

11262

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-6,  
IL-8 Y TNF $\alpha$  EN LAVADO BRONQUIAL DE  
RECIEN NACIDOS BAJO ASISTENCIA  
VENTILATORIA MECANICA**

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A :  
**DRA. LETICIA I. SOLLANO CARRANZA**

*TUTOR DE TESIS:*  
**DR. ERASMO MARTINEZ CORDERO**

*CO-TUTOR:*  
**DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA**

MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL SERVICIO DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATALES DEL C.M.N. 20 DE NOVIEMBRE ISSSTE, LABORATORIO DE INMUNOLOGIA EN LA TORRE DE INVESTIGACION DE CMN 20 DE NOVIEMBRE ISSSTE Y DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA.

## DEDICATORIAS

**A mis hijos: MANOLO, MAURI Y FERNANDA**

Por darme la bendición más grande que es: ser Madre y acompañarme desde in útero en todas mis travesías.

Por sus sonrisas, besos y abrazos en los momentos más difíciles.

Por: " *estudiamos y hacemos la tarea juntos mamá*"

**GRACIAS**

**A mi Mamá:**

Por ser la mejor Madre del mundo. Siempre a mi lado, con tu cariño y apoyo.

**A mi Papá:**

Por tu ejemplo, tu enseñanza y cariño. Que me han permitido ser la persona que ahora soy. Con mucho amor y admiración

**A mis hermanos Toto y Claus:**

Por ser mis compañeros toda mi vida. Por estar junto a mí siempre, por ser mis hermanos. **GRACIAS**

**A mis Abuelitos**

Por todos esos momentos que pasamos juntos, y continuar a mi lado.

**A Verónica, Salvador, Salvadorsito y Verito: por creer en mi**

**Al Dr. Sergio Ponce de León: por ser MI MAESTRO. Con profunda admiración y agradecimiento.**

## **Agradecimiento :**

A los **Dr. Luis Felipe Montaña y Dr. Felipe Masso**, quienes me apoyaron con los recursos tanto materiales como de asesoría para terminar este proyecto.

A **Fernando Gómez Gallegos, Miguel Ángel Pezzotti, Eduardo Carsi, Alfredo Morayta y José Ángel Salas** por su **AMISTAD** y su apoyo durante toda mi vida profesional, especialmente a lo largo de esta **Maestría**.

## **INDICE**

Abreviaturas	.....	7
Resumen en Inglés	.....	8
Resumen en español	.....	9
Antecedentes	.....	10
Justificación	.....	25
Objetivos	.....	26
Hipótesis	.....	27
Metodología	.....	28
Tipo de estudio		
Criterios de inclusión		
Criterios de exclusión		
Criterios de eliminación		
Diseño	.....	30
Resultados	.....	35
Discusión	.....	39
Conclusiones	.....	45
Anexos	.....	46
Bibliografía	.....	51

## **Índice de Anexos**

**Anexo 1** Formato de Recolección de Datos

**Anexo 2** Carta de Consentimiento Informado

**Anexo 3** Técnica de ELISA

**ABREVIATURAS**

<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>CPAP</b>	Presión Positiva Continua en las Vías Aéreas
<b>DBP</b>	Displasia Broncopulmonar
<b>EMH</b>	Enfermedad de Membrana Hialina
<b>FC</b>	Frecuencia de Ciclado
<b>FIO<sub>2</sub></b>	Fracción inspirada de Oxígeno
<b>HTVM</b>	Hora totales de ventilación mecánica
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>NK</b>	Citocidas naturales (natural killer)
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>PEEP</b>	Presión Positiva al Final de la Espiración
<b>PIP</b>	Presión Inspiratoria Pico
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>RNPT</b>	Recién Nacido Pretérmino
<b>SDR</b>	Síndrome de Distres Respiratorio
<b>TI</b>	Tiempo Inspiratorio
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>VMA</b>	Ventilación Mecánica Asistida



## Resumen en inglés

Exposure of the immature developing lung to barotrauma and hyperoxia leads to bronchopulmonary dysplasia (BPD) in many infants of extremely low birth weight. The mechanisms of the acute lung injury, that is followed by lung repair, are incompletely understood. Inflammation occurs as a result of the toxic effects of the oxygen on the lungs as well as the mechanical injury. There is growing evidence to suggest that an inflammatory pulmonary reaction following lung trauma, leading to lung fibrosis. Inflammation includes production of chemotactic factors in response to a stimulus, migration of inflammatory cells, increased expression of adhesion molecules on endothelial and epithelial cells, adhesion of neutrophils, secretion of proteases and toxic oxygen radicals, and increased microvascular permeability.

Lung lavage levels of TNF alpha, IL-6, IL-8, were measured by ELISA in newborn under mechanical ventilation. Bronchoalveolar lavage fluid was obtained from 18 infants between 25 and 37 weeks. Serial tracheal aspirates were collected on day 1, 3, 5, 7 while the infant remained intubated.

There were no significant differences in birthweight and gestational age

TNF alpha and IL6 were markedly elevated in tracheobronchial aspirate fluids from neonates that did not survive, whereas survivors showed an enhanced IL-8 concentration and low levels of IL-6. These data support the concept that RDS infants have severe vascular endothelium damage in the bronchopulmonary tree, which in severe cases, usually related with increased levels of PIP due to necessary mechanical ventilation.

## RESUMEN ESPAÑOL

La exposición del pulmón inmaduro en desarrollo a barotrauma e hiperoxia, conduce a displasia broncopulmonar (DBP) en los bebés de muy bajo peso al nacimiento.

Los mecanismos de daño pulmonar agudo, seguidos de una reparación pulmonar, son aun poco claros. La inflamación ocurre como un resultado de los efectos tóxicos del oxígeno hacia el pulmón así como del mecanismo de lesión. Existe una evidencia cada vez mayor que sugiere que una reacción inflamatoria del pulmón después de trauma pulmonar conduce a fibrosis pulmonar. La inflamación incluye la producción de factores quimiotácticos en respuesta a un estímulo, migración de células inflamatorias, expresión aumentada de moléculas de adhesión en el endotelio y células epiteliales, adhesión de neutrófilos, secreción de proteasas y radicales libres de oxígeno, y permeabilidad microvascular aumentada.

En neonatos bajo asistencia ventilatoria se midieron niveles de IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  en el lavado bronquial, por técnica de ELISA. El líquido alveolar fue obtenido de 18 recién nacidos entre 25 y 37 semanas de gestación. Se recolectaron aspirados seriados en los días 1,3,5,7 mientras el neonato permanecía intubado.

No hubo diferencia significativa en peso al nacimiento, edad gestacional.

El TNF- $\alpha$  e IL-6 estuvieron marcadamente elevadas en el aspirado bronquial de neonatos que no sobrevivieron, en tanto los neonatos que sobrevivieron mostraron una concentración elevada de IL-8 y bajos niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$ . Esta información soporta el concepto de que neonatos con SDR tienen daño endotelial severo vascular en el árbol bronquial, que en muchos casos, se relaciona con PIP y FiO<sub>2</sub> elevadas por tiempo prolongado, debido a la necesidad de ventilación mecánica.

## **ANTECEDENTES**

### **Citocinas**

Las Citocinas son proteínas secretadas por las células de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa que median muchas de las funciones de estas células.

En la inmunidad innata, las fuentes principales de citocinas son los macrófagos, los neutrófilos y las células NK, pero las células endoteliales y algunas células epiteliales como los queratinocitos también producen muchas de estas proteínas. Al igual que en la inmunidad adaptativa, las citocinas sirven para comunicar información entre las células inflamatorias y entre éstas y las células tisulares de respuesta, como las células del endotelio vascular.

Las citocinas se producen en respuesta a microorganismos y otros antígenos, y diferentes citocinas estimulan respuestas diferentes de las células implicadas en la inmunidad y la inflamación.

En la fase de activación de las respuestas inmunitarias, las citocinas estimulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos, en las fases efectoras de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa activan diferentes células efectoras para que eliminen microorganismos y otros antígenos.

Las Citocinas también estimulan el desarrollo de las células hematopoyéticas. (1,2)

Las propiedades generales de las citocinas son:

- a. La secreción es un acontecimiento breve y autolimitado
- b. Las acciones son pleiotrópicas y redundantes
- c. Influyen en la síntesis y las acciones de otras citocinas
- d. Sus acciones pueden ser locales y sistémicas
  - Acción autocrina
  - Acción paracrina
  - Acción endocrina
- e. Inician sus acciones uniéndose a receptores de membrana específicos (1,2)

## **Factor de necrosis Tumoral (TNF)**

El factor de necrosis tumoral (TNF) es el mediador principal de la respuesta inflamatoria aguda frente a las bacterias gramnegativas y a otros microorganismos infecciosos y es responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves.

La principal fuente celular del TNF son los fagocitos mononucleados activados, pero también puede ser secretado por células T estimuladas por antígenos, células NK (citocidas naturales) y mastocitos.

Existen dos receptores distintos para el TNF, cuyos tamaños moleculares son de 55 kD( receptor de TNF tipo I) y 75 kD (receptor de TNF tipo II). Ambos receptores de TNF están presentes en casi todos los tipos celulares examinados.

La principal función fisiológica del TNF es la estimulación del reclutamiento de neutrófilos y monocitos en los focos de inflamación y la activación de estas células para erradicar microorganismos.

En concentraciones bajas actúa sobre los leucocitos y el endotelio induciendo inflamación aguda. En concentraciones moderadas, media los efectos sistémicos de la inflamación. En concentraciones elevadas, causa las alteraciones patológicas del choque séptico(1,2).

El TNF actúa sobre los hepatocitos, aumentando la síntesis de ciertas proteínas séricas, como la proteína A amiloidea sérica y el fibrinogeno. La combinación de las proteínas plasmáticas derivadas de los hepatocitos inducidas por el TNF y por la IL-1 y la IL-6, constituyen la respuesta de fase aguda a estímulos inflamatorios .

## IL 6

La interleucina 6 (IL-6) es un 184 A.A. polipéptido con sitios potenciales O y N-glicosilación, y una homología significativa con G-CSF. Es producida por varias células, incluyendo células T y B, monocitos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células mensajales, astrocitos, células del estroma de la médula ósea y células tumorales diversas.

Regula el crecimiento y diferenciación de varios tipos celulares con actividades importantes en el sistema inmune, hematopoyesis e inflamación. La IL-6 induce la maduración final de los linfocitos B en anticuerpos produciendo células y es un factor de crecimiento potente para las células de mieloma/plasmocitoma.

IL-6 (co-)estimula el crecimiento de los linfocitos T la diferenciación de los linfocitos T citotóxicos. Promueve el desarrollo de megacariocitos y sinergia con otras citocinas para estimular progenitores hematopoyéticos multipotentes. También puede inducir diferenciación e inhibición del crecimiento de algunas leucemias o líneas celulares tumorales no hematopoyéticas.

Es también un gran inductor de las reacciones en fase aguda en respuesta a inflamación o daño tisular.(1,2).

Junto con IL-1 u TNF, induce la síntesis de proteínas de la fase aguda (APP) por los hepatocitos, cada citocina o combinación de citocinas muestra un patrón preferencial de producción de APP(39,40,48).

También interactúa con el sistema neuroendócrino, Ej. a través de inducir producción de ACTH. Por eso, IL-6 es una citocina con múltiples actividades endocrinas, paracrinas y posiblemente autocrinas en varios tejidos.

Aunque la mayor parte de los controles tienen niveles indetectables de IL-6 en el suero, grandes cantidades de IL-6 son detectables en situaciones inflamatorias severas, tales como septicemia. La elevación de IL-6 sérica precede a la de la fase aguda de las proteínas. Por ejemplo en un fenómeno postoperatorio, y esto quizá debido a un parámetro temprano de investigar condiciones inflamatorias.

La IL-6 sérica ha sido descrita en asociación con daño tisular quirúrgico o traumático, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes incluyendo artritis, rechazo de colgajo, cirrosis hepática alcohólica, malignidad.

El mayor efecto atribuido a IL-6 incluye la regulación de la respuesta inmune local, pero evidencias recientes demostraron que la instilación directa intratraqueal de IL - 6 induce daño pulmonar sugiriendo que IL-6 puede también ejercer efecto importante anti-inflamatorio en el pulmón. (32,33,35). Parece ser que los efectos inflamatorios de IL-6 son causados, en parte, por la inhibición de la síntesis de TNF y citotoxicidad inducida por TNF.

Es una citocina que actúa en la inmunidad innata y adaptativa. Es sintetizada por los fagocitos mononucleados, las células endoteliales vasculares, los fibroblastos y otras células en respuesta a microorganismos y a otras citocinas, principalmente la IL-1 y el TNF. También la sintetizan algunos linfocitos T activados.

La IL-6 tiene varias acciones diferentes. En la inmunidad innata, estimula la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, contribuyendo así a los efectos sistémicos de la inflamación, la respuesta de fase aguda.

En la inmunidad adaptativa, la IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han diferenciado en células productoras de anticuerpos (1,2)

## **IL 8**

Las quimiocinas están agrupadas en por lo menos 25 pequeñas citocinas, todas se unen a heparina, un ejemplo es la IL-8. Estas moléculas son liberadas en los sitios de inflamación y pueden unirse a grupos de heparina sulfato, presentes en la superficie del endotelio. Es producida por diferentes poblaciones de leucocitos, principalmente monocitos y fibroblastos. Sus células blanco son los neutrófilos, basófilos, linfocitos T, queratinocitos. Sus principales efectos quimotaxis, angiogénesis, liberación de superóxido.

## **Pulmón e inflamación**

La reacción local inicial de la inmunidad innata es la respuesta inflamatoria, en la que los leucocitos son reclutados al sitio de inflamación y se activan para erradicar la infección.

El proceso de migración leucocitaria a los sitios de infección depende de la estimulación de las citocinas .

La inflamación produce diversos cambios generales en el huésped que incrementan la capacidad del sistema inmunitario innato de erradicar la infección y en las infecciones graves, puede contribuir a la lesión tisular sistémica o a la muerte(1,3)

## **Recién nacido prematuro bajo ventilación mecánica**

El desarrollo y avance de las técnicas de asistencia ventilatoria en el neonato prematuro (menor de 37 semanas de gestación) ha resultado en un marcado incremento en la sobrevivencia de los pacientes con insuficiencia respiratoria primaria.(1). Para lograr una adecuada asistencia respiratoria en los neonatos, mediante ventilación mecánica asistida se debe considerar las características anatómicas y fisiológicas de este grupo etario (recién nacido menor de 28 días de vida extrauterina), y los factores de riesgo tales como prematuridad, barotrauma e infección, que hacen al epitelio bronquial particularmente vulnerable al daño (1, 2,3). La función fisiológica del factor surfactante se reduce a dos eventos claves: protección del epitelio contra los radicales de oxígeno que a su vez disminuye la velocidad de recambio de las células epiteliales favoreciendo una membrana alveolar más estable, y por ende evitando el colapso del alvéolo(3,4). En el RNPT la necesidad de forzar el intercambio de gases en ausencia de factor surfactante convierte al O<sub>2</sub> en un elemento agresivo, el cual induce lesiones en las células epiteliales y acelera el recambio de las mismas, impidiendo la estabilización de la membrana del alvéolo por células más maduras. (1,3,4 )

Las evidencias que sustentan un proceso mecánico incluyen: el hallazgo de alteración de la motilidad ciliar y diversos cambios en la función del epitelio inducidos por cambios importantes en la presión inspiratoria pico, fracción inspirada de O<sub>2</sub>, niveles de CO<sub>2</sub>, frecuencia de ciclado, temperatura y grado de humidificación. ( 1,3,4,5 )

Este proceso de lesión inducida por VMA que incluye no solamente al O<sub>2</sub>, sino también la PIP, FC, PEEP genera "in situ" un proceso inflamatorio que en vez de favorecer la rápida maduración de los neumocitos retrasa el proceso ya que los innumerables elementos presentes en una respuesta inflamatoria tales como citocinas y otras poblaciones celulares pueden retrasar el proceso de maduración de los neumocitos. No solamente hay alteraciones en el recambio epitelial sino también en la distensibilidad del músculo liso localizado por debajo de la membrana basal (2). Estas alteraciones generan manifestaciones clínicas que van desde alteraciones reversibles con hiperreactividad de vía aéreas, hasta el desarrollo de daño pulmonar agudo, edema e hipertensión pulmonar o bien displasia broncopulmonar, que actualmente es la complicación más importante por su repercusión clínica, de sobrevivencia y económica (1,2). De hecho, el concepto clínico de que muchas condiciones pulmonares del neonato son debidas a la "historia natural" de su patología de base, ha cambiado radicalmente hasta aceptar que en muchas ocasiones el daño broncoalveolar por baropresión puede constituir el componente más importante dentro de su patología respiratoria.

La inmadurez de los neumocitos tipo II que constituyen el alvéolo impide que se considere un evento central en el inicio del llamado síndrome de distres respiratorio(SDR) o enfermedad de membrana hialina (EMH). Este síndrome es la principal causa de mortalidad en este grupo de recién nacidos prematuros y es a su vez el que genera la necesidad de la VMA. El objetivo de la VMA es favorecer el intercambio gaseoso mientras los neumocitos tipo II maduran y empieza a producir y secretar el factor surfactante. (3,4)

El tratamiento con surfactante exógeno y la aplicación con nuevas técnicas ventilatorias ha disminuido la morbimortalidad de estos neonatos. (6,7,8,9,10,11)



A pesar de los recientes avances en la prevención antenatal y el manejo del SDR, la DBP continua siendo una fuente significativa de morbilidad entre los neonatos de muy bajo peso al nacer (6,7,8,9,10,11,12).

Este aumento en la sobrevida ha generado un incremento en el numero de pacientes que desarrollan la complicación más severa de la VMA: la DBP

## **DISPLASIA BRONCOPULMONAR O ENFERMEDAD PULMONAR CRONICA**

A pesar del avance en la prevención del síndrome de distres respiratorio o enfermedad de membrana hialina, la DBP permanece siendo una complicación mayor en neonatos prematuros que requieren soporte ventilatorio prolongado (1).

La displasia broncopulmonar, descrita originalmente por Nothway en 1967 (3) permanece siendo una complicación mayor en neonatos prematuros recibiendo altas concentraciones de oxígeno inspirado, y ventilados mecánicamente con presiones positivas elevadas. (1)

La mejoría en el cuidado respiratorio y manejo del recién nacido minúsculo, ha permitido tener una mayor sobrevivencia, incluso antes del uso del surfactante exógeno. Esto ha conducido a aumentar la sobrevida de neonatos muy inmaduros, que estaban en riesgo de desarrollar DBP(1,2,7, 8,9)

La incidencia de DBP está inversamente relacionada a la edad gestacional, y por tal motivo, la inmadurez estructural y funcional de los pulmones, quizá juega un papel importante en la patogénesis .

Entre los neonatos con peso menor de 1500 gr., 15 a 47% se diagnostican con DBP(1,2), la frecuencia de DBP en este grupo se ha incrementado en las dos ultimas décadas de 10 a 32% mientras que en los menores de 1000 gr. solo ha aumentado de 32 a 39%, esta relativa menor diferencia se debe a que este grupo tiene una mayor mortalidad. Los niños con SDR están en mayor riesgo de desarrollar DBP por requerir oxígeno terapia por periodos más prolongados. Los niños con DBP tienen mayor susceptibilidad a desarrollar neumonía recurrente, hipertrofia cardiaca global e hipertensión pulmonar.

Se ha reportado que la mortalidad global de neonatos con DBP es de 11 a 71% (1,2,4) el gran rango de esta cifra se encuentra condicionado a la severidad de la DBP, dada por la mayor dependencia a O<sub>2</sub>, lesión del epitelio reportado en la citología de aspirado bronquial, y mayor dificultad respiratoria.

La mortalidad tardía de neonatos con DBP esta entre 5% y 50%, con gran afectación en la función respiratoria y en el crecimiento y desarrollo.

La DBP por lo general ocurre después de exposiciones prolongadas a Oxígeno como tratamiento del SDR en el neonato prematuro, pero puede presentarse también después del uso de ventiladores y con alta concentración de O<sub>2</sub> debido a otros problemas con HTP. ( 2)

La dependencia prolongada de oxígeno y del respirador ocurre en alrededor de 20% de los niños de menos de 1000g que sobreviven los primeros días de vida.

La terapia con surfactante exógeno ha mejorado dramáticamente la sobrevivencia de los recién nacidos de muy bajo peso con SDR, pero no ha afectado la incidencia de la DBP esto sugiere que además de la deficiencia de surfactante y la inmadurez del epitelio hay factores adicionales que contribuyen al daño pulmonar neonatal. (6,7,8)

Entre estos factores se deben considerar a la respuesta inflamatoria pulmonar exagerada, que resulta en un mayor daño pulmonar, mayores requerimientos de soporte prolongado respiratorio, y estancia hospitalaria más prolongada conllevando a sí mismo a una incremento en el riesgo de infecciones intrahospitalarias, convirtiéndose esto en un círculo vicioso.

La DBP es una de las secuelas más importantes de la prematuréz. Entre los neonatos con peso menor de 1500 g, 15-47% se diagnostican con DBP. (2,4) La frecuencia de DBP ha incrementado las dos últimas décadas de 10% a 32 y en los menores de 100 gr. de 32 a 39%. (2,30) Los niños afectados están en riesgo por requerimientos por largos periodos de terapia con oxígeno y por síntomas pulmonares persistentes.

Este trastorno se presenta en las unidades de cuidados intensivos neonatales entre neonatos que han requerido un tratamiento enérgico para mantener la vida. Por lo general ocurre después de haber presentado una enfermedad de membrana hialina, pero también puede ocurrir después del uso de ventiladores y mezclas con alta

concentración de oxígeno debido a otros problemas tales como hipertensión pulmonar persistente(30).

Estos neonatos pueden tener una respuesta inflamatoria pulmonar exagerada que resulta en un mayor daño pulmonar, y requerimientos de soporte prolongado respiratorio, mayor estancia hospitalaria y DBP (2,5).

Actualmente, con el uso de esteroides prenatales y surfactante exógeno, se ha presentado una forma de DBP moderada, llamada por algunos autores ECL, que resulta más prevalente. (2,8,9,10)

La DBP es la forma más común de daño pulmonar aun no resuelto. Los mecanismos que conducen a alteración morfológica y funcional de los pulmones en pacientes con DBP no se han establecido(25).

En la primera o segunda semana de vida, la presencia de un conducto arterioso persistente puede producir sintomatología semejante, y a menudo se asocia con DBP. El conducto arterioso se considera un factor de riesgo para desarrollar DBP.

Se habla de displasia broncopulmonar en neonatos con dificultad respiratoria que además tengan:

1. Antecedentes de ventilación mecánica y oxigenoterapia por más de 48 horas
2. Requerimientos persistentes de oxígeno por un período mayor 28 días
3. Requerimiento de oxígeno después de las 36 semanas de gestación
4. Cambios radiológicos crónicos con imágenes radiolúcidas y áreas de mayor densidad. (3)

Este trastorno puede representar el resultado de la lesión pulmonar debida a enfermedad de la membrana hialina, toxicidad por oxígeno o estrés por ventilación mecánica.



**Factores implicados en la patogénesis de la Displasia Broncopulmonar.** (Bancalari E. Strocker T. Bronchopulmonary dysplasia. Hemisphere Publishing Corporation. Washington, DC EUA 1988.

En adición a la lesión debida a hiperoxia y barotrauma sobre pulmones inmaduros, el exceso de aporte de líquidos y el conducto arterioso persistente puede contribuir a los cambios observados en DBP. (7,8,9).

Gran número de observaciones sugieren que los neutrófilos pueden contribuir al desarrollo de daño pulmonar edematoso en neonatos con DBP.

Neonatos con SDR que desarrollan DBP han mostrado tener incremento en el número de células Polimorfonucleares (PMN) en el lavado bronquial comparado con neonatos con SDR solo o controles. Además, los neonatos que desarrollan DBP tienen persistentemente cuenta elevada de neutrófilos. La acumulación de neutrófilos es con frecuencia encontrada en las células endoteliales dañadas en los pulmones de neonatos o animales con daño pulmonar edematoso. Se ha mencionado también la posibilidad que los macrófagos alveolares, debido a su localización (cerca del endotelio capilar de la unidad alveolar) y su capacidad de liberar factores que recluten, adhieran y activen neutrófilos, puedan también estar relacionados en el desarrollo de daño pulmonar edematoso agudo.(2,13,14,15)

El flujo de neutrófilos dentro del pulmón es un hallazgo histológico de toxicidad pulmonar por oxígeno. La activación de neutrófilos ha sido propuesta como una causa importante que induce daño pulmonar por toxicidad por oxígeno debido a que los neutrófilos pueden generar radicales libres de oxígeno, liberar hidrolasas secretoras y generar productos araquidonicos. Como resultado, el reclutamiento y activación de neutrófilos durante la exposición a hiperoxia puede causar daño extenso al tejido pulmonar(16).

La depresión de neutrófilos protege o disminuye el edema del daño pulmonar agudo en conejos expuestos a hiperoxia, apoyando la hipótesis de que las células inflamatorias son importantes contribuyentes al edema de daño pulmonar agudo.

Hay evidencia en contra del papel de los neutrófilos en el daño mediado por oxidantes, implicando que los radicales de oxígeno tienen efectos dañinos directos en el tejido pulmonar. Por eso es ciertamente concebible que los neutrófilos juegan un papel en el aumento en la permeabilidad de líquido pulmonar que es un componente integral de la DBP. (8,9,13,14,25,31)

El papel potencial de la inflamación en este proceso es sugerido por estudios citológicos e histológicos, confirmando la presencia de células inflamatorias en

neonatos con DBP y también en los estudios animales de experimentación sugiriendo un papel para la inflamación o células inflamatorias en el desarrollo de daño pulmonar agudo o edema, hiperreactividad bronquial, e hipertensión pulmonar, todos hallazgos característicos de neonatos con DBP (2,15,17,25,31,34,36)

Sin embargo puede ser discutido que la sola presencia de células inflamatorias en el pulmón puede ser de pequeñas consecuencias. Es realmente la secreción o liberación de productos de estas células que alteran la función pulmonar y/o dañan las células en las estructuras del tejido conectivo, por tal motivo conduciendo a la respuesta biológica observada. (18)

La liberación de varios mediadores inflamatorios a partir de células inflamatorias activadas ha sido reportada: mediadores lípidos, enzimas proteolíticas y proteínas cationicas, radicales libres de oxígeno, y citocinas. Todos estos mediadores pueden estar relacionados en el desarrollo de DBP. (17,18,34)

Recientemente, la infección ha sido reconocida como un factor etiológico a potencia para DBP. Las infecciones nosocomiales durante el periodo neonatal y la colonización del tracto respiratorio neonatal con *Ureaplasma urealyticum* ha sido implicadas en la patogénesis de la DBP a través de la participación de citocinas inflamatorias(30).

Muchos neonatos con DBP también desarrollan hipertensión pulmonar. Cuadros crónicos o repetidos de inflamación pulmonar pueden estar asociados con el desarrollo de HTP, por ejemplo, pacientes con fibrosis quística, enfisema, y SDR del adulto han reportado desarrollar HTP. Una asociación entre inflamación pulmonar e HTP también se observa en los casos de irradiación pulmonar, y después de ingestión de aceite tóxico.

El papel de infecciones repetidas y la reacción inflamatoria crónica en el desarrollo de DBP no se ha establecido aun. El hecho que la DBP ocurra casi exclusivamente en neonatos que tienen intubación endotraqueal prolongada y que es muy comúnmente asociado con colonización bacteriana del aparato respiratorio inferior, soporta la importancia de las infecciones como un posible factor contribuyente en el

desarrollo de DBP. Clínicamente, los neonatos que desarrollan DBP están caracterizados por episodios frecuentes de infecciones pulmonares que producen deterioro agudo del status pulmonar y comúnmente son la causa final de muerte en muchos de ellos.(30)

El análisis de lavados bronquiales en neonatos con DBP ha mostrado evidencias claras de inflamación con un número aumentado de leucocitos polimorfonucleares que persisten por varias semanas. Estos hallazgos están asociados con aumento de la relación elastasa/1 proteinasa inhibidor sugiriendo que estos neonatos están en riesgo aumentado de daño pulmonar proteolítico. La posibilidad que algunos mediadores de la inflamación puedan ser responsables parcialmente de algunos de las manifestaciones funcionales de la DBP, tales como aumento de las resistencias vasculares pulmonares y broncoconstricción(2,8,9)

Hallazgos patológicos de DBP son consistentes con un proceso de inflamación pulmonar prolongada (9,10, 36,40,41)

Estudios con lavados bronquiales han demostrado excesiva producción los primeros días de vida de las proteasas de leucocitos y citocinas de macrófagos, tales como TNF  $\alpha$  e, IL-1 (11.) En este sentido, aunque se puede argumentar que la presencia de células inflamatorias en el pulmón tiene mucha importancia en la lesión epitelial, la liberación de los productos de estas células puede alterar la morfología y función respiratorias, alterando tanto las células pulmonares, como los componentes del tejido conectivo que conforman su matriz estructural(34, 36).

Se ha observado un flujo rápido de neutrófilos hacia el pulmón durante las primeras 24 a 96 H después de aplicar O<sub>2</sub>, hay un aumento que traduce una lesión en el endotelio vascular seguida por un aumento en los macrófagos alveolares con subsiguiente resolución de la inflamación de la vía aérea.

En recién nacidos que desarrollan DBP, el flujo interno de neutrófilos es prolongado y la entrada de macrófagos al alvéolo es retrasada y lenta. Las diferencias tempranas en el reclutamiento células inflamatorias y activación puede contribuir a la patogénesis de la DBP en recién nacidos susceptibles.(51,52,55)

Los mediadores derivados de componentes lipídicos, enzimas proteolíticas y proteínas catiónicas, así como los radicales libres de oxígeno y una variedad de citocinas han sido descritas como posibles mediadores de daño tisular.

Recientes estudios han demostrado que elevadas concentraciones de citocinas proinflamatorias en el líquido de aspirado bronquial obtenido de neonatos prematuros predicen el desarrollo subsecuentes de DBP(36).

Aunque varias anormalidades bioquímicas se han descrito en DBP, incluyendo un imbalance de elastasa/ inhibidor alfa 1-proteinasa (51), niveles elevados de factor activador de plaquetas (53) y fibrinólisis intra-alveolar disminuida (16), los mediadores que regulan el daño pulmonar neonatal en pacientes con DBP no han sido completamente elucidadas.

Existen actualmente evidencias experimentales que la cascada inflamatoria iniciada por daño agudo en el pulmón adulto es mediada por la liberación de citocinas.

Estos polímeros son importantes en la coordinación de la respuesta inmune del huésped a la inflamación y daño tisular.

Estudios previos reportan incremento de las concentraciones de las citocinas TNF y de IL-6 en líquido amniótico de mujeres con embarazos prematuros complicados con infección intraamniótica (38,40,46.). Y en plasma de recién nacidos con sepsis (46).

El daño bronquial puede obedecer a un gran número de causas, pero los mecanismos fisiopatogénicos y su gran interrelación no han sido explorados suficientemente.

Cuando se ha evaluado el daño epitelial mecánico y la estimulación farmacológica, una resultante común ha sido el incremento de la expresión génica de IL-8 en las células bronquiales, lo que puede favorecer tanto la activación del neutrófilo como la producción de mediadores inflamatorios y los cambios patológicos en las vías aéreas (24,31, 43).

En modelos de infección por H. influenza empleado su endotoxina, se ha observado un incremento sustancial en la síntesis de IL-6, IL-8 e ICAM-1 soluble en las células epiteliales bronquiales (39,44,45).

Otros autores han indicado que la expresión y función del receptor para IL-6 en el epitelio respiratorio es modulado por el nivel de IL-1  $\alpha$  y autocrinamente por la IL-6 misma, que se pueden producir en exceso en diversas condiciones de lesión tisular (40,41,44).



Recientemente se ha encontrado también, que la producción de factores proinflamatorios por el epitelio bronquial, incluyendo a la IL-1 beta, GM-CSF y RANTES puede contribuir en la amplificación de los mecanismos de lesión tisular al incrementar la quimiotaxis y la capacidad de adherencia de eosinófilos y neutrófilos a nivel bronquial (52,,53,54)

En cuanto al proceso de reepitelización bronquial en el que participa, la unión y migración de las células epiteliales, se ha reportado un mecanismo de regulación a través de citocinas, como lo muestra el incremento de la migración celular y la inhibición de su unión a fibronectina mediante la adición de TNF  $\alpha$  y metabolitos del ácido araquidónico, que son productos importantes durante el proceso inflamatorio (54).

Desde otra perspectiva, una vez iniciado el daño bronquial, pueden participar e interactuar un gran número de mediadores químicos como efectores comunes en diversas formas de lesión tisular.

Por lo anterior, nuestro interés es estudiar los mecanismos de lesión epitelial bronquial consecutiva a la ventilación asistida, evaluando tanto marcadores inflamatorios, de adhesión celular y mediadores solubles que pueden generar daño tisular y por lo tanto de DBP.

Los estudios que han abordado los mecanismos que conducen a las alteraciones morfológicas y funcionales en el pulmón del neonato con VMA, han sugerido la participación combinada de factores mecánicos relacionados con la baropresión; la presencia de procesos inflamatorios y la liberación de mediadores solubles que favorecen o perpetúan la lesión epitelial (3).

## **JUSTIFICACION**

La ventilación mecánica asistida en el pulmón inmaduro del recién nacido prematuro produce daño en el endotelio del alveolo, con elevación de los mediadores inflamatorios (IL-6, IL-8, TNF) como respuesta, conllevando al desarrollo de DBP

## **OBJETIVOS**

1. Determinar los valores de las citocinas con capacidad pro inflamatoria: IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  en neonatos bajo ventilación mecánica.
2. Establecer si los niveles de estas citocinas en el lavado bronquial de neonatos con asistencia ventilatoria se relacionan con las horas totales de ventilación.
3. Correlacionar los valores de estas citocinas en el lavado bronquial de neonatos bajo asistencia ventilatoria con el genero, edad gestacional y peso.

## **HIPOTESIS**

**Ho** La ventilación mecánica en el recién nacido, no produce daño a nivel del epitelio bronquial y por lo tanto no se observa incremento de los marcadores de lesión tisular. No hay asociación entre el incremento de los niveles de IL-6, IL8 y TNF $\alpha$  y la producción de daño del epitelio bronquial.

**Ha** La ventilación mecánica en el recién nacido daña inicialmente el epitelio bronquial y por lo tanto favorece la liberación de mediadores de lesión tisular, por lo que es factible que exista alguna citocina, como la IL-6, IL-8 y TNF  $\alpha$ , que sirva como marcador del daño del epitelio bronquial mediado por la respuesta inflamatoria.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Se trata de un estudio :**

Comparativo

De impacto (causa → efecto)

Observacional

Longitudinal

Prolectivo

Estudio de varias cohortes

## **DEFINICION DE LA POBLACIÓN OBJETIVO**

### **CRITERIOS DE INCLUSION**

Pacientes recién nacidos prematuros (menor de 38 sem de gestación) (4,5,6) quienes requirieron de ventilación mecánica asistida.

Las indicaciones de ventilación mecánica son :

- a. Apnea
- b. Insuficiencia ventilatoria (aumento en PaCO<sub>2</sub>)
- c. Hipoxia que no responde a CPAP (PaO<sub>2</sub> < 50 torr con FiO<sub>2</sub> >0.5
- d. Recién nacidos ≤ 1 000 g (indicación relativa)
- e. Anormalidades obstructivas de la vía aérea
- f. Deterioro clínico

(4,5,6)

### **CRITERIOS DE EXCLUSION**

Pacientes recién nacidos prematuros trasladados a la SCIN de otros hospitales en donde habían sido sometidos a asistencia ventilatoria.

## CRITERIOS DE ELIMINACION

Se eliminaron del estudio a aquellos pacientes que una vez que fueron seleccionados, las muestras de aspirado bronquial no se tomaron o fueron inadecuadas.

## ASPECTOS ETICOS

El lavado y aspirado bronquial de donde se tomaron las muestras para la determinación de citocinas, es un procedimiento de rutina en el recién nacido bajo ventilación mecánica asistida, para limpiar la vía aérea y sacar las secreciones que se acumulan tanto en la vía aérea como en el tubo endotraqueal, y se lleva a cabo por razón necesaria, dependiendo de cada paciente entre 5 a 12 veces en 24 hrs. Los padres están informados de dicho procedimiento y el motivo por el cual se realiza.

### Tamaño de muestra (IL 6):

$1003/1409 = 24$

$(64+64) + 7.84$

$(64)2\text{murieron}(\text{IL } 6) 210 =/- 8$

vivieron (IL 6)  $146 =/- 8$

## **DISEÑO**

Se estudiaron 18 pacientes recién nacidos prematuros que ingresaron al SCIN del CMN 20 de Noviembre, ISSSTE que requirieron de ventilación mecánica asistida.

Todos los pacientes fueron intubados por vía oral, con tubos endotraqueales cuyo diámetro interno varió de 2.5 a 3.5 mm, dependiendo de las características anatómicas y el peso de cada bebé, localizando la punta del tubo a un centímetro por arriba de la carina, con comprobación radiológica inmediata. Todos fueron ventilados con respiradores limitados por presión y los parámetros respiratorios (PIP, PEEP, FiO<sub>2</sub>, FC, TI) ajustados según la gravedad del SDR, la evolución del cuadro clínico, los resultados de las gasometrías arteriales o arterIALIZADAS y la valoración de las radiografías de tórax de control.

Las muestras de lavado bronquial para la determinación de IL-6, IL-8 y TNF  $\alpha$  se estudiaron durante la primera hora de intubación, y consecutivamente a las 12, 72 horas y 6, 12 y 21 días después de la intubación.

## FLUJOGRAMA



**\* EL MISMO PROCEDIMIENTO SE REALIZO PARA CADA UNA DE LAS MUESTRAS A LAS 12, 72 HR Y 6, 12, 21 DÍAS DESPUES DE LA INICIACION DE LA VENTILACION MECANICA**



El procedimiento para toma de la muestra de lavado bronquial fue:

- 1) Se desconecta unos segundos al bebe del ventilador.
- 2) Se instila 1 ml de solución salina isotónica a través del tubo endotraqueal.
- 3) Se realiza ventilación manual con bolsa: 3 o 4 insuflaciones.
- 4) Se aspira el tubo endotraqueal utilizando una presión subatmosférica de 40 a 50 mmHg y cateteres desechables 6F y 8F. Se inicia el proceso con la cabeza del bebé primero a la derecha, después a la izquierda y por último al centro, previa ventilación durante 20 segundos entre cada aspiración. Cuidar que el tubo endotraqueal se introduzca de 1 a 3 cm por debajo de la punta del tubo.
- 5) Se reconecta el tubo endotraqueal al respirador.
- 6) El líquido así obtenido, es colectado en trampas estériles de Lee, obteniendo entre 1 a 3 ml aproximadamente.

### **Determinación de Citocinas**

La muestra se centrifuga para separar el paquete celular del sobrenadante, a fin de congelar inmediatamente el sobrenadante a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Una vez que se obtuvo el total de muestras, se transportaron al Departamento de Biología Celular del Instituto Nacional de Cardiología, en donde se realizó la determinación de IL-6 IL-8 y TNF alpha, mediante la técnica de ELISA utilizando los siguientes Kit comerciales:

**IL-6** BioSource Europe SA: ensayo inmunoenzimométrico para la medición cuantitativa de la interleucina 6 (IL-6) humana en suero, plasma, células de medio de cultivo u otros fluidos biológicos. No de catálogo: 40.126.00/KAC1261.

(Anexo 3)

**Human IL-8 Immunoassay**

Quantikine, R&D Systems

Catalog Number D8050

For the quantitative determination of human interleukin 8 concentrations in cell culture supernate serum, and plasma.

(Anexo 3)

**TNF-alfa humana**

Quantikine, R&

D Systems

Catalog Number DTA50

For the quantitative determination of human tumor necrosis factor alpha concentrations in cell culture supernate serum, and plasma. (Anexo 3.)

**ELISA**

Todas las muestras que estaban congeladas a - 70 oC, se llevaron a temperatura ambiente justo antes de iniciar su proceso. Todos los ensayos se hicieron por duplicado siguiendo las instrucciones del productor para cada uno de los kits. Un breve flujograma muestra el sistema que se utilizó

Preparación de las muestras para IL-8, IL-6 y TFN  $\alpha$



Agregar 100  $\mu$ L Diluyente RD1-8 a cada pozo



Agregar 50  $\mu$ l de sobrenadante a cada pozo. Gentilmente golpear la charola para asegurar la homogeneidad de la solución



Agregar 100  $\mu\text{l}$  de IL-8 en cada pozo con suficiente fuerza para mezclar.



Incubar por 3 horas a temperatura ambiente



Aspirar y lavar 6 veces: se lava llenando cada pozo con Wash Buffer(400 $\mu\text{l}$ ) usando el autowasher. Después de la última lavada, retirar cualquier sobrante de Wash Buffer a través de aspirar o decantar. Invierta la charola y sacuda sobre una toalla de papel limpia.



Agregue 200  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato a cada pozo  
Incube por 30 minutos a temperatura ambiente.



Agregar 50  $\mu\text{l}$  de Stop Solution a cada pozo. Golpear suavemente para asegurar una mezcla adecuada.



Determinar la densidad óptica de cada pozo en 30 minutos. Usando un lector de a 450 nm. La corrección de longitud de onda a 540 nm

## RESULTADOS

### PACIENTES

Se estudiaron 18 recién nacidos, obtenidos todas por cesárea, 9 masculinos y 9 femeninos. Las características clínicas, evaluación de apgar, horas de ventilación total y patología de base se muestra en la tabla 1. Todos los niños estaban bajo ventilación mecánica asistida con parámetros de ventilación de acuerdo a patología de base. El tratamiento de cada uno de estos niños fue dirigido de acuerdo a su patología de base por lo que no pudimos hacer una evaluación de los efectos de los diferentes esquemas sobre el resultado final. Como mencionamos anteriormente, el común denominador en estos niños fue la ventilación mecánica asistida, el hecho de que todos eran niños prematuros, y la presencia de síndrome de distres respiratorio. Como se puede observar, solamente 5 de los niños fallecieron. Los análisis de correlación entre las variables clínicas descritas y el resultado del paciente, en términos de vivir o morir, no mostraron ninguna relación causa efecto.

### DETERMINACION DE CITOCINAS

Sin embargo debido a lo anterior, y dada la problemática respiratoria de estos niños que tiene como fondo fisiopatológico en todos ellos a la inflamación, disparada por diferentes causas que están fuera del alcance de este proyecto, decidimos evaluar las concentraciones relativas de citocinas relacionadas con procesos inflamatorios severos. Así, determinamos la concentración en lavado bronquial de IL-6, IL-8 y TNF-alfa. Los resultados mostraron una elevación en los niveles de estas citocinas, sin embargo fue muy interesante observar que el valor promedio de IL-6 fue mucho mayor en los niños que fallecieron; así mismo fue notable ver que el valor promedio de IL-8 fue significativamente mayor en los niños que sobrevivieron. Las concentraciones promedio de TNF-alfa mostraron una concentración **744.04** en los niños que sobrevivieron versus **de -0.005106** en los niños que fallecieron (tabla 2).

Pudimos observar, dado que las determinaciones fueron efectuadas en diferentes días, que los valores individualizados por niño de IL-6 y TNF-alfa iban en aumento a pesar de que estos niños recibían, además de la ventilación asistida, dexametasona

que es un agente anti-inflamatorio. Los niños que mostraron este patrón de respuesta fallecieron, sin embargo también fue notable observar que la concentración de IL-8 en estos niños no se modificó en el transcurso de su enfermedad. En el caso de los niños que sobrevivieron no se observó un aumento en la concentración de IL-6 pero sí se observó un importante incremento paulatino en la concentración de IL-8.

<b>Edad Gestacional (sem)</b>	<b>No de pacientes</b>
25-26	3
27-28	2
29-30	3
31-32	6
33-34	0
35-36	3
37	1

#### **Distribucion por edad gestcional**

<b>Patología de base</b>	<b>No de Pacientes</b>
Síndrome de distres respiratorio	13
Persistencia de conducto arterioso	9
Displasia Broncopulmonar	6
Asfixia	4
Sepsis	4
Hemorragia Intraventricular	2
Atresia esofágica	2
Cardiopatías Congénitas	2
Enterocolitis Necrozante	1
Taquipnea Transitoria	1

#### **Distribucion por patologia de base**

	Vivos	Muertos	P*
TFN $\alpha$ (pg/mL)	744.04	-0.005106	0.117763
IL-6 (pg/mL)	146.0 $\pm$ 63.0	210.0 $\pm$ 54.0	< 0.05
IL-8 (pg/mL)	460.0 $\pm$ 84.0	176.0 $\pm$ 13.0	< 0.022

**Nivele de Citocinas**

Pacient e	Peso	Edad	Edad gestacio	Genero	Prem. Extrema	SDR	PCA	DBP	ECN	Astixia	Sepsis	TTRN	HIV	Card.Co	Apagar 1	Apgar5	HTVMA	TNF alpha	IL-6	IL-8	Vivo / Falleco
1	750	25	M	x		x	x								4	7	61	-16.6096	220.25	39.2086	F
2	1720	32	M						x						7	8	24	--	84.2534	26.9729	F
3	940	29	F	x		x	x	x		x					2	5	72	--	116.6981	694.414	V
4	920	27	M	x		x	x	x		x			x		2	5	24	--	312.987	501.716	F
5	1024	28	F	x		x	x	x			x				6	8	70	--	646.209	58.2831	F
6	785	26	F	x		x	x	x		x					7	8	46	107.285	85.990	238.0691	F
7	870	29	F	x		x	x	x							7	8	1008	317.3795	83.7413	67.163	V
8	786	27	F	x		x	x	x							6	8	840	-729.7623	209.3779	418.6971	V
9	1900	35	F												8	8	312	-2154.4	531.328	41.7161	V
10	2580	36	M											x	7	9	72	--	32.3256	147.703	V
11	1342	32	M			x									1	6	648	2235.74	179.5865	310.19	V
12	1200	31	F	x		x	x			x		x			6	7	72	0.0765	51.8751	-278.5916	V
13	2600	32	M												2	7	768	-914.792	839.6066	-418.7507	V
14	700	29	M	x		x	x	x			x		x		5	7	696	--	612.22997	71.7226	V
15	920	32	M			x				x					5	7	35	--	434.30855	81.74615	V
16	1150	31	M	x		x	x	x			x				7	8	720	1760.25	401.8030	860.6649	V
17	2030	35	F			x			x						7	8	60	--	233.679	45.439	V
18	3000	37	F											x	6	8	48	--	172.119	24.3502	V
Total	---	---	F-9	10	13	9	8	2	4	4	4	1	2	2	---	---	5576				V-13
			M-9												---	---					F- 5
Prom.	1389.7	30.7													5.2	7.3	309.77				
DS	732.3	3.5													2.1	1.0	357.3				
ES	172.6	0.82													0.51	0.2	84.2				

## **DISCUSION**

La ventilación mecánica produce daño al pulmón del recién nacido prematuro a pesar de que se han manejado diferentes estrategias ventilatorias para tratar de evitar el daño pulmonar y así poder mejorar el pronóstico de estos neonatos.

A pesar de la búsqueda de diferentes técnicas de ventilación mecánica, se continúa observando que el epitelio alveolar se daña por la ventilación mecánica resultando en migración de leucocitos hacia los alvéolos, que aumentan la permeabilidad y favorecen el edema a nivel intersticial y alveolar. Se produce disrupción de los elementos estructurales con la liberación de múltiples productos que promueven la cascada inflamatoria. A nivel alveolar se liberan TFN alpha, IL-1 $\beta$ , IL-6, las cuales aumentan dentro de las primeras horas de ventilación asistida, las citocinas y quimocinas generadas por el epitelio alveolar, amplifican la respuesta al daño mecánico a través de atraer leucocitos periféricos al interior del pulmón.

La ventilación de recién nacidos prematuros con SDR resulta en un aumento en el número de macrófagos y un flujo de granulocitos hacia el espacio aéreo. Los neonatos que progresan a DBP tienen persistencia de leucocitos en los lavados bronquiales. Estas muestras traqueobronquiales contienen niveles elevados de las mismas citocinas / quimocinas, identificadas en el líquido amniótico de neonatos con riesgo de DBP.

Las muestras de las vías aéreas también tienen incrementos de otros factores que promueven la migración de leucocitos a los pulmones y otros indicadores de daño pulmonar (laminina, fibronectina, complemento, elastasa). Citocinas antiinflamatorias tales como IL-10 están bajas cuando las citocinas proinflamatorias están altas. La relativa importancia de los diferentes componentes de las mezclas de moléculas efectoras aun es desconocido.

El flujo de mediadores inflamatorios y células en el árbol traqueobronquial de neonatos prematuros con SDR parece ser importante en el desarrollo de la DBP. El mecanismo que inicia esta respuesta inflamatoria aun no esta bien identificado.

La inmadurez, barotrauma y toxicidad por oxígeno se han considerado como factores importantes en la etiología de DBP.



Sin embargo es poco claro porqué se desarrolla DBP severa en algunos neonatos prematuros con SDR leve, mientras que DBP no se desarrolla en otros prematuros con inmadurez comparable con SDR severo.

El papel de la infección en la etiología de DBP durante el periodo neonatal fue propuesto por el Dr. Rojas et al (30) en base de la observación de que los neonatos que adquirieron infecciones nosocomiales desarrollaron DBP más frecuentemente que aquellos que no tuvieron. También se ha propuesto que la exposición a procesos inflamatorios prenatales puede conducir a daño pulmonar y predisponer a el desarrollo subsecuente de DBP. La hipótesis de que la infección pueda jugar un papel en la patogénesis de DBP es consistente con la evidencia patológica que la inflamación pulmonar está presente en estas condiciones.

Las invasión microbiana en la cavidad amniótica esta presente en 25% de los casos de nacimientos prematuros (30). Además, en pacientes con parto prematuro, entre menor edad gestacional en el momento de la presentación, mayor la frecuencia de invasión microbiana de la cavidad amniótica. Y también de DBP.

La invasión microbiana de la cavidad amniótica está acompañada frecuentemente por la presencia en líquido amniótico niveles elevados de la concentración de citocinas proinflamatorias tales como IL-1, TNF  $\alpha$  e IL-8. Microorganismos, citocinas proinflamatorias y otros agentes bioactivos (factor activador de plaquetas) pueden ser aspirados durante la vida fetal hacia el pulmón, conduciendo a neumonitis intrauterina, haciendo al pulmón más susceptible a daño por barotrauma y toxicidad por oxígeno e incremento del riesgo para DBP (26,34).

Hay evidencias que indican que varios marcadores inflamatorios en el pulmón (neutrófilos, elastasa, IL-6, IL-8, IL1 - beta, fibronectina, leucotrienos B4, componentes del complemento) están aumentados en los lavados bronquiales de los neonatos que subsecuentemente desarrollan DBP. Esta observación se ha interpretado como indicador de que el mecanismo patogénico responsable del desarrollo de DBP se debe a un proceso inflamatorio prolongado. La etiología precisa del proceso inflamatorio aun no se determina, aunque el barotrauma y toxicidad por oxígeno se consideran como contribuyentes al daño pulmonar.

Se sabe que el incremento en la concentración de oxígeno, favorece una mayor oxidación de proteínas y elementos presentes en las membranas de las células del epitelio bronquial (25), que generan un importante aumento en los mecanismos redox, por lo que el daño en un epitelio ya de por sí inmaduro se perpetúa ante la

generación de lesiones celulares que requieren de mecanismos antioxidantes para su protección.(19)

En nuestro estudio se determinaron los niveles de TNF  $\alpha$ , IL 6 e IL 8 del aspirado de recién nacidos intubados y sometidos a ventilación mecánica, siendo la primera muestra minutos después de la intubación, al inicio de la ventilación asistida, posteriormente dependiendo de las horas totales de ventilación mecánica tomaron una serie de observaciones relacionadas con el valor predictivo que pueden tener ciertas citocinas consideradas como proinflamatorias. Encontramos que los 5 niños que fallecieron, tenían concentraciones muy elevadas de IL-6 y TNF alfa, mientras que todos aquellos que sobrevivieron mostraron una disminución relativa de esta interleucina y un aumento importante en la concentración de IL-8.

Este comportamiento sugiere que el mecanismo inmune de los niños prematuros el cual de por sí no solamente es inmaduro sino que está sesgado a generar respuestas del tipo TH2, o sea mayor probabilidad de producir IL-6 IL-8, ante cualquier agresión ya sea por patógenos externos o por lesiones secundarias a entre otras cosas hiperoxemia, tiene una tendencia a comportarse de manera equivalente a lo que solemos observar en los casos de pacientes con choque séptico y sistema inmune maduro.

Efectivamente no logramos encontrar ninguna correlación con los datos clínicos que evaluamos, sin embargo observamos que el paciente que falleció de mayor edad gestacional, no tuvo problemas de SDR, sino que murió a consecuencia de una NEC.

El porqué su patrón de citocinas en los niños que sobrevivieron no era niveles tan altos como en los otros niños, lo desconocemos. Se sabe que hay algunos niños prematuros con respuestas cardiorrespiratorias anormales en los cuales, además de generar un patrón de citocinas similar al que observamos nosotros, mostraron niveles elevados de proteína C reactiva (CPCR), la cual se eleva en condiciones de incremento en la concentración de IL-1 y generalmente se considera un marcado de choque séptico.

Uno de los parámetros terapéuticos más utilizado en el niño prematuro es además de la oxigenación, el uso de esteroides, sin embargo se sabe que a nivel del timo, los esteroides disminuyen una gran cantidad de linfocitos T inmaduros y que el organismo teniendo que mantener una concentración mínima de linfocitos T

circulantes, hace que el timo libere, linfocitos T, semimaduros que todavía no han sido seleccionados negativamente por lo que la posibilidad de perpetuar un daño auto inmune de tipo TH1 y sus respectivas citocinas especialmente IL- 1 beta, podría explicar el incremento en la concentración de PCR. La experiencia que tengo en el CMN 20 de Noviembre, UCIN, me permite asegurar que un porcentaje elevado de estos niños, no necesariamente sépticos, presentan niveles elevados de proteína C reactiva (PCR).

Todo lo anterior nos lleva a tratar de establecer un patrón diferente de manejo terapéutico.

El tamaño de la muestra aun es pequeño, sin embargo muchos de los tratamientos que damos a estos niños hasta la fecha son de una maneja muy empírica.

En realidad el sistema inmune del pequeño, reconoce la agresión de la ventilación mecánica y produce una respuesta de defensa, la cual dado el gran sesgo que tiene el sistema inmune de estos niños de convertir todo a una respuesta del tipo TH2 explica las elevadas concentraciones de este tipo de citocinas.

La respuesta deficiente de las citocinas del pulmón inmaduro está asociada con SDR severo y síndrome de circulación fetal persistente.

Poco tiempo después del nacimiento prematuro, las citocinas IL-1 beta y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos están aumentados en el aspirado de vías aéreas de neonatos prematuros no infectados. Pocos días después Chemoattractants, IL-8 y otras, citocinas inflamatorias (IL-6, IL.1B, IL-1 alfa, TNF alfa y otros) así como otros mediadores inflamatorios están aumentados significativamente en los aspirados de vías aéreas en los neonatos que posteriormente desarrollan DBP (29)

Todo parecería indicar que el uso muy temprano de concentraciones pequeñas de dexametasona y de PIP más bajos pueden ser útiles siempre y cuando, éstos se apliquen en fase temprana, observación que avala nuestra experiencia clínica.

El uso de estos mismos elementos en etapas posteriores, en las que el niño ya ha sido sometido a dos grandes vías de estrés, la primera que es tratar de compensar con un sistema inmunológico muy inmaduro el hecho de haber nacido prematuramente y de carecer de moléculas básicas para la vida como lo es el factor surfactante, y la segunda el que en ese tiempo, el contacto bacteriano ya sea ambiental o derivado de infecciones intrauterinas ha gestado un sistema orgánico en

el que el niño tiene que proceder por suprimir un proceso infeccioso, y generar rápidamente moléculas que ayuden a la maduración del sistema y tercero reparar la agresión a la que ha sido sometido por la terapia que le estamos dando a través de la ventilación mecánica.

Nos queda claro que tenemos mucho camino que recorrer en el entendimiento de la fisiología del niño prematuro, quien tiene sistemas biológicos inmaduros que no porque puedan sobrevivir con dificultad afuera están listos para enfrentar el reto que implica responder como un bebe de termino.

Hay la necesidad de mejorar la agudeza de detección temprana y el grado de enfermedad inflamatoria intrauterina y definir el papel del feto en la infección intrauterina.

Evidencia acumulada sugiere que la exposición intrauterina es también un factor de riesgo para el desarrollo de DBP. Se han reportado recientemente neonatos con DBP y presentan altas concentraciones de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8) y TNF alfa en el líquido amniótico de las madres de neonatos con DBP.

El propósito de este estudio fue la determinación de los valores de la IL-8, un potente quimiotáctico de neutrófilos humanos, aparece en la vía aérea de neonatos prematuros con SDR en quienes la DBO se desarrolla antes del flujo de neutrófilos. Además la secreción de IL-6, una citocina proinflamatoria, que es un marcador de inflamación en neonatos prematuros con SDR que progresan a DBP.

Munshi en un estudio semejante al realizado por nosotros reporta que la elevación de IL-6 e IL-8 precede al flujo de neutrófilos que se observan el aspirado traqueobronquial en neonatos que desarrollan DBP. (47)

Tullus reporta que los niveles de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) encontrados en aspirado traqueobronquial de neonatos prematuros, fueron mayores en neonatos que desarrollaron DBP comparados con los que no desarrollaron DBP. Así mismo señala que los niveles fueron menores en aquellos que fueron tratados con esteroides locales o sistémicos (49) (29,49).

En nuestro estudio, el incremento de los niveles de IL-6 y TNF $\alpha$  no fue significativo el día 1, sin embargo conforme pasaban más horas de VMA y días intubado, los niveles se incrementaron 3 a 4 veces el valor inicial.

La IL-6 es una citocina multifuncional con efectos potenciales locales y sistémicos. Induce la producción de proteínas reactantes de fase aguda hepáticas, estimula la

diferenciación de los linfocitos B y activación de linfocitos T, aumenta la permeabilidad vascular in vitro.

Las fuentes potenciales de IL-6 en las vías aéreas pueden ser :

- 1) células pulmonares ( macrófagos, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales)
- 2) fuga alveolar de proteínas plasmáticas incluyendo citocinas
- 3) Aspiración de líquido amniótico

La presencia de estos niveles elevados en el aspirado bronquial sugiere que estas citocinas pueden iniciar la cascada de inflamación aguda en los pulmones, o son marcadores del proceso inflamatorio que pone al neonato prematuro en alto riesgo de desarrollar DBP.

TNF $\alpha$  es un inductor potente de IL-6 expresado por células inflamatorias y estructurales. IL-6 inhibe la liberación de TNF por los macrófagos, por lo que produce una retroalimentación negativa, que puede limitar la inflamación.

Debido a la observación de un incremento inicial de la actividad de la IL-6 y un aumento tardío de TNF en el lavado bronquial de neonatos con DBP, se piensa que la elevación temprana de IL-6 pueda ser una respuesta a daño pulmonar severo y quizá sea un marcador importante de DBP, en tanto que TNF quizá pueda contribuir a la inflamación crónica en el desarrollo de DBP.

## **CONCLUSIONES**

El recién nacido prematuro, cuyo epitelio pulmonar es inmaduro se encuentra bajo diferentes agresiones a partir de su nacimiento, tales como altas concentraciones de oxígeno, VMI, infecciones a nivel pulmonar. En nuestro estudio se vio un incremento de IL-6 y TNF  $\alpha$  en aquellos neonatos que pasaron mayor tiempo en VMI y ésto relacionado inversamente con la edad gestacional y el peso al nacimiento.

Así mismo entre mayor nivel de IL-6 y TNF $\alpha$  mayor incidencia de DBP y mayor mortalidad. Estos resultados confirman la presencia de liberación de marcadores inflamatorios en el pulmón de estos neonatos, atribuido no solo a la VMA, sino también a elevadas concentraciones de O<sub>2</sub> e infecciones nosocomiales.

Los niveles de TNF  $\alpha$ , IL-6, IL-8 están marcadamente elevadas en el aspirado traqueobronquial de neonatos con DBP. El tratamiento con esteroides parece reducir estos niveles.

La presencia de IL-6 e IL-8 en el aspirado traqueobronquial de estos neonatos sugiere que estas citocinas, pueden iniciar la cascada inflamatoria aguda en los pulmones o son marcadores tempranos de el proceso inflamatorio que coloca al RNPT en elevado riesgo de DBP.

# **ANEXOS**

**ANEXO 1**

<b>HOJA DE RECOLECCION DE DATOS</b>
-------------------------------------

NOMBRE  No. de Pacientes

EXPEDIENTES

FECHA DE NACIMIENTO  HORA DE NACIMIENTO

GENERO  F  M  I VIA DE NACIMIENTO

APGAR 1' \_\_\_\_\_ 5' \_\_\_\_\_ S-A 1' \_\_\_\_\_ 5' \_\_\_\_\_ 10' \_\_\_\_\_

EDAD GESTACIONAL  sem

PESO NACIMIENTO  grs.

DIAGNOSTICO(s) DE INGRESO \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

DIAGNOSTICO RESPIRATORIO \_\_\_\_\_

INDICACION DE INTUBACION \_\_\_\_\_

FECHA DE INTUBACION  FECHA DE EXTUBACION

DIAS TOTALES DE INTUBACION

EN CASO DE FALLECIMIENTO,

CAUSA DE MUERTE  FECHA



día/mes/año

**DETERMINACION DE LOS NIVELES DE IL6, IL8 Y FNT $\alpha$  EN EL ASPIRADO  
BRONQUIAL DE NEONATOS BAJO VENTILACION MECANICA ASISTIDA**

NOMBRE \_\_\_\_\_

NO PACIENTE \_\_\_\_\_

MUESTRA | FECHA

PARAMETROS VENTILATORIOS  
PIP/PEEP/MAP/FIO2

<1Hr		
12 Hr		
72 Hr		
6 días		
12 días		
21 días		
28 días		
35 días		
42 días		
49 días		
56 días		

**ANEXO 2**

**FORMATO DE ACEPTACION PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACION "**  
**DETERMINACION DE LOS NIVELES DE IL6, IL8 Y FNT $\alpha$  EN EL ASPIRADO**  
**BRONQUIAL DE NEONATOS BAJO VENTILACION MECANICA ASISTIDA**

Investigador : Leticia Sollano Carranza

Médico Adscrito al Servicio de Cuidados Intensivos Neonatales

CMN 20 de Noviembre, ISSSTE

Tel . 575.70.22 Ext 1338/1327/1326

Radio : 629.98.00 Clave 4139

A QUIEN CORRESPONDA:

Yo \_\_\_\_\_

Acepto voluntariamente que mi hijo participe en el estudio " **DETERMINACION DE LOS NIVELES DE IL6, IL8 Y FNT $\alpha$  EN EL ASPIRADO BRONQUIAL DE NEONATOS BAJO VENTILACION MECANICA ASISTIDA**",

que se lleva a cabo en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre". Acepto que, como parte del estudio se realicen una tomas de aspirado bronquial a través del lavado bronquialveolar, que es un procedimiento de rutina en todo recién nacido que se encuentra intubado, sin ningún riesgo para el bebé ; cuyos procedimientos se me han explicado con anticipación.

Entiendo que tengo la libertad de no aceptar este procedimiento si así lo considero conveniente. En caso de que esto suceda la calidad de atención médica dentro de este Instituto no se verá afectada.

Firma de aceptación \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Testigo \_\_\_\_\_ Testigo \_\_\_\_\_

Investigador \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

### **ANEXO 3**

#### Técnica de ELISA

ELISA: análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)

Existen distintas variedades de ELISA, pero la más utilizada y sensible es el análisis tipo < sándwich >

Utiliza dos topes distintos de anticuerpos que reaccionan con el antígeno cuya concentración se quiere medir. Se fija una cantidad constante de un antígeno a una serie de soportes sólidos repetidos tales como pocillos de micro titulación de plástico. Se añade a estos pocillos la solución problema que contiene el antígeno en una concentración desconocida o una serie de soluciones patrón con concentraciones conocidas del antígenos y se deja que se unan. Se elimina mediante lavado el antígeno no unido y se permite la unión del segundo anticuerpo, que esta marcado con un isótopo radioactivo o ligado a una enzima. El antígeno sirve de puente, de manera que cuando más antígeno exista en las soluciones problema o patrón, mayor cantidad se unirá al segundo anticuerpo marcado radiactivamente o ligado a una enzima. Los resultados de las soluciones patrón se utilizan para elaborar una curva de la unión al segundo anticuerpo en función de la concentración del antígeno, a partir de la cual se puede explorar la cantidad de antígeno presente en las soluciones problema. Cuando se realiza este análisis con dos anticuerpos monoclonales, es esencial que vean determinantes no superpuestos en el antígeno, ya que de lo contrario no podría unirse el segundo anticuerpo.

## **BIBLIOGRAFIA**

### **Inmunología**

1. Abbas A, Lichtman A, Pober J. Inmunología Celular y Molecular. Mecanismos Efectores de las Respuestas Inmunitarias Edit McGraw-Hill-Interamericana. 4ª edición. 2002. Pag: 241-348
2. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. Cell Migration and Inflammation. Mosby. Fifth edition.1998. Pag. 62-68

### **Ventilación asistida / RNP / DBP**

3. Goldsmith J, Karotkin E. Assisted Ventilation of the Neonate : Complications. Saunders third Edit 1996. Pag : 327 – 339.
4. Bancalari E. Strocker T. Bronchopulmonary dysplasia. Hemisphere Publishing Corporation. Washington,DC EUA 1988.
5. Sola A, Urman J. Cuidados Intensivos Neonatales. Secuelas pulmonares crónicas de la ventilación mecánica. Edit. Científica Interamericana S.A. 3ª edición. Pag 238-247
6. Avery ME, Taeusch HW. Enfermedades del Recién Nacido. Interamericana 5ª edición .Pag. 155-158
7. Fanaroff A, Martin R. Neonatal-Perinatal Medicine. Chronic neonatal lung disease. The C.V. Mosby Company. 4<sup>th</sup> edition. Pag 628-638

### **Surfactante exógeno**

8. Hennes HM, Lee MB, RimmAA,Shapiro DL. Surfactant replacement therapy in respiratory distress syndrome. AM J Dis Chil 1991 ;145 :102-104.
9. Walti H.Monset-Couchard M.A risk-benefit assessment of natural and synthetic exogenous surfactants in the management of neonatal respiratory distress syndrome.Drug Safty 1998;18: 321-37.

10. Da Costa DE, Pai MG, Al Khusaiby SM. Comparative trial of artificial and natural surfactants in the treatment of respiratory distress syndrome of prematurity: experiences in a developing country. *Pediatric Pulmonology* 1999;27: 312-7
11. Fajardo C, Levin D, García M, Abrams D. Surfactant versus saline as a vehicle for corticosteroid delivery to the lungs of ventilated rabbits. *Pediatrics Research* 1998;43: 542-545
12. Lloyd J, Todd DA, John E. Serial phospholipid analysis in preterm infants: comparison of Exosurf and Survanta. *Early Human Development*. 1999; 54 : 157-68
13. Merritt TA, Gluck I. Reduction of lung injury by human surfactant treatment in respiratory distress syndrome. *Chest* 1983 ; 83 :27 s- 30s12
14. Husain AN, Siddiqui NH, Stocker JT. Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Human Pathology*. 1998; 29: 710-7

### **Citología del aspirado bronquial**

15. D'Ablang G, Bernard B, Zaharov I. Neonatal Pulmonary Cytology and Bronchopulmonary Dysplasia *Acta Cytologica* 1975 ; 19 :21-28
16. Merritt TA, Puccia JM, Stuard ID. Cytologic evaluation of pulmonary effluent in neonates with respiratory distress syndrome and bronchopulmonary dysplasia. *Acta Cytol* 1981 ; 25 : 631-639
17. Doshi N, Kanbour a, Fujikura T. Traqueal Aspiration Cytology in Neonates with Respiratory Distress *Acta Cytologica* 1980 ;26 :15-21

### **Displasia Broncopulmonar**

18. Hentschel et al . Predicting chronic lung disease in very low birthweight infants: Comparison of 3 scores. *J. Perinat. Med* 1998 ; 26: 378-383
19. Jobe A, Ikegami M. Mechanisms initiating lung injury in the preterm. *Early Human Development*. 1998.53:81-94

20. Robertson B. The evolution of neonatal respiratory distress syndrome into chronic lung disease. *Eur Respir J* . 1989 Suppl 3: 33s-37s 20.
21. Viscardi RM, Broderick K Disordered pathways of fibrin turnover in lung lavage of premature infants with respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992 ; 146 :492-499
22. Brunton JA, Saigal S, Atkinson SA. Growth and body composition in infants with bronchopulmonary dysplasia up to 3 months corrected age: a randomized trial of a high-energy nutrient-enriched formula fed after hospital discharge. 1998; 133: 340-5
23. Beverly A. Banks, Harry Ischiropoulos, Molly McClelland, Philip L. Ballard. Plasma 3-Nitrotyrosine is elevated in Premature Infants who develop Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatrics* 1998;101: 870-874
24. Yoom BH, Romero R, Sum Kim K, Park JS. A systemic fetal inflammatory response and the development of bronchopulmonary dysplasia. *AM J Obstet Gynecol* 1999; 181: 773
25. O'Brodovich HM, Mellins RB . bronchopulmonary dysplasia : unresolved neonatal acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1985 ; 132 :694-709
26. Coalson J., Winter V., Siler-Khodr T., Yoder B. Neonatal Chronic Lung Disease in extremely Immature Baboons . *AmJ Respir Crit care Med*, 1999; 160: 1333-1346
27. Coalson JJ, Kuehl TJ, Prihoda TJ, de Lemos RA. Diffuse alveolar damage in the evolution of bronchopulmonary dysplasia in the baboon . *Pediatr Res* 1988 ;24 : 357-366
28. Hallman M. Cytokines, Pulmonary Surfactant and Consequences of intrauterine Infection. *Biol Neonate* 1999;76: 2-9
29. Gómez R, Romero R, Ghezzi F, Yoom B. The fetal inflammatory response syndrome. *AmJ Obstet Gynecol*. 1998; 179 : 194-202
30. Rojas MA, Gonzalez A, Bancalari E, Claure N, Ploole C, Silva-Neto Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* 1995; 126: 605-10

### **Dexametasona**

31. Groneck P, Reuss D. Effects of dexamethasone on chemotactic activity and inflammatory mediators in tracheobronchial aspirates of preterm infants at risk for chronic lung disease. 1993 ; J Pediatr 122 : 938-944
32. Yoder MC, Chua R, Tepper R Effect of dexamethasone on pulmonary inflammation and pulmonary function of ventilator-dependent infants with bronchopulmonary dysplasia. Am Rev Respir Dis 1991 ; 143 : 1044-1048
33. Bessler H. Dexamethasone like cytokines modulator. Biol Neonate. 1999; 75: 225-233
34. Groneck P, Speer Ch. Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 1995;73(1)
35. Yoon B, Romero R, Kwan Jun J, Park H, Park JD, Ghezzi F. Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. Am J Obstet Gynecol. 1997; 177: 825-830

### **Citocinas en el neonato**

36. Kelly J Cytokines of the lung. Am. Rev Respir Dis 1991 ;765-788

### **IL-6**

37. Bagchi A, Viscardi R, Taciak V, Ensor J. Increased Activity of Interleukin-6 but not Tumor Necrosis factor- $\alpha$  in lung lavage of premature Infants is associated with the development of bronchopulmonary Dysplasia. Pediatric Research. 1994; 36: 244-252
38. Romero R, Avial C, Santthanam U, Sehgal PB Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor, J Clin Invest 1990 ;85 : 1392-1400
39. De Bont ESJM, Martens A, Van RaanJ, Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and interleukin 6 plasma levels in neonatal sepsis .Pediatr Res 1993 ; 33 :380-383

40. Grogg JM, Barber A. Increased levels of bronchoalveolar lavage fluid interleukin 6 in preterm ventilated infants after prolonged rupture of membranes. *Am Rev Respir* 1992 ; 154 : 782-786
41. Ulich TR, Yin S, Guo K, Yi Es. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. L6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. *Am J Pathol* 1991 ; 138 : 1097-1101
42. Takizawa H, Ohtoshi T, Yamashita N, Oka T, Ito K. Interleukin 6 receptor expression on human bronchial epithelial cells: regulation by IL-1 and IL-6. *American Journal of Physiology*. 1996 ;270(3 Pt 1):L346-52

### IL-8

43. Ghezzi F, Gómez R, Romero R, Yoon B. Elevated interleukin 8-concentration in amniotic fluid of mothers whose neonates subsequently develop bronchopulmonary dysplasia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1998. 78: 5-10
44. Shibata Y, Nakamura H, Kato S, Tomoike H. Cellular detachment and deformation induce IL-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *Journal of Immunology*. 1996 ;156(2):772-7
45. Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Davie RJ. Effect of erythromycin on *Haemophilus influenzae* endotoxin-induced release of IL-8 and sICAM-1 by cultured human bronchial epithelial cells. *European Respiratory Journal*. 1995 ;8(9): 1451-7.

### TNF

46. Hitti Jane, Krohn Marijane, Patton Dorothy et al . Amniotic fluid tumor necrosis factor-alpha and the risk of respiratory distress syndrome among preterm infants. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1997;177:50-56
47. Munshi UK, Niu JO, Siddiq MM, Parton LA. Elevation of interleukin-8 and interleukin-6 precedes the influx of neutrophils in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol*. 1997; 24:331-6)



48. Murch, S, Costeloe Mucosal Tumor Necrosis Factor. Alpha production and Pediatric Research 1996; 40(3) 484-489)
49. Tullus K, Noack GW, Burman LG, Nilsson R, Wretling B, Brauner A. Elevated cytokine levels in traqueobronchial aspirate fluids from ventilator treated neonates with bronchopulmonary dysplasia. European Journal of Pediatrics. 1996; 155: 112-6
50. Romero R, Manogue KR, Mitchell Md. Infection and labor : IV Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. Am J Obstet Gynecol 1989 ;161 : 336-341.
51. Speer CP, Ruess D Neutrophil elastase and acute pulmonary damage in neonates with severe respiratory distress syndrome. Pediatrics 1993 ; 91 :794-799
52. Abdelaziz MM. Devalia JL. Khair OA. Calderon M. Sapsford RJ. Davies RJ. The effect of conditioned medium from cultured human bronchial epithelial cells on eosinophil and neutrophil chemotaxis and adherence in vitro. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology 1995 ; 13(6):728-37.
53. Ito H.. Rennard SI. Spurzem JR. Mononuclear cell conditioned medium enhances bronchial epithelial cell migration but inhibits attachment of fibronectin Journal of Laboratory and Clinical Medicine 1966 ; 127(5):484-503
54. Herbert CA, Arthur MJ, Robinson C. Augmentation by eosinophils of gelatinase activity in the airway mucosa: comparative effects as a putative mediator of epithelial injury. British Journal of Pharmacology. 1996;117(4):667-74
55. Takafuji S. Ohtoshi T. Takizawa H. Todokoro K. Ito K. Eosinophil degranulation in the presence of bronchial epithelial cells. Effect of cytokines and role of adhesion. Journal of Immunology. 1996 ;156(10): 3980-5