticoides sistémicos o inhalados no aportan un efecto clínicamente relevante en la reducción de los ingresos hospitalarios o la duración de la hospitalización.

- La ribavirina nebulizada tampoco debe utilizarse sistemáticamente. El efecto de la ribavirina tiene un escaso impacto clínico. Podría considerarse restringido su uso a pacientes con infecciones respiratorias por VRS grave de alto riesgo.

- El suero salino hipertónico parece ser eficaz y útil en el manejo de la BA del paciente hospitalizado, por no tener una relación favorable con la mejoría clínica en los primeros tres días y una potencial disminución de las tasas de hospitalización. Sin embargo, los últimos estudios de Havard Ove Skjerven y cols. 2015, no han encontrado ningún beneficio en los pacientes ingresados con BA por VRS cuando recibieron tratamiento con suero salino hipertónico nebulizado, frente a medidas de soporte. Tampoco descendió la duración de la hospitalización.

- Se ha propuesto la ventilación no invasiva o presión positiva continua de las vías respiratorias (CPAP) o doble nivel de presión positiva de las vías respiratorias (BiPAP), como una alternativa o paso intermedio, antes de la

ventilación invasiva, de forma particular en aquellos pacientes con crisis de apnea frecuentes.

- Se debe considerar el uso selectivo de heliox en BA moderada–grave administrándolo con mascarilla reservorio-oxígeno y de forma continua con una concentración 70/30 en los casos de BA grave. Se recomienda utilizar el heliox combinado con CPAP.

- No se recomienda el uso general de las metilxantinas en la BA., Se podrían considerar como de uso alternativo en la BA con apnea en neonatos y/o en lactantes con antecedentes de prematuridad.

- Ni el óxido nítrico, ni la DNAasa recombinante humana nebulizada, ni el interferón intramuscular, ni la furosemida nebulizada, ni la inmunoglobulina intravenosa, ni el bromuro de ipratropio, ni la fisioterapia respiratoria se han demostrado eficaces en el tratamiento de la BA. Tampoco los antibióticos, considerándose inapropiado su uso.

- El surfactante es recomendable en los casos de BA grave, pero no existen estudios de coste para valorar la relación coste-beneficio para este tipo de tratamiento. Las proteínas de surfactante asociada SP-A y SP-D son moléculas de reconocimiento de patrones con estructura colectina. La detección de alteraciones cualitativas y cuantitativas en el surfactante de lactantes con BA grave, constituye la base racional para la suplementación terapéutica de surfactante exógeno. El surfactante es un agente tensioactivo compuesto por proteínas y fosfolípidos que se produce en los neumocitos tipo 2, bien conocido en patología respiratoria neonatal para mejorar la estabilización alveolar al disminuir la tensión superficial. De sus cuatro componentes proteicos (A, B, C y D), dos de ellos (A y D) tienen capacidad de unirse a marcadores reconocidos en la superficie de bacterias y virus, como en el caso de BA por VRS. En este sentido no está claro si el uso del surfactante en BA por otros virus pudiera ser diferente (Willson y coll., 2005). La administración de surfactante en lactantes con BA grave que precisan ventilación mecánica parece una alternativa eficaz y segura. Las evidencias existentes, aunque limitadas, surgieron un efecto beneficioso clínico y gasométrico, así como una mejoría de la función pulmonar en las primeras 60 horas de su aplicación. Hay

que considerar si estos estudios son suficientes para su utilización en el tratamiento de la BA por VRS (Luchetti y coll., 2002).

De una forma más específica se exponen los diferentes fármacos.

1.3.5.1. Fármacos

1.3.5.1.1. Broncodilatadores adrenérgicos

Los broncodilatadores adrenérgicos como la adrenalina y el salbutamol, son los fármacos más estudiados y usados. Los estudios comparativos publicados con Adrenalina versus Salbutamol tampoco parecen demostrar una clara ventaja de uno sobre el otro; aunque en algún ensayo clínico se ha documentado la superioridad de la adrenalina sobre los beta-2. Se le atribuye al efecto alfa añadido, la mejoría de los scores clínicos en pacientes ingresados y, especialmente en los de urgencias, el menor tiempo de estancia hasta el alta y el menor número de ingresos en planta, aunque no modifican el tiempo de hospitalización (King y cols., 2004).

Se necesitan más estudios para saber la dosis óptima de Adrenalina, pero en la mayoría de los protocolos se recomiendan dosis de 3 mg independientemente del peso o edad. Se presupone que la dosis debe ser similar independientemente del peso, porque la cantidad de fármaco que llega al pulmón depende del volumen Tidal.

Los efectos adversos de ambos fármacos son por lo general clínicamente poco preocupantes; en general palidez, taquicardia, hipertensión arterial y vómitos, entre otros. En algunas series se han detectado en mayor proporción con el Salbutamol, en comparación con la Adrenalina. Culley, 2002 ha demostrado que la Adrenalina es segura en comparación con placebo y Salbutamol, sin evidenciarse efectos secundarios de gravedad. Hasta un 10% de los pacientes pueden sufrir una hipoxemia paradójica tras la administración de broncodilatadores, que hace necesaria la administración de oxigenoterapia transitoriamente (Karadag y cols., 2007).

Los ensayos realizados con broncodilatadores orales no han demostrado eficacia.

1.3.5.1.2. Corticoides

Se ha referido algún beneficio en su uso.

Kuyucu S y cols., 2004 refieren que administrar en la fase inicial de la enfermedad una dosis de Dexametasona IM (0,6 mg/Kg) añadida a broncodilatadores nebulizados (L-adrenalina o Salbutamol) da lugar a una mejoría de los scores clínicos, frecuencia respiratoria (FR) y saturación en la fase tardía (5^o día) de las bronquiolitis leve/moderada versus a broncodilatadores solos, sin diferencias significativas de estas variables antes del 5^o día ni a los 2 meses.

En cuanto a los corticoides inhalados la mayoría de trabajos, como el de Csonkay cols., 2003, encuentran alguna evidencia sobre su eficacia incluyendo tanto bronquiolitis como episodios de sibilancias recurrentes. Los que incluyen exclusivamente pacientes con bronquiolitis han demostrado ausencia de beneficios a corto y largo plazo, e incluso más efectos adversos (ej. reingresos) entre los pacientes que usaron esteroides inhalados. Wong JYW y cols. 2000 han observado un cierto descenso en las recidivas en bronquiolitis por Rinovirus. Hasta el momento actual, no se ha podido demostrar que la Budesonida nebulizada disminuya los síntomas en bronquiolitis aguda o prevenga sibilancias posteriores.

1.3.5.1.3. Anticuerpos IgG monoclonales frente a VRS (Palivizumab)

La inmunoprofilaxis pasiva más utilizada frente a la BA es el Palivizumab (anticuerpos antiglicoproteína F monoclonales murinos humanizados frente al VRS).

Reduce un 55% el riesgo de hospitalización en pacientes pediátricos de alto riesgo. En el subgrupo de prematuros se redujo la incidencia de hospitalización en un 78% y en el de enfermedad pulmonar crónica (EPC) un 39%. Parece ser útil para prevenir ingresos hospitalarios y en UMI, pero no para evitar la ventilación mecánica (Wang, 2006).

Son eficaces en la prevención en los grupos de riesgo, pero su uso en la enfermedad ya establecida no ha sido concluyente. Se ha demostrado su efecto antiviral en la enfermedad aguda al reducir el número de cultivos positivos, pero no hay significación clínica ni estadística en días de ingreso, mejoría de scores o necesidad de ventilación mecánica (Rodríguez, Gruber, 1997). En el metaanálisis realizado por Fuller, Del Mar, 2008 ninguno de los estudios incluidos demostró beneficio estadísticamente significativo del tratamiento con IgIV.

No se han encontrado diferencias significativas en la duración de la hospitalización entre los tratados o no con Palivizumab.

La profilaxis pasiva se administra una vez al mes a dosis de 15 mg/kg. Se usa en períodos epidémicos.

Su inconveniente es el altísimo coste.

1.3.5.1.4. Montelukast

Diversos estudios fisiopatológicos (Bisgard, 2003) sugieren que la vía de los leucotrienos está muy activada en la patogénesis de la bronquiolitis. De ahí que cuando surgieron los fármacos inhibidores de los leucotrienos, como montelukast, aprobados para el tratamiento del asma y las sibilancias recurrentes de los lactantes y preescolares era razonable que por la aparente analogía entre la BA y el asma y por su asociación epidemiológica, se pensara que éstos fármacos podrían constituir una alternativa definitiva en el manejo terapéutico de la BA, tanto de su sintomatología aguda como de las recurrencias postbronquiolitis. Sin embargo, los estudios diseñados a tal efecto hasta el momento actual no han podido demostrar que Montelukast sea eficaz para acelerar la curación de la BA en fase aguda ni para prevenir los síntomas postbronquiolitis durante la convalecencia. De estos estudios (Amirav y cols., 2008) se pueden extraer varias enseñanzas provechosas, la primera es que la BA y el asma (y sibilancias recurrentes del lactante y preescolar) son enfermedades completamente distintas y que el tratamiento eficaz de la BA es muy probable que no venga del tratamiento del asma (Bisgard y cols., 2008), (Martínez – Gimeno, 2009).

1.3.6. Recidivas

Las recidivas tras bronquiolitis por Rinovirus oscilan en torno a un 63% frente a 20% para VRS. Tras una bronquiolitis grave por VRS es frecuente la recidiva de episodios de sibilantes, hasta en un 30-80%. La prevalencia de estas recidivas va disminuyendo hacia los 3-5 años de edad. No es fácil sin embargo, determinar “a priori” qué lactantes presenta recurrencias. Sin otros factores predisponentes, las recidivas cesan hacia los 11 años. Los pacientes con menos de 6 meses en pico epidémico tienen mayor riesgo de recidivas. Existe 5 veces más riesgo de asma si tienen 122 días en el momento de la bronquiolitis (Martínez – Gimeno, 2009).

1.3.7. Indicaciones de profilaxis

La principal medida de prevención son las **medidas higiénicas**, tanto en los hogares y guarderías, como en centros sanitarios. Estas recomendaciones incluyen: lavado frecuente de manos, evitar tabaquismo pasivo, evitar el contagio a través de hermanos en edad escolar y la asistencia a guardería.

Profilaxis activas-vacunas: aún no disponibles.

En agosto de 2015 se ha publicado que el adenovirus de chimpancé PanAd3- RSV y el virus *vaccinia* modificado Ankara, MVA-RSV, son vectores virales de replicación defectuosa que codifican la proteína de fusión F del VRS, de la nucleocápside (N) y de la matriz (M2-1), proteínas que sirven para la inducción humoral y la respuesta celular. Se ha realizado un estudio en adultos sanos, a los que se administró la vacuna, por vía intramuscular o intranasal, demostrándose su seguridad e inmunogenicidad. Además son muy bien toleradas y sin eventos adversos, excepto reacción local (Green Christopher y cols., 2015).

1.4. DEFENSAS FRENTE A LA INFECCIÓN EN EL SISTEMA RESPIRATORIO

El sistema respiratorio humano está compuesto de vías respiratorias altas y de vías respiratorias bajas (Figura 2).

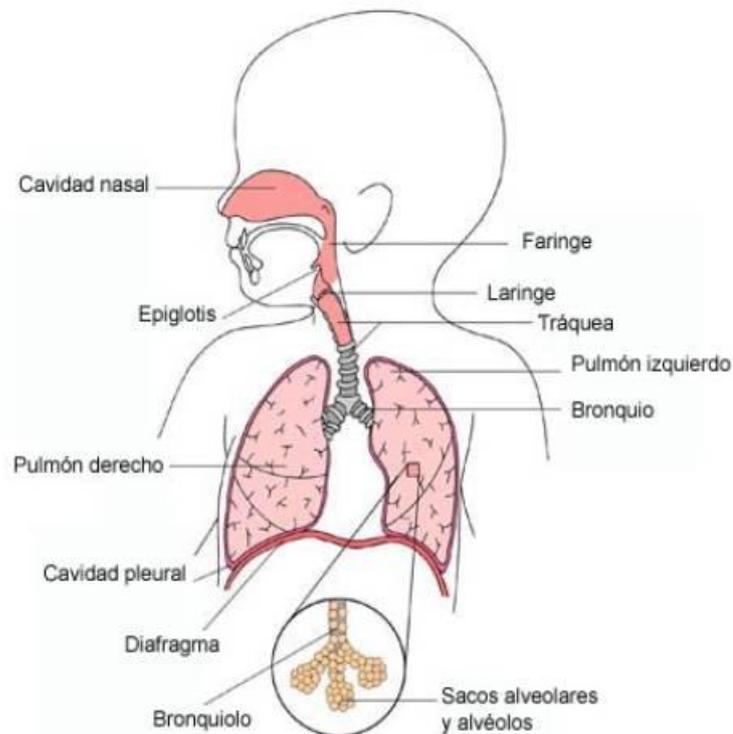


Figura 2: Sistema Respiratorio Humano

Tomado de: <http://www.biodic.net>

Los agentes externos penetran en el organismo por primera vez a través de las vías respiratorias altas (fosas nasales y faringe).

Las vías respiratorias bajas comprenden la laringe, la tráquea y los bronquios.

Los pulmones son órganos de tejido esponjoso irrigados por los vasos sanguíneos, esenciales en el intercambio gaseoso, que conectan el sistema respiratorio con el sistema circulatorio.

Dentro de cada pulmón la vía respiratoria continua a los bronquios primarios, dividiéndose hasta llegar a las vías aéreas de menor calibre, llamados bronquiolos terminales, que acaban en estructuras llamadas alveolos. Los alveolos se encuentran rodeados de vasos sanguíneos, que son capilares que garantizan la correcta difusión de los gases respiratorios a través de la barrera hemato-gaseosa.

El epitelio alveolar es plano y está compuesto por dos tipos de células, neumocitos tipo I y II que recubren aproximadamente el 90% de la superficie alveolar (suponen menos de 10% del total de las células presentes en el pulmón). Los neumocitos se diferencian entre la semana 24 y 34 de la gestación, y son células especializadas en sintetizar y secretar el surfactante pulmonar (Figura 3), fluido que evita el colapso alveolar tras la espiración (Jobe, 2002).

1.4.1. Inmunidad Pulmonar

El sistema inmunitario consta de varias líneas de defensa.

1.4.2. Inmunidad innata y surfactante pulmonar

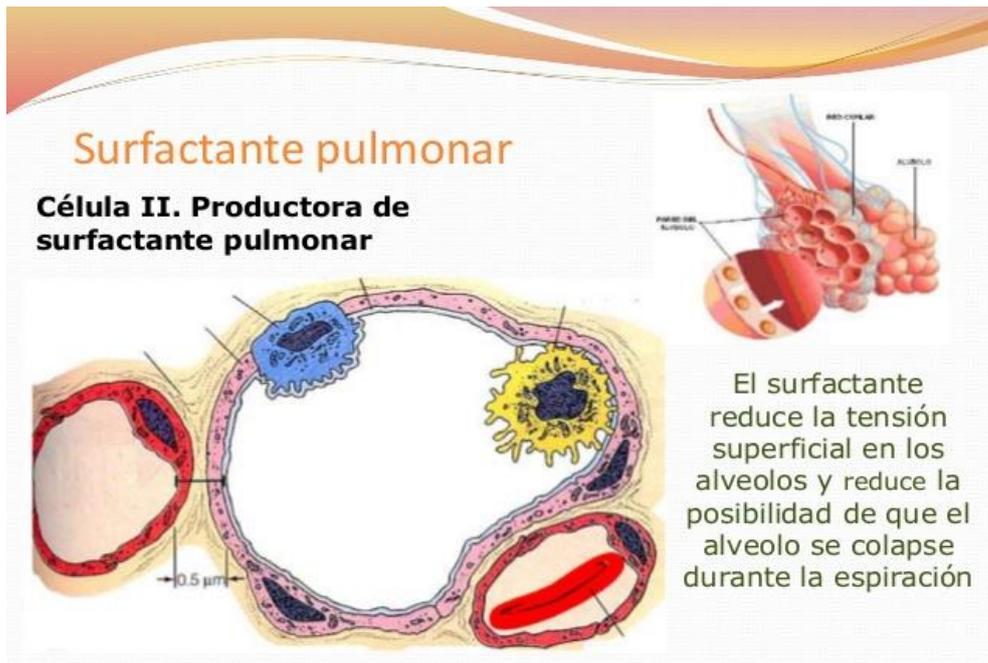


Figura 3: Surfactante Pulmonar.

Tomado de:<http://demy.asia/>

La inmunidad innata (natural o inespecífica), que carece de especificidad y de memoria, es la primera línea de defensa del organismo. Sus componentes están siempre presentes y dispuestos para actuar inmediatamente y no requieren un tiempo de latencia para desencadenar una respuesta.

Si un organismo traspasa la barrera epitelial y comienza a crecer en los tejidos del huésped, en la mayoría de los casos es reconocido por los macrófagos que están en los tejidos. Los macrófagos son las primeras células que encuentran a los microorganismos, ingieren, destruyen y producen sustancias que activan al

endotelio de los vasos locales estimulando la extravasación de neutrófilos circulantes (reclutamiento celular). Además, la inmunidad innata es responsable de la comunicación con la inmunidad adquirida y el inicio de dicha respuesta. Esto es debido a que los monocitos se diferencian en macrófagos capaces de activar a los linfocitos T. Además, son las células presentadoras de antígeno profesionales encargada de la activación de linfocitos T.

Los macrófagos y neutrófilos, así como otras células de la inmunidad innata reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; pathogen-associated molecular patterns) mediante receptores de estos patrones, los PRRs (pattern recognition receptors). Además, existen PRRs solubles, como es el caso de algunas proteínas del complemento o las proteínas surfactante pulmonares A y D. Los PRRs no tienen la especificidad de los receptores del Sistema Inmunológico Adquirido, sino que reconocen estructuras comunes y conservadas en un amplio rango de microorganismos.

Los PAMP mejor conocidos son el lipopolisacárido (LPS) bacteriano, el peptidoglicano, los ácidos lipoteicoicos, la manosa, el DNA o el RNA bacteriano y los glicanos. Estas estructuras son químicamente muy diferentes pero a su vez muy estables y se encuentran ampliamente distribuidas. Otra característica importante de los PAMPs es que son producidos únicamente por patógenos microbianos y no por sus huéspedes.

Por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS) es sintetizado solamente por bacterias Gram negativas; el receptor PRR reconoce el LPS y alerta al huésped de la presencia de un organismo infectante.

Las estructuras reconocidas por el sistema inmunológico innato son esenciales para la supervivencia de los microorganismos o su patogenicidad.

Los PAMPs son estructuras invariantes de clases enteras de patógenos. Por ejemplo, todas las bacterias Gram negativas tienen LPS, y de esta forma el receptor de patrón de reconocimiento de LPS puede detectar la presencia de infección bacteriana por Gram negativos. Los PRRs están codificados en el genoma y difieren de los receptores antigénicos de la inmunidad adquirida. Los

PRRs celulares se expresan en muchas células efectoras del sistema inmunológico innato, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, pero también en las células de la inmunidad adquirida como linfocitos B (que son también células presentadoras de antígeno) y en menor grado en linfocitos T. Además, se expresan en otras muchas células, como células endoteliales y queratinocitos, que aunque no son específicas del sistema inmunológico, juegan un papel importante en la defensa frente a la infección y en el desarrollo de la respuesta inflamatoria.

La expresión de los receptores de reconocimiento de patrones no es clonal, y tienen especificidades idénticas. Una vez que los receptores de reconocimiento de patrones identifican a un patrón molecular asociado a patógenos, la célula efectora es estimulada a desarrollar sus funciones efectoras inmediatamente, sin necesidad de proliferación anterior. Esta característica permite la respuesta rápida del sistema inmunológico innato. Los receptores PRR pertenecen a varias familias (Tabla 2).

Tabla 2: Receptores de reconocimiento de patógenos

Receptores de membrana
Receptor tipo Toll (TLR) Receptores Scavenger (SR) Receptores tipo lectina (CLR)
Proteínas de la vía clásica y alternativa de complemento
Receptores de patrones solubles
Proteína de unión a manosa (MBL), Proteínas de Surfactante Pulmonar A y D (SP-A y SP-D) Proteína C Reactiva (PCR) Pentraxina 3 (PTX3)
Receptores de reconocimiento intracelular
Nod-like receptors (NLR, como las proteínas NOD 1 y 2 o NLRP3)

Funcionalmente los PRRs pueden encontrarse como receptores de membrana, como receptores dentro de endosomas o ser solubles (secretados). Entre estos últimos se encuentran las proteínas surfactantes A y D.

Receptores secretados

Las moléculas de reconocimiento de patrones secretadas funcionan como opsoninas. En este grupo se encuentran algunos componentes del complemento, colectinas, pentraxinas, la proteína amiloide del suero y la proteína C-reativa, LPS binding protein (LBP), *bactericidal permeability increasing protein* (BPI) y las *peptidoglycan recognition proteins* (PGRS).

Variantes genéticas de la proteína D del surfactante pulmonar (SP-D): papel en la susceptibilidad y gravedad de la infección por virus respiratorio sincitial (VRS)

Una colectina muy importante es la lectina de unión a la manosa (MBL), un PRR (Pattern Recognition Receptors) importante del sistema inmunológico innato que se une a bacterias, virus, hongos y protozoos.

La MBL reconoce predominantemente hidratos de carbono en la superficie de microorganismos; pero también fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas no glicosiladas.

Son producidas junto con moléculas surfactantes por el hígado y secretadas al suero como reactantes de fase aguda. Se unen a los carbohidratos de las bacterias Gram positivas y negativas, hongos, virus y parásitos.

1.4.3. Inmunidad frente al Virus Respiratorio Sincitial

Jacoby DB y cols. (1997) demostraron que existía susceptibilidad genética para la bronquiolitis por VRS según variantes de la IL 8.

Un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de la IL8, relacionado con los niveles de producción del mismo, se ha asociado con la severidad de la enfermedad en niños con bronquiolitis por VRS (Heinzmann, 2004).

Durante la bronquiolitis por VRS se liberan interleuquinas y cis-leucotrienos (cis-LT). La respuesta inmunitaria de las vías respiratorias a las infecciones virales incluye la liberación de una serie de interleuquinas proinflamatorias, la afluencia de macrófagos, linfocitos y eosinófilos (Gern, Busse, 2000), y la liberación de mediadores como los cis-LT, que se encuentran en mayores cantidades en la secreción de las vías respiratorias durante la infección por VRS (Garafalo y cols., 1992), (Volovitz y cols., 1988).

La inmunidad por células T juega un papel clave en la eliminación de virus de los pulmones infectados. Dado que el desarrollo de la inmunidad adquirida por células T requiere de varios días, la activación de los mecanismos de inmunidad innata es esencial para que se contenga la infección vírica y para la posterior generación de una inmunidad específica.

El primer elemento celular de la respuesta innata a VRS son los macrófagos alveolares (MA). Experimentos *in vitro*, tanto en ratones como en humanos, han señalado que los MA se activan tras ser incubados con VRS, generando citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL6 e interferones α y β (Panuska, 1990), (Franke-Ullmann y cols., 1995).

Las infecciones por virus de ARN, así como por el virus respiratorio sincitial y el virus de la gripe, son las mayores causas de inflamación de vías respiratorias. Los TLRs expresados en los compartimientos intracelulares (TLR3; 7; 8; 9) reconocen ácidos nucleicos de estos virus y de esta forma detectan la infección intracelular.

En la BA el papel de la predisposición genética se sustenta en la fuerte asociación de la susceptibilidad a presentar formas más graves de infección con historia familiar de asma y en diferencias en la susceptibilidad según los distintos grupos étnicos, raciales o de sexo.

Un trabajo realizado en Dinamarca por Jansen y cols., estudiaron 12346 pares de gemelos en un periodo de 10 años, relacionados con la hospitalización causada por VRS. La concordancia fue de 0,66 en los gemelos monocigóticos frente a 0,53 de los dicigóticos y se estimó una contribución genética del 16 a 20% en la gravedad de la enfermedad (Janssen y cols., 2007).

La infección por los virus respiratorios generalmente se restringe a las células superficiales del epitelio respiratorio, a las células de los bronquiolos y de los neumocitos tipo 1, y en su curación participa la inmunidad innata y la adquirida.

Las células epiteliales detectan virus VRS a través de receptores tipo Toll (TLR). Los TLR, mediante una cascada de señalización inducen la inmunidad innata con la expresión de una respuesta inflamatoria liberando distintas citocinas y quimocinas. El funcionamiento inadecuado o excesivo de estos mediadores inmunitarios de las vías respiratorias es regulado por distintos genes y puede aumentar la respuesta inflamatoria y causar daño en el tracto respiratorio.

El CX3C, fractalkina, es una proteína presente en los leucocitos que interacciona con el receptor CX3CR cuando se liga a la proteína G del VRS mediando reacciones inmunológicas posteriores. El polimorfismo T280M del receptor CX3CR se ha asociado a bronquiolitis grave por VRS (Amanatidou y cols., 2006).

La gravedad se relaciona con un mayor inóculo del virus. La carga viral influye en la gravedad de la enfermedad (DeVincenzo y cols., 2005).

Determinadas secuencias de la proteína G del virus pueden influir en el equilibrio Th/Th2 incrementando la respuesta Th2.

La susceptibilidad de la enfermedad está influenciada por un número de factores genéticos y no genéticos. La mayoría pueden tener un nivel diferente de impacto en las diferentes etapas de la vida.

Los componentes genéticos que determinan la susceptibilidad en la enfermedad pulmonar aguda y crónica han sido estudiados en diferentes contextos biológicos y se están correlacionando con los factores ambientales y/o contaminantes, las enfermedades bacterianas y víricas o las condiciones como el nacimiento prematuro o la necesidad de ventilación mecánica (Villar y cols., 2008).

Se cree que la variabilidad en la presentación clínica de la BA por VRS tiene una base poligénica. Los datos epidemiológicos y clínicos no apoyan un modelo de herencia mendeliana de las enfermedades más comunes.

En principio, los SNPs no alteran el fenotipo de un individuo, pero en determinadas condiciones ambientales pueden afectar a la función genética determinando la susceptibilidad a presentar una enfermedad como la bronquiolitis (Amanatidou y cols., 2009).

Los genes que se estudian están implicados en el control directo del patógeno y pueden alterar la adhesión del virus, su fusión o replicación, o modificar la respuesta inmunológica posterior. Probablemente estos dos aspectos sobre el sistema inmunológico y la inflamación se combinan de distintas maneras en cada individuo según la edad y la genética propia.

En estudios sobre predisposición genética, se han encontrado polimorfismos en los genes relacionados con determinadas citocinas y quimiocinas incluyendo IL-4 y su receptor, IL-8, IL-9, IL10, IL-13 (Puthothu y cols., 2006), y CCR5 (Hoebee y cols., 2003). También se han relacionado formas graves de la enfermedad con polimorfismos de genes implicados en la interacción célula-virus y señales intercelulares como CX3CR1, SP-A, SP-D (proteínas del surfactante implicados en la opsonización del virus) (TalG y cols., 2004) y TLR-4 (Haynes y cols., 2001).

Así mismo se han relacionado determinados haplotipos genéticos de IL-13 con mayor gravedad de la enfermedad (Puthothu y cols. 2006).

El complejo del receptor TLR4/CD14+ activado por la proteína F del VRS, tiene un importante papel en la respuesta innata al virus. Así, determinados polimorfismos en dicho receptor como el cambio en el aminoácido D259G (Puthothu y cols.,2006) o los alelos (299) Gly y (399) Ile se asocian con menor señal del factor nuclear NF-kB, menor producción de IFN, IL-8, IL-10, IL-12p35, IL-18 y ausencia de factor de necrosis tisular TNFa (Tulic y cols., 2007). Estudios experimentales en roedores carentes de TLR4 o con dichos polimorfismos han demostrado que la enfermedad se prolonga más en el tiempo y es más grave (Kurt-Jones y cols., 2000).

La variación genética en los genes implicados en la adaptación pulmonar puede contribuir, bajo ciertas condiciones, a las diferencias en la susceptibilidad de la enfermedad o a la severidad de la misma entre las personas.

Estudios de la genética de los componentes del surfactante pulmonar y en particular de las proteínas del surfactante, han revelado la correlación con la enfermedad pulmonar en RN, niños y adultos (Flores y cols., 2003).

Las variaciones genéticas y mutaciones de las proteínas del surfactante se han correlacionado con la susceptibilidad de la enfermedad o patogénesis (Flores y cols., 2009).

1.4.4. Proteínas asociadas al surfactante SP-A y SP-D

El surfactante pulmonar (Figura 3), es un complejo de lipoproteínas, sintetizado por las células epiteliales tipo II en el pulmón. Su función es reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido alveolar y así evitar el colapso alveolar. Juega además un papel importante en la inmunidad innata siendo esencial para la vida, para la salud respiratoria y para la función pulmonar normal durante toda la vida (Flores y Kala, 1998).

El surfactante pulmonar mantiene la integridad alveolar y juega un papel importante en la defensa pulmonar y en el control de la inflamación. Su principal función es reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido del interior del alveolo y prevenir el colapso alveolar.

Está compuesto aproximadamente por 90-92% de lípidos y 8-10% de proteínas (Postle y cols., 2001; Weaver, 2010).

La fracción lipídica está compuesta principalmente por fosfolípidos, la mayoría de los cuales es fosfatidilcolina (PC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) un particular componente clave en la reducción de la tensión superficial. El segundo más abundante es fosfatidilglicerol (PS) y otros fosfolípidos, así como lípidos no fosforilado como el colesterol y los triglicéridos (Flores y Phelps, 1997).

Es probable que cada uno de los componentes sea importante en la formación y absorción de la película, así como de su comportamiento en la superficie alveolar.

Han sido identificadas cuatro proteínas asociadas al surfactante (SP: A, B, C y D) (White R y cols., 1985).

El componente proteico del surfactante pulmonar consiste en proteínas de suero y proteínas del surfactante que originalmente se pensó que era específico solo para el pulmón. Sin embargo, el surfactante se puede encontrar en tejidos extra pulmonares, especialmente las proteínas hidrofílicas (SP-A y SP-D) (Brauer y cols., 2009).

Las cuatro proteínas del surfactante (SP-A, SP-B, SP-C y SP-D) se dividen en dos grupos por sus propiedades de hidrofobicidad. Las hidrofóbicas, proteína surfactante (SP-B) B y C (SP-C), están implicadas principalmente en la prevención del colapso alveolar en las vías respiratorias bajas, reduciendo la tensión superficial. SP-C posee apenas la capacidad de enlazar LPS y juega un importante papel en la inmunidad innata (Glasser y cols., 2001, Augusto y cols., 2003).

SP-A y SP-D son proteínas hidrofílicas que pertenecen a la familia de lectinas tipo C (colectinas), siendo su principal misión la defensa de huésped, (Crouch, 2001, Hawgood y Poulain, 2001).

Se ha demostrado que SP-D juega un papel importante en la estructura de la forma extracelular del surfactante, mielina tubular, y otras funciones relacionadas con el surfactante (Wang y cols., 2010), así como en la homeostasis del surfactante (Hawgood y Poulain, 2000; Ikegami y cols., 2000; Botas y cols., 1998).

Los miembros de la familia colectinas se caracterizan por un dominio N-terminal del colágeno y un dominio de reconocimiento del carbohidrato C-terminal (CRD) que permite el enlace a varios tipos de macromoléculas, incluyendo carbohidratos, fosfolípidos y proteínas, así como a un número de agentes patógenos y alérgenos (Crouch y Wright, 2001).

La SP-D se encuentra en grandes estructuras oligoméricas que se unen a virus, bacterias y hongos. Esta unión es dependiente del calcio (Loros, Wang y Lin, 2005), (Kishore y cols. 2006), (Holmskov y cols. 2003).

SP-A es una proteína de 248 aminoácidos (aa) (35kDa), asociada en una subunidad estructural trímica (105kDa), y seis de estos trímeros se unen en una estructura oligomérica, generalmente hexámeros (630kDa) que contiene un total de dieciocho monómeros SP-A1 y SP-A2 (Wang y cols., 2007, Mikerov y cols., 2008).

Los oligómeros de SP-D son estructuras tetraméricas cruciformes de 540kDa compuestas por cuatro subunidades de 130kDa y cuyos monómeros poseen 375aa (Kishore y cols., 2006).

La SP-A y la SP-D son componentes importantes del sistema inmune innato. Estas moléculas potencian la defensa frente a bacterias, virus, hongos y otros patógenos, por mecanismos como agregación, aglutinación o inhibición de la opsonización (Kishore y cols., 2005).

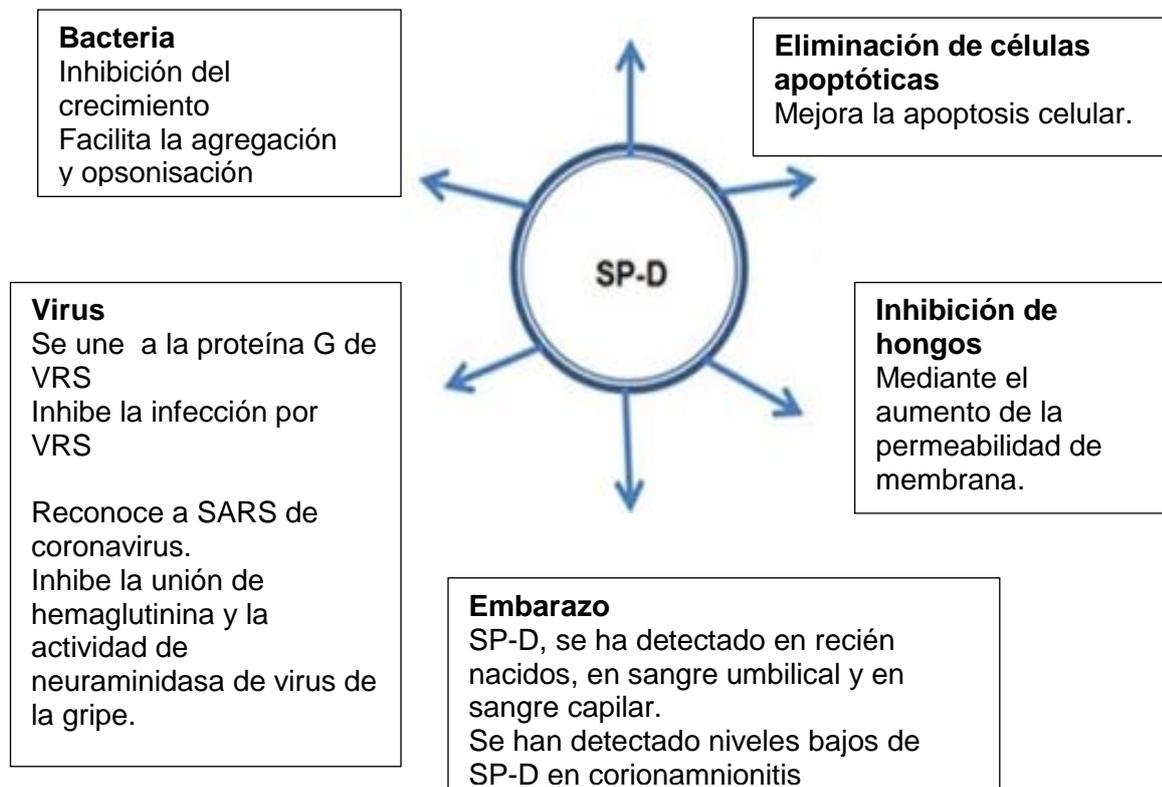
Se han descrito diversos receptores de membrana que reconocen a las colectinas, por ejemplo, la SP-A interactúa con CD35 (CR1) (Tenneret y cols., 1989), C1qR (CD93), CD14 (Sano y cols., 2000), CD91/calreticulina. Algunos receptores de la SP-A se han identificado en las células alveolares tipo II, pero no en la superficie celular de los macrófagos alveolares, indicando su papel potencial como agente tensoactivo. La mayoría de las moléculas de receptor que interactúan con la SP-A también interactúan con la SP-D y proteína de señal reguladora alfa (SIRPalfa, CD91/calreticulina, gp-340, TLR-2, TLR-4 y CD14), para promover la fagocitosis, la eliminación de células apoptóticas y por otra parte modula la producción de citoquinas o actúa como quimiocinas, estimulando la migración del macrófago alveolar.

Las colectinas facilitan la destrucción de diversas bacterias, virus y hongos, tras la interacción directa con el patógeno, o la activación de las células inmunes (Wu y cols., 2003, Schaeffer y cols., 2004).

La SP-A y la SP-D no sólo regulan la función de las células inmunes innatas, como las células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno, sino que también regulan las funciones de las células T, proporcionando un enlace entre el sistema inmune innato y el adquirido, con el fin de aliviar la infección y la inflamación y promover la restauración la homeostasis del tejido (Pastva y cols., 2007).

Las proteínas asociadas al surfactante A y D juegan además un papel muy importante en la regulación de la respuesta inflamatoria (Gardai y cols., 2003), (Wright, 2005), y promueven el aclaramiento de células apoptóticas del pulmón (Vandivier y cols., 2002). Por otra parte, se encargan de mantener el pulmón en estado quiescente en ausencia de infección.

Hipersensibilidad e inflamación. Mejora la apoptosis de eosinófilos y la captación en los pacientes con asma. Reduce la proliferación de PBMCs en los pacientes sensibles a ácaros. Agregación y captación de gránulos de polen. Suprime la inflamación inducida por el alérgeno y disminución de la sensibilización. Disminuye la infiltración de eosinófilos y la producción de citoquinas proinflamatorias.



VRS: *virus respiratorio sincitial*; SP-D: proteína surfactante D; PBMCs: células mononucleares de sangre periféricas.

SARS: Síndrome respiratorio agudo grave.

Figura 4: Funciones múltiples de las proteínas asociadas al surfactante SP-D

Variantes genéticas de la proteína D del surfactante pulmonar (SP-D): papel en la susceptibilidad y gravedad de la infección por virus respiratorio sincitial (VRS)

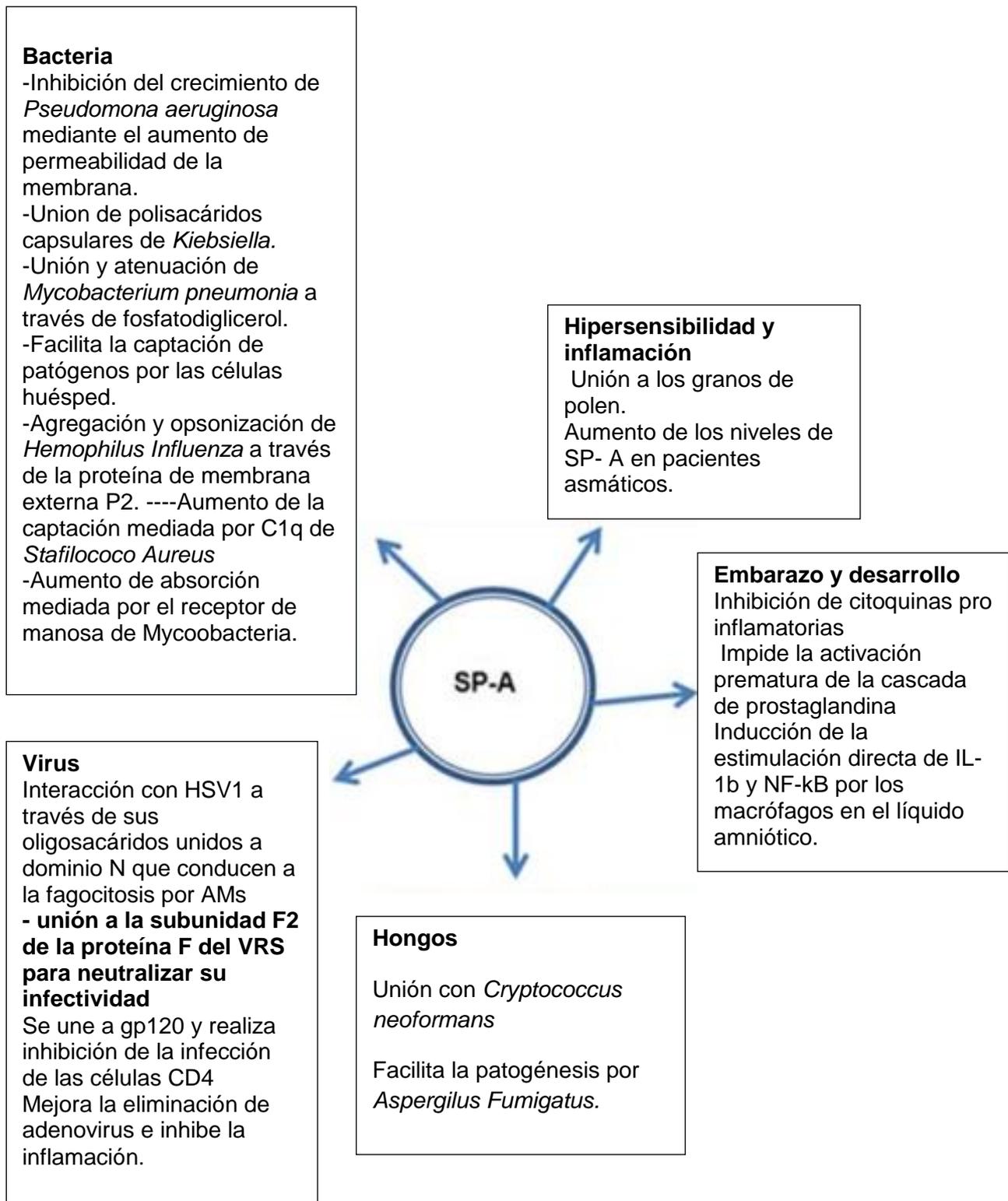
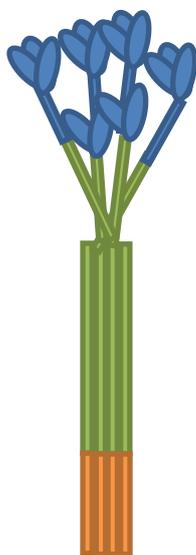
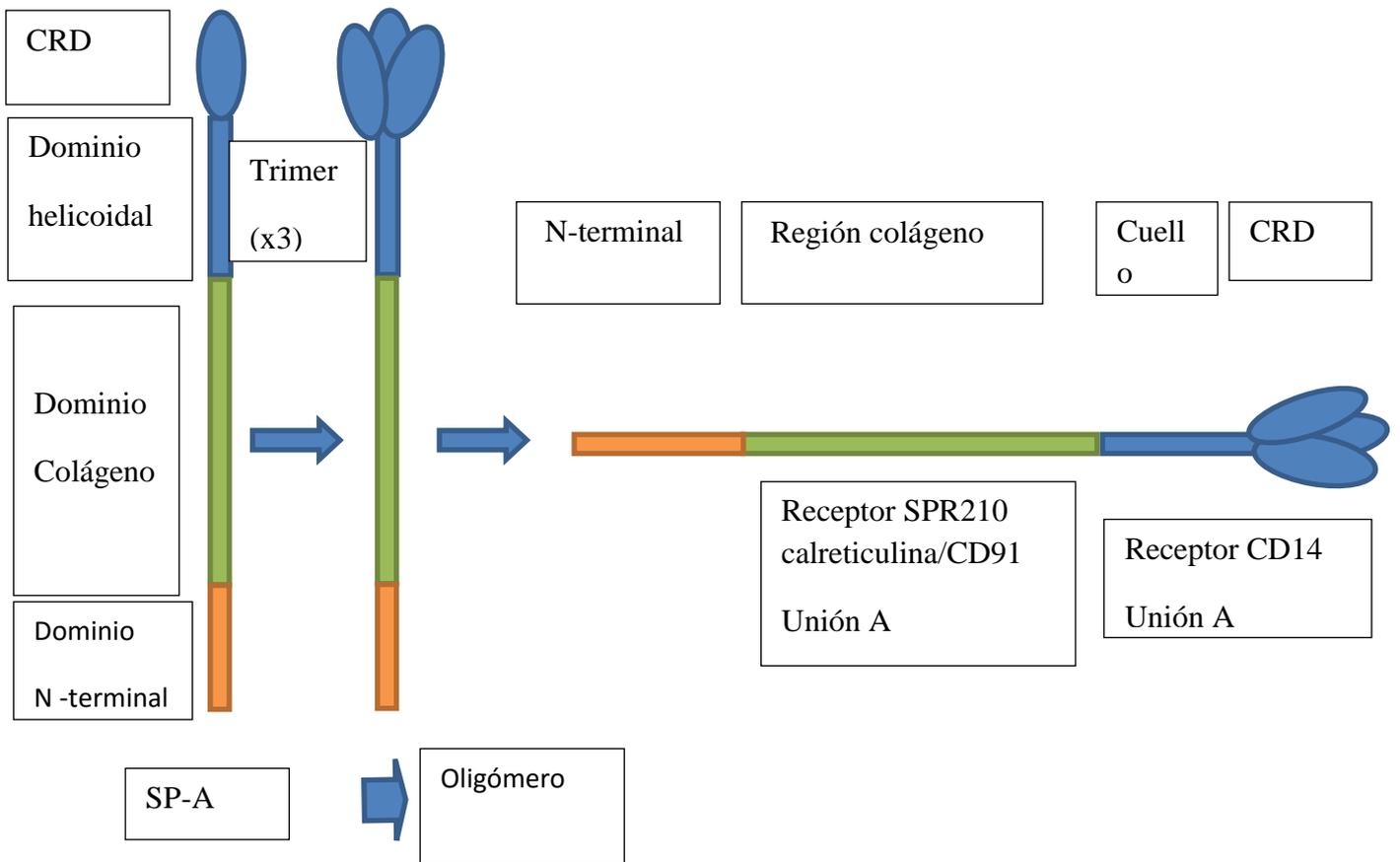


Figura 5: Funciones múltiples de las proteínas asociadas al surfactante SP-A

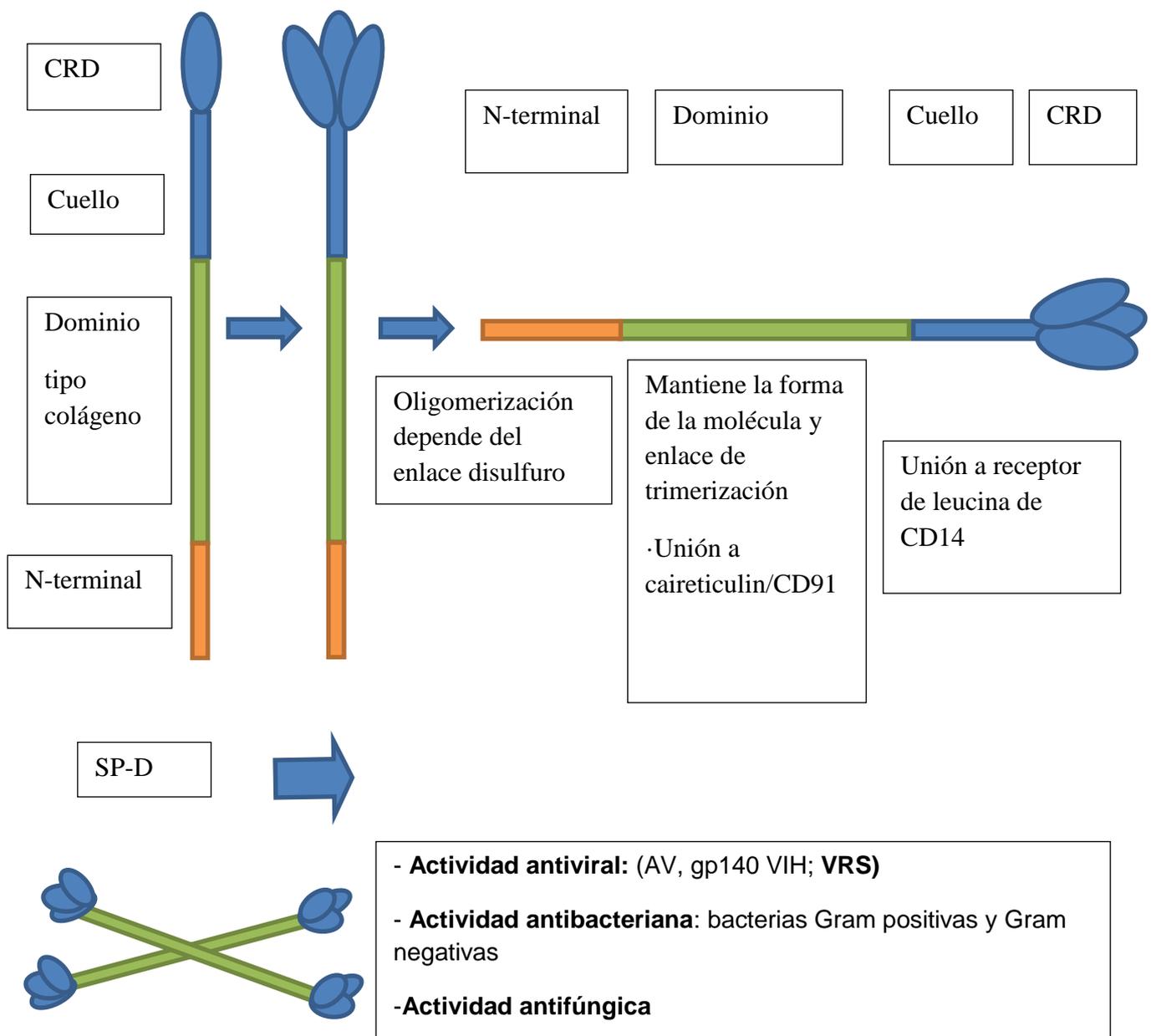
Variantes genéticas de la proteína D del surfactante pulmonar (SP-D): papel en la susceptibilidad y gravedad de la infección por virus respiratorio sincitial (VRS)



- **Actividad antiviral:** residuos de ácido siálico de SP-A controlan la actividad de opsoninas atando a las glicoproteínas F y G de VRS
- **Actividad antibacteriana:** *S aureus*, *P aeruginosa*, *E coli*, *M tuberculosis*, *H. Influenze*
- **Actividad antifúngica:** *Pneumocystis*, *C albicans*, *A fumigatus*

Figura 6: Molécula SP-A

Variantes genéticas de la proteína D del surfactante pulmonar (SP-D): papel en la susceptibilidad y gravedad de la infección por virus respiratorio sincitial (VRS)



CRD: Carbohydrate recognition Domain

Figura 7: Molécula de SP-D

Figuras 6 y 7: Molécula de SP-A y SP-D que representa a las diferentes regiones. Las moléculas se muestran por primera vez como monómeros y trímeros, que se dividen en cuatro subunidades, el dominio N-terminal no colágeno, la región colágena, el cuello helicoidal, y el dominio de reconocimiento de carbohidratos C-terminal. Cada subunidad tiene afinidades de unión a diferentes patógenos (Adaptado de *Annapurna Nayak et al, Immunology, 2012*).

1.4.4.1. Estructura y variación genética

Las dos proteínas hidrofóbicas del surfactante, SP-B y SP-C, están codificadas por un solo gen, localizados en los cromosomas 2 y 8, respectivamente.

Las proteínas humanas SP-A y SP-D están codificadas por tres genes (“cluster”), localizados en el brazo largo del cromosoma 10. El locus de la SP-A humano consiste en dos genes funcionales altamente homólogos *SFTPA1* y *SFTPA2* en orientación transcripcional opuesta y un pseudo gen que se ubica entre los dos genes. Se encuentran junto al gen de la SP-D, *SFTPD* (Figura 8).

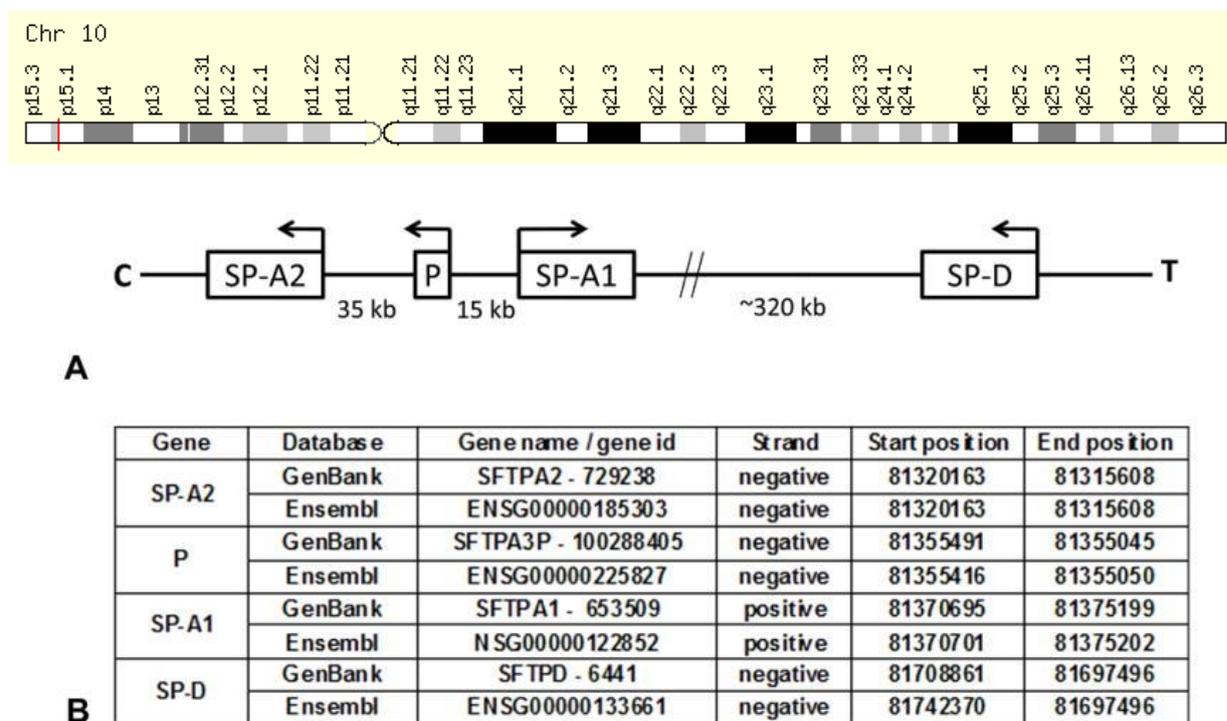


Figura 8: Distribución de los genes de las proteínas surfactante A1, A2 y D en brazo q del cromosoma 10

Representación esquemática de la región 10q22-23 del cromosoma humano 10. A: El locus de la proteína A del surfactante humano consta de dos genes funcionales (SP-A1, SP-A2) situados en orientación transcripcional opuesta y un pseudogene (P). El locus de la SP-D se encuentra más cerca a los telómeros (T). B: La información con respecto a la ubicación específica de estos Loci genéticos, se encuentran disponibles en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) y las bases de datos de Ensembl (www.ensembl.org/). “Positive strand” se refiere a la orientación de la DNA (5'-3') de C y T, mientras que el “Negative strand” se refiere a la orientación opuesta.

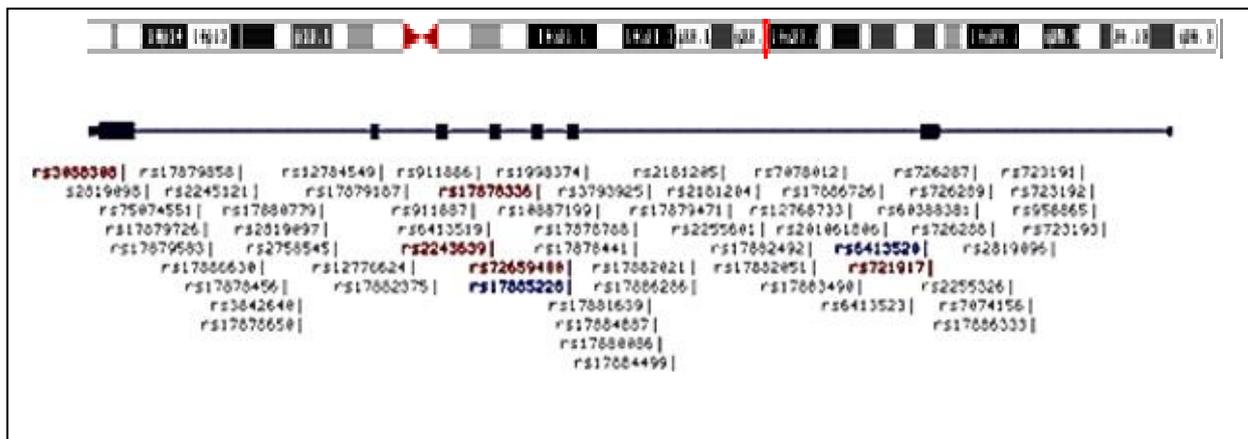


Figura 9: Gen *SFTPD* y mapa de polimorfismos del gen

Representación gráfica del gen. La línea fina de color negro representa los intrones del gen. Las áreas más gruesas representan los exones codificantes y las intermedias los no codificantes. Los SNPs están identificados por su número identificador rs y por el tipo: (rojo), no sinónimos (azul), sinónimos; (<http://genome.ucsc.edu>).

El genoma humano cuenta con aproximadamente 3,2 billones de pares de bases.

Variantes genéticas de la proteína D del surfactante pulmonar (SP-D): papel en la susceptibilidad y gravedad de la infección por virus respiratorio sincitial (VRS)

Con 1,4 millones de SNPs, el número teórico de SNPs del genoma humano puede ir hasta 3-4 millones, y aplicando la teoría neutral clásica de genética evolutiva hasta 11 millones (Kruglyak, Nickerson, 2001).

Estas cifras hacen referencia a polimorfismos presentes como mínimo en el 1% de la población mundial.

En la última actualización de los datos de una de las bases de datos genómicas más completas, *USCS browser*, ya existen descritos 12,8 millones de SNP, 31 848 genes y alrededor de 82960 transcritos (Karolchik y cols., 2014).

La complejidad genética de los genes de la SP-A1, SP-A2 y SP-D ha sido ampliamente estudiada y revisada (Liu y cols., 2003). Un *locus* particular se considera polimórfico si el alelo menos frecuente tiene una frecuencia en la población de no menos del 1% y una frecuencia de heterocigotos de al menos 2%. Los SNPs se originan cuando un nucleótido (purina o pirimidina) en una secuencia de ADN se sustituye por un nucleótido diferente. Un SNP puede dar cualquier resultado en un cambio sinónimo o no-sinónimo de aminoácido (aa), donde el aa codificado es el mismo o diferente, respectivamente. La probabilidad de recombinación que ocurre dentro de un haplotipo depende parcialmente de la distancia física entre los *loci* o los SNPs. Por lo tanto, los *loci* espaciados tienen menos probabilidades de ser separados, lo que se describen como ligamiento, esto es se heredarán conjuntamente. En consecuencia, si se conoce el genotipo de un SNP, el genotipo del otro SNP puede predecirse si hay un alto nivel de ligamiento entre los genes de dos SNPs

El gen de la SP-D contiene un total de ocho exones, siete de los cuales son codificantes. El exón I y parte del exón II corresponden a los 5' UTR y la última parte del exón 8 corresponde a los 3' UTR. Los SNPs codificantes y no codificantes (rs721917, rs6413520, rs2243639, rs3088308, rs1051246, rs1923537, rs2245121, rs911887, rs2255601 y rs7078012) han sido asociados con varias enfermedades (M.G.Foreman y cols., 2010) y se representan en la Tabla 3. Por otro lado, se ha demostrado que los niveles séricos de SP-D están genéticamente influenciados (Sorensen y cols., 2007, Heidinger y cols., 2005).

Tabla 3: SP-D SNPs humano

SNP s	Nucleótido	Sustitución de aminoácido ¹
rs721917	C/T	aa11: ATG (Met) > ACG (Thr)
rs6413520	T/C	aa25: AGT (Ser) > AGC (Ser)
rs2243639	A/G	aa160: ACA (Thr) > GCA (Ala)
rs3088308 ²	A/T	aa270: TCT (Ser) > ACT (Thr)
rs1051246 ²	C/T	aa286: GCT (Ala) > GCC (Ala)
rs1923537	T/C	3'UTR
rs2245121	A/G	intrón
rs911887	A/G	Intrón
rs22556012	G/A	Intrón
rs7078012	C/T	Intrón

¹ La numeración de la posición del aminoácido (aa) se basa en la proteína madura y no incluye el péptido señal.

²Estos SNPs han sido identificados en la SP-D pero no se ha demostrado su asociación con ninguna enfermedad en la actualidad.

En general, la literatura indica que existen asociaciones entre variantes genéticas de SP-A y SP-D que pueden incluir polimorfismos de nucleótido único y haplotipos y el desarrollo de enfermedades pulmonares crónicas y agudas.

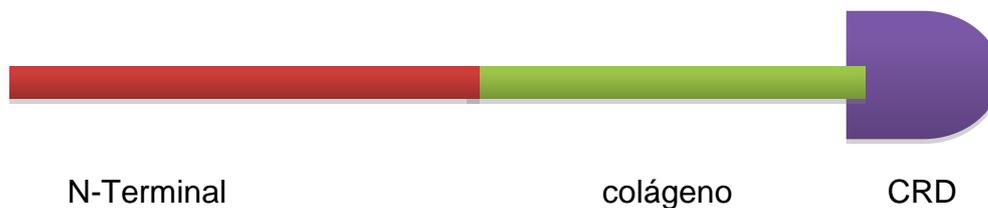


Figura 10: Representación simplificada de la estructura polipeptídica de la SP-D

Tabla 4: Polimorfismos no sinónimos y sus combinaciones en haplotipos

GENES HAPLOTIPOS	Polimorfismos no sinónimos del gen <i>SFTPD</i>		
<i>SFTPD</i>	aa11 rs721917	Aa160 rs2243639	aa270 rs3088308
D¹	T/Met	C/Ala	A/Ser
D²	C/Thr	T/Thr	A/Ser
D³	T/Met	T/Thr	A/Ser
D⁴	C/Thr	T/Thr	T/Thr
D⁵	C/Thr	C/Ala	A/Ser
D⁶	T/Met	T/Thr	T/Thr

Los SNPs se identifican por sus números rs.
El color indica el dominio en el que se encuentra cada SNP.

Tabla 5: Información disponible que se encuentra asociada significativamente a variantes genéticas, (SNP) y haplotipos de SP-A1, SP-A2 y SP-D en la edad pediátrica y adulta.

Enfermedad	Gen	Población	SNP o haplotipo	Nucleótido (aminoácido)	Susceptibilidad	Casos	Controles	Referencia
RA	SP-D	China	rs721917	C (Thr)	riesgo	216	84	Deng y cols., 2009
Asma	SP-D	Alemana			no asociación	322	270	Krueger y cols.,2006
Asma	SP-D	Afroamericana	rs721917	T (Met)	riesgo	162	97	Brandt y cols.,2008
CV	SP-D	Noruega	rs721917	C/C (Thr/Thr)	riesgo	130	100	Berg y cols.,2009
EPOC	SP-D	Caucásica	rs2245121	A	riesgo	389	472	Foreman y cols.,2010
EPOC	SP-D	Caucásica	rs911887	G	riesgo	389	472	Foreman y cols.,2010
EPOC	SP-D	Caucásica	rs6413520	C (Ser)	riesgo	389	472	Foreman y cols.,2010
EPOC	SP-D	Caucásica	rs721917	C (Thr)	riesgo	389	472	Foreman y cols.,2010
EPOC	SP-D	Caucásica	rs7078012	C	riesgo	389	472	Foreman y cols.,2010
VRS	SP-D	Mixto	rs2243639	A (Thr)	posible (riesgo)	148	n/a	Thomas y cols.,2009
VRS	SP-D	Mixto	rs721917- rs2243639	T(Met)G(Ala)	protector	148	n/a	Thomas y cols.,2009
VRS	SPA1 SPA2 SP-D	Mixto	6A ² -1A ⁰ - rs2243639	G (Ala)	protector	148	n/a	Thomas y cols.,2009
VRS	SP-A2	Filandesa	1A ³		riesgo	86	95	Lofgren y cols.,2002
VRS	SP-A2	Filandesa	1A		protector	86	95	Lofgren y cols.,2002
VRS	SP-A1	Filandesa	6A		protector	86	95	Lofgren y cols.,2002

VRS	SPA1 SPA2	Filandesa	6A/1A		protector	86	95	Lofgren y cols.,2002
VRS	SP-A1	Filandesa	rs1059047	C (Ala)	protector	86	95	Lofgren y cols.,2002
VRS	SP-A2	Filandesa	rs17886395	C (Pro)	protector	86	95	Lofgren y cols.,2002
VRS	SP-A2	Filandesa	rs1965708	A (Lys)	riesgo	86	95	Lofgren y cols.,2002
VRS	SP-A2	Filandesa	1A ¹ /1A ¹		riesgo	86	95	Lofgren y cols.,2002
VRS	SP-A2	Filandesa	1A ⁰ /1A ³		riesgo	86	95	Lofgren y cols.,2002
VRS	SP-A1/SP-A2	Filandesa	6A ² /1A ³		riesgo	86	95	Lofgren y cols.,2002
VRS	SP-D	Filandesa	rs721917	T (Met)	riesgo	84	93	Lahti y cols.,2002
TBC	SP-D	Mexicana	rs721917	C (Thr)	riesgo	178	101	Floros y cols.,2000
UC	SP-D	Japonesa	rs911887	G	riesgo	296	394	Tanaka y cols.,2009
UC	SP-D	Japonesa	rs2243639- rs911887	A (Thr)-G	riesgo	296	394	Tanaka y cols.,2009
Influenza A	SP-A	Española	rs1965708	A	riesgo	93	1736	Herrera Ramos y cols.,2014
Pneumonia	SP-A SP-D	Española	A1/6A (2)		riesgo	682	769	García-Laorden et al,2011

RA: Rinitis alérgica; CV: cardiovascular; FQ: Fibrosis Quística; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; VRS: Virus Respiratorio Sincitial; TBC: tuberculosis; UC: colitis ulcerosa.

Algunas variantes alélicas en *SFTPD* se han asociado con la susceptibilidad a infecciones respiratorias por varios microorganismos y a otras enfermedades pulmonares como el asma y la EPOC. Las asociaciones de las variantes de *SFTPD* con enfermedades se resumen en la Tabla 5.

Diversas enfermedades respiratorias en edad pediátrica como en adultos se han asociado con variantes de SP-A1, SP-A2 y SP-D, tanto con SNPs como con haplotipos.

Dado el papel de SP-A y SP-D en la defensa y en el control de la inflamación pulmonar, no resulta sorprendente que la SP-A y SP-D (como las proteínas hidrofóbicas del surfactante), estén involucradas en el desarrollo de la protección a varias enfermedades pulmonares.

Se han encontrado varios polimorfismos de SP-A y SP-D que se asocian con el riesgo de tuberculosis (Malik y cols., 2006, Madan y cols., 2002), incluyendo variantes haplotípicas de *SFTPA*, SP-A1 6A4 (Floros y cols., 2000), y SP-A2 1A3 (Malik y cols., 2006), y 1A5 (Malik y cols., 2006).

Los SNPs rs1136451 y rs4253527, SP-A2 rs17886395 y rs1965708 (Malik y cols., 2006), rs721917 de *SFTPD* (Floros y cols., 2000) y G459A (Vaid y cols., 2006) se han asociado con Tuberculosis.

También se han asociado polimorfismos en los genes de la SP-A y SP-D, con el desarrollo de las enfermedades alérgicas como la rinitis o el asma (Krueger y cols., 2006, Deng y cols., 2009, Deng y cols., 2010, Pettigrewet, 2007).

La variante Met11Thr SP-D y otra variante se han asociado con la función y concentración de SP-D (Leth-Larsen y cols., 2005).

Dos grupos independientes analizaron las asociaciones de polimorfismos SP-A con susceptibilidad a la otitis media, una de las infecciones más comunes de la niñez temprana (Pettigrew y cols., 2006), causada por bacterias patógenas (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* (Dudley y cols., 2001), y *Staphylococcus aureus* o secundaria a la infección del Virus Respiratorio Sincitial (VRS (Andrade y cols., 1998). SP-A y SP-D se expresan en la

trompa de Eustaquio, y alteraciones en la expresión o la regulación de estas moléculas también pueden ser un factor de riesgo importante para la otitis media (Lim y cols., 2000). Este grupo finlandés identificó los haplotipos 6A2/1A0, SP-A1/SP-A2 como factor de riesgo de la otitis aguda, 6A4/1A5 como riesgo para la infección aguda y recurrente y el genotipo de 6A2/6A2 SP-A1 para otitis recurrente.

El genotipo C/C (Thr/Thr), en el SNP con rs721917 se relaciona con los niveles más bajos de SP-D en el suero, las estructuras oligoméricas más pequeñas, una menor afinidad a los patógenos y la susceptibilidad a la enfermedad pulmonar (Leth-Larsen y cols., 2005). Sin embargo, aunque la SP-D juega un papel importante en la homeostasis lipídica y la eliminación de las células muertas del huésped, estos autores concluyen que las variantes de SP-D están débilmente asociadas con el proceso aterogénico.

Son de especial interés las asociaciones genéticas de las variantes en SP-A1, SP-A2 Y SP-D (SNPs/ y haplotipos) con la enfermedad del recién nacido, así como su relación con otros factores (por ejemplo, prematuridad, uso de tratamiento pre y post parto, como corticoides prenatales, ventilación mecánica, etc.), debido a su potencialidad para predecir susceptibilidades y para ayudar en las decisiones sobre el uso del tratamiento apropiado. Los polimorfismos en genes de la SP-A y SP-D están asociados con dos enfermedades neonatales, el síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y la displasia broncopulmonar (DBP) que reflejan, respectivamente, la lesión pulmonar aguda y crónica. La deficiencia de surfactante puede tener importancia en los recién nacidos prematuros con SDR, habiéndose detectado en estos pacientes una cantidad insuficiente de proteínas del surfactante, particularmente SP-A, así como la ausencia de la mielina tubular, una forma estructural extracelular del surfactante pulmonar (Mello y cols., 1989, Pryhuber y cols., 1991).

Hil Gendorff y cols. Refieren que para SP-D, un SNP no codificante de *SFTPD* (rs1923537) era protector frente al SDR (Gendorff y cols., 2009), mientras que Thomas y cols. identificaron varios haplotipos de SP-A1, SP-A2 y SP-D que también se asocian con la protección SP-A2/SP-D: 1A1-Thr160 (rs2243639), 1A1-Met11 (rs721917)-Thr160 (rs2243639), SP-A1-A2/SP/SP-D: 6A4-1A2-Tr160

(rs2243639) y 6A3-1A1-Met11 (rs721917)-Thr160 (rs2243639) y 6A4-1A2-Met11 (rs721917)-Thr160 (rs2243639), (Thomas y cols., 2007).

1.4.4.2. Variantes en *SFTPD* y Bronquiolitis Aguda por VRS

Polimorfismos en los genes de la SP-A y SP-D se han relacionado con la susceptibilidad a la infección por VRS (Lahti y cols., 2002, Lofgren y cols., 2002, Thomas y cols., 2009).

En la Tabla 5 se resume la información disponible asociada a variantes genéticas (SNP) y haplotipos de SP-A1, SP-A2 y SP-D en la edad pediátrica y su relación con diferentes enfermedades.

Los factores genéticos pueden jugar un papel importante en las diferencias relacionadas con el huésped en la susceptibilidad a la infección grave por VRS. En una población finlandesa se asoció el riesgo de infección por el VRS con las variantes 1A3, 1A1/1A1 y 1A1/1A3 de SP-A y 6A2/1A3 de SP-A1 Y SP-A2 (Lofgren y cols., 2002). También se han asociado con el riesgo contar con una asparagina en el aa9 (rs1059046), lisina en aa223 (rs1965708) de SP-A2 (Lofgren y cols., 2002), así como el rs721917 de SP-D (Lahti y cols., 2002). En contraste, alanina en aa9 SP-A1 (rs1059047), y prolina en SP-A2 aa91 (rs17886395), ha sido referidos como protectores (Lofgren y cols., 2002).

Otras asociaciones protectoras incluyen la SP-A1 6A (Lofgren y cols., 2002), la variante 1A de SP-A2 (Thomas y cols., 2009), así como genotipo 1A0/1A0, (El Saleeby y cols., 2010) y haplotipos de SP-A, SP-A1/SP-A2 6A2/1A3 (Lofgren y cols., 2002), haplotipos de SP-D Met11 (rs721917) / Ala160 (rs2243639) (Thomas y cols., 2009) y haplotipos de SP-A1-A2/SP/SP-D 6A2/1A0/Ala160 (rs2243639) (Thomas y cols., 2009). De otra parte, SP-A tiene la capacidad de enlazar las glicoproteínas virón VRS y aumentar su absorción por las células inmunes (Ghildyai y cols., 2002, Hickling y cols., 2000). Se ha encontrado que la SP-D se une a la glicoproteína de la fusión de VRS y disminuye la infectividad de VRS (Hickling y cols., 2000).

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Puesto que algunos polimorfismos genéticos pueden afectar a la expresión, estructura o función inmunomoduladora de la proteína D del surfactante, se sugiere que:

1. Polimorfismos genéticos de un solo nucleótido del gen *SFTPD*, y/o combinaciones de estos en haplotipos, influyen en la susceptibilidad a padecer bronquiolitis aguda por virus respiratorio sincitial tipo A y tipo B.
2. Polimorfismos genéticos de un solo nucleótido del gen *SFTPD*, y/o combinaciones de estos en haplotipos, influyen en la gravedad de la bronquiolitis aguda por virus respiratorio sincitial.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Se pretende conocer la epidemiología de la bronquiolitis por VRS en la población de Gran Canaria menor de dos años de edad, con la determinación de la prevalencia, variación epidemiológica, respuesta al tratamiento y los factores epidemiológicos de riesgo asociados a la infección; así como estratificar los niveles de riesgo de los pacientes infectados y determinar, en la medida de lo posible, las características de los pacientes que desarrollarán una sintomatología más grave.

Objetivo 1: Estimar la prevalencia, variación epidemiológica (cepa de virus), respuesta al tratamiento y factores de riesgo epidemiológicos para la infección por VRS en la población infantil menor de 2 años de edad de la isla de Gran Canaria.

Objetivo 2: Identificar factores genéticos (análisis de frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas codificantes de la proteína surfactante D (*SFTPD*) en pacientes y en grupo control) asociados con la susceptibilidad a padecer bronquiolitis por VRS. Se realiza también un estudio caso-control de susceptibilidad a bronquiolitis por VRS – A y VRS – B por separado.

Objetivo 3: Estudio prospectivo en el que se analizan las variantes (alélicas y genotípicas) del *SFTPD* en función de la gravedad de la sintomatología de los pacientes con bronquiolitis aguda, establecida por el score de Wood-Downe- Lecks. Se analizan también dichas variantes genéticas en relación con parámetros analíticos de inflamación y valores clínicos de la bronquiolitis aguda.

PACIENTES Y MÉTODOS

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4.1 PACIENTES Y CONTROLES

El diseño del estudio es de tipo prospectivo caso-control y fue evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil (CHUIMI) de Gran Canaria. Se registraron los datos clínicos y los parámetros de gravedad mediante una hoja de recogida de datos diseñada a tal efecto (Anexo 1).

Los tutores legales de los pacientes incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado tras recibir la información adecuada, antes de realizar la extracción de la muestra biológica.

A todos los niños se les extrajo muestra sanguínea aprovechando la realización de las pruebas clínicas necesarias (para el diagnóstico en el grupo caso y para el preoperatorio en el grupo control) de las que se pudo extraer el DNA necesario para el tipaje de los distintos polimorfismos genéticos. Además se les realizó un cuestionario estructurado (“recogida de datos”).

Todos los individuos incluidos en el proyecto fueron seleccionados y estudiados en el Hospital Universitario Materno-Infantil de Canarias (HUMIC) en el periodo comprendido de 2006 a 2008 y se distribuyeron en 2 grupos (casos/controles), previa autorización mediante firma del consentimiento informado por los padres o tutores.

4.1.1. Grupo I (casos)

Pacientes menores de dos años de edad, que fueron atendidos en el Servicio de Urgencias con el diagnóstico de bronquiolitis aguda (Tabla 6). Se tomó una muestra nasofaríngea para detectar y confirmar la presencia de VRS (excluyendo otros patógenos respiratorios) y además se les realizó una serie de pruebas clínicas consistentes en hemograma y PCR, así como una radiografía de tórax.

La gravedad de la bronquiolitis fue estratificada en base a la Escala de Wood-Downes-Lecks (Tabla 1). Inicialmente se reclutaron 201 pacientes con bronquiolitis aguda por VRS. De estos 8 fueron excluidos por no ser españoles de raza caucásica y uno por tener un hermano gemelo incluido en el estudio. Finalmente, se incluyeron 192 pacientes con infección por VRS; en 68 fue debida a VRS-A (60 con información genética) y en 124 a VRS-B (119 con información genética) (Figura 11).

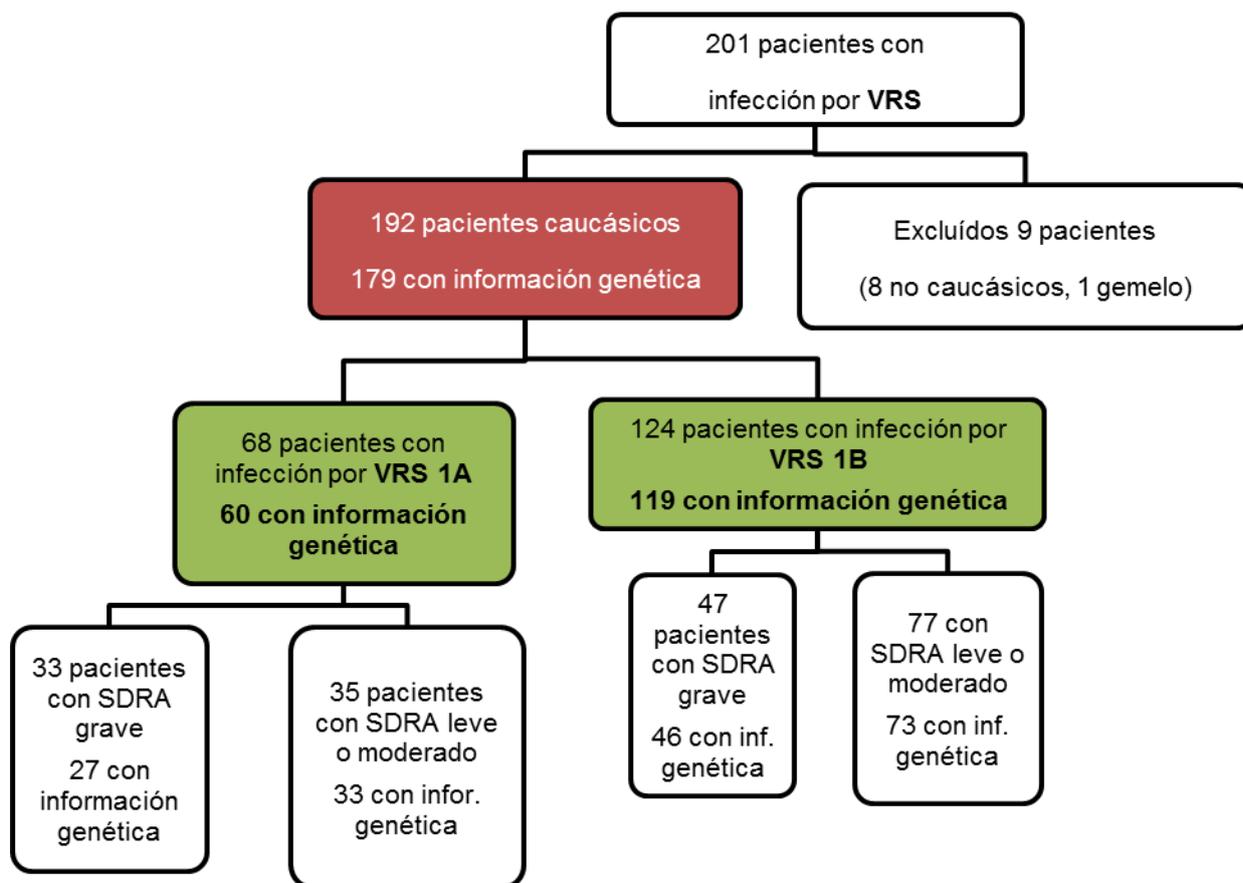


Figura 11: Diagrama de flujo

4.1.2 Grupo II (controles)

El grupo control consistió en 330 pacientes menores de dos años de edad, españoles de raza caucásica, atendidos en el Hospital Universitario Materno-Infantil de Gran Canaria. Los individuos del grupo control fueron seleccionados entre los pacientes que acudieron a realizarse una extracción analítica como valoración preoperatoria para una cirugía menor y que no habían presentado patologías respiratorias documentadas previas ni procesos inflamatorios en un periodo mínimo

de 3 meses, precedentes a su inclusión en este estudio (Tabla 6). Hay que recordar que no era necesario comprobar la presencia de infección por VRS porque no hay portadores sanos. Ninguno de los niños del grupo control fue diagnosticado de BA por VRS durante el proceso de recogida de datos.

Inicialmente se reclutaron 346 lactantes. De estos, 11 fueron excluidos por no ser españoles de raza caucásica y 5 por tener un hermano gemelo incluido en el estudio. Al final, la muestra se completó con 330 individuos (Tabla 6).

Tabla 6: Población de estudio

	Controles	Casos	Total
Muestra inicial	346	201	547
Españoles raza caucásica	330	192	522
Otras nacionalidades	11	8	19
Gemelos	5	1	6
Excluidos	16	9	25
Muestra total final	330	192	522

4.2 PROCEDIMIENTOS CLÍNICOS Y RECOGIDA DE DATOS

Los pacientes con BA se clasificaron según la gravedad, utilizando el score de Wood – Downes – Lecks (Tabla 1).

En los pacientes con infección debida a VRS-A (n=68), 33 tenían un score grave y los 35 pacientes restantes leve o moderado. En los pacientes con infección por VRS – B (n=124), 47 sufrieron BA grave y 77 leve o moderado (Figura 11).

Se recogieron datos de edad, sexo, peso al nacer, lactancia materna, antecedentes familiares de asma, alergia alimentaria, atopia y rinitis alérgica, datos clínicos como frecuencia cardiaca y respiratoria, saturación de oxígeno (satO₂), así como datos de pruebas complementarias como Proteína C Reactiva y hemograma.

4.3. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

4.3.1 Hemograma

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les extrajo sangre para realizar un hemograma.

El hemograma permite evaluar los tres tipos principales de células sanguíneas: hematíes, leucocitos y plaquetas. El recuento anormal de leucocitos puede ser un indicador de infección y/o inflamación. Las plaquetas, que desempeñan un papel importante en la coagulación y control de las hemorragias, también se consideran reactantes de fase aguda de la infección.

El hemograma se realizó de forma automatizada. La muestra se obtuvo por punción venosa, en tubos adecuados con anticoagulante específico etileno – diamino – tetraacetato (EDTA) y fueron procesadas en contador hematológico (Beckman Coulter, LH750), siendo un proceso automático con control de calidad y bioseguridad.

Hemograma:

Seria roja

Hemoglobina (Hb) : niveles normales: 13,5 – 17,5 g/dl (varones)

12 - 16 g/dl (mujeres)

Hematíes: niveles normales: 4500 000 – 5 900 000/ml(varones).

4 000 000- 5 200 000/ml, (mujeres).

Volumen corpuscular medio: (VCM): niveles normales: 88-100 fl (por hematíe).

Hemoglobina corpuscular media (HCM): niveles normales, entre 27 y 33 pg (picogramos)/hematíe,

Serie Blanca

Leucocitos: niveles normales: 4500 – 13500/ ml

Neutrófilos: 2000 -7500/ μ l; (40,0 – 59,0%),

Linfocitos: 1300 – 4000/ μ l; (24,0 - 45,0%),

Monocitos: 300 - 1000/ μ l; (3,4-10,0%),

Eosinófilos: 0 – 500 / μ l; (0,00- 5,0%),

Basófilos: 0 – 150 / μ l; (0,0 – 1,5%),l

Serie plaquetar

Plaquetas: niveles normales: 150000 – 450000/ μ l

4.3.2 Proteína C reactiva (PCR)

La proteína C reactiva (PCR) es un miembro de proteínas conocidas como **pentraxinas**. La PCR es una proteína plasmática circulante que actúa como opsonina, principalmente de bacterias; aumenta de forma muy significativa sus niveles en respuesta a la inflamación (es una proteína-reactante de fase aguda).

A los pacientes estudiados también se les extrajo sangre para la determinación de los niveles de PCR. La muestra fue procesada para la determinación cuantitativa de PCR en suero con los sistemas C-reactive Protein-hs, BioSystems. S.A.

Los valores normales en edad pediátrica se consideran de 0,0-1,00 mg/dl. (Ridker, Libby, 2007).

4.3.3 Detección de Virus Respiratorio Sincitial (VRS)

En los pacientes del grupo casos se realizó una toma de muestras mediante lavado nasofaríngeo a temperatura ambiente y se envió al laboratorio de microbiología donde se procesó la muestra.

4.3.3.1 Técnicas para la detección de virus respiratorio sincitial:

Se emplearon una de las 2 técnicas que reseñamos a continuación:

A. Técnica de Inmunocromatografía (RSV Respi-Strip, *Coris Bioconcept* Laboratorios MATERLAB).

Se coge un tubo estéril, se añaden 8 gotas del tampón de extracción, se añade 250 µl (ó 6 gotas) de la muestra con la pipeta de plástico estéril, se agita en el vortex para homogeneizar la solución. Se sumerge la varilla sensibilizada (tira de inmunocromatografía) en el tubo de ensayo con la muestra y el reactivo de extracción, se deja la tira en el tubo durante el tiempo de incubación (15 minutos).

En aquellas muestras con resultado “Inválido” ó “negativo”, en período estacional (Nv-Fb), se realizó la inmunofluorescencia directa para VRS (IMF DFA).

B. Técnica de Inmunofluorescencia directa para VRS (Respiratory Syncitial Virus DFA (Light Diagnostics, Millipore™)

Procedimiento:

Se agita la muestra para homogenizarla.

Con una pipeta estéril se dispensa una gota en un pocillo del portaobjetos, se deja secar a temperatura ambiental o con calor.

Los portaobjetos se fijan con acetona fría durante 10 minutos.

Se añade 25 µl del reactivo Respiratory Syncitial Virus DFA, Light Diagnostics, Millipore™. Se incuba 30 minutos en cámara húmeda a 37°C. Se lava durante 2-3 minutos con PBS, y luego se lava durante 5 minutos con agua bidestilada, para eliminar los restos de sales del PBS.

Se deja secar completamente y a continuación se procede al montaje (Mounting fluid) con un cubreobjetos.

Se observa al microscopio de fluorescencia. Se considera positivo si la Fluorescencia es verde brillante.

En aquellos que fueron positivos, se procedió con una técnica de microarray (*CLART[®]-PneumoVir-Genomica* (reactivo de amplificación y visualización)) que detectaba VRS (A y B).

4.4 DETERMINACIONES GENÉTICAS

Una vez procesadas y analizadas genéticamente las muestras, a través del estudio del desequilibrio de ligamento genético, se propusieron establecer las frecuencias y el modo de herencia de las variantes seleccionadas de los genes de *SFTPD* en la población de pacientes menores de 2 años en Gran Canaria.

Se pretende estudiar la influencia de estas variantes como factores de riesgo o de protección en los pacientes con bronquiolitis aguda por VRS.

Se estudiaron, asimismo, determinaciones de 9 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

4.4.1. Estudios de asociación genética

La variabilidad en la presentación clínica tiene una base poligénica.

Los datos epidemiológicos y clínicos no apoyan un modelo de herencia mendeliana en las enfermedades más comunes.

Los mapas de ligamento genético se utilizan para representar la segregación de los SNPs. En la Figura 12 se representan los valores de D^1 obtenidos para la población control cuando se consideraron los 9 SNPs del gen *SFTPD*.

En la Figura 13 se presentan los valores del coeficiente de correlación (r^2) para medir el grado de desequilibrio de ligamento (LD) entre los SNPs.

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les extrajo sangre en un tubo con EDTA, para posteriormente extraer el DNA. Las muestras y los consentimientos informados de los pacientes se recibieron en el Servicio de Inmunología de Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr Negrin” (HUGCDN) a través de mensajería desde el HUMIC.

En términos generales, planteamos revelar la posible relación de la variabilidad genética de las proteínas asociadas al surfactante SP-D con la susceptibilidad a padecer bronquiolitis por VRS y con la predisposición a una mayor gravedad clínica de los pacientes afectados.

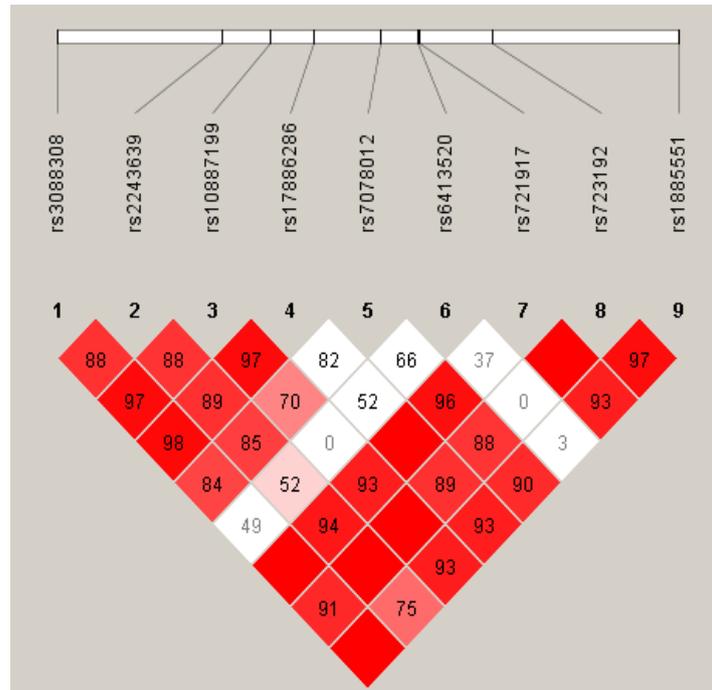


Figura 12: Desequilibrio de ligamento (D^1) de *SFTPD*

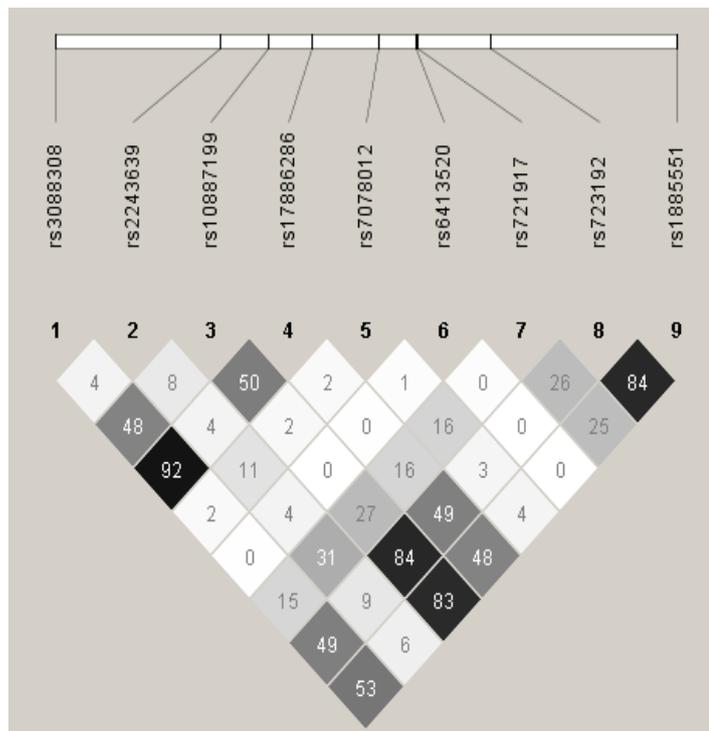


Figura 13: Desequilibrio de ligamento (r^2) en *SFTPD*

4.4.2 Extracción de DNA

La extracción de DNA, así como el tipaje del gen *SFTPD* de todas las muestras, se realizó en la Unidad de Inmología del Hospital Universitario de Gran Canaria “Dr. Negrín”.

De cada individuo a estudio se obtuvo una muestra de 5 ml de sangre venosa anticoagulada en un tubo con EDTA, que se procesó según el siguiente protocolo estándar de extracción por fenol-cloroformo (modificado de Blin y Stafford, 1976) (Tesis Doctoral, Maria Isabel Garcia-Laorden, ULPGC.2009).

Para el aislamiento y lavado de las células blancas, a la sangre total de cada individuo se le añadió tampón de lisis de células rojas hasta un volumen de 50 ml y se centrifugó a 600 $\times g$ durante 10 minutos. A continuación, se decantó el sobrenadante y se repitió el lavado dos veces más.

Las células blancas se lisaron resuspendiendo el precipitado resultante en 4 ml de solución de lisis e incubando en agitación a 42°C hasta el día siguiente. Tras este paso, se añadieron 4 ml de fenol/cloroformo/isoamílico y se puso en agitación

10 minutos a temperatura ambiente, centrifugándose a continuación 10 minutos a 1.700 xg. La fase superior (acuosa) resultante se pasó a otro tubo y se repitió el proceso, desechándose la fase inferior (orgánica). Para el siguiente paso, se añadieron 4 ml de cloroformo-isoamílico a la fase superior y se puso en agitación a temperatura ambiente durante 7 minutos, tras lo cual se centrifugó 5 minutos a 1.200 xg. De nuevo se rescató la fase superior acuosa y se repitió el proceso. Se añadieron 300 ml de NaCl 3M y 4 ml de isopropanol, mezclando suavemente por inversión hasta la aparición del precipitado. Dicho precipitado se extrajo a otro tubo y se lavó durante 30 minutos en etanol al 70% frío, tras lo cual se dejó secar a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Una vez seco, se añadieron 500 ml de tris-EDTA (TE) 1/0,1 y se puso a rotar en un agitador orbital en días sucesivos hasta su resuspensión.

Para proceder a la realización de las determinaciones genéticas, la concentración de trabajo considerada óptima fue de 100 ng/ul con una ratio absorbancia 260/280 en un rango de 1.7 a 2.2 (valor de ratio establecido para asegurar que es DNA). La calidad de las muestras se determinó con el espectrofotómetro NanoDropND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Estados Unidos).

4.4.3. Selección de polimorfismos

La información necesaria para realizar la selección de las variantes genéticas fue obtenida con acceso de internet, principalmente NCBI, Ensemble, UCSC genome, Genecard, plataformas que integran la información de muchas bases de datos, incluyendo los datos del proyecto del genoma humano (HapMap Project). <http://www.hapmap.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.SNP>; <http://www.rcsb.org/pdb/>; <http://www.genome.ucsc.edu>.

Estos mapas presentan las relaciones (desequilibrio de ligamento entre polimorfismos), lo que permite estudiarlos en conjunto, a través de haplotipos. Nos proporciona una información valiosa a la hora de seleccionar los SNPs respetando los siguientes criterios: un coeficiente de correlación (r^2) de desequilibrio de ligamiento mayor de 0,8 y una frecuencia del alelo menos frecuente (MAF) del 5%.

Se escogieron SNPs que tuvieran una frecuencia en la población general lo suficientemente alta como para que su frecuencia pueda ser detectada en los análisis y que proporcionara la máxima información acerca de la variabilidad del gen *SFTPD*. Como población de referencia del proyecto Hapmap se escogió la población CEU (población europea) y los SNPs fueron seleccionados tras procesar los datos mediante el software Haploview 4.2 (Barrett y cols., 2005), <http://broad.mit.edu/haploview/haploview>.

Algunos SNPs seleccionados conllevan cambios conformacionales o estructurales que son susceptibles de afectar a la función biológica de la proteína codificada; no obstante, también se incluyeron SNPs intrónicos, sinónimos y en regiones no codificantes que podrían afectar a la expresión y la regulación de la proteína SP-D. Además se completó la selección de los SNPs con la inclusión de un SNP asociado en la literatura con los niveles séricos de la proteína (Foreman y cols., 2011) (Tesis doctoral, Estefanía Herrera Ramos, ULPGC, 2015).

4.4.4. Técnicas de análisis molecular de los polimorfismos de *SFTPD*

Para los análisis genéticos se han utilizado técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.

Para visualizar los resultados se utilizan sondas que contienen marcadores fluorescentes, lo que permite la detección de las variantes en los SNPs en cada ciclo mediante un ordenador que está conectado al termociclador.

La identificación de los distintos polimorfismos se ha realizado mediante discriminación alélica a través de sondas de hidrólisis TaqMan (Life technologies, Carlsbad, Estados Unidos) con fluorocromos que emiten a una longitud de onda específica (VIC a 550 nm y/o FAM a 520). Se trata de cadenas cortas de nucleótidos marcadas con un fluorocromo para cada alelo. Cuando se unen al DNA se rompen liberando la fluorescencia a una longitud de onda determinada. El análisis se realizó siguiendo las instrucciones protocolizadas por el fabricante Taqman genotyping assays (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos).

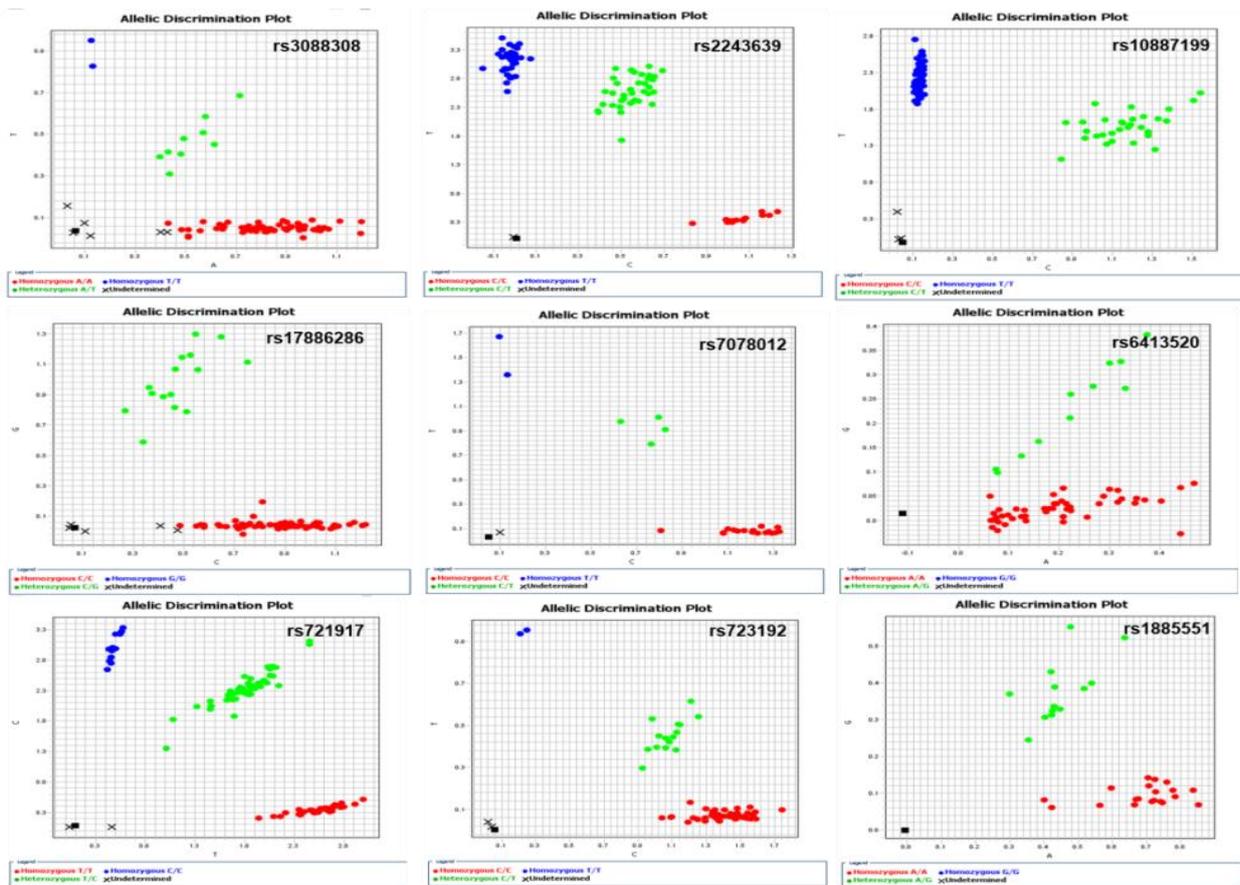
De cada una de las muestras, se puso 1 µg de ADN, a una concentración aproximada de 100 ng/µl, en cada uno de los 96 pocillos que poseen las placas ópticas compatibles con el sistema de genotipado. A su vez se añadieron 12,5 µl de MasterMix, 11,25 µl de agua libre de enzimas y 1,25 µl del ensayo prediseñado (TaqMan Predesigned SNP genotyping assay) a una concentración 20X. Dicho ensayo contenía las sondas y los primers específicos para cada SNP, así como la enzima Taq polimerasa necesaria para la amplificación. Los códigos de identificación de cada ensayo se muestran en la Tabla 7. La información está disponible en la web <http://www.lifetechnologies.com>

Tabla 7: SNP código de ensayo

SNP ¹	NP_003010.4 ²	NC_000010.10 ³	NM_003019.44 ⁴	Código de ensayo ⁵
rs3088308	p.Ser270Thr	g.81697868 A>T	c.868T>A	C__26726209_10
rs2243639	p.Thr160Ala	g.81701722 T>C	c.538A>G	C__26726205_10
rs10887199	Intrón	g.81702834 T>C	c.200-199A >G	C__31530298_10
rs17886286	Intrón	g.81703852C>G	c.200-1217G>C	C__63652102_10
rs7078012	Intrón	g.81705433C>T	c.199+784G>C	C__29213175_10
rs6413520	p.Ser25=	g.81706281A>G	c.135T>C	C__1362981_20
rs721917	p.Met11Thr	g.81706324A>G	c.92T>C	C__1362980_10
rs723192	Intrón	g.81708013C>T	c.4+809G>A	C__630297_10
rs1885551	Promotor	g.81712353AC>G	-	C__12124527_20

Código identificador (rs) de cada SNP (¹); Localización y consecuencia de cada SNP (²); La posición en el genoma (³); La posición relativa en el ARN mensajero (⁴); Código identificador del ensayo prediseñado (*TaqMan Predesigned SNP genotyping assay*) (⁵)

Todas las PCRs se realizaron con un volumen final de 25 µl por pocillo y para el proceso de amplificación del material genético, se empleó el equipo ^{ViiA7} Real-Time PCR System de Life technologies siguiendo los protocolos estandarizados: un paso inicial de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos, cada uno de 15 segundos a 92°C, y un minuto a 60°C. Ciclo a ciclo, en el ordenador se obtuvieron las curvas de fluorescencia que se podían leer a punto final, a través del análisis y la lectura de las mismas con el programa ViiTM7 Software Instrument Console. Se han obtenido las gráficas de discriminación alélica mostradas en las imágenes que se presentan en la Figura14.



Gráficos de puntos. Se representa en el eje Y cada una de las fluorescencias detectadas de la sonda VIC, mientras que en el eje X se representan las correspondientes la sonda marcada con FAM

Figura 14: PCR en tiempo real de los SNPs estudiados en el gen *SFTPD*

4.5. HERRAMIENTAS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS

Los análisis estadísticos básicos se llevaron a cabo mediante el software SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

Las frecuencias alélicas y genotípicas observadas se determinaron por recuento directo en cada grupo de estudio. El Equilibrio Hardy-Weinberg se testó utilizando χ^2 con corrección de Yates para comparar las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas calculadas a partir de las frecuencias alélicas observadas.

La comparación de frecuencias alélicas, haplotípicas, y para un locus se realizó mediante el test exacto de Fisher o el test de χ^2 con corrección para comparaciones. En todos los casos se analizó la asociación mediante regresión logística asumiendo modelos de herencia dominantes y recesivos.

En el estudio se analizó tanto la susceptibilidad (estudio caso/control) como la gravedad y pronóstico (estudio prospectivo) de la infección a estudio. Se realizó un estudio descriptivo de los datos obtenidos, para posteriormente realizar un análisis estadístico. La estadística univariante se realizó con el objetivo de detectar, mediante tests paramétricos y no paramétricos en función de la distribución de las variables, aquellas asociaciones y diferencias más relevantes entre los grupos para, después, introducirlas en el análisis multivariante. Este se basa en una regresión logística binaria que define el riesgo de padecer en función de variables genéticas, microbiológicas y clínicas.

El análisis estadístico se realizó tomando intervalos de confianza al 95% y un nivel de significación del 5%. Un contraste de hipótesis se consideró significativo cuando el correspondiente valor de p fue inferior a 0,05 aunque finalmente se consideró que superaba la corrección para múltiples comparaciones de Bonferroni cuando el valor de p fue inferior a 0,0055. Dicho valor se corresponde con el análisis de los 9 polifomorfismos incluidos en esta Tesis Doctoral.

La inferencia de haplotipos se realizó con un software diseñado exclusivamente para estudios de asociación genética: PLINK (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>). Este programa ayuda a procesar los datos genéticos y sobre todo es útil para el análisis de asociaciones de los mismos con la enfermedad, por lo cual se ha utilizado para los análisis de datos incluidos en esta Tesis Doctoral.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Se ha estudiado la prevalencia, la variación epidemiológica y la distribución de antecedentes familiares asociados con el riesgo de infección por VRS para así conocer mejor la situación epidemiológica de la bronquiolitis aguda por VRS en la población de Gran Canaria. Para ello, se estratificaron en niveles de riesgo a los pacientes afectos para definir, en la medida de lo posible, qué características son las que presentan los pacientes con una sintomatología más grave. Posteriormente se ha evaluado si existía asociación entre los polimorfismos de gen *SFTPD* y sus haplotipos, con la susceptibilidad a bronquiolitis por VRS y con el score de gravedad clínica que presentan los pacientes con bronquiolitis aguda por VRS.

5.1 POBLACIÓN ESTUDIADA

5.1.1 Años de estudio, hospitalización y estacionalidad

En el Servicio de Urgencias Pediátricas del CHUIMI se atendieron a 52.828 pacientes en el periodo comprendido entre octubre de 2006 a septiembre de 2007; de ellos 1.690 pacientes fueron diagnosticados de BA (3,2%), precisando ingreso hospitalario 489 (28,93%), lo que supone el 0,93% del total de visitas.

En el periodo de octubre de 2007 a septiembre de 2008 consultaron en el Servicio de Urgencias Pediátricas del CHUIMI 54.380 pacientes; de ellos 1.849 por BA (3,4%), de los que fueron ingresados 815 (44%), lo que supone el 1,5% del total de visitas.

De los 192 pacientes estudiados con BA (grupo casos):

- En la epidemia 2006-2007 se incluyeron 85 pacientes (30 con BA por VRS A y 55 con BA por VRS B), de los cuales ingresaron 48 (57%) en las plantas de hospitalización.

- En la epidemia 2007-2008, se incluyeron 107 pacientes (38 con BA por VRS A, y 69 con BA por VRS B), de los que ingresaron 66 (62%) en las plantas de hospitalización.

Con respecto a la estacionalidad, en nuestro medio las epidemias ocurrieron entre los meses de noviembre y febrero, con un pico entre diciembre y enero. Se observaron casos esporádicos hasta mayo.

En la figura 15 se representan los datos de la estacionalidad en las dos epidemias anteriormente valoradas.

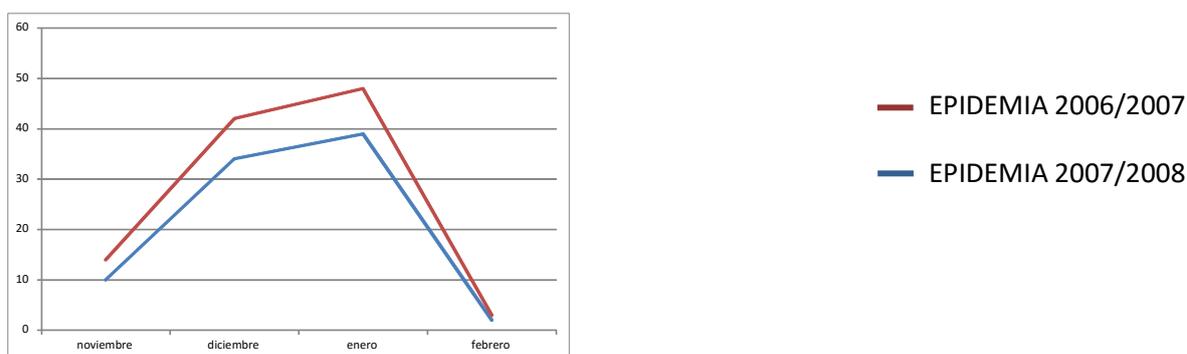


Figura 15. Estacionalidad de la Bronquiolitis aguda (2006-2008)

5.1.2 Edad

Todos los pacientes seleccionados para este estudio eran menores de 24 meses de edad.

Se incluyeron 68 pacientes afectados de bronquiolitis aguda por VRS-A, 124 por VRS-B y 330 controles.

La edad media de los pacientes con VRS-A fue de $6,3 \pm 2,21$ meses, la de los pacientes VRS-B de $5,99 \pm 2,11$ meses y la de controles fue de $9,87 \pm 3,17$ meses (Tabla 8).

Los controles cuentan con mayor edad ($p=0,0238$) que los pacientes con infección por VRS, sin embargo esto se podría explicar porque este grupo de pacientes acudían programados para una intervención quirúrgica. En la edad pediátrica se demoran las intervenciones hasta que el paciente gane suficiente peso y tenga la edad necesaria para poder soportar dicho procedimiento, siempre que la patología que motiva la cirugía no sea urgente y la clínica lo permita.

5.1.3 Sexo

La distribución por sexos para los grupos de casos y controles se muestra en la Tabla 8.

Se observa que la prevalencia de varones es mayor en el grupo control que en el grupo de pacientes, aunque no se hallaron asociaciones significativas entre la susceptibilidad a esta infección y el género ($p=0,107$).

Tabla 8: Distribución de la población estudiada por edad, sexo y peso al nacimiento en los pacientes y controles con bronquiolitis aguda por VRS

	VRS-A	VRS-B	Casos VRS	Controles	p
	n = 68	n = 124	n = 192	n = 330	
Edad (meses)	6,30 ± 2,,21	5,99 ± 2,11	6,10 ± 2,15	9,98 ± 2,17	0,0238
Peso al nacer	3277,28 ±528,96	3150,12± 581,81	3195,44±565,42	3213,58±491,44	0,04334
Sexo					
Varones	41 (60,3%)	74 (59,7%)	115 (59,89%)	229 (69,4%)	0,107
Mujeres	27 (39,7%)	50 (40,3%)	77 (40,11%)	101 (30,6%)	

Los datos son medias ± SD, medianas (IQR) y frecuencias (%); La p representa-casos con bronquiolitis aguda por VRS frente a controles. En el caso del género se presenta el tamaño muestral y entre paréntesis el porcentaje.

5.2 PESO AL NACIMIENTO Y EDAD GESTACIONAL

El peso al nacimiento fue significativamente menor en los pacientes con bronquiolitis aguda por VRS, que en los controles ($p= 0,04334$; OR 2,209; IC-95%, 1,008-4,841) (tabla 8).

Comparando el peso al nacimiento y la edad gestacional (bajo peso para su edad < 2500 gr y EG > 37 semanas), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Dentro del grupo de casos sólo 25 (13%) fueron recién nacidos a término pequeños para la edad gestacional (EG > 37 semanas y peso < 2,500 gr) y 15 (7,81%) nacieron pretérmino (edad gestacional < 37 semanas).

En el grupo control, 26 (7,9%) fueron recién nacidos a término pequeños para la edad gestacional y 8 pacientes (2,42%) nacieron antes de las 37 semanas de edad gestacional.

5.3 LACTANCIA MATERNA

Hemos encontrado diferencias respecto a la alimentación con lactancia materna entre ambos grupos.

Dentro del grupo de casos 107 (55,4%) habían recibido lactancia materna menos de un mes o no la habían recibido y 85 (44,0%) superior a un mes.

En el grupo control, 220 (66,7%) se alimentaron con lactancia materna más allá del primer mes y el resto (33,3%), inferior a un mes o nunca la habían recibido. Estas diferencias eran estadísticamente significativas ($p=0,04864$; OR 0,5262; IC- 95% 0,2758-1,004).

5.4 ANTECEDENTES FAMILIARES (AF)

Los antecedentes familiares, como asma, atopia, rinitis alérgica o alergia alimentaria se muestran en la Tabla 9.

Dentro de grupo casos, 49 (25,4%) tenían como antecedentes rinitis alérgica. En el grupo control solo 20 (6,1%), presentaban estos antecedentes. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,0030$; OR 2,4; IC-95% 1,331-4,329).

Tabla 9: Antecedentes familiares y asociación con el desarrollo de bronquiolitis aguda por VRS

AF	Casos (n=192)		Controles (n=330)		p
	SI	NO	SI	NO	
Asma	95 (49,2%)	97 (50,3%)	101 (30,6%)	229 (69,4%)	< 0,001
Atopia	73 (37,8%)	119 (61,7%)	77 (23,3%)	253 (76,7%)	0,022
Rinitis alérgica	49 (25,4%)	143 (74,6%)	20 (6,1%)	310 (93,9%)	0,0030
Alergia alimentaria	5 (2,6%)	187 (97,4%)	3 (0,9%)	327 (99,1%)	0,147

AF: Antecedente familiares; VRS: Virus Respiratorio Sincitial; La p representa-casos con bronquiolitis aguda por VRS frente a controles. En el caso de AF se presenta el tamaño muestral y entre paréntesis el porcentaje.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas con los antecedentes familiares de asma y atopia y no con la alergia alimentaria, tal como se muestra en la Tabla 9.

5.5 SINTOMATOLOGÍA

Los pacientes con bronquiolitis aguda por VRS fueron clasificados en tres grupos según la gravedad de la sintomatología, mediante la aplicación de la escala de Wood-Downes-Lecks.

5.5.1 Clasificación según gravedad

VALORACIÓN DE GRAVEDAD – SÍNDROME DISTRÉS RESPIRATORIO

Según el Score de Wood– Downes – Lecks los pacientes fueron clasificados en 3 grupos:

1. Bronquiolitis aguda leve-SDRA (1): 31pacientes (con información genética 30).
2. Bronquiolitis aguda moderada-SDRA (2): 81 pacientes (con información genética 76).
3. Bronquiolitis aguda grave-SDRA (3): 80 pacientes (con información genética 73).

5.6 EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS

Las pruebas complementarias realizadas como reactantes de fase aguda (PCR) y los valores de leucocitos y plaquetas se representan en la Tabla 10.

Dentro de grupo casos el valor absoluto de leucocitos fue de $12,99 \times 10^3$ comparado con los valores de $10,07 \times 10^3$ en el grupo control ($p < 0,001$).

El valor absoluto de neutrófilos en el grupo casos ($3,1 \times 10^3$) y en el grupo control ($3,6 \times 10^3$) ($p=0,189$) no fueron estadísticamente significativos.

El valor absoluto de linfocitos fue superior en el grupo casos ($5,6 \times 10^3$), que en el grupo control (5×10^3), siendo estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

El valor absoluto de plaquetas fue superior en grupo casos (363×10^3), que en el grupo control (310×10^3) con significación estadística ($p < 0,001$).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de PCR en el grupo casos (0,66 mg/l), comparado con el grupo control (0,70 mg/l) ($p= 0,236$).

Con respecto a la Rx de tórax, que se realizó en todos los pacientes del grupo con BA, en 188 pacientes (97,9 %) fue normal y solo en 4 pacientes (2,1%) presentaba hallazgos patológicos.

Tabla 10: Resultados analíticos en pacientes con bronquiolitis aguda por VRS y en individuos controles

	Controles (n=330)	Casos (n=192)	p
PCR, mg/l	0,70 (0,45 ; 1,08)	0,66 (0,23 ; 1,56)	0,236
Leucocitos (x10³)/μl	10,07 (9 ; 12)	12,99 (10 ; 14,7)	< 0,001
Linfocitos (x10³)/μl	5 (4 ; 6)	5,6 (4,5 ; 6,5)	< 0,001
Neutrófilos (x10³)/μl	3,6 (3 ; 4,4)	3,1 (2,4 ; 4,2)	0,189
Plaquetas (x10³)	310 (230 ; 360)	363 (287 ; 461)	< 0,001

Los datos son medias ± SD, medianas (IQR).La p de significación es el resultado de la comparación estadística de casos (VRS) frente a controles.

5.7 SIGNOS VITALES – CONSTANTES VALORADAS

En la Tabla 11 se representan los datos de signos vitales tomados en los dos grupos de pacientes para determinar la gravedad clínica-dificultad respiratoria (SDRA).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar pacientes con bronquiolitis aguda por VRS con individuos controles, para la saturación de oxígeno (p=0,0035; OR 2,603; IC-95% 1,087-6,237), frecuencia respiratoria (p=0,0012; OR 1,435; IC-95% 1,049-1,963) y frecuencia cardíaca (p=0,0023, OR 1,895, IC-95% 1,256-2,857) como puede apreciarse en la Tabla 11.

En los pacientes con infección por VRS, la gravedad es mayor para los afectos por VRS-A.

Tabla 11: Signos vitales en pacientes con bronquiolitis aguda por VRS (VRS-A/VRS-B) y en individuos controles

	VRS-A (n=68)	VRS-B (n=124)	VRS (n=192)	Controles (n=330)	p
T (°C)	37,6 ± 0,6	37,7 ± 0,7	37,6 ± 0,7	36,7 ± 0,5	0,156
SatO2 (%)	92 ± 2	93 ± 2	92 ± 2	98 ± 1	0,0035
FR por minuto	44 ± 7	43 ± 8	43 ± 7	31 ± 4	0,0012
FC latidos/minuto	138 ± 22	136 ± 21	137 ± 21	98 ± 14	0,0023

Los datos son medias ± SD, medianas (IQR); La p se refiere a casos VRS y a controles; T°C: temperatura corporal; SatO2: saturación de oxígeno; FR: frecuencia respiratoria; FC: frecuencia cardiaca

5.8 TRATAMIENTO

5.8.1 Aerosolterapia con salbutamol

En el grupo de casos, 190 pacientes (98,4%) recibieron tratamiento con salbutamol nebulizado, mientras que al grupo de controles, obviamente no se administró esta terapia. Dos pacientes no recibieron tratamiento con salbutamol, por la clínica leve de la BA.

5.8.2 Corticoides

En el grupo de casos, recibieron tratamiento con corticoides sistémicos 48 pacientes (24,9%), respecto, obviamente, a ninguno dentro del grupo control.

Los pacientes con BA no recibieron ningún otro tipo de tratamiento, salvo las medidas de soporte.

5.9. ASOCIACIONES GENÉTICAS

5.9.1 ASOCIACIONES DE LAS VARIANTES EN *SFTPD* CON LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA BRONQUIOLITIS AGUDA POR VRS

Tabla 12: Frecuencias genotípicas en la población control y equilibrio de Hardy-Weinberg

Variantes	Genotipos	Población control	HWE
<i>SFTPD</i>		n = 296	p
rs3088308 (S270T)	TT/TA/AA	245(82,8)/47(15,9))/4(1,4)	0,4665
rs2243639 (T180A)	CC/CT/TT	36(12,2)/137(46,3)123(41,6)	0,9464
rs10887199 (intr.)	CC/CT/TT	9(3,0)/81(27,4)/206(69,6)	0,8784
rs17886286 (intr.)	CC/GC/GG	243(82,1)/49(16,6)/4(1,4)	0,5551
rs7078012 (intr.)	CC/CT/TT	190(64,2)/85(28,7)/21(7,1)	0,0193
rs6413520 (S45S)	AA/AG/GG	259(87,5)/37(12,5)/0(0,0)	0,2514
rs721917 (M31T)	CC/CT/TT	44(14,9)/145(49,0)/107(36,1)	0,7652
rs723192 (intr.)	CC/CT/TT	216(73,0)/74(25,0)/6(2,0)	1
rs1885551 (prom)	AA/AG/GG	211(71,3)/75(25,3)/10(3,4)	0,3939

Como paso previo e indispensable en todo estudio de asociación genética se realizó un análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg para las variantes a estudio en el grupo control. El análisis del equilibrio de Hardy-Weinber, corregido para comparaciones múltiples (al igual que el resto de comparaciones genéticas), mostró que todos los SNP estudiados se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg.

5.9.1.1 Estudio de asociación de los polimorfismos (SNPs) de *SFTPD* con la susceptibilidad a Bronquiolitis Aguda por VRS

En el estudio se calculó la frecuencia alélica de cada uno de los nueve SNPs estudiados de *SFTPD* y se comparó su distribución entre los pacientes con infección por VRS y los individuos control. Este estudio se realizó también para analizar la asociación con BA por VRS-A y VRS-B por separado.

La distribución de las frecuencias entre los pacientes con infección por VRS y los individuos control es diferente para los SNP rs7078012 y rs6413520. Sin embargo, la asociación de rs7078012 es marginal y no se mantiene tras corrección para múltiples comparaciones (Tabla 13). El alelo menos frecuente del SNP rs6413520 (rs6413520-G) se asoció con el doble de riesgo (OR 1,994) de padecer BA por VRS, siendo la única asociación que se mantiene significativa tras comparación para múltiples comparaciones. Diversos SNP se han asociado con susceptibilidad a BA por VRS-A, rs10887199, rs7078012, rs6413520, rs721917 y rs1885551 (Tabla 14). Sin embargo, tras corrección para múltiples comparaciones, la única asociación que se mantiene significativa es la de rs6413520: El alelo menos frecuente, rs6413520-G, confiere un riesgo de 2,48 (IC 95% 1,343-4,564, $p=0,0028$) de sufrir BA por VRS-A.

Al analizar la asociación de BA por VRS-B, la única asociación observada es con rs6413520 ($p=0,035$; OR 1,76, IC 95% 1,035-2,995), aunque esta asociación no se mantiene estadísticamente significativa tras corrección para múltiples comparaciones (Tabla 15). En las Tablas que se muestran a continuación (Tablas 13,14 y 15) se presentan las frecuencias alélicas en pacientes (VRS, VRS-A y VRS-B respectivamente) y controles.

Tabla 13: Frecuencias Asociación de SNPs de *SFTPD* con la susceptibilidad a Bronquiolitis Aguda por VRS

SNPs	A1	Casos (n=358)	Frec.	Controles (n=592)	Frec.	A2	p	OR (IC-95%)
rs3088308 (S290T)	A	30	0,0838	55	0,09291	1	0,6337	0,893 (0,5606-1,423)
rs2243639 (T180A)	C	139	0,3883	209	0,353	4	0,2748	1,163 (0,8868-1,526)
rs10887199 (Intr)	C	44	0,1229	99	0,1672	4	0,06411	0,6978 (0,4761-1,023)
rs17886286 (Intr)	G	29	0,08101	57	0,09628	2	0,4264	0,8273 (0,5183-1,321)
rs7078012 (Intr)	T	97	0,2709	127	0,2145	2	0,04711	1,361 (1,003-1,845)
rs6413520 (S45S)	G	42	0,117	37	0,0625	1	0,003024	1,994 (1,255-3,168)
rs721917 (M31T)	C	119	0,3324	233	0,3936	4	0,05848	0,7672 (0,5828-1,01)
rs723192 (Intr)	T	45	0,1257	86	0,1453	2	0,3965	0,8459 (0,5743-1,246)
rs1885551 (Prom)	G	43	0,1201	95	0,1605	1	0,08711	0,7142 (0,485-1,052)

Valores de p y OR para la susceptibilidad de la Bronquiolitis Aguda por VRS; VRS: Virus Respiratorio Sincitial; VRS

A: Virus Respiratorio Sincitial tipo A; VRS B: Virus Respiratorio Sincitial tipo B.

Tabla 14: Frecuencias Asociación de SNPs de *SFTPD* con la susceptibilidad a Bronquiolitis Aguda por VRS-A

SNPs	A1	Casos BA VRSA (n=120)	Frec.	Controles (n=592)	Frec.	p	OR (IC-95%)
rs3088308 (S290T)	A	9	0,075	55	0,09291	0,5318	0,7916 (0,3801-1,649)
rs2243639 (T180A)	C	50	0,4167	209	0,353	0,1865	1,309 (0,8773-1,953)
rs10887199 (Intr)	C	9	0,075	99	0,1672	0,01022	0,4038(0,198-0,8235)
rs17886286 (Intr)	G	9	0,075	57	0,09628	0,4635	0,761 (0,366-1,583)
rs7078012 (Intr)	T	37	0,3083	127	0,2145	0,02605	1,632 (1,057-2,52)
rs6413520 (S45S)	G	22	0,1833	48	0,08108	0,0028	2,476(1,343-4,564)
rs721917 (M31T)	C	34	0,2833	233	0,3936	0,02292	0,6091 (0,3963-0,9363)
rs723192 (Intr)	T	11	0,09167	86	0,1453	0,1185	0,5938 (0,3066-1,15)
rs1885551 (Prom)	G	10	0,08333	95	0,1605	0,02977	0,4756 (0,2401-0,9421)

La p representa-casos con bronquiolitis aguda por VRS-A frente a controles.

Tabla 15: Frecuencias Asociación de SNPs de *SFTPD* con la susceptibilidad a Bronquiolitis Aguda por VRS-B

SNPs		Casos BA VRS-B (n=238)	Frec.	Controles (n=592)	Frec.	p	OR (IC-95%)
rs3088308 (S290T)	A	21	0,08824	55	0,09291	0,8329	0,9449 (0,5579-1,6)
rs2243639 (T180A)	C	89	0,3739	209	0,353	0,5701	1,095(0,8012-1,495)
rs10887199 (Intr)	C	35	0,1471	99	0,1672	0,4751	0,8586 (0,5649-1,305)
rs17886286 (Intr)	T	20	0,08403	127	0,09628	0,5822	0,8611 (0,5052-1,468)
rs7078012 (Intr)	G	60	0,2521	57	0,2145	0,2413	1,234 (0,8677-1,755)
rs6413520 (S45S)	G	35	0,105	37	0,0625	0,03501	1,761 (1,035-2,995)
rs721917 (M31T)	C	85	0,3571	233	0,3936	0,3288	0,856 (0,6264-1,17)
rs723192 (Intr)	T	34	0,1429	86	0,1453	0,9288	0,9806 (0,6385-1,506)
rs1885551 (Prom)	G	33	0,1387	95	0,1605	0,4312	0,8422 (0,5488-1,292)

La p representa casos con bronquiolitis aguda por VRS-B frente a controles.

El análisis multivariante mostró que la asociación del SNP rs6413520 con el desarrollo de BA por VRS es independiente de la edad, la lactancia materna (menor de un mes o no lactancia frente a mayor de un mes) y de la presencia de antecedentes familiares de alergia ($p=0,025$; OR 2,545). De forma similar, la asociación de rs6413520 con bronquiolitis por VRS-A es también independiente de la edad, la lactancia materna y de la presencia de antecedentes familiares de alergia ($p=0,045$; OR 2,512).

5.9.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE HAPLOTIPOS DE *SFTPD* CON LA SUSCEPTIBILIDAD A BRONQUIOLITIS AGUDA POR VRS

Como se ha mostrado anteriormente, varios de los SNPs analizados se encuentran en DL. El SNP rs6413520 conlleva un cambio sinónimo en la proteína, por lo que la asociación de este polimorfismo con el desarrollo de BA por VRS pudiera deberse a ser un marcador de otro SNP que sea realmente la causa de dicha asociación. Alternativamente, este SNP podría ser marcador de un haplotipo que contenga una combinación particular de aminoácidos en los residuos (11-160-270).

Una consecuencia de la existencia de DL es que al analizar la distribución de haplotipos definidos por los nueve SNP analizados se identificaron sólo ocho haplotipos con una frecuencia mayor del 1%. Uno de estos haplotipos, el haplotipo TCTCCGTCA se encontró con mayor frecuencia en pacientes con VRS que en controles (0,089 frente a 0,037 respectivamente, $p=0,0014$) (Tabla 16). Este haplotipo, (denominado D^1 -TCCGCA según nomenclatura para los tres SNPs no sinónimos estudiados) contiene el alelo G del rs6413520 (el alelo menor, asociado a BA por VRS) y es con diferencia el haplotipo mayoritario que contiene este alelo. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de los otros diez haplotipos, incluso al comparar el haplotipo TTTCTGTCA, el cual también contiene el alelo rs6413520-G.

Al comparar la distribución de haplotipos entre individuos control y pacientes con VRS-A o VRS-B se comprobó que el haplotipo TCTCCGTCA también se asocia a por VRS-A y VRS-B ($p=0,0062$ y $p=0,0076$ respectivamente (Tabla 16).

Tabla 16: Asociaciones de haplotipos de *SFTPD* y susceptibilidad para Bronquiolitis aguda por VRS, VRS-A y VRS-B.

Haplotipo	Frecuencia Casos VRS	Frecuencia Controles	P
TTCCATCA	0,1332	0,1329	0,9871
TCTCCATCA	0,294	0,317	0,4724
TTTCTGTCA	0,01249	0,01023	0,7553
TCTCCGTCA	0,08865	0,0374	0,001409
TTTCTATCA	0,1562	0,1263	0,2111
ATCGCACTG	0,04926	0,06727	0,276
TTCCACCA	0,1527	0,1963	0,1014
ATCGTACTG	0,0277	0,01636	0,2504
TTTCTACCA	0,05797	0,05085	0,6487
TTCCCACTG	0,02777	0,04533	0,1895
Haplotipo	Frecuencia Casos VRS-A	Frecuencia Controles	P
TTCCATCA	0,1376	0,1329	0,8939
TCTCCATCA	0,3068	0,317	0,8315
TTTCTGTCA	0,01768	0,01023	0,499
TCTCCGTCA	0,09776	0,0374	0,00617
TTTCTATCA	0,1647	0,1263	0,2747
ATCGCACTG	0,03555	0,06727	0,2032
TTCCACCA	0,1422	0,1963	0,1798
ATCGTACTG	0,03555	0,01636	0,1813
TTTCTACCA	0,06221	0,05085	0,6234
TTCCCACTG	0	0,04533	0,02132
Haplotipo	Frecuencia Casos VRS-B	Frecuencia Controles	P
TTCCATCA	0,131	0,1329	0,9464
TCTCCATCA	0,2875	0,317	0,4219
TTTCTGTCA	0,009852	0,01023	0,9624
TCTCCGTCA	0,08402	0,0374	0,007632
TTTCTATCA	0,1519	0,1263	0,3449
ATCGCACTG	0,05623	0,06727	0,5711
TTCCACCA	0,158	0,1963	0,2153
ATCGTACTG	0,02371	0,01636	0,4929
TTTCTACCA	0,05581	0,05085	0,7796
TTCCCACTG	0,04189	0,04533	0,8337

Los haplotipos se han construido según el siguiente orden de los SNPs: rs3088308|rs2243639|rs10887199|rs17886286|rs7078012|rs6413520|rs721917|rs723192|rs1885551. VRS: Virus Respiratorio Sincitial; VRS A: Virus Respiratorio Sincitial tipo A; VRS B: Virus Respiratorio Sincitial tipo B

Variantes genéticas de la proteína D del surfactante pulmonar (SP-D): papel en la susceptibilidad y gravedad de la infección por virus respiratorio sincitial (VRS)

5.9.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS (SNPs) DE *SFTPD* CON LA GRAVEDAD DE LA BRONQUIOLITIS AGUDA POR VRS.

A continuación se detallan (Tablas 17, 18 y 19) los valores de marcadores de gravedad (parámetros clínicos y analíticos), en relación con las distintas variantes estudiadas del gen *SFTPD*. Al comparar las frecuencias alélicas para cada SNP entre pacientes con BA por VRS que han desarrollado SDRA grave frente a los que han desarrollado SDRA moderado o leve no se han encontrado diferencias significativas (Tabla 17). Sin embargo, si se comparan las frecuencias del alelo 6413520-G entre pacientes con BA por VRS que han desarrollado SDRA grave o moderado (frecuencia 0,1283) frente a los que han desarrollado SDRA leve y controles (frecuencia 0,0619), sí se observan diferencias significativas ($p=0,00055$; OR 2,23, IC 95% 1,4-3,55).

Tabla 17: Asociación genotipos, con la gravedad clínica de Bronquiolitis Aguda por VRS

SNPs		SDRA GRAVE(3) (n=73)	FREC	SDRA moderado (2) leve (1) (n=106)	Frec.	p	OR	L95	U95
rs3088308	A	15	0,1027	15	0,0708	0,28	1.504	1	3,18
rs2243639	C	55	0,3767	84	0,3962	0,71	0,921	1	1.421
rs10887199	C	19	0,1301	25	0,1179	0,73	1.119	1	2.117
rs17886286	T	15	0,1027	14	0,0660	0,21	1.619	1	3.466
rs7078012	G	41	0,2808	56	0,2642	0,73	1.088	1	1.745
rs6413520	G	16	0,1096	26	0,1226	0,706	0,88	0,4542	1,707
rs721917	C	50	0,3425	69	0,3255	0,74	1.079	1	1.687
rs723192	T	19	0,1301	56	0,1226	0,83	1,07	1	2.016
rs1885551	G	19	0,1301	24	0,1132	0,63	1.172	1	2.228

Asociación de genotipos la con la gravedad clínica (según escala utilizada) para determinados SNPs con diferencia significativa (comparando con controles). SDRA (1): Síndrome de distres respiratorio agudo leve, n=30; SDRA (2): Síndrome de distres respiratorio agudo moderado, n=76; SDRA (3): Síndrome de distres respiratorio agudo grave, n=76.

Tabla 18: SNPs y marcadores clínicos de la Bronquiolitis Aguda por infección de VRS (grupo casos)

SNPs		Casos (n=179)								
		SatO2 (%)			FR			FC		
		N	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD
rs3088308 (S290T)	AA	149	93	2	149	43	7	149	136	20
	AT	30	92	2	30	44	8	30	136	23
	TT	0			0			0		
rs2243639 (T180A)	CC	29	92	2	29	43	6	29	135	18
	CT	81	92	2	81	43	7	81	137	21
	TT	69	92	2	69	44	8	69	136	22
rs10887199 (Intr)	CC	1	90		1	46		1	144	
	CT	42	92	2	42	43	8	42	135	23
	TT	136	92	2	136	43	7	136	137	20
rs17886286 (Intr)	CC	151	92	2	151	43	7	151	137	20
	GC	27	92	2	27	43	8	27	134	24
	GG	1	90		1	46		1	144	
rs7078012 (Intr)	CC	110	93	2	110	43	7	110	135	21
	CT	41	92	2	41	46	7	41	136	22
	TT	28	92	2	28	40	7	28	144	19
rs6413520 (S45S)	AA	137	92	2	137	43	8	137	136	22
	AG	42	92	2	42	44	6	42	139	18
	GG	0								
rs721917 (M31T)	CC	16	92	1	16	44	7	16	137	21
	CT	87	92	2	87	43	8	87	134	22
	TT	76	92	2	76	43	7	76	139	19
rs723192 (Intr)	CC	135	92	2	135	44	7	135	137	20
	CT	43	90	2	43	43	9	43	133	24
	TT	1			1	46		1	144	
rs1885551 (Prom)	AA	136	93	2	136	43	7	136	137	20
	AG	43	92	2	43	44	8	43	135	23
	GG	0			0			0		

Los datos son números absolutos y frecuencias de los alelos de casos de BA por VRS, en el correspondiente SNPs.

Tabla 19: SNPs y marcadores analíticos de la Bronquiolitis Aguda por infección de VRS (grupo casos)

SNPs		Casos (n=179)														
		Leucocitos/mm3			Neutrófilos (%)			Linfocitos (%)			Plaquetas/mm3			PCR (mg/dl)		
		N	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD
rs3088308 (S290T)	TT	149	12849	3799	149	34,29	15,48	149	54,62	15,58	149	377953	115008	149	1,078	1,395
	TA	30	13606	4139	30	38,33	14,62	30	49,87	13,37	30	383833	119428	30	1,188	1,139
	AA	0	.	.	0	.	.	0	.	.	0	.	.	0	.	.
rs2243639 (T180A)	CC	29	13179	3551	29	33,76	16,43	29	55,93	17,62	29	358966	100690	29	1,181	1,691
	CT	81	13064	3935	81	35,25	16,33	81	53,58	15,94	81	392580	118437	81	0,907	1,145
	TT	69	12787	3931	69	35,14	13,90	69	53,22	13,56	69	371319	117283	69	1,287	1,413
rs10887199 (Intr)	CC	1	8800	.	1	40,00	.	1	56,00	.	1	272000	.	1	0,500	.
	CT	42	13750	4662	42	39,05	14,63	42	50,86	14,30	42	396476	132533	42	1,127	1,263
	TT	136	12768	3557	136	33,67	15,48	136	54,72	15,59	136	374309	109701	136	1,092	1,388
rs17886286 (Intr)	CC	151	12840	3776	151	34,44	15,71	151	54,38	15,75	151	378861	114583	151	1,077	1,387
	GC	27	13892	4234	27	37,74	13,56	27	50,59	12,64	27	383333	122590	27	1,229	1,183
	GG	1	8800	.	1	40,00	.	1	56,00	.	1	272000	.	1	0,500	.
rs7078012 (Intr)	CC	110	13316	3862	110	35,01	15,31	110	53,35	15,63	110	380591	119159	110	1,150	1,551
	CT	41	12282	3642	41	34,00	15,88	41	54,39	14,86	41	375805	105440	41	1,042	0,962
	TT	28	12654	4109	28	36,21	15,35	28	54,82	15,10	28	377036	118461	28	0,966	0,961

rs6413520 (S45S)	AA	137	12812	3709	137	35,19	15,33	137	53,09	14,91	137	379569	113290	137	1,182	1,405
	AG	42	13510	4306	42	34,24	15,67	42	56,19	16,48	42	376881	123599	42	0,813	1,134
	GG	0			0			0			0			0		
rs721917 (M31T)	CC	16	12981	2706	16	33,88	12,54	16	52,13	11,35	16	401625	135165	16	1,625	1,479
	CT	87	12915	4167	87	35,91	14,71	87	52,84	14,47	87	386092	124196	87	1,139	1,431
	TT	76	13045	3730	76	34,12	16,72	76	55,30	16,91	76	365974	99736	76	0,938	1,216
rs723192 (Intr)	CC	135	12699	3432	135	33,38	15,36	135	55,14	15,54	135	374919	109393	135	1,093	1,391
	CT	43	13944	4880	43	39,84	14,69	43	49,63	14,08	43	394047	133192	43	1,122	1,258
	TT	1	8800	.	1	40,00		1	56,00	.	1	272000	.	1	0,500	.
rs1885551 (Prom)	AA	136	12666	3440	136	33,67	15,48	136	54,74	15,58	136	376757	110552	136	1,096	1,387
	AG	43	13955	4867	43	39,07	14,46	43	50,93	14,18	43	385837	130881	43	1,099	1,2258
	GG	0	.	.	0	.	.	0	.	.	0	.	.	0	.	.

Se han observado asociaciones significativas del rs 7078012 con la frecuencia cardiaca ($p=0,04$) y el número de linfocitos ($p=0,027$) de los SNP rs723192, rs188551 y rs10887199 con el número de neutrófilos mononucleares ($p=0,02$, $p=0,04$ y $p=0,46$ respectivamente); y de rs3088303 y rs17886286 con la saturación de oxígeno (SatO₂). Sin embargo, todas estas asociaciones son marginales y no se puede excluir que al menos alguna de ellas sea fruto del elevado número de comparaciones realizadas.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Este estudio ha pretendido evaluar la epidemiología de la BA, así como la asociación de variantes genéticas del gen *SFTPD*, en la población menor de dos años de edad en la isla de Gran Canaria.

El virus respiratorio sincitial es un importante patógeno del tracto respiratorio en la primera infancia. Los factores ambientales, el género y el nivel socioeconómico, juegan un papel importante en el riesgo de contraer una infección por VRS, pero las diferencias relacionadas con el huésped y en su susceptibilidad sugieren que existen factores genéticos que contribuyen también en el riesgo de padecer esta enfermedad (Malhotra y Krilov, 2000).

Como ha sido ampliamente referido (Terletskaia-Ladwing y cols., 2005) las infecciones por VRS cursan a nivel mundial de forma estacional, ya que tienen lugar en los meses de octubre y noviembre, con picos asistenciales máximos durante diciembre y enero, disminuyendo en los meses de primavera y esporádicamente se pueden encontrar casos aislados durante el resto del año. La excepción son las zonas ecuatoriales donde se observan durante todo el año (Stensballe y cols., 2003). Los datos de nuestro estudio colorean estos datos, ya que las infecciones por VRS en la isla de Gran Canaria también se presentan entre los meses de noviembre y febrero, con pico máximo en diciembre y enero. Referir, asimismo, que la mayoría de los lactantes quedan expuestos a este virus en al menos una ocasión (Carroll y cols., 2008).

En cuanto a la frecuencia de consulta a urgencias, durante la epidemia 2006-2007 fue del 3,2% y en la de 2007-2008, del 3,4%. Mansbach y cols., refieren frecuencia de consultas por BA en Atención Primaria del 4-20% y en urgencias del 2,6% (Mansbach y cols., 2005), similar a las referidas en nuestra serie de un Servicio de Urgencias hospitalario.

En la epidemia de 2006-2007 la tasa de ingresos hospitalarios por BA fue del 0,96% y en la de 2007-2008, del 1,5%. Nuestros datos son similares a los estudios publicados. Para la población menor de dos años de edad la frecuencia de ingresos

por BA se sitúa entre 1-3,5% siendo por VRS entre el 0,8-2,5% (Shay y cols., 1999, Nielsen y cols., 2003).

El VRS es el agente etiológico predominante en la BA, siendo el responsable del 56% de los casos ingresados por debajo de los dos años de edad (intervalo 27%-73%), pudiendo llegar a ser fatales (Vicent, 2003). Los datos de nuestro estudio son similares a los de Vicent, ya que ingresaron por BA por VRS el 57% (durante la epidemia de 2006-2007 y el 66% durante la epidemia de 2007-2008).

Parece existir una alternancia anual en las epidemias de ingresos por infección por VRS, siendo unas de comienzo precoz e intenso, con otras de comienzo tardío y leve (Tarletskaja-Ladwing y cols., 2005).

En el presente estudio la edad de la población afectada fue de $6,3 \pm 2,21$ meses para los pacientes con infección por VRS-A y $5,99 \pm 2,11$ meses para los afectados por VRS-B ($p=0,02383$). La edad media del grupo control fue superior a la de los casos por tratarse de pacientes que acudían programados para una intervención quirúrgica, ya que en la edad pediátrica se demoran las intervenciones hasta que el paciente gane suficiente peso y tenga la edad necesaria para poder soportar dicho procedimiento, siempre que la patología que motiva la cirugía no sea urgente y la clínica lo permita.

Los principales factores de riesgo para padecer BA y que ésta sea de mayor gravedad son: Prematuridad, Displasia brocopulmonar (DBP), EPC y las Cardiopatías Congénitas (CC) (fundamentalmente las complejas hemodinámicamente inestables o con hiperaflujo pulmonar) (Liese y cols., 2003, Rietveld y cols., 2006). De hecho, en poblaciones de riesgo la frecuencia de ingresos por IRA por VRS es mayor que para la población general, por ejemplo, en los prematuros menores de 32 semanas de edad gestacional oscila entre 4,4-18%; en lactantes con DBP entre 7,3%-42% y en niños con CC entre 1,6-9,8% (Bonillo y cols., 2000, Pedersen y cols., 2003).

Existen otros factores de riesgo como tener hermanos mayores, asistir a la guardería, el género masculino, la exposición al tabaco (fundamentalmente durante

la gestación), el haber recibido lactancia materna durante menos de 1-2 meses y el pertenecer a niveles socioeconómicos inferiores (Cilla y cols., 2006).

Con respecto a estas premisas, en nuestros pacientes los varones se afectaron algo más que las mujeres, pero estas diferencias no eran significativas ($p=0,107$).

Con respecto al peso al nacimiento fue significativamente menor en los pacientes con bronquiolitis aguda por VRS, que en los controles ($p= 0,04334$; OR 2,209; IC-95%, 1,008-4,841). Sin embargo, comparando el peso al nacimiento y la edad gestacional (bajo peso para su edad < 2500 gr y EG > 37 semanas), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

También corroboramos, como Eriksson y cols., 2002, que la alimentación con lactancia materna durante menos de un mes es un factor de riesgo para sufrir BA, ya que más de la mitad (55,4%) de los pacientes habían recibido menos de un mes lactancia materna o no la habían recibido ($p=0,04864$, OR 0,5262, IC 95% 0,2758-1,004).

Con respecto a los antecedentes familiares (como atopia, asma, rinitis alérgica) corroboramos, como Rossi y cols. 2007, que juegan un importante rol en el desarrollo de infección por VRS. Para rinitis alérgica el resultado fue $p=0,003022$; OR 2,4; IC 95%: 1,331-4,329. No encontramos asociación con la alergia alimentaria.

En nuestra población, y como era de esperar, los parámetros clínicos que definen la gravedad de la enfermedad, como la frecuencia respiratoria, la frecuencia cardíaca o la saturación de oxígeno, se han asociado significativamente con la gravedad clínica de la BA por VRS. De hecho, la hipoxia (Sat O₂ $< 92-94\%$) es el mejor predictor clínico de la gravedad, requiriendo oxigenoterapia u otros tratamientos y medida de soporte. Clínicamente la hipoxia se correlaciona con la frecuencia respiratoria, pero no con las sibilancias o el tiraje.

La identificación de factores de riesgo o marcadores clínicos de gravedad puede resultar útil en la toma de decisiones médicas, fundamentalmente para la indicación o no de realización de pruebas diagnósticas o la instauración de

procedimientos terapéuticos. En los últimos años ha surgido un especial interés por identificar factores de riesgo de BA grave.

A pesar de la elevada incidencia y los múltiples estudios realizados, ningún tratamiento ha demostrado claramente su eficacia en la bronquiolitis. Sólo la oxigenoterapia se considera eficaz y necesaria en los casos con hipoxia (American Academy of Pediatrics, 2006). En referencia al tratamiento instaurado en nuestros pacientes, el 98,4% recibieron salbutamol nebulizado. Solo en dos pacientes no fue prescrito, probablemente por la clínica leve de la BA. Sigue existiendo controversia acerca de la eficacia real del salbutamol inhalado y cuándo usarlo. No hay suficiente evidencia para recomendar su uso sistemático, ya que no se ha podido demostrar su eficacia y no están exentos de efectos adversos. Los últimos metaanálisis publicados por Zhang y cols., 2005, sostienen que el beneficio obtenido es parcial y transitorio, por lo que debe sopesarse su uso valorando los riesgos y beneficios. Wainwright y cols., 2003, refieren que mejoran la oximetría y las puntuaciones de las escalas de trabajo respiratorio de forma aguda (aunque menos efecto en otros parámetros como duración de la hospitalización o tasa de ingresos). En otros estudios no han demostrado tener más eficacia que el placebo. En la experiencia clínica es cierto que algunos pacientes mejoran tras su administración; por lo tanto, es correcto usar una dosis de prueba, valorando la relación riesgo- beneficio, pero si tras la reevaluación el paciente no mejora, no hay motivo para mantener el tratamiento. No está bien establecida la cadencia de administración de las inhalaciones en los lactantes en los que se encuentra mejoría tras su administración, concluyendo la mayoría de los estudios que se debe ser a demanda. Por otra parte, parece ser que el Salbutamol es más eficaz en niños mayores de 6 meses o con historia de atopia o asma familiar y la Adrenalina en los menores de 3-5 meses (Langley y cols., 2005).

Por otra parte, recibieron tratamiento con corticoides sistémicos 48 pacientes (24,9%). En el momento actual se mantiene la recomendación de no aconsejar su utilización (tanto sistémica como inhalada) para los pacientes ambulatorios, e individualizarla en pacientes ingresados administrándolos sólo en casos muy seleccionados, que es lo que ha sucedido en nuestros pacientes.

No fue prescrita ninguna otra medicación en nuestra serie.

En el presente trabajo se observó una asociación del SNP rs6413520 de *SFTPD* con la predisposición a sufrir BA por VRS: ($p=0,003$, OR 1,994, IC 95% 1,255-3,168). Además, el SNP rs7078012 se asoció marginalmente con la predisposición a BA por VRS ($p=0,047$). Cuando se realizó la asociación con BA por VRS-A y VRS-B por separado, el SNP que mostró una mayor asociación con BA por VRS-A fue también rs6413520 (0,028; OR 2,476, IC 95% 1,34-4,56). Otros SNP como rs10887199 ($p=0,01$), rs7078012 ($p=0,026$), rs 721917 ($p=0,023$) y rs1885551 ($p=0,03$) también se asociaron con BA por VRS-A pero en menor grado. Sin embargo, a pesar de que el tamaño muestral del grupo de pacientes con BA por VRS-B era el doble que el de VRS-A, el SNP rs6413520 se asoció en menor grado con BA por VRS-B ($p=0,035$; OR 1,761, IC 95% 1,035-2,995) y no se observaron asociaciones con los otros SNP analizados. De las asociaciones observadas con la predisposición a BA con VRS, VRS-A o VRS-B, únicamente la asociación de rs6413520 con predisposición a BA por VRS y VRS-A se mantuvo significativa tras corrección para comparaciones múltiples. Como resumen del estudio de asociación, nuestros resultados indican que el alelo menos frecuente de rs6413520 (alelo G) predispone a BA por VRS y VRS-A y podría asociarse en menor grado con BA por VRS-B. La asociación de rs6413520-G con predisposición a BA por VRS y VRS-A es además independiente la edad, la lactancia materna (menor de un mes o no lactancia frente a mayor de un mes) y de la presencia de antecedentes familiares de alergia como variables independientes, tal como se mostró en el análisis de regresión logística en el que se incluyeron estas variables.

Los estudios previos de análisis de asociación de variantes de *SFTPD* con BA por VRS han sido contradictorios (Thomas y cols., 2009; Lathi y cols., 2009, Ampuero y cols., 2011). En dos estudios previos, el SNP rs721917 se asoció con la susceptibilidad a bronquiolitis por VRS (Lathi y cols., 2009, Ampuero y cols., 2011). En el estudio de Lathi y cols., se estudiaron 84 pacientes menores de un año de edad hospitalizados para tratamiento de bronquiolitis aguda por VRS y 93 niños control. En su estudio se observó una débil asociación ($p=0,033$) del alelo del rs721917 codificante para Metionina en el residuo 11 (Met11) con la susceptibilidad a BA por VRS. Por otra parte, Ampuero y cols., estudiaron 118 pacientes pediátricos menores de 6 meses de edad con infección por VRS (59 con BA grave, 34 moderada

y 25 leve) y 118 adultos donantes de sangre. Al contrario que en el estudio anterior, ellos observaron una débil asociación ($p=0,028$) del alelo del rs721917 codificante para Treonina en el residuo 11 (Thr11) con la susceptibilidad a BA por VRS. Thomas y cols. (Thomas y cols 2009) estudiaron mediante el test de desequilibrio de ligamento 148 niños hospitalizados por bronquiolitis por VRS (edad media 2,3 meses, IQR 1,3-7,3) de los cuales 55 requirieron admisión en unidades de medicina intensiva pediátrica (UCI) y 32 requirieron intubación endotraquel, y al menos uno de sus progenitores. En el estudio de SNPs individuales el SNP rs721917 no se asoció con BA por VRS o con su gravedad. Como se puede apreciar las asociaciones encontradas en los dos primeros estudios son contradictorios y con una significación muy baja, que no sería significativa si se realizara una corrección para las comparaciones realizadas en esos estudios. Mientras que en el tercer estudio no hay asociación.

El SNP rs721917 es el más estudiado del gen de la SP-D. Este SNP se asoció con diversas enfermedades respiratorias como tuberculosis, asma y EPOC (Silveyra P y cols., 2012). El SNP rs721917 conlleva el intercambio de una metionina (Met) por una treonina (Thr) en el dominio SP-D amino-terminal e influye en la estructura oligomérica y la función de la proteína. Winkler y cols. 2014 observaron que los ratones transgénicos para la variante Met (11) Thr de la SP-D humana son más susceptibles a la inflamación de las vías respiratorias en un modelo de asma. La variante Met11Thr SP-D se ha asociado con la función y concentración de SP-D: la variante Thr11 se asocia a oligómeros de menor tamaño, a menor concentración sérica de SP-D y a diferencias en la unión a ciertos ligandos (Leth-Larsen y cols., 2005). En un estudio reciente de nuestro grupo, el alelo rs721917 codificante para treonina en posición 11 (Thr11) se asoció con una menor función pulmonar en individuos alérgicos a ácaros del polvo (Tesis doctoral de Estefanía Herrera-Ramos, 2014. Datos pendientes de publicación).

En el presente estudio no se observó una asociación del SNP rs721917 con la susceptibilidad ni con la gravedad de la BA por VRS. Para la realización de esta Tesis Doctoral se analizó la variabilidad genética del gen *SFTPD* en 179 pacientes con VRS, (73 con BA grave, 76 moderada y 30 leve) y 296 niños control. Los tamaños de los grupos utilizados en el presente estudio son mayores que los de los

de los estudios previos, por lo que las diferencias de tamaño muestral no parecen explicar la ausencia de asociación en nuestro estudio comparando con los estudios previos. Tampoco se encontraron asociaciones significativas (tras corrección para múltiples comparaciones) para este SNP cuando los pacientes fueron estudiados en función de la cepa de VRS, VRS-A o VRS B, análisis no realizado en los estudios anteriores. En consecuencia, los resultados obtenidos hasta la fecha no permiten establecer una asociación del SNP rs721917 con la BA por VRS o su gravedad.

En el estudio de Ampuero y cols. (Ampuero y cols 2011) en pacientes chilenos, el rs2243639, en concreto el alelo codificante para treonina se asoció con BA por VRS, aunque con una significación muy marginal ($p=0,046$). Este SNP no se asoció con BA por VRS en los otros dos estudios previos (Thomas y cols., 2009; Lathi y cols., 2009). Nuestros datos tampoco apoyan la asociación de este SNP con BA por VRS. El único SNP que se ha asociado en nuestro estudio con la susceptibilidad a BA por VRS es el rs6413520, que se asoció tanto con BA por VRS como por VRS-A. Este alelo también se asoció con BA por VRS-B, pero la asociación con BA por VRS-B no resultó significativa para corrección para comparaciones múltiples. Este SNP no ha sido estudiado en los estudios previos de asociación con BA por VRS (Thomas y cols., 2009; Lathi y cols., 2009, Ampuero y cols., 2011), en los que sólo se estudiaban los tres SNP que producen cambios no sinónimos en la proteína. En cambio, en el presente estudio se ha realizado una selección de TagSNP para el estudio de la variabilidad haplotípica de *SFTPD* y se han añadido algunos SNP asociados con enfermedades respiratorias en otros estudios. El SNP rs6413520 es una mutación sinónima que no conlleva un cambio de aminoácido en la proteína. No se puede afirmar actualmente la razón por la que este SNP se asocia con susceptibilidad a BA por VRS.

En el análisis de haplotipos definidos por los nueve SNP estudiados, se identificó un único haplotipo, TCTCCGTCA, que se asocia a desarrollo de BA por VRS, VRS-A y VRS-B. La significación de esta asociación es mayor que la del rs6413520 por separado. El SNP rs6413520 (el alelo menor G) y en concreto el haplotipo TCTCCGTCA de nuestro estudio pudieran ser marcadores de alguna otra variante en en desequilibrio de ligamento en el gen *SFTPD*. Alternativamente, este SNP podría ser un marcador de un haplotipo con una combinación determinada de

los tres SNP que inducen cambios no sinónimos en la proteína (rs721917, rs2243639 y rs3088308) que conlleve un cambio estructural mayor de la SP-D. En concreto el haplotipo TCTCCGTCA codifica una variante con los alelos Ser₂₇₀-Ala₁₆₀-Met₁₁. Por otra parte, el alelo rs6413520-G y el haplotipo TCTCCGTCA pudiera encontrarse en desequilibrio de ligamiento con variantes genéticas de otros genes cercanos. En este sentido, es importante recordar que los genes de SP-A1 y SP-A2 se encuentran cercanos, en el mismo brazo cromosómico al gen de la SP-D, y las variantes genéticas de SFTPA1 y SFTPA2 se han asociado en diversos estudios con el desarrollo de BA por VRS (Silveyra P y cols. 2012). No se puede excluir la posibilidad de que realmente el SNP rs6413520 y el haplotipo TCTCCGTCA de la *SFTPD* de nuestro estudio sean realmente marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con variantes de la SP-A1 y/o SP-A2. Esta hipótesis se está comenzando a estudiar en un nuevo trabajo del que todavía no se dispone de resultados.

Hay dos diferencias importantes de nuestros estudios con los estudios previos que pudieran explicar las diferencias observadas. En estudios previos únicamente se analizaron los SNP no sinónimos rs3088308, rs2243639 y rs721917. Además, es importante destacar que nuestro trabajo es el único en el que se han estudiado pacientes en los que se ha identificado la infección por las cepas VRS-A y VRS-B por separado. Como se ha indicado anteriormente, la cepa VRS-A es más agresiva y grave, produciendo epidemias todos los años mientras que VRS-B surge cada uno o dos años. Como consecuencia, las cepas de ambos grupos circulan al mismo tiempo durante las epidemias, pero varían proporcionalmente entre los grupos A y B y entre los subtipos (Milinaric-Galinovic y cols., 2009). En nuestro estudio el número de pacientes con BA por VRS-B fue el doble que el de BA por VRS-A y eso pudiera explicar en parte las diferencias con los estudios previos. Por otra parte, pocos estudios de asociación de variantes genéticas de *SFTPD* con enfermedad han realizado un estudio amplio de los SNP en este gen. La mayoría se han centrado en los tres SNP no sinónimos rs3088308, rs2243639 y rs721917. En un estudio en el que se analizó la asociación de seis SNP de *SFTPD* con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, entre los que se encontraba rs721917, la mayor asociación con el desarrollo de EPOC se observó precisamente con rs6413520 (Foreman MG y cols. 2011).

Son diversos los mecanismos por los que la variabilidad de la SP-D pudiera influir en la susceptibilidad a BA por VRS. La SP-D humana es capaz de neutralizar y promover el aclaramiento de VRS *in vivo* e *in vitro* debido a su unión a las proteínas F y G del virus (Hickling y cols. 1999, Le Vine y cols. 2004). De hecho, los ratones deficientes en SP-D son más susceptible a la neumonía por VRS (Le Vine, Whitsett, 2001). Por lo tanto, cambios en la estructura de la SP-D pudieran afectar al aclaramiento de VRS y su infectividad, influyendo en la susceptibilidad a BA. Por otra parte, la SP-D juega un importante papel en el mantenimiento del pulmón en un estado anti-inflamatorio (Gardai y cols. 2003), de manera que alteraciones en la estructura de la proteína que disminuyeran su potencial antiinflamatorio podrían facilitar el desarrollo de BA, aunque no se ha observado ningún SNP de *SFTPD* asociado con la gravedad de BA por VRS.

La evidencia experimental disponible respecto a SP-D sugiere la existencia de asociaciones genéticas para la susceptibilidad a padecer bronquiolitis aguda por VRS. Las interacciones entre éstos y otros factores genéticos, así como el impacto de los factores ambientales, ampliarán nuestros conocimientos sobre la complejidad subyacente del papel de las colectinas en las enfermedades respiratorias. La comprensión de estas complejidades y del impacto de la variabilidad genética nos ayudará a entender mejor la enfermedad, la susceptibilidad individual, así como a identificar a grupos de riesgo, lo que permitirá la detección temprana de recién nacidos de riesgo y por lo tanto, diseñar las intervenciones adecuadas en un intento por disminuir la lesión pulmonar a largo plazo.

No hay vacuna disponible actualmente para la prevención de la infección por VRS. Varias de las vacunas candidatas no sólo han demostrado ser ineficaces, sino que también pueden provocar la enfermedad. Los inhibidores dirigidos contra la proteína de fusión del VRS (F proteína) fueron abandonados. El anticuerpo monoclonal contra la proteína F, palivizumab, es de restringida aplicación y sólo está reservado para su uso profiláctico en los pacientes de alto riesgo durante las epidemias,

En agosto de 2015 se ha publicado que próximamente podemos tener una vacuna segura (Green y cols., 2015).

Uno de los principales retos de la medicina en general y la pediatría en concreto es identificar a aquellos pacientes que son susceptibles para padecer una enfermedad, y poder así prevenirla. Dentro de las enfermedades infantiles, la bronquiolitis aguda no es sólo un problema de salud en las épocas de epidemia, sino que constituye un grave problema socioeconómico que conlleva elevados costes directos e indirectos.

El uso de preparados de surfactante pulmonar para el tratamiento de recién Nacidos prematuros se utiliza desde hace muchos años (Willson y cols. 1999). Si se confirma la asociación del SNP rs6413520 con la susceptibilidad a BA por VRS, además de aportar conocimientos acerca de la susceptibilidad a la BA por VRS y permitir identificar a individuos más susceptibles, podría sentar las bases para preparados alelo-especificos de SP-D para el tratamiento de BA por VRS.

Limitaciones

La principal limitación del estudio es el tamaño muestral para poder establecer conclusiones definitivas. Aún así, este estudio es el de mayor tamaño muestral tanto de pacientes como de controles realizado hasta la fecha para el estudio de la variabilidad de *SFTPD* con el desarrollo de BA por VRS.

El estudio puede servir para el desarrollo en el futuro de otros trabajos con un tamaño muestral más grande donde puedan ser consideradas importantes estrategias intervencionistas y/o terapéuticas, principalmente biológicas y genéticas. El reto de futuro será el tratamiento personalizado mediante la farmacogenética.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

En base a lo previamente expuesto, se llega a las siguientes conclusiones:

1. El bajo peso al nacimiento, lactancia materna inferior a un mes y los antecedentes familiares de atopia, rinitis alérgica y asma son factores de predisposición a bronquiolitis aguda por VRS, confirmando resultados publicados anteriormente.
2. El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs6413520 del gen *SFTPD* se asocia con la susceptibilidad a bronquiolitis aguda por VRS, especialmente la causada por la infección por VRS-A.
3. Aunque se ha observado una discreta asociación estadística del SNP rs721917 con la susceptibilidad a bronquiolitis aguda por VRS-A, pero no VRS-B ni VRS total, esta asociación no se mantiene tras corrección para múltiples comparaciones. Los datos obtenidos no apoyan un papel del rs721917 en la susceptibilidad a bronquiolitis aguda por VRS, como se había propuesto en estudios previos.
4. El haplotipo TCTCCGTCA de las variantes a estudio del gen *SFTPD* se asocian con la susceptibilidad a VRS, tanto VRS-A como VRS-B.
5. Pudiera existir una asociación del alelo rs6413520-G con una mayor predisposición a la bronquiolitis aguda por VRS moderada o grave, aunque los datos no permiten establecer conclusiones definitivas.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abul-Ainine A, Luyt D. Short term effects of adrenaline in bronchiolitis: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child*. 2002; 86:276-9.
2. Al-Salmi Q A, Walter J N, Colasurdo G N , Sockrider M M, Smith E O, Takahashi H, et al. Serum KL-6 and surfactant proteins A and D in pediatric interstitial lung disease. *Chest* . 2005; 127:403-407.
3. Alcais A, Abel L, Casanova J L. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest*. 2009; 119:2506-2513.
4. Amanatidou V, Apostolakis S, Spandidos D. Genetic diversity of the host and severe respiratory syncytial virus-induced lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2009; 28:135-40.
5. Amanatidou V, Sourvinos G, Apostolakis S, Tsilimigaki A, Spandidos DA. T280M variation of the CX3C receptor gene is associated with increased risk for severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25:410-4.
6. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Diagnosis and Management of Bronchiolitis. *Pediatrics*. 2006; 118:1774-93.
7. Amirav I, Luder AS, Kruger N, Borovitch Y, Babai I, Miron D, et al. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of montelukast for acute bronchiolitis. *Pediatrics*. 2008; 122:1249-55
8. Ampuero S, Luchsinger V, Tapia L, Palomino MA, Larrañaga CE. SP-A1, SP-A2 and SP-D gene polymorphisms in severe acute respiratory syncytial infection in Chilean infants. *Infect Genet Evol*. 2011; 11:1368-77.
9. Andrade MA, Hoberman A, Glustein J, Paradise JL, Wald ER. Acute otitis media in children with bronchiolitis. *Pediatrics*. 1998; 10:617-9.
10. Arnedo-Pena A, Garcia-Marcos L, Carvajal U I, Busquets M R, Morales Suarez-Varela M, et al. Air pollution and recent symptoms of asthma, allergic rhinitis, and atopic eczema in schoolchildren aged between 6 and 7 years. *Arch Bronconeumol*. 2009; 45:224-229.

11. Augusto LA, Synguelakis M, Johansson J, Pedron T, Girard R, Chaby R. Interaction of pulmonary surfactant protein C with CD 14 and lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2003; 71:61-7.
12. Barlas C, Kiper N, Goçmen A, Ozcelik U, Dilber E, Anadol D. Racemic adrenaline and other treatment regimens in mild and moderate bronchiolitis. *Cocuk sagligi ve Hastaliklari Dergisi* 1998; 41; 155-165.
13. Barret J C, Fry B, Maller J, Daly M J. Haploview analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21:263-265.
14. Beck R, Elias N, Shoval S, Tov N, Talmon G, Godfrey S, et al. Computerized acoustic assessment of treatment efficacy of nebulized epinephrine and albuterol in RSV bronchiolitis. *BMC Pediatr*. 2007; 2; 7:22.
15. Berg KK, Madsen HO, Garred P, Wiseth R, Gunnes S, and Videm V. The additive contribution from inflammatory genetic markers on the severity of cardiovascular disease. *Scand J Immunol*. 2009; 69:36-42.
16. Bertrand P, Aranibar H, Castro E, Sánchez I. Efficacy of nebulized epinephrine versus salbutamol in hospitalized infants with bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol*. 2001; 3:284-8.
17. Bisgaard H, Study Group on Montelukast and Respiratory Syncytial Virus. A randomized trial of montelukast in respiratory syncytial virus postbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167:379-83.
18. Bisgaard G, Wenninger J, Wang Z, Olson EB Jr. Environmental hyperoxia and development of carotid chemoafferent function. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 605:30-4.
19. Bisgaard H, Flores-Nuez A, Goh A, Azimi P, Halkas A, Malice MP, et al. Study of montelukast for the treatment of respiratory symptoms of post-respiratory syncytial virus bronchiolitis in children. *Am Respir Crit Care Med*. 2008; 178:854-60.
20. Blom D, Ermers M, Bont L, van Aalderen WMC, van Woensel JBM. Corticosteroides inhalados durante la bronquiolitis aguda para la prevención de las sibilancias postbronquiolíticas (Revisión Cochrane). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2007 Número 3. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de *The Cochrane Library*, 2007 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
21. Blount RE Jr, Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956; 92:544-9.

22. Boeckh M, Berrey MM, Bowden RA, Crawford SW, Balsley J, Corey L. Phase 1 evaluation of the respiratory syncytial virus-specific monoclonal antibody palivizumab in recipients of hematopoietic stem cell transplants. *J Infect Dis.* 2001; 184:350-4.
23. Bont L, Stejin M, Van Aalderen W M, Brus F, Th Draaisma J M, Van Diemen-Steenvoorde R A, et al. J L. Seasonality of long term wheezing following respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Thorax* 2004; 59: 512-516.
24. Bonillo C, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Roest Crollius H, Dasilva C, Jaillon O, et al. Karyotype and chromosome location of characteristic tandem repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenet Cell Genet.* 2000; 88:50-5.
25. Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, et al. Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:11869-74.
26. Boyce TG, Mellen BG, Mitchel EF Jr, Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. *J Pediatr.* 2000; 137:865-70.
27. Brandenburg AH, van Beek R, Moll HA, Osterhaus AD, Claas EC. G protein variation in respiratory syncytial virus group A does not correlate with clinical severity. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3849-52.
28. Brandt EB, Mingler MK, Stevenson MD, Wang N, Khurana Hershey GK, Whitsett JA, et al. Surfactant protein D alters allergic lung responses in mice and human subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121:1140-1147.
29. Bratcher P E, Weathington N M, Nick H J, Jackson P L, Snelgrove R J, Gaggar A. MMP-9 cleaves SP-D and abrogates its innate immune functions in vitro. *PLoS One.* 2012; 7: e41881.
30. Bräuer L, Möschter S, Beileke S, Jäger K, Garreis F, Paulsen FP. Human parotid and submandibular glands express and secrete surfactant proteins A, B, C, and D. *Histochem Cell Biol.* 2009;132:331-8.
31. Bräuer L, Kindler C, Jager K, Sel S, Nolle B, Pleyer U, et al. F P. Detection of surfactant proteins A and D in human tear fluid and the human lacrimal system. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48:3945-3952.
32. Breij E C, Batenburg J J. Surfactant protein D/anti-Fc receptor bifunctional proteins as a tool to enhance host defence. *Expert Opin Biol Ther.* 2008; 8:409-419.

33. Bronchiolitis Guideline Team, Cincinnati Children's Hospital Medical Center: Evidence-based care guideline for management of bronchiolitis in infants 1 year of age or less with a first time episode, Bronchiolitis Pediatric Evidence-Based Care Guidelines, Cincinnati Children's Hospital Medical Center , Guideline 1, pages 1-16, 2010. *Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Bronchiolitis in children*. SIGN publication number 91. 2006, p. 1-41.
34. Bronchiolitis in children: a national clinical guide. <http://www.sign.ac.uk/pdf/sign91.pdf>. Acceso 13.11.07
35. Brown-Augsburger P, Hartshorn K, Chang D, Rust K, Fliszar C, Welgus HG, et al. Site-directed mutagenesis of Cys-15 and Cys-20 of pulmonary surfactant protein D. Expression of a trimeric protein with altered anti-viral properties. *J Biol Chem* 1996; 7:13724-30.
36. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, Picard C, Puel A, Abel L et al. Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20:39-47.
37. Cade A, Brownlee KG, Conway SP, Haigh D, Short A, Brown J, et al. Randomised placebo controlled trial of nebulised corticosteroids in acute respiratory syncytial viral bronchiolitis. *Arch Dis Child*. 2000; 82:126-30.
38. Callén Blecua M, Aizpurua Galdeano P, Ozcoidi Erro I, Mancisidor Aguinagalde L, Guedea Adiego C, Busselo Ortega E, et al. Inhaled corticosteroids and wheezing post-bronchiolitis. *An Esp Pediatr*. 2000; 52:351-5.
39. Cane PA. Analysis of linear epitopes recognised by the primary human antibody response to a variable region of the attachment (G) protein of respiratory syncytial virus... *J Med Virol*. 1997; 51:297-304.
40. Carbonell Estrany X, Quero Jiménez J. Recommendations for the prevention of respiratory syncytial virus infections. Standards Committee of the Spanish Society of Neonatology. Board of Directors of the Spanish Society of Neonatology. *An Esp Pediatr*. 2000; 52:372-4.
41. Carlsen KH, Leegaard J, Larsen S, Orstavik I. et al. Nebulised beclomethasone dipropionate in recurrent obstructive episodes after acute bronchiolitis. *Arch Dis Child*. 1988; 63:1428-33.
42. Carroll KN, Gebretsadik T, Griffin MR, Wu P, Dupont WD, Mitchel EF, et al. Increasing burden and risk factors for bronchiolitis-related medical visits in infants enrolled in a state health care insurance plan. *Pediatrics*. 2008; 122:58-64.

43. Cartwright KA, Jones DM, Smith AJ, Stuart JM, Kaczmarek EB, Palmer SR. Influenza A and meningococcal disease. *Lancet*. 1991; 338:554–7.
44. Chanock RM, Kim HW, Vargosko AJ, Deleva A, Johnson KM, Cumming C, et al. Respiratory syncytial virus. I. Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases in children. *JAMA*. 1961; 176:647-53.
45. 40. Chanock R, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg*. 1957; 66:291-300.
46. Cheng O Z, Palanlyar N, NET balancing: a problema in inflammatory lung diseases. *Front Immunol*. 2013; 4:1.
47. Cilla G, Sarasua A, Montes M, Arostegui N, Vicente D, Pérez-Yarza E. et al. Risk factors for hospitalization due to respiratory syncytial virus infection among infants in the Basque Country, Spain. *Epidemiol Infect*. 2006; 134:506-13.
48. Claireaux A E. Hyaline membrane in the neonatal lung. *Lancet*. 1953; 265:750-753.
49. Chi EY, Lagunoff D. Linear arrays of intramembranous particles in pulmonary tubular myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75:6225-9.
50. Collins PL, McIntosh K, Chanock RM, eds. Fields Virology. 3rd ed. v.I. Philadelphia: *Lippincott-Raven*; 1995:1312-1351.
51. Committee on Infectious Diseases; American Academy of Pediatrics. Respiratory syncytial virus. In: Pickering LK, ed. 2003 *Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases*. 2006:560–6
52. Corneli HM1, Zorc JJ, Mahajan P, Shaw KN, Holubkov R, Reeves SD, et al. A Multicenter, randomized, controlled trial of dexamethasone for bronchiolitis. *N Engl J Med*. 2007; 26; 357:331-9.
53. Couto Sant'Anna C y D'Elia C. Bronquiolitis. Libro electrónico: Infecciones respiratorias en niños; Sección III, capítulo 13; 247-263. *Organización Panamericana de la Salud, World Health Organization WHO 1999. www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/aipei1.htm*.
54. Crouch E, Rust K, Veile R, Donis-Keller H, Grosso L. Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D). SP-D is encoded on chromosome 10q22.2-23.1. *J Biol Chem*. 1993; 268:2976-83.

55. Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol.* 2001; 63:521-54.
56. Culley FJ, Pollott J, Openshaw PJ. Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood. *J Exp Med.* 2002; 196:1381-6.
57. Csonka P, Kaila M, Laippala P, Iso-Mustajarvi M, Vesikari T, Ashorn P, Oral prednisolone in the acute management of children age 6 to 35 months with viral respiratory infection-induced lower airway disease: a randomized, placebo-controlled trial. *J Pediatr.* 2003; 143: 725-30.
58. Dayan PS, Roskind CG, Levine DA, Kuppermann N. Controversies in the management of children with bronchiolitis. *Clin Ped Emerg Med.* 2004, 5:41-53.
59. De Vincenzo JP. Factors predicting childhood respiratory syncytial virus severity: what they indicate about pathogenesis. *Pediatr Infect Dis J.* 2005; 24:177-83.
60. deMello D, Heyman S, Phelps D, Floros J. Immunogold localization of SP-A in lungs of infants dying from respiratory distress syndrome. *Am J Pathol.* 1993; 142:1631-40.
61. deMello DE, Chi EY, Doo E, Lagunoff D. Absence of tubular myelin in lungs of infants dying with hyaline membrane disease. *Am J Pathol.* 1987; 127:131-9.
62. deMello DE, Phelps D, Patel G, Floros J, Lagunoff D. Expression of the 35kDa and low molecular weight surfactant-associated proteins in the lungs of infants dying with respiratory distress syndrome. *Am J Pathol.* 1989; 134:1285-93.
63. Deng Y, Chen S, Chen J, Tao Z, Kong Y, Xu Y, et al. Relationship between surfactant protein A polymorphisms and allergic rhinitis in a Chinese Han population. *Mol Biol Rep.* 2011; 38:1475-82.
64. Deng YQ, Tao ZZ, Kong YG, Xiao BK, Chen SM, Xu Y, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of surfactant protein D and allergic rhinitis in Chinese patients. *Tissue Antigens.* 2009; 73:546-52.
65. DeVincenzo JP, El Saleeby CM, Bush AJ. Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants. *J Infect Dis.* 2005, 191:1861-8.
66. DiAngelo S, Lin Z, Wang G, Phillips S, Ramet M, Luo J, et al. Novel, non-radioactive, simple and multiplex PCR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles. *Dis Markers.* 1999; 15:269-81.

67. du Prel JB, Puppe W, Gröndahl B, Knuf M, Weigl JA, Schaaff F, et al. Are meteorological parameters associated with acute respiratory tract infections? *Clin Infect Dis*. 2009; 15; 49:861-8.
68. Dudley S, Ashe K, Winther B, Hendley JO. Bacterial pathogens of otitis media and sinusitis: detection in the nasopharynx with selective agar media. *J Lab Clin Med*. 2001; 138:338-42. 2.
69. Durani Y, riedman MJ, Attia MW. Clinical predictors of respiratory syncytial virus infection in children. *Pediatr Int*. 2008; 5:352-5.
70. El Saleeby CM, Li R, Somes GW, Dahmer MK, Quasney MW, DeVincenzo JP. Surfactant protein A2 polymorphisms and disease severity in a respiratory syncytial virus-infected population. *J Pediatr*. 2010; 156:409-14.
71. Eriksson M, Bennet R, Rotzen-Ostlund M, von Sydow M, Wirgart BZ. Population-based rates of severe respiratory syncytial virus infection in children with and without risk factors, and outcome in a tertiary care setting. *Acta Paediatr* 2002; 91:593-8.
72. Feltes TF, Cabalka AK, Meissner HC, Piazza FM, Carlin DA, Top FH Jr, et al. Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease. *J Pediatr*. 2003; 143:532-40.
73. Ferguson JS, Voelker DR, McCormack FX, Schlesinger LS. Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol*. 1999 1; 163:312-21.
74. Figueras Aloy J, López Sastre J, Medrano López C, Bermúdez-Cañete Fernández R, Fernández Pineda L, et al. Spanish multidisciplinary consensus on the prevention of respiratory syncytial virus infection in children. *An Pediatr (Barc)*. 2008; 69:63-71.
75. Figueras Aloy J, Quero J, Doménech E, López Herrera MC, Izquierdo I, Losada A, et al. Recommendations for the prevention of respiratory syncytial virus infection. *An Pediatr (Barc)*. 2005; 63:357-62.
76. Fitzgerald DA, Kilham HA. Bronchiolitis: assessment and evidence-based management. *Med J Aust*. 2004; 180:399-404.
77. Flores G, Horwitz RI. Efficacy of beta2-agonist in bronchiolitis: a reappraisal and meta-analysis. *Pediatrics*. 1997; 100:233-9.

78. Floros J, DiAngelo S, Koptides M, Karinch AM, Rogan PK, Nielsen H, et al. Human SP-A locus: allele frequencies and linkage disequilibrium between the two surfactant protein A genes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996; 15:489-98.
79. Floros J, Kala K. Surfactant proteins: molecular genetics of neonatal pulmonary diseases. *Annu Rev Physiol*. 1998; 60:365-84.
80. Floros J, Lin HM, García A, Salazar MA, Guo X, DiAngelo S, et al. Surfactant protein genetic marker alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population. *J Infect Dis*. 2000; 182:1473-8.
81. Floros J, Pavlovic J. Genetics of acute respiratory distress syndrome: challenges, approaches, surfactant proteins as candidate genes. *Semin Respir Crit Care Med*. 2003; 24:161-8.
82. Floros J, Phelps DS. Pulmonary surfactant protein A; structure, expression, and its role in innate host defense. In: Nakos G, Lekka M, editors. *Surfactant-Update of Intensive Care Medicine*. Vol. 6. Ioannina: University of Ioannina 6; 2002; 87–102.
83. Floros J, Thomas N. Research Signpost, K., India. Genetic variations of surfactant proteins and lung injury. In: Nakos G, Papathanasiou A, editors. *Surfactant Pathogenesis and Treatment of Lung Disease*. 2009. 25–48.
84. Floros J, Wang G, Lin Z. Genetic Diversity of Human SP-A, a Molecule with Innate host Defense and Surfactant-Related Functions; Characteristics, Primary Function, and Significance. *Current Pharmacogenomics*. 2005; 3:87-95.
85. Foreman MG, Kong X, DeMeo DL, Pillai SG, Hersh CP, Bakke P, et al. Polymorphisms in surfactant protein-D is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 44:316-22.
86. Fox GF, Everard ML, Marsh MJ, Milner AD. Randomised controlled trial of budesonide for the prevention of post-bronchiolitis wheezing. *Arch Dis Child*. 1999; 80:343-7.
87. Fornůsková A, Vinkler M, Pagès M, Galan M, Jousselin E, Cerqueira F. et al. Contrasted evolutionary histories of two Toll-like receptors (Tlr4 and Tlr7) in wild rodents (MURINAE). *BMC Evol Biol*. 2013; 12:13.
88. Fornuskova A, Bryja J, Vinkler M, Macholán M, Piálek J. Contrasting patterns of polymorphism and selection in bacterial-sensing toll-like receptor 4 in two house mouse subspecies. *Ecol Evol*. 2014; 4:2931-44.

89. Franke-Ullmann G, Pförtner C, Walter P, Steinmüller C, Lohmann-Matthes ML, Kobzik L, et al. Alteration of pulmonary macrophage function by respiratory syncytial virus infection *in vitro*. *J Immunol*. 1995; 1; 154:268-80.
90. Fuller H, Del Mar C. Inmunoglobulinas para el tratamiento de la infección por virus sincicial respiratorio (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, número 3, 2008. Oxford, Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de *The Cochrane Library, Issue. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.*).
91. Gadomski AM, Bhasale AL. Broncodilatadores para la bronquiolitis (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2007 Número 4. Oxford: Update 11 Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de *The Cochrane Library, 2007 Issue 4. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.*).
92. Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, et al. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell*. 2003; 3; 115:13-23.
93. Garcia-Garcia M, Calvo Rey C, Quevedo Teruel S, Martínez Pérez M, Sánchez Ortega F, Martín del Valle F, et al. Radiografía de tórax en la bronquiolitis: ¿es siempre necesaria? *An Pediatr (Barc)*. 2004; 61:219-219.
94. García-Laorden MI, Rodríguez de Castro F, Solé-Violán J, Rajas O, Blanquer J, Borderías L, et al. Influence of genetic variability at the surfactant proteins A and D in community-acquired pneumonia: a prospective, observational, genetic study. *Crit Care*. 2011; 15:57-58.
95. Garofalo R, Kimpen JL, Welliver RC, Ogra PL. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr*. 1992; 120:28-32.
96. Gaynor CD, McCormack FX, Voelker DR, McGowan SE, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol*. 1995; 1; 155:5343-51.
97. Gern JE, Busse WW. The role of viral infections in the natural history of asthma, *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:201-12.
98. Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen Virol*. 2002; 83:753-7.

99. Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, et al. Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 22; 98:6366-71.
100. Glezen WP, Couch, RB. Influenza viruses. En: *Viral infections of humans*. Springer US; 1997: 473-505.
101. Glezen WP. The changing epidemiology of respiratory syncytial virus and influenza: impetus for new control measures. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23:202-6.
102. Green Christopher A, Scarselli E, Charles J, Sande Charles J, Amber J, Thompson Catherine Met al. Chimpanzee adenovirus – and MVA – vectored respiratory syncytial virus vaccine is safe and immunogenic in adults. *Infectious Disease*. 2015; 7:300ra126.
103. González C, Tato E, Korta J, Alustiza S, Sánchez J, Arranz L, et al. Guía Consensuada para el manejo de la bronquiolitis aguda. País Vasco. Abril 2008. En www.svnp.es/Documen/GuiadeBronquiolitis.doc.
104. González de Dios J, Ochoa Sangrador C. Grupo de Revisión y panel de expertos de la Conferencia del Proyecto aBREVIADO. Conferencia de Consenso sobre bronquiolitis aguda (I): metodología y recomendaciones. *An Pediatr (Barc)*. 2010; 221:1-221.e33.
105. Gluck L. Biochemical development of the lung: clinical aspects of surfactant development, RDS and the intrauterine assessment of lung maturity. *Clin Obstet Gynecol*. 1971; 14:710-21
106. Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, et al. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol*. 2005; 1; 174:1259-68.
107. Goodrich JS, Miller MB, Comparison of Cepheid's analyte-specific reagents with BD directigen for detection of respiratory syncytial virus, *J Clin Microbiol* 2007;45:604-6.
108. Greene CM, Branagan P, McElvaney NG. Toll-like receptors as therapeutic targets in cystic fibrosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2008; 12:1481-95.
109. Groothuis JR. Safety and tolerance of palivizumab administration in a large Northern Hemisphere trial. Northern Hemisphere Expanded Access Study Group. *Pediatr Infect Dis J*. 2001; 20:628-30.

110. Guo CJ, Atochina-Vasserman EN, Abramova E, Foley JP, Zaman A, Crouch ES, et al. S-nitrosylation of surfactant protein-D controls inflammatory function. *PLoS Biol.* 2008; 11; 266.
111. Hagan EC, Lloyd AL, Rasko DA, Faerber GJ, Mobley HL. Escherichia coli global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathog.* 2010; 1001-187.
112. Hallman M, Feldman BH, Kirkpatrick E, Gluck L. Absence of phosphatidylglycerol (PG) in respiratory distress syndrome in the newborn. Study of the minor surfactant phospholipids in newborns. *Pediatr Res.* 1977; 11:714-20.
113. Hariprakash S, Alexander J, Carroll W, Ramesh P, Randell T, Turnbull F. Randomized controlled trial of nebulized adrenaline in acute bronchiolitis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2003; 14:134-9.
114. Hartling L, Wiebe N, Russell K, Patel H, Klassen TP. Epinefrina para la bronquiolitis (Revisión Cochrane). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2007 Número 3. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de *The Cochrane Library*, 2007 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
115. Hawgood S, Poulain FR. The pulmonary collectins and surfactant metabolism. *Annu Rev Physiol.* 2001; 63:495-519.
116. Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol.* 2001; 75:10730-7.
117. Heidinger K, König IR, Bohnert A, Kleinstieber A, Hilgendorff A, Gortner L, et al. Polymorphisms in the human surfactant protein-D (SFTPD) gene: strong evidence that serum levels of surfactant protein-D (SP-D) are genetically influenced. *Immunogenetics.* 2005 ;57:1-7
118. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Sep;114: 671-6
119. Heminway BR, Yu Y, Tanaka Y, Perrine KG, Gustafson E, Bernstein JM, et al. Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology.* 1994; 200:801-5.
120. Herrera-Ramos E, López-Rodríguez M, Ruíz-Hernández JJ, Horcajada JP, Borderías L, Lerma E et al. Surfactant protein A genetic variants associate with

- severe respiratory insufficiency in pandemic influenza A virus infection. *Crit Care*. 2014; 20:18:127.
121. Hickling TP, Malhotra R, Bright H, McDowell W, Blair ED, Sim RB. Lung surfactant protein A provides a route of entry for respiratory syncytial virus into host cells. *Viral Immunol*. 2000; 13:125-35.
 122. Hilgendorff A, Heidinger K, Bohnert A, Kleinsteiber A, König IR, Ziegler A. Association of polymorphisms in the human surfactant protein-D (*SFTPD*) gene and postnatal pulmonary adaptation in the preterm infant. *Acta Paediatr*. 2009; 98:112-7.
 123. Hoebee B, Rietveld E, Bont L, Oosten Mv, Hodemaekers HM, Nagelkerke NJ, et al. Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms. *J Infect Dis*. 2003; 1; 187:2-11.
 124. Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:547-78.
 125. Husby S, Herskind AM, Jensenius JC, Holmskov U. Heritability estimates for the constitutional levels of the collectins mannan-binding lectin and lung surfactant protein D. A study of unselected like-sexed mono- and dizygotic twins at the age of 6-9 years. *Immunology*. 2002; 106:389-94.
 126. Hussey GD, Apolles P, Arendse Z, Yeates J, Robertson A, Swingler G, et al. Respiratory syncytial virus infection in children hospitalised with acute lower respiratory tract infection. *S Afr Med J*. 2000; 90:509-12.
 127. Ikegami M, Whitsett JA, Jobe A, Ross G, Fisher J, Korfhagen T. Surfactant metabolism in SP-D gene-targeted mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279:468-76.
 128. Jack DL, Cole J, Naylor SC, Borrow R, Kaczmarek EB, Klein NJ, et al. Genetic polymorphism of the binding domain of surfactant protein-A2 increases susceptibility to meningococcal disease. *Clin Infect Dis*. 2006; 1; 43:1426-33.
 129. Jacoby DB. Role of the respiratory epithelium in asthma. *Res Immunol*. 1997; 148:48-58.
 130. Janssen R, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers HM, Ermers MJ, Doornbos G, et al. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *J Infect Dis*. 2007; 196: 826-34.

131. Jobe AH. An unknown: lung growth and development after very preterm birth. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166:1529-30.
132. Kajosaari M, Syvänen P, Förars M, Juntunen-Backman K. Inhaled corticosteroids during and after respiratory syncytial virus-bronchiolitis may decrease subsequent asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2000; 11:198-202.
133. Karadag B, Ceran O, Guven G, Dursun E, Ipek IO, Karakoc F, et al. Efficacy of Salbutamol and Ipratropium Bromide in the Management of Acute Bronchiolitis-A. Clinical Trial. *Respiration.* 2007; 6:283-7.
134. Karolchik D, Barber GP, Casper J, Clawson H, Cline MS, Diekhans ,et al. heUCSC Genome Browser database: *Nucleic Acids Res.* 2014;42:764-70.
135. Kellner JD, Ohlsson A, Gadomski AM, Wang EE. Bronchodilators for bronchiolitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;CD001266.
136. Kerr MH, Paton JY. Surfactant protein levels in severe respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159:1115-8.
137. King VJ, Viswanathan M, Bordley WC, Jackman AM, Sutton SF, Lohr KN, et al. Pharmacologic treatment of bronchiolitis in infants and children: a systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2004; 158:127-37.
138. Kim G, Weiss S J, Levine R L. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 184:901-905.
139. Kishore U, Bernal AL, Kamran MF, Saxena S, Singh M, Sarma PU, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D in human health and disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005; 53:399-417.
140. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol.* 2006; 43:1293-315.
141. Kneyber MC, Brandenburg AH, Rothbarth PH, de Groot R, Ott A, van Steensel-Moll HA. Relationship between clinical severity of respiratory syncytial virus infection and subtype. *Arch Dis Child.* 1996; 75:137-40.
142. Koehoorn M, Karr CJ, Demers PA, Lencar C, Tamburic L, Brauer M. Descriptive epidemiological features of bronchiolitis in a population-based cohort. *Pediatrics.* 2008; 122:1196-203.
143. Kristjánsson S, Lødrup Carlsen KC, Wennergren G, Strannegård IL, Carlsen KH. Nebulised racemic adrenaline in the treatment of acute bronchiolitis in infants and toddlers. *Arch Dis Child.* 1993; 69:650-4.

144. Krueger M, Puthothu B, Gropp E, Heinze J, Braun S, Heinzmann A. Amino acid variants in Surfactant protein D are not associated with bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006; 17: 77-81.
145. Kruglyak VV, Gorobets OY, Gorobets YI, Kuchko AN. Magnetization boundary conditions at a ferromagnetic interface of finite thickness. *J Phys Condens Matter*. 2014; 8:26-40.
146. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*. 2000; 1:398-401.
147. Kuyucu S, Unal S, Kuyucu N, Yilgor E. Additive effects of dexamethasone in nebulized salbutamol or L-epinephrine treated infants with acute bronchiolitis. *Pediatr Int*. 2004; 46:539-44.
148. Kuzik BA, Al-Qadhi SA, Kent S, Flavin MP, Hopman W, Hotte S, et al. Nebulized hypertonic saline in the treatment of viral bronchiolitis in infants. *J Pediatr*. 2007; 151:266-70.
149. Lahti M, Lofgren J, Marttila R, Renko M, Klaavuniemi T, Haataja R, et al. Surfactant protein D gene polymorphism associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Res*. 2002; 51:696-9.
150. Lam E, dos Santos CC. Advances in molecular acute lung injury/acute respiratory distress syndrome and ventilator-induced lung injury: the role of genomics, proteomics, bioinformatics and translational biology. *Curr Opin Crit Care*. 2008; 14:3-10.
151. Langley JM, Smith MB, LeBlanc JC, Joudrey H, Ojah CR, Pianosi P. Racemic epinephrine compared to salbutamol in hospitalized young children with bronchiolitis; a randomized controlled clinical trial. *BMC Pediatr*. 2005; 5: 5:7.
152. Leth-Larsen R, Garred P, Jensenius H, Meschi J, Hartshorn K, Madsen JA et al. A common polymorphism in the SFTPD gene influences assembly, function, and concentration of surfactant protein DJ *Immunol*. 2005; 174:1532-8.
153. LeVine A M, Whitsett J A. Pulmonary collectins and innate host defense of the lung. *Microbes Infec*. 2001; 3:161-166.
154. Levine DA, Platt SL, Dayan PS, Macias CG, Zorc JJ, Krief W, et al. Risk of serious bacterial infection in young febrile infants with respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*. 2004; 113: 1728-1734.

155. Li L, Zhang J, Diao W, Wang D, Wei Y, Zang C et al. MicroRNA-155 and MicroRNA-21 promote the expansion of functional myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2014; 192: 1034-1043.
156. Lim DJ, Chun YM, Lee HY, Moon SK, Chang KH, Li JD, et al. Cell biology of tubotympanum in relation to pathogenesis of otitis media - a review. *Vaccine.* 2000; 1:17-25.
157. Liu J, Hu F, Liang W, Wang G, Singhal PC, and Ding G. Polymorphisms in the surfactant protein a gene are associated with the susceptibility to recurrent urinary tract infection in Chinese women. *Tohoku J Exp Med.* 2010; 221:35-42.
158. Liu W, Bentley CM, Floros J. Study of human SP-A, SP-B and SP-D loci: allele frequencies, linkage disequilibrium and heterozygosity in different races and ethnic groups. *BMC Genet.* 2003; 11: 4-13.
159. Liese AD, Hirsch T, von Mutius E, Weiland SK. Burden of overweight in Germany: prevalence differences between former East and West German children. *Eur J Public Health.* 2006; 16:526-31.
160. Lodrup Carlsen KC, Carlsen KH. Inhaled nebulized adrenaline improves lung function in infants with acute bronchiolitis. *Respir Med.* 2000; 94:709-14.
161. Löfgren J, Rämét M, Renko M, Marttila R, Hallman M. Association between surfactant protein A gene locus and severe respiratory syncytial virus infection in infants. *J Infect Dis.* 2002; 185:283-9.
162. Lowell DI, Lister G, Von Koss H, McCarthy P. Wheezing in Infants: The response to epinephrine. *Pediatrics.* 1987; 79:939-45.
163. Lozano JM. Bronchiolitis. *BMJ Clin Evid.* 2007; 10; 2007. Pii: 0308.
164. Luchetti M, Ferrero F, Gallini C, Natale A, Pigna A, Tortorolo L, et al. Multicente, randomized, controlled study of porcine surfactant in severe respiratory syncytial virus-induced respiratory failure. *Pediatric Crit Care Med.* 2002; 3:261-268.
165. Madan T, Kishore U, Shah A, Eggleton P, Strong P, Wang JY, et al. Lung surfactant proteins A and D can inhibit specific IgE binding to the allergens of *Aspergillus fumigatus* and block allergen-induced histamine release from human basophils. *Clin Exp Immunol.* 1997; 110:241-9.
166. Madan T, Saxena S, Murthy KJ, Muralidhar K, Sarma PU. Association of polymorphisms in the collagen region of human SP-A1 and SP-A2 genes with pulmonary tuberculosis in Indian population. *Clin Chem Lab Med.* 2002; 40:1002-8.

167. Madhi SA, Venter M, Madhi A, Petersen MK, Klugman KP. Differing manifestations of respiratory syncytial virus-associated severe lower respiratory tract infections in human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected children. *Pediatr Infect Dis J*. 2001; 20:164-70.
168. Malik S, Greenwood CM, Eguale T, Kifle A, Beyene J, Habte A, et al. Variants of the SFTPA1 and SFTPA2 genes and susceptibility to tuberculosis in Ethiopia. *Hum Genet*. 2006; 118:752-9.
169. Malhotra R, Merry T, Ray KP. Innate immunity: a primitive system in humans. *Immunol Today*. 2000; 21:534-5.
170. Mansbach J.M, Emond J.A, Camargo Jr C.A. Bronchiolitis in US emergency departments 1992 to 2000: epidemiology and practice variation. *Pediatr Emerg Care*. 2005; 21:242-247.
171. Martínez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med*. 1995; 332:133-8.
172. Martínez-Gimeno A. Onions, myths, beliefs, fashion and reality in asthma. *Allergol Immunopathol*. 2009; 37:309-13.
173. Martinez – Gimeno A. Montelukast en la bronquiolitis: historia y enseñanzas de una decepción. *Evid pediatr*. 2009; 5:3.
174. Martinon-Torres F, Rodriguez-Nunez A, Martinon-Sanchez JM. Nasal continuous positive airway pressure with heliox in infants with acute bronchiolitis. *Respir Med*. 2006; 100:1458-62.
175. Martinon-Torres F, Rodriguez-Nunez A, Martinon-Sanchez J. Nasal continuous positive airway pressure with heliox versus air oxygen in infants with acute bronchiolitis: a crossover study. *Pediatrics*. 2008; 121:1189-94.
176. McConnochie KM. Bronchiolitis: What's in the name? *Am J Dis Child*. 1993; 137:11-3.
177. Menon K, Sutcliffe T, Klassen TP. A randomized trial comparing the efficacy of epinephrine with salbutamol in the treatment of acute bronchiolitis. *J Pediatr*. 1995; 126:1004-7.
178. Mikerov AN, Umstead TM, Gan X, Huang W, Guo X, Wang G, et Al. Impact of ozone exposure on the phagocytic activity of human surfactant protein A (SP-A) and SP-A variants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 294:121-30.

179. Mikerov AN, Umstead TM, Huang W, Liu W, Phelps DS, Floros J. SP-A1 and SP-A2 variants differentially enhance association of *Pseudomonas aeruginosa* with rat alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 288:150-8.
180. Mikerov AN, Wang G, Umstead TM, Zacharatos M, Thomas NJ, Phelps DS, et al. Surfactant protein A2 (SP-A2) variants expressed in CHO cells stimulate phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* more than do SP-A1 variants. *Infect Immun*. 2007; 75:1403-12.
181. Mitchell I, Tough S, Gillis L, and Majaesic C. Beyond randomized controlled trials: a "real life" experience of respiratory syncytial virus infection prevention in infancy with and without palivizumab. *Pediatr Pulmonol*. 2006; 41:1167-74.
182. Miyairi I, DeVincenzo JP. Human genetic factors and respiratory syncytial virus disease severity. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21:686-703.
183. Mlinaric-Galinovic G, Vojnovic G, Cepin-Bogovic J, Bace A, Bozikov J, Welliver RC, et al. Does the viral subtype influence the biennial cycle of respiratory syncytial virus? *Virology*. 2009; 6:133.
184. Montoya Guarín CJ, Patiño Grajales PJ, Rugeles López MT. *Inmunología: una ciencia activa*. Editorial Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina, 2009.
185. Morris JA, Blount RE, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956; 92:545-549.
186. Muething S, Schoettker PJ, Gerhardt WE, Atherton HD, Britto MT, Kotagal UR. Decreasing overuse of therapies in the treatment of bronchiolitis by incorporating evidence at the point of care. *J Pediatr*. 2004; 144:703-10.
187. Mull CC, Scarfone RJ, Ferri LR, Carlin T, Salvaggio C, Bechtel KA, et al. A randomized trial of nebulized epinephrine vs albuterol in the emergency department treatment of bronchiolitis. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004; 158:113-8.
188. Nayak A, Dodagatta-Marri E, Tsolaki AG, Kishore U. An Insight into the Diverse Roles of Surfactant Proteins, SP-A and SP-D in Innate and Adaptive Immunity. *Front Immunol*. 2012; 7: 3-13.
189. New Zealand Guidelines Group. Wheeze and Chest Infection in Infants under 1 year. April 2005.
190. Nilsen J, Diaz Brinton R. Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:2842-7.

191. Noah TL, Murphy PC, Alink JJ, Leigh MW, Hull WM, Stahlman MT, et al. Bronchoalveolar lavage fluid surfactant protein-A and surfactant protein-D are inversely related to inflammation in early cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168:685-91.
192. Numa AH, Williams GD, Dakin CJ. The effect of nebulized epinephrine on respiratory mechanics and gas exchange in bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164:86-91.
193. Ofek I, Crouch E, Keisari Y. The role of C-type lectins in the innate immunity against pulmonary pathogens. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 479:27-36.
194. Paediatric Society of New Zealand. Best Practice Evidence Based Guideline Wheeze and Chest Infection Infants Under 1 Year. 2005. www.paediatrics.org.nz.
195. Panuska JR, Cirino NM, Midulla, Despot JE, McFadden ER Jr, Huang YT. Productive infection of isolated human alveolar macrophages by respiratory syncytial virus. *J Clin Invest.* 1990; 86:113-9.
196. Park JW, Ryter SW, Choi AM. Functional significance of apoptosis in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD.* 2007; 4:347-53.
197. Pastva AM, Wright JR, Williams KL. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2007; 4:252-7.
198. Patel H, Platt R, Lozano JM, Wang EEL. Glucocorticoides para la bronquiolitis viral aguda en lactantes y niños pequeños (Revisión Cochrane). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2007 Número 3. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de *The Cochrane Library*, 2007 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd).
199. Pavlovic J, Papagaroufalos C, Xanthou M, Liu W, Fan R, Thomas NJ, et al. Genetic variants of surfactant proteins A, B, C, and D in bronchopulmonary dysplasia. *Dis Markers.* 2006; 22:277-91.
200. Pedersen L, Mollerup J, Hansen E, Jungbauer A. Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 790:161-73.
201. Perrotta C, Ortiz Z, Roque M. Fisioterapia respiratoria para la bronquiolitis aguda en pacientes pediátricos de hasta 24 meses de vida (Revisión Cochrane). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2007 Número 3. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de

The Cochrane Library, 2007 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).

202. Pettigrew MM, Gent JF, Zhu Y, Triche EW, Belanger KD, Holford TR, et al. Respiratory symptoms among infants at risk for asthma: association with surfactant protein A haplotypes. *BMC Med Genet*. 2007; 2; 8:15.
203. Pettigrew MM, Gent JF, Zhu Y, Triche EW, Belanger KD, Holford TR, et al. Association of surfactant protein A polymorphisms with otitis media in infants at risk for asthma. *BMC Med Genet*. 2006; 7:68.
204. Phelps DS. Surfactant regulation of host defense function in the lung: a question of balance. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2001; 20:269-92.
205. Piedra P, Stark A. Treatment; outcome; and prevention of bronchiolitis in infants and children. *UpToDate*. 2008 www.uptodate.com
206. Piedra PA, Cron SG, Jewell A, Hamblett N, McBride R, Palacio MA, et al. Immunogenicity of a new purified fusion protein vaccine to respiratory syncytial virus: a multi-center trial in children with cystic fibrosis. *Vaccine*. 2003;21:2448-60
207. Postle AD, Mander A, Reid KB, Wang JY, Wright SM, Moustaki M, et al. Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999; 20:90-8.
208. Pryhuber GS, Hull WM, Fink I, McMahan MJ, Whitsett JA. Ontogeny of surfactant proteins A and B in human amniotic fluid as indices of fetal lung maturity. *Pediatr Res*. 1991; 30:597-605.
209. Purcell K, Fergie J. Concurrent serious bacterial infections in 912 infants and children hospitalized for treatment of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23: 267-9.
210. Purcell K, Fergie J. Lack of usefulness of an abnormal White blood cell count for predicting a concurrent serious bacterial infection in infants and Young children hospitalized with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; 26:311-5.
211. Puthothu B, Krueger M, Forster J, Heinzmann A. Association between severe respiratory syncytial virus infection and IL13/IL4 haplotypes. *J Infect Dis*. 2006; 193: 438-41.

212. Ralston S, Hartenberger C, Anaya T, Qualls C, Kelly HW. Randomized, placebo-controlled trial of albuterol and epinephrine at equipotent beta-2 agonist doses in acute bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol.* 2005; 40:292-9.
213. Rämetsä M, Haataja R, Marttila R, Hämäläinen A, Knip M, Hallman M. Human surfactant protein-A gene locus for genetic studies in the Finnish population. *Dis Markers.* 2000; 16:119-24.
214. Rämetsä M, Löfgren J, Alho OP, Hallman M. Surfactant protein-A gene locus associated with recurrent otitis media. *J Pediatr.* 2001; 138:266-8.
215. Read RC, Fox A, Miller K, Gray T, Jones N, Borrow R, et al. Experimental infection of human nasal mucosal explants with *Neisseria meningitidis*. *J Med Microbiol.* 1995; 42:353-61.
216. Redecke V, Häcker H, Datta S, Fermin A, Pitha PM, Broide D, et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol.* 2004; 172:2739-43.
217. Regamey N, Kaiser L. Rhinovirus infections in infants: is respiratory syncytial virus ready for the challenge?. *Eur Respir J.* 2008; 32:249-51.
218. Reijonen T, Korppi M, Kuikka L, Remes K. Anti-inflammatory therapy reduces wheezing after bronchiolitis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1996; 150:512-7.
219. Reis PM, Raab TW, Chuat JY, Leser ME, Miller R, Watzke HJ, et al. Influence of Surfactants on Lipase Fat Digestion in a Model Gastro-intestinal System. *Food Biophys.* 2008; 3:370-381.
220. Rietveld E, Vergouwe Y, Steyerberg EW, Huysman MW, de Groot R, Moll HA. Hospitalization for respiratory syncytial virus infection in Young children: development of a clinical prediction rule. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25:201-7.
221. Ridker PM, Libby P, Risk Factors for Atherosclerotic Disease. *Braunwald' Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine.* 8th ed. Philadelphia, Pa; Saunders Elsevier; 2007:chap.39.
222. Rodriguez WJ, Gruber WC, Groothuis JR, Simoes EA, Rosas AJ, Lepow M, et al. Respiratory syncytial virus immune globulin treatment of RSV lower respiratory tract infection in previously healthy children. *Pediatrics.* 1997; 100:9-10.
223. Rossi GA, Medici MC, Arcangeletti MC, Lanari M, Merolla R, Paparatti UD, et al. Risk factors for severe RSV-induced lower respiratory tract infection over four consecutive epidemics. *Eur J Pediatr.* 2007; 166:1267-72.

224. Sano H, Chiba H, Iwaki D, Sohma H, Voelker DR, Kuroki Y. Surfactant proteins A and D bind CD14 by different mechanisms. *J Biol Chem.* 2000; 275:22442-51.
225. Saxena S, Kumar R, Madan T, Gupta V, Muralidhar K, Sarma PU. Association of polymorphisms in pulmonary surfactant protein A1 and A2 genes with high-altitude pulmonary edema. *Chest.* 2005; 128:1611-9.
226. Saxena S, Madan T, Shah A, Muralidhar K, Sarma PU. Association of polymorphisms in the collagen region of SP-A2 with increased levels of total IgE antibodies and eosinophilia in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111:1001-7.
227. Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, Weiss AA. Bordetella pertussis lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A. *J Immunol.* 2004; 173:1959-65.
228. Schroeder AR, Marmor AK, Pantell RH, Newman TB. Impact of pulse oximetry and oxygen therapy on length of stay in bronchiolitis hospitalizations. *ArchPediatr Adolesc Med.* 2004; 158:527-30.
229. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Bronchiolitis in children. *SIGN publication number 91.* 2006, p.1-41. <http://www.sign.ac.uk/pdf/sign91.pdf>
230. Siezen CL, Bont L, Hodemaekers HM, Ermers MJ, Doornbos G, Van't Slot R, et al. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis in preterm children is associated with airway remodeling genes and innate immune genes. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28:333-5.
231. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA.* 1999. 282:1440-6.
232. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171:137-141.
233. Simon A, Khurana K, Wilkesmann A, Müller A, Engelhart S, Exner M. Nosocomial respiratory syncytial virus infection: impact of prospective surveillance and targeted infection control. *Int J Hyg Environ Health.* 2006; 209:317-24.
234. Silveyra P, Floros J, Genetic variant associations of human SP-A and SP-D with acute and chronic lung injury. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012; 17:407-429.

235. Skjerven HO, Rolfsjord LB, Berents TL, Engen H, Dizdarevic E, Midgaard C, et al. Allergic diseases and the effect of inhaled epinephrine in children with acute bronchiolitis: follow-up from the randomised, controlled, double-blind, Bronchiolitis ALL trial. *Lancet Respir Med.* 2015 ;3:702-8
236. Sørensen GL, Hjelmberg Jv, Kyvik KO, Fenger M, Høj A, Bendixen C, et al. Genetic and environmental influences of surfactant protein D serum levels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290:1010-7.
237. Sorensen GL, Husby S, Holmskov U. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology.* 2007; 212:381-416.
238. Spurling GKP, Fonseka K, Doust J, Del Mar C. Antibióticos para la bronquiolitis en niños (Revisión Cochrane). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2007 Número 3. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2007 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
239. Steiner RW. Treating Acute Bronchiolitis Associated with VRS *Am Fam Physician.* 2004; 69:325-30.
240. Stensballe LG, Devasundaram JK, Simoes E. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. *Pediatr Infect Dis J.* 2003; 22:21-32.
241. Swingler GH, Hussey GD, Zwarenstein M. Duration of illness in ambulatory children diagnosed with bronchiolitis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2000; 154:997-1000.
242. Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, et al. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis.* 2004; 189:2057-63.
243. Tal G, Cesar K, Oron A, Hourri S, Ballin A, Mandelberg A. Hypertonic saline/epinephrine treatment in hospitalized infants with viral bronchiolitis reduces hospitalization stay: 2 years experience. *Isr Med Assoc J.* 2006; 8:169-73.
244. Tanaka M, Arimura Y, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamamoto H, et al. Genetic variants in surfactant, pulmonary-associated protein D (*SFTPD*) and Japanese susceptibility to ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15:918-925.
245. Tenner AJ, Robinson SL, Borchelt J, Wright JR. Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. *J Biol Chem.* 1989; 264:13923-8.

Variantes genéticas de la proteína D del surfactante pulmonar (SP-D): papel en la susceptibilidad y gravedad de la infección por virus respiratorio sincitial (VRS)

246. Terletskaia-Ladwing E, Enders G, Schalasta G, Endres M, Defining the timing of respiratory syncytial virus (RSV) outbreaks:an epidemiological study, *BMC Infect Dis* 2005;5:20-2.
247. The Impact-RSV Study Group. Palivizumab, a humanized RSV monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics*. 1998; 102:531-7.
248. Thomas N, DiAngelo S, Hess J, Fan R, Ball M, Geskey J, et al. Transmission of surfactant protein variants and haplotypes in children hospitalized with respiratory syncytial virus. *Pediatr Res*. 2009; 66:70-3.
249. Thomas N, Fan R, Diangelo S, Hess J, Floros J. Haplotypes of the surfactant protein genes A and D as susceptibility factors for the development of respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr*. 2007; 96:985-9.
250. Tino MJ, Wright JR. Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific pulmonary pathogens by alveolar macrophages. *Am J Physiol*. 1996; 270:677-88.
251. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 174:886-93.
252. Tulic MK, Hurrelbrink RJ, Prêle CM, Laing IA, Upham JW, Le Souef P, et al. TLR4 polymorphisms mediate impaired responses to respiratory syncytial virus and lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2007; 179:132-40.
253. Vaid M, Kaur S, Taruna M, Singh H, Gupta V, Murthy K, et al. Association of SP-D, MBL and I-NOS genetic variants with pulmonary tuberculosis. *Indian J Hum Genet*. 2006; 12:105–110.
254. Van Aerde T. In infants with bronchiolitis, is epinephrine more effective than placebo in improving clinical outcomes, as measured by clinical score, oxygen saturation and respiratory rate? Part A: Evidence-based answer and summary. *Paediatr Child Health*. 2003; 8:629-30.
255. Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, et al. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol*. 2002; 169:3978-86.
256. Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez –Yarza E.G, Pérez-Trallero. Hospitalization for respiratory syncytial virus in the pediatric population in Spain. *Epidemiol Infect*. 2003; 131: 865-870.

257. Villar J, Flores C, Méndez-Alvarez S. Genetic susceptibility to acute lung injury. *Crit Care Med.* 2003; 3:272-5.
258. Voets S, Van Berlaer G, Hachimi-Idrissi S. Clinical predictors of the severity of bronchiolitis. *Eur J Emerg Med.* 2006; 13:134-8.
259. Volovitz B, Welliver RC, De Castro G, Krystofik DA, Ogra PL. The release of leucotrienes in the respiratory tract during infection with respiratory syncytial virus: role in obstructive airway disease. *Pediatr Res.* 1988; 24:504-7.
260. Vogel AM, Lennon DR, Harding JE, Pinnock RE, Graham DA, Grimwood K, et al. Variations in bronchiolitis management between five New Zealand hospitals: can we do better? *J Paediatr Child Health.* 2003; 39:40-5.
261. Voss T, Melchers K, Scheirle G, Schäfer KP. Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein SP-A derived from two human coding sequences: implications for the chain composition of natural human SP-A. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991; 4:88-94.
262. Wainwright C, Altamirano L, Cheney M, Cheney J, Barber S, Price D, et al. A multicenter, randomized, double-blind, controlled trial of nebulized epinephrine in infants with acute bronchiolitis. *N Engl J Med.* 2003; 349:27-35.
263. Walsh E, Hall C. Approaches to a vaccine for respiratory syncytial virus. En: Meyers RA, ed. *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine.* Weinheim. Germany: VCH. 1996:286-296.
264. Wang EE, Tang NK. WITHDRAWN: Immunoglobulin for preventing respiratory syncytial virus infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; 18:CD001725.
265. Wang G, Guo X, Diangelo S, Thomas NJ, Floros J. Humanized SFTPA1 and SFTPA2 transgenic mice reveal functional divergence of SP-A1 and SP-A2: formation of tubular myelin in vivo requires both gene products. *J Biol Chem.* 2010; 285:11998-2010.
266. Wang G, Myers C, Mikerov A, Floros J. Effect of cysteine 85 on biochemical properties and biological function of human surfactant protein A variants. *Biochemistry.* 2007; 46:8425-35.
267. Wang G, Phelps D, Umstead T, Floros J. Human SP-A protein variants derived from one or both genes stimulate TNF-alpha production in the THP-1 cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 278:946-54.
268. Wang G, Umstead TM, Phelps DS, Al-Mondhiry H, Floros J. The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein a variants to stimulate cytokine production. *Environ Health Perspect.* 2002; 110:79-84.

Variantes genéticas de la proteína D del surfactante pulmonar (SP-D): papel en la susceptibilidad y gravedad de la infección por virus respiratorio sincitial (VRS)

269. Wang G, Guo X, Floros J. Differences in the translation efficiency and mRNA stability mediated by 5' – UTR splice variants of human SP-A1 and SP- A2 genes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 289:497-508.
270. Weber B, Borkhardt A, Stoll-Becker S, Reiss I, Gortner L. Polymorphisms of surfactant protein A genes and the risk of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Turk J Pediatr*. 2000; 42:181-5.
271. Weaver BP, Zhang Y, Hiscox S, Guo GL, Apte U, Taylor KM et al. 259. Zip4 (Slc39a4) expression is activated in hepatocellular carcinomas and functions to repress apoptosis, enhance cell cycle and increase migration. *PLoS One*. 2010; 5:1-3
272. White RT, Damm D, Miller J, Spratt K, Schilling J, Hawgood S, et al. Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. *Nature*. 1985; 317:361-3.
273. Willson D, Zaritsky A, Bauman L, Dockery K, James R, Conrad D, et al, Instillation of calf lung surfactant extract (calfactant) is beneficial in pediatric acute hypoxemic respiratory failure. *JAMA*. 1999; 27:188-95.
274. Willson D, Thomas N, Markovitz B, Bauman L, DiCarlo J, Pon S, et al. Effect of exogenous surfactant (calfactant) in in pediatric acute lung injury. *JAMA*. 2005; 293:470-6.
275. Willwerth BM, Harper MB, Greenes DS. Identifying hospitalized infants who have bronchiolitis and are at high risk for apnea. *Ann Emerg Med*. 2006; 48:441-7.
276. Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:58-68.
277. Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weiss A, Fisher JH, et al. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest*. 2003; 111:1589-602.
278. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007; 448:427-34.
279. Xu D, Liu H, Komai-Koma M. Direct and indirect rol of Toll-like receptor in T cell mediated immunity. *Cell Mol Immunol*. 2004; 1:239-46.
280. Zhang L, Sanguetsche LS. The safety of nebulization with 3 to 5 ml of adrenaline (1:1000) in children: an evidence based review. *J Pediatr (Rio J)*. 2005; 81:193-7.

PÁGINAS WEBS CONSULTADAS

<http://epidemiologiamolecular.com/etiologia-bronquiolitis/>

<http://www.biodic.net>

<http://demy.asia/>

<http://genome.ucsc.edu>

<http://broad.mit.edu/haploview/haploview>

<http://www.hapmap.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

<http://www.rcsb.org/pdb/>

<http://www.lifetechnologies.com>

<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>

<http://www.update-software.com>

<http://www.sign.ac.uk/pdf/sign91.pdf>

<http://www.sign.ac.uk/pdf/sign91.pdf>

www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

www.ensembl.org

www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/aipei1.htm

www.svnp.es/Documen/GuiadeBronquiolitis.doc

www.paediatrics.org.nz

ANEXO

PROTOCOLO DE ESTUDIO
Polimorfismos Genéticos de BA por VRS

Núm. Registro URG _____ Protocolo núm. _____

Fecha: _____

Nombre y Apellidos: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____ Móvil: _____

Fecha de Nacimiento: _____ Sexo: Hombre Mujer

A.P.

Peso al Nacer:	Pecho: SI NO	Mixta: SI NO Artificial
----------------	--------------	----------------------------

A.F.

	Padre	Madre	Hermanos
Asma			
Atopia			
Rinitis Alérgica			
Alérgia Alimentaria			

Analítica:

Hemograma			
VSG			
PCR			
1er. Tubo			
2º Tubo			
VRS			
RX Tórax	Si no		Tª C

Entrada de Aire	0 = NO 1 = Final espiración 2 = Toda espiración 3 = Inspiración + espiración
Cianosis	0 = NO 1 = SI

Crisis Leve	1 - 3 puntos
Crisis Moderada	4 - 7 puntos
Crisis Grave	8 - 14 puntos

	Sat O2 / antes de Tto.	Sat O2 / después de Tto.
Crisis Leve		
Crisis Moderada		
Crisis Grave		

SFTPD

Colectinas

SP-D

VRS

SUSCEPTIBILIDAD

INFLAMACIÓN

Genotipos

ADN

POLIMORFISMOS

Haplotipos

GRAVEDAD

SURFACTANTE

PULMÓN



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS