



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

INFLUENCIA DE LAS CELULAS CLARA Y
PROTEINA cc10 EN LA EVOLUCION CLINICA
DE NEONATOS CON SOPORTE
RESPIRATORIO PROLONGADO

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

NEONATOLOGÍA

P R E S E N T A:

DR. ANTONIO CALDERÓN MOORE

TUTOR DE TESIS Y ASESOR METODOLÓGICO:

DR. JOSÉ GUZMÁN BARCENAS



MÉXICO, D. F.

Febrero 2014





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.

VoBo

DRA. REBECA GOMEZ-CHICO VELASCO
DIRECTOR DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a central mark that resembles the letters 'JG'. Below the signature, the text 'VoBo' is printed.

DR. JOSÉ GUZMÁN BARCENAS
TUTOR DE TESIS Y ASESOR METODOLÓGICO

DEDICATORIAS.

Gracias a Dios y a la vida por haberme colocado en el camino y la situación correcta y haber hecho de mi paso por el Hospital Infantil de México Federico Gómez una aventura extraordinaria.

Gracias a nuestros queridos y pequeños neonatos, símbolo de fuerza y coraje, los mejores maestros y el motivo por el cual todo sacrificio y esfuerzo vale la pena.

Gracias a mis otros maestros, Dr. José Guzmán, asesor y amigo, gracias por inculcar en mí la duda, el cuestionamiento y no aceptar la costumbre; Dra. Dina, ejemplo y maestra, excelencia y dedicación, gracias por la exigencia y el cariño; Dr. Adrián, gracias por inculcar practicidad, actualidad y energía; Dra. Edna, experta en neurodesarrollo y compañera de consultas; Dr. Daniel, energía, dinamismo y entrega, gracias por el apoyo incondicional.

Gracias a 5 amigos de aventuras: Clau, Marce, Ale, Ivonne y Lalo, compañeros de sueños, llanto, desahogo y alegría, haber recorrido estos 5 y 2 años con ustedes le dio un valor muy especial a la aventura, cada uno añadiendo su toque a nuestra querida UCIN. Clau, mejor amiga, compañera de sueños, no cambio por nada haber estado a tu lado tantos años, sobre todo estos dos últimos, eres un ejemplo de dedicación y apoyo, me entusiasma seguir compartiendo nuestros caminos.

Gracias Ale, oírte y saber que estas a mi lado, literal o cruzando el océano, dibujó una sonrisa en mi cara todos los días, convirtió cada momento en algo inolvidable y brindó la fuerza necesaria para librar cada batalla.

DEDICATORIAS.

Gracias Mamá, Papá, Martita, Moni y ale, por su apoyo incondicional, por consentir y ayudar, por estar siempre ahí. Siguen siendo mi mayor ejemplo y motivo.

Gracias también al resto del equipo: Luz, con el comentario atinado siempre, Oly, amigas enfermeras, Carmelita y Ceci. Este triunfo es compartido, porque en equipo, logramos grandes hazañas.

ÍNDICE.

1.- ANTECEDENTES.....	7
2.- MARCO TEÓRICO	8
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
4.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	17
5.- JUSTIFICACIÓN.....	18
5.- OBJETIVOS.....	19
7.- METOLOGÍA	20
8.- PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
9.- DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.....	29
10.- RESULTADOS	32
11.- DISCUSIÓN.....	35
12.- CONCLUSIÓN.....	36
13.- BENEFICIOS Y EXPECTATIVAS.....	37
14.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	37
15.- ASPECTOS ÉTICOS.....	38

ÍNDICE.

16.- CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	39
17.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
18.- ANEXOS.....	43

ANTECEDENTES.

Diferentes estudios realizados en mamíferos han identificado dentro del microambiente pulmonar a la proteína cc10, producida por las células clara, como una proteína antiinflamatoria que favorece la adecuada función pulmonar. (Broeckaert, 2000)¹.

El papel de las células clara en el microambiente pulmonar ha sido estudiado en los últimos años al identificar la proteína producida por estas células, la proteína cc10, como una proteína antiinflamatoria que se sospecha disminuya su concentración en pacientes con falla a la mecánica ventilatoria lo cual puede asociarse en el futuro con la aparición de displasia broncopulmonar (DBP). (Beth, 2005)².

Actualmente no se cuenta con valores establecidos de la proteína cc10 en los recién nacidos y no se han llevado a cabo estudios para identificar la probable asociación de la disminución de esta proteína, mayor inflamación a nivel pulmonar y la progresión a displasia broncopulmonar. Así mismo en la actualidad no se conoce los factores que influyen en la producción de esta proteína antiinflamatoria.

El estudio de las células claras y su proteína antiinflamatorio, cc 10, constituye un campo de acción aún no explorado dentro de la Neonatología y su papel en la fisiopatología de la DBP debe ser estudiado.

MARCO TEÓRICO.

Las células clara como parte de la estructura bronquial.

Los bronquiolos son estructuras tubulares microscópicas que conectan al sistema de conducción (bronquios) con el sistema de intercambio (alvéolos). Una diferencia morfológica notable entre bronquios y bronquiolos es que estos últimos no poseen cartílago en sus paredes. La parte interna o mucosa bronquiolar está compuesta por un epitelio mixto de células ciliares, células secretoras y las células Clara. En el hombre los bronquiolos normales carecen de células caliciformes productoras de moco. Las porciones proximales de los bronquiolos están recubiertas de epitelio columnar o cuboidal con pocas células ciliares mientras que las regiones más distales están formadas por epitelio cuboidal, sin cilios, conocido como epitelio no-ciliar. Las células no ciliares producen secreciones importantes como proteínas, carbohidratos y lípidos. Un tipo muy importante de célula secretora no-ciliar en los bronquiolos es la llamada célula Clara. Estas células Clara además de tener funciones de detoxificación (oxidasa de función mixta) participan también junto con los neumocitos tipo II en la formación del surfactante pulmonar. (Beth, 2005)²

Proteínas de las células clara (cc10- cc16).

La proteína de las células Clara (cc10), es una proteína de 10-kDa que se secreta a lo largo del árbol traqueo bronquial y sobre todo en los bronquios terminales donde se localiza el mayor número de éstas células. Aunque la función exacta in vivo de cc10 no se conoce, diversos autores han tratado de clarificar dicha función, la evidencia está aumentando ya que cc10 juega un importante en el papel protector en el tracto respiratorio contra la respuesta inflamatoria (Broeckaert, 2000)¹. Por otro lado, también se ha descrito su importancia como marcador pulmonar para evaluar la integridad celular del epitelio y evaluar la permeabilidad de las vías aéreas. Broeckaert y cols observaron que la concentración plasmática de cc10 disminuye en pacientes con daño pulmonar crónico causado por el humo del tabaco y otros contaminantes aéreos como consecuencia de la destrucción de células de Clara.

Inicialmente, se habían nombrado como uteroglobina (útero de conejo) o lacryglobin (lágrimas de humano). Después, resultó que la misma proteína también se expresa en otros tejidos en cantidades significantes. Por ejemplo, poco después el descubrimiento de que la uteroglobina (utero-globin, UG) se encontrara en pulmón de conejo. Estos resultados iniciales se redescubrieron diez años después cuando se identificó que se encontraba esta proteína en células clara secretoras en pulmón de conejo, posteriormente se estudio en ratón, ratas y últimamente en pulmón humano, aunque también se ha encontrado expresada en la próstata. Recientemente fue clonado y caracterizado el cDNA (Singh, 1998)³ y la región 5' del gen que codifica para la cc10 a partir de las células alveolares (Clara) de origen pulmonar, el cual se localiza en el cromosoma 11q12.3-13 humano. Esta región se ha encontrado en varios genes involucrados con patologías tales como el asma y la distrofia muscular. Este hecho no descarta la posibilidad de que la cc10 pudiera estar altamente relacionada con este tipo de patologías. La proteína conocida como "Clara cell 10 Kd" tiene 61.5% de homología con la Uteroglobina de conejo, 54.2% con la rata y 52.8% con el ratón (Carlomagno, 1997)⁴.

A partir de la purificación de la UG recombinante humana (dímero unido por puentes de disulfuro) se demostró que ésta proteína posee dos actividades características importantes:

- 1) Es un sustrato excelente de la transglutaminasa.
- 2) Es un inhibidor potente pancreático porcino, por lo que se sugirió que esta proteína tiene importancia fisiológica y farmacológica (Mantile, 1993)⁵. Además se ha visto que evita la inflamación del pulmón y previene la hidrólisis de los fosfolípidos del factor surfactante inducida por la fosfolipasa A2. Algunos estudios de la expresión del gen de UG en el pulmón fetal en conejas demostraron que la expresión del gen ocurre a lo largo de toda la gestación con una baja antes del parto. Dicha expresión aumenta dramáticamente en el pulmón del feto a mayor edad gestacional, demostrándose además que mantiene una relación inversa entre los niveles de UTG, PGE2 y PGF2 y una relación directamente proporcional con los leucotrienos C4 (Pieri, 1995)⁶.

Diferentes autores han reportado esta proteína, como una de las proteínas que juegan un papel importante en el pulmón y aunque no está descrita su función específica, se sabe que está involucrada con la función del surfactante pulmonar.

La concentración de cc10 y cc16 en suero ha sido determinada por diferentes técnicas de inmunoensayo. La concentración de éstas proteínas varía de 5 a 50 $\mu\text{g/L}$ en lavados bronco alveolares (Pieri⁶, Shijub⁷, Bernard⁸) en condiciones normales, sin embargo, muchos valores reportados en muertes neonatales están por arriba de 1000 $\mu\text{g/L}$ (Nomori)⁹. Por consiguiente la expresión de la cc10 constituye una reacción relevante ante la respuesta inflamatoria e inmunológica en el pulmón, habiéndose corroborado este hecho al inducir a ratones con lipopolisacáridos intratraqueales (Arsalane, 2011)¹⁰.

La evidencia muestra que la acumulación de cc10 juega un papel importante como protector en la respuesta inflamatoria, la concentración de cc10 está disminuida en sujetos con daño pulmonar crónico, por ejemplo el causado por tabaquismo, como consecuencia de la destrucción de las células clara. En contraste la concentración de cc10 se incrementa en pacientes adultos con desordenes o daño pulmonar agudo. (Broeckert, 2000)¹.

Fosfolipasa A2 (PLA2).

Las fosfolipasas A2 son una familia de enzimas que hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos, principalmente el ácido araquidónico y lisofosfolípidos. Las fosfolipasas A2 de secreción son producidas por numerosas células bajo la acción de diferentes estímulos como la interleucina-1, el factor de necrosis tumoral α y los lipopolisacáridos, los cuales provocan su acumulación en los líquidos inflamatorios y en el plasma de pacientes con diversas enfermedades inflamatorias.

Recientemente se propuso que las fosfolipasas de secreción actúan preferencialmente sobre microvesículas emitidas por las células cuyas membranas han perdido la asimetría fosfolípida. La hidrólisis de fosfolípidos del surfactante

pulmonar por la secreción de fosfolipasa A2 (sPLA2) contribuye a que haya un trastorno agudo en el surfactante dando como resultado el síndrome de dificultad respiratorio. En un estudio realizado por Chabot y cols Demuestran que sPLA2 -IIA, sPLA2 -V, y sPLA2 -X hidrolizan eficazmente los fosfolípidos del surfactante *in vitro*. En el contraste, sPLA2 -IIC, -IID, -IIE, y -IIF que no tienen el efecto. (Chabot, 2003) ¹¹.

Posteriormente fue purificada la proteína A del surfactante (SPA) demostrando que puede inhibir la actividad de PLA2-IIA, en ratones, por tanto la SPA inhibe la activación de la PLA2 que puede jugar también un papel de protección en el mantenimiento de la integridad del surfactante durante una lesión pulmonar, en donde también los neutrófilos juegan un papel importante en la fisiopatogénesis de lesión pulmonar aguda y en particular en el SDR. (Geerts, 2001)¹². encontraron una correlación en la concentración de la proteína cc10 (cc10 como un inhibidor de la quimiotaxis de los neutrófilos) y angiogenina (como inhibidor de degranulación) (Linnoila, 2000) ¹³. Sugieren que cc10 tiene un papel importante en la carcinogénesis pulmonar como un marcador de supresión tumoral ya que cc10 se expresa inusualmente en células de pulmón humano a pesar de producirse abundantemente por las células de epitelio neoplásicas.

La PLA2 juega un papel importante en varios procesos, incluyendo homeostasis de membrana celular, digestión de lípidos, respuesta inflamatoria, así como transductor de señales y la producción de mediadores como eicosanoides y leucotrienos.

Surfactante Pulmonar.

El surfactante es un material de composición compleja que se sitúa en la interfase gas líquido del alveolo y que se sintetiza en el neumocito tipo II. Contiene una importante cantidad de fosfolípidos de los que la fosfatidilcolina (lecitina) es el más abundante; a su vez es el responsable de la disminución de la tensión superficial (acción surfactante). Los estudios de su biosíntesis se han centrado predominantemente en los de la lecitina (fosfatidil-colina). Sus vías metabólicas de síntesis no son idénticas en todos los mamíferos, e incluso en el mismo animal, pueden variar dependiendo de la edad de gestación. Si bien hacía algún tiempo se sabía que el pulmón era capaz de

sintetizar lípidos complejos a partir de palmitatos y acetatos, la sorprendente actividad metabólica del mismo sólo se valoró correctamente desde hace pocos años. La primera lecitina que aparece en el humano es la ..-palmitoil-..-miristoil-fosfatidil-colina y posteriormente, a partir de la semana 35, aparece la dipalmitoil-fosfatidil-colina. (Haller, 2008) ¹⁴

El surfactante contiene además cuatro proteínas denominadas SP-A, SP-B, SP-C y SP-D, que se sintetizan en el pulmón. La SP-A y la SP-D son glicoproteínas (aproximadamente de 30.000-40.000) mientras que la SP-B y la SP-C son más pequeñas (aproximadamente de 5.000 - 18.000) y son proteolípidos extremadamente hidrófobos, formados a partir de precursores mayores mediante proteólisis.

La función de estas proteínas no está totalmente aclarada pero se acepta que la SP-A tenga un papel decisivo en la recaptación del surfactante, así como estabilizador de la mielina tubular. Por su lado, inhibe la secreción del surfactante, lo que parecería sugerir un papel global de mediar la secreción, estabilizar la mielina y favorecer la recaptación.

Las SP-B y SP-C tienen un papel predominantemente estabilizador a nivel de la interfase aire/líquido, y por último, la SP-D, que tiene una acción semejante a la lecitina, tiene una acción en la respuesta primaria inmunológica.

La síntesis de fosfolípidos y las proteínas del surfactante está regulada por el pulmón a medida que avanza la gestación y puede estimularse mediante los corticoides o bien otras hormonas. El surfactante se almacena en los cuerpos laminares que, además, también almacenan SP-B y SP-C, ahora bien, no está claro donde se almacenan las proteínas SP-A, la cual seguramente se secreta independientemente de los cuerpos de inclusión. Así, la secreción de fosfatidilcolina es un proceso que puede regularse, y en la célula aislada, puede estimularse mediante elementos fisiológicos u otros agentes, que pueden actuar al menos por varias vías distintas. Después de la secreción al espacio alveolar, el surfactante se transforma en mielina tubular, y los componentes lipídicos y proteicos se separan, colocándose la fracción lipídica en la monocapa de la interfase aire-líquido. La mayor parte del surfactante se

reincorpora de nuevo al neumocito tipo II mediante endocitosis (mediada a su vez por un receptor específico). Algunos componentes del surfactante recaptado se reciclan directamente en nuevo surfactante, mientras que otros se metabolizan y degradan. (Haller, 2008) ¹⁴

Inmunidad en Pulmón.

La integridad de las vías respiratorias depende principalmente de un sistema de defensa natural y este confiere una protección inicial frente a los factores externos (microorganismos, partículas extrañas, etc.) estimulando una respuesta inmunitaria adaptativa. Los componentes celulares del sistema inmunitario natural incluyen fagocitos (neutrófilos o macrófagos), células agresoras naturales (basófilos, mastocitos, eosinófilos y otros). Los epitelios del cuerpo humano forman interfases entre el medio interno y el medio externo. Para el caso de las vías respiratorias, la mucosa epitelial que las reviste es el primer punto de contacto entre las sustancias inhaladas, como los contaminantes del medio ambiente. En los últimos años se ha puesto de manifiesto que las células epiteliales de las vías respiratorias no solo desempeñan una función pasiva de barrera, sino que también contribuyen activamente al sistema inmunitario natural. Así la importancia del epitelio es contribuyendo a la defensa incluyendo la actividad de movimiento ciliar y la producción de quimocinas, citocinas, péptidos, inhibidores de la proteinasa y proteínas del surfactante (Speer, 2009) ¹⁵.

La inflamación como mecanismo fisiopatogénico de la DBP.

Existe evidencia del papel que juega la inflamación en los estadios iniciales de la DBP del neonato debido a un fallo en la regulación y control de la respuesta inflamatoria. Esta respuesta inflamatoria es un proceso muy complejo en el que intervienen citocinas pro y antiinflamatorias, leucotrienos, prostaciclina y factor activador de plaquetas. En prematuros que desarrollaron DBP se han detectado concentraciones de citocinas proinflamatorias en el líquido amniótico y en muestras de lavados broncoalveolares en las primeras horas de vida, permaneciendo elevadas hasta las dos o tres semanas de edad, sugiriendo que el proceso responsable de la DBP puede iniciarse antes de nacer (Speer, 2009) ¹⁵.

Hiperoxia y toxicidad por el oxígeno: Las enzimas antioxidantes y otros antioxidantes no enzimáticos son el sistema de defensa celular al estrés oxidativo. En condiciones de hiperoxia, reperfusión e inflamación se produce un incremento de radicales libres que alteran el equilibrio oxidativo y producen daño de la membrana celular. El prematuro, cuyo sistema antioxidante suele estar ausente al nacimiento, tiene un mayor riesgo de lesión si se somete a hiperoxia terapéutica. La Interleucina 1 es un importante mediador de la respuesta inflamatoria precoz, recluta y activa células inflamatorias y causa la liberación de otras citocinas.

La Interleucina 6 (IL6) es otra citocina proinflamatoria, estimula células B y T. Puede encontrarse en el líquido amniótico y en el primer día de vida en los lavados alveolares de prematuros que progresan hacia una DBP.

La Interleucina 8 (IL8) es probablemente uno de los factores quimiotácticos pulmonares más importantes. Producida por macrófagos alveolares, fibroblastos, neumocitos tipo II y células endoteliales. Aparece en altas concentraciones en los lavados alveolares de niños con DBP. La IL8 y la IL6 en el aspirado traqueal, son marcadores precoces del proceso inflamatorio.

La Interleucina 10 (IL10) es una citocina antiinflamatoria producida por macrófagos, células T y B. En condiciones de inflamación pulmonar, esta citocina no se detecta en prematuros y sí que se encuentra en recién nacidos a término. Jones, ha descrito que el factor de expresión genética de esta Interleucina se regularía con el desarrollo, lo que en parte podría reflejar que la susceptibilidad de los prematuros a desarrollar DBP estaría determinada por la inhabilidad de expresión de la IL10. Sin embargo la influencia de la IL10 en la patogénesis de la DBP sigue sin aclararse.

Al identificarse el papel de las Interleucinas y citocinas en la cascada inflamatoria y progresión a DBP, el papel de proteínas antiinflamatorias como la cc10 en progresión a DBP aún se encuentra en estudio (Coalson, 2006) ¹⁶.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La función de las células clara en la respuesta inmunológica e inflamatoria en mamíferos y adultos ha sido estudiada por múltiples autores, siendo identificada como parte de la respuesta antiinflamatoria (aumento de síntesis de proteínas durante la respuesta inflamatoria aguda) con un cambio hacia la disminución en número de células y disminución en la producción de sus proteínas, principalmente cc10, en los procesos inflamatorios crónicos, perdiendo el efecto antiinflamatorio. En los recién nacidos no ha sido establecido los niveles de proteína cc10 y si la disminución de la misma y por lo tanto de su efecto antiinflamatorio condiciona muy posiblemente inestabilidad respiratoria prolongando el soporte respiratorio.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

La disminución de la concentración de proteína cc10 en aspirado bronquial de neonatos se relaciona con periodos prolongados de soporte ventilatorio (mayor de 7 días), lo que además se relaciona con un incremento en la incidencia de Displasia broncopulmonar.

JUSTIFICACIÓN.

La función de las células clara y de sus proteínas (cc10) no se ha reportado en los paciente recién nacidos con soporte respiratorio prolongado ni se ha estudiado su relación con la displasia broncopulmonar por lo que la realización de este trabajo contribuirá en la generación de nueva información sobre el microambiente pulmonar en la falla a la ventilación mecánica y la posterior progresión a DBP, con el fin de, posteriormente, identificar marcadores y estrategias de tratamiento en estos pacientes.

Las propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de la proteína cc10 han sido estudiadas en múltiples modelos animales, encontrándose beneficios con la administración exógena de la misma, ya que en sus propiedades se encuentran la inhibición de la inactivación del factor tensoactivo, regulación de la respuesta inflamatoria al estímulo de la ventilación mecánica y al estímulo bioquímico de sustancias proinflamatorias. Así mismo se ha identificado por Ramsay y colaboradores la relación en modelos de corderos entre la disminución de proteína cc10 y desarrollo de DBP. (Ramsay, 2012)¹⁷

OBJETIVOS.

Objetivos Generales:

- Describir la concentración de proteína cc10 en aspirados bronquiales de neonatos durante el periodo de soporte respiratorio en dos tiempos convencionales (a la intubación y a los 7 días de soporte respiratorio) considerando su evolución clínica.

Objetivos secundarios:

- Identificar la concentración de proteína cc10 en aspirados bronquiales en pacientes con falla al soporte respiratorio. (Falla= ventilación mecánica mayor a 7 días). (Greenough,2007) ¹⁸
- Correlacionar las concentraciones de proteínas cc10, soporte ventilatorio, factores acompañantes y la presencia de displasia broncopulmonar. (Bancalari, 2001) ¹⁹

METODOLOGÍA

TIPO DE INVESTIGACION: EXPERIMENTAL BÁSICA.

DISEÑO DEL ESTUDIO: DESCRIPTIVO, LONGITUDINAL, PROSPECTIVO.

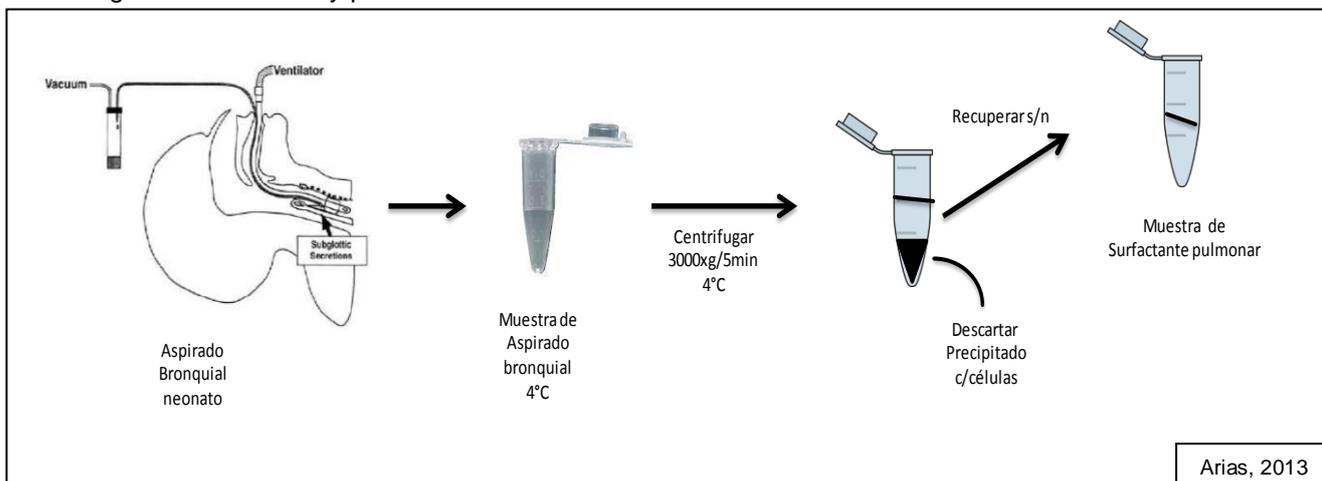
MÉTODO:

- 1) Se obtuvieron muestras de aspirado bronquial de neonatos con intubación orotraqueal que se encuentren hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) del Hospital Infantil de México Federico Gómez que cumplan con los siguientes características: Recién nacidos con diagnóstico de patología neonatal que amerite intubación endotraqueal y que se encuentren en el primer día de intubación, que no hayan recibido medicamentos por vía endotraqueal.
 - a. Criterios de inclusión: Neonato hospitalizado en la UCIN del Hospital infantil de México con intubación orotraqueal bajo ventilación mecánica en quien se puede obtener aspirado bronquial en el día 1 y 7 de intubación.
 - b. Criterio de exclusión: Haber recibido medicamentos por vía endotraqueal (a excepción de surfactante exógeno).
No permanecer con intubación orotraqueal por 7 días.
Haber sido intubado previo a su ingreso al HIM en hospital de referencia y no encontrarse en su primer día de intubación.
- 2) Las muestras de aspirado bronquial se obtuvieron el día 1 y el día 7 de intubación orotraqueal con equipo de succión y frasco de recolección especiales para el estudio. La muestra fue tomada por la enfermera a cargo del paciente junto con el residente de neonatología de forma estéril y depositada en el frasco de recolección especial, rotulándose con nombre y registro del paciente así como fecha de obtención. Posteriormente la muestra se refrigeró a menos 70 grados centígrados con el fin de conservar las células del epitelio bronquial para su posterior estudio.

3) Las muestras se enviaron al Departamento de Biología Molecular con el Dr. Joel Arias Martínez en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) para su proceso y análisis. A continuación se describe el proceso:

Se utilizaron muestras de lavados bronquioalveolares (LBA) de cerdos lechones de la raza (Hampshire Suino) y conejos adultos de la raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) de 4 kg en promedio y de 3 a 5 meses de edad, que se mantuvieron en condiciones adecuadas en el bioterio del INPer. Se recibieron en condiciones estériles y a 4°C Aspirado bronquioloalveolar (ABA) de neonatos humanos del HIM Federico Gómez.

Figura 1: Obtención y procesamiento de muestra.



Se realizó cultivo Primario de neumocitos de tipo II. (Haller, 1998)¹⁶, donde se aislaron las células de epitelio pulmonar a partir de la muestra de aspirado bronquioloalveolar.

Se filtró la suspensión celular a través de una gasa de algodón y tres mallas de nylon (150-, 20-, y 10-mm), se centrifuga a 900 rpm por 8 min. Se resuspendió la pastilla celular en medio DMEM e incubó en cajas cubiertas de IgG (IgG-coated plastic dish) a 37°C para remover los macrófagos, centrifugar las células que no se adhirieron y resuspender en medio DMEM complementado con 10% FCS, 100 unidades/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomycin, y 24 mmol/l NaHCO₃, incubar en cajas de vidrio a baja densidad (40 células por mm²), y cultivar en una atmósfera con 95% humedad y 5% CO₂ a 37°C. Los cultivos pueden usarse 1–2 días después.

Para el caso del aislamiento y cultivo de células clara se cultivan por 4 días en presencia de 10 nM de dexametasona, 0.1 mM de cAMP y 0.1 mM isobutilmetilxantina, se ha reportado previamente que estas condiciones favorecen la diferenciación de los linajes celulares de epitelio del espacio aéreo (González y cols). El explante se digiere con tripsina, DNasa y EDTA para obtener una suspensión de células individuales como lo describe Ballard y col. (Ballard, 1986). Las células mezcladas son cultivadas toda la noche a una densidad de 10^6 células /por placa de 35 mm para uso de cocultivos. Además, una parte de la suspensión se cultivo por 1h, posteriormente se toman las células que se adhieren a la placa, estas son 99% fibroblastos aproximadamente.

Se obtuvieron las proteínas contenidas en las células y sobrenadante de los cultivos y se les realizó determinación de proteínas (método de Bradford). Para esta técnica de las muestras obtenidas a cada una se les determinó la cantidad de proteínas utilizando macro ó micro método.

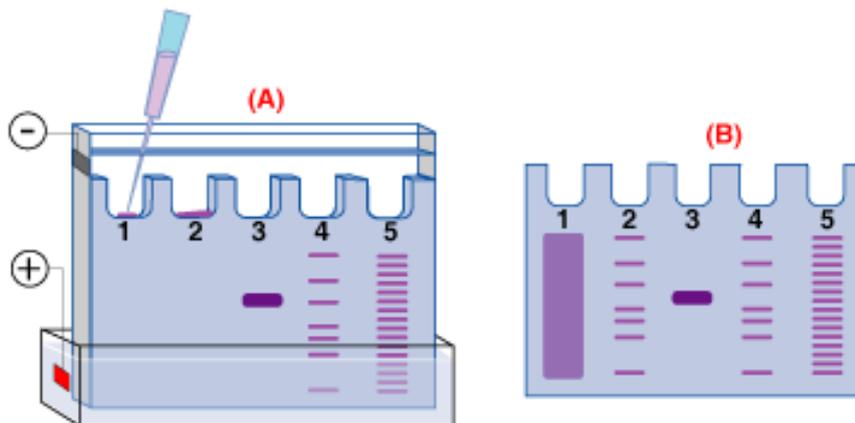
Macrométodo: Diluir el reactivo de color 1:5 con agua desionizada, y construir una curva patrón de 10 a 100 μ g de proteína (albúmina), ajustar el volumen de cada tubo a 100 μ l con el buffer apropiado. Preparar tubo blanco con el solvente, Agregar 5mL de la solución de color diluida, agitar y leer a 595 nm después de cinco minutos.

Micro método: Construir curva standard de 2 a 20 μ g de proteína, ajustar el volumen de los tubos a 800 μ l, y agregar 0.2 ml del reactivo de color concentrado, agitar y leer a 595 nm después de 5 minutos.

Las proteínas obtenidas se analizaron por Electroforesis en gel. (*Gel de SDS-Polyacrilamida.*) Se preparó el gel separador al 15% de acrilamida/bisacrilamida (30/0.8%) y se vertió en la placa de electroforesis, y se dejó polimerizar por 1 h. seguido se preparó el gel concentrador al 4% de acrilamida/bisacrilamida (30/0.8%) y se vertió en la placa de electroforesis, se colocó el peine formador de 10 pozos y se dejó polimerizar 30 minutos, después se colocó el gel en la cámara de electroforesis (marca Biorad) la cual contiene la solución reguladora de corrida 1x y se colocaron las muestras en los carriles del gel, así como un marcador de pesos moleculares preteñido (marca Biorad) o el marcador de pesos moleculares Mark 12 (Invitrogen,

LC5677), posterior el gel se corrió a un voltaje de 10mA y se detiene justo antes de que se salga el frente de migración. Para identificar a cada una de las proteínas (cc10, SPA, SPD) se realizó Western blot. Las proteínas antes mencionadas una vez separadas en una membrana de soporte, se cortó una hoja de papel de nitrocelulosa y cuatro hojas de papel filtro absorbente (Whatman 3MM o su equivalente) al tamaño del gel, se pasó la membrana cuidadosamente por metanol, después por agua y finalmente se dejó en el buffer de transferencia, humedeció el papel filtro con el buffer de transferencia, y se sumergió el gel, la membrana, el papel filtro, y los cojines de soporte en el buffer de transferencia para asegurar que habían sido completamente empapados. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente, en agitación.

Figura 2. Electroforesis en gel.



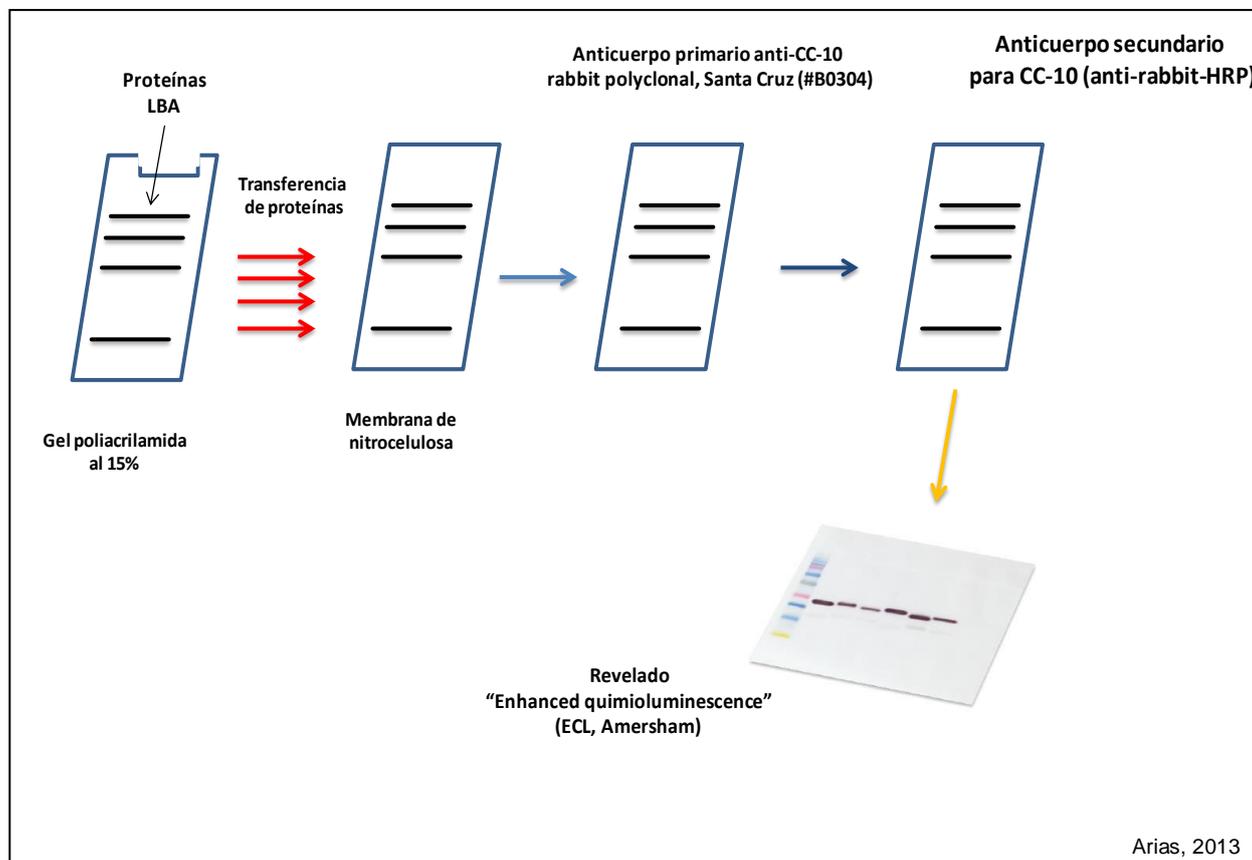
Arias, 2013

De las proteínas que se obtuvieron se analizaron por medio de Calorimetría diferencial de barrido (CDB). Los experimentos calorimétricos, se llevaron a cabo en un Micro calorímetro VP-DSC de MicroCal conectado a una computadora que contiene un sistema automático de recolección de datos.

La calorimetría es quizás el único método para determinar directamente los parámetros termodinámicos de una molécula y su patrón de desnaturalización. Los parámetros termodinámicos obtenidos de la desnaturalización de una molécula en condiciones experimentales determinadas son características específicas de la

misma, características que la distinguen de otras moléculas y dependen de su peso molecular y su conformación.

Figura 3. Identificación de cc10 por inmunoblot.



La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución, cuyo objetivo es la separación de mezclas de proteínas altamente complejas, que para cada una de las proteínas (cc10, SPA, SPD) se analizaran específicamente y este se basa en la separación secuencial de las proteínas por dos criterios físicos. En primer lugar las proteínas son separadas en un gel con gradiente de pH en condiciones desnaturalizantes de acuerdo con su punto isoeléctrico (isoelectroenfoque). Tras esta separación por carga las proteínas son separadas de acuerdo con su masa molecular por electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Tras la tinción del gel las proteínas aparecen formando manchas circulares (spots).

Las células son lisadas en un medio fuertemente desnaturalizante y el extracto es sometido a isoelectroenfoque (IEF).

Para el IEF se incubó la muestra resuspendida en solución de rehidratación en la tira de pH 3-10 (Immobiline DryStrip gels, Amersham) toda la noche, se colocaron las tiras en el equipo de isoelectroenfoque (IPGPhor, Amersham) y se realizó la corrida para que migraran las proteínas de acuerdo a su punto isoelectroenfoque, después de la corrida se pudieron guardar a -70 °C en una bolsa de plástico.

Tras una etapa de equilibración/reducción/alquilación el gel de isoelectroenfoque es colocado sobre un gel de poliacrilamida y sometido a SDS-PAGE. Las proteínas pueden ser detectadas por varios métodos de diferente sensibilidad, aplicabilidad y complejidad técnica. Los geles son escaneados y las imágenes obtenidas, llamadas mapas bidimensionales, son analizadas mediante software especializado de análisis densitométrico.

El Objetivo de la utilización de Cromatografía de Gases es que es una técnica que nos facilitara identificar todo tipo de ácidos grasos y fosfolípidos presentes en las muestras, donde se el fundamento principal es que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, la elusión se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte, se utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un gas inerte. La aplicación fundamental de este equipo es que tiene la capacidad de resolver (separar) mezclas orgánicas complejas de sistemas bioquímicos, se puede determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra.

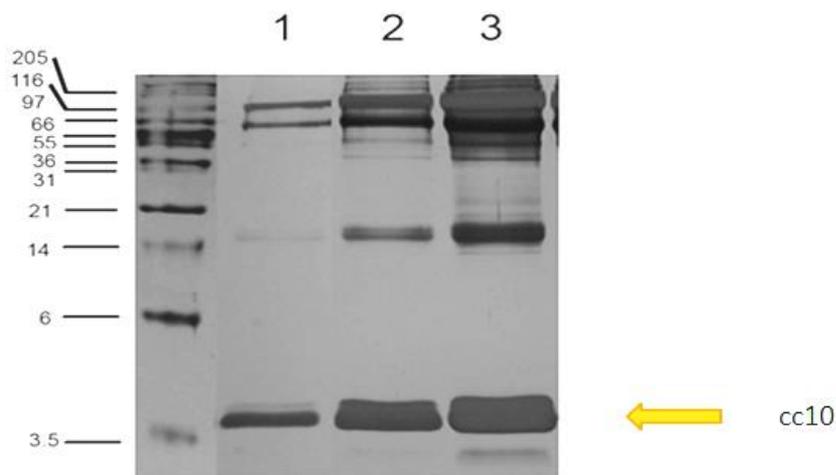
Para la Extracción de ARN es necesario cultivar las células, Lizar las células con 1ml con reactivo Trizol. Resuspender el lizado celular cuidadosamente con pipeta, Incubar el homogenizado por 5 minutos entre 15 y 30°C adicionar 0.2 ml de cloroformo por ml de Trizol (en tubos Eppendorf con tapa de seguridad), agitar los tubos vigorosamente por 15 segundos e incubar entre 15 y 30°C por 2 o 3 minutos. centrifugar las muestra a no más de 12,000g por 15 minutos a 2 o 8°C. transferir la fase acuosa superior a tubos nuevos, precipitar el ARN de la fase acuosa mezclando con 0.5 ml de alcohol isopropílico. Incubar las muestras a 15 o 30°C por 10 minutos y centrifugar a no más de 12,000g por 10 minutos a 2 o 8°C. El ARN precipita, después de la centrifugación,

formando una pastilla gelatinosa en la parte inferior del tubo, remover el sobrenadante. Lavar la pastilla del ARN una vez con al menos 1 ml de etanol al 75% (prepararlo usando agua libre de RNasa). Mezclar las muestras por agitación en vortex y centrifugar a no más de 7,500g por 5 minutos a 2 o 8°C. secar brevemente la pastilla de ARN (aire seco o con vacío por 5-10 minutos), no secar el ARN por centrifugación con vacío. Es importante no secar completamente la pastilla de ARN porque disminuye considerablemente su solubilidad, disolver el ARN en agua libre de RNasa o en una solución de 0.5% de SDS, resuspendiendo suavemente con pipeta, e incubar por 10 minutos a 55 o 60°C. Este se almacena para su uso en RT-PCR y PCR.

Una vez terminada la migración de las proteínas en el gel, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa para hacer el Western Blot, identificando la proteína cc10 en el gel de poliacrilamida. A continuación se muestra un ejemplo de identificación de proteína cc10:

Figura 4. Ejemplo de Identificación de proteína cc10 en 3 neonatos.

Proteínas totales en Aspirados bronquioalveolares de neonatos humanos con SDR



Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%

Arias, 2013

4) Una vez obtenida la concentración de proteína cc10 en aspirados bronquioloalveolares se realizó la comparación entre las muestra obtenidas. Posteriormente se analizó la base de datos para relacionar las características clínicas de los pacientes.

PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La tesis es un proyecto de investigación básica en el cual se utilizó:

1. Modelo descriptivo (promedios, desviación estándar, medias) para mencionar los niveles de proteína cc10 en los recién nacidos.

Según lo antes descrito tendremos dos grupos de estudio:

- Pacientes con niveles de cc10 similares en las dos mediciones y que no presentan progresión a DBP, con soporte respiratorio óptimo.
- Pacientes con niveles de cc10 menores en la segunda medición y que presentan progresión a DBP.

2. Modelo analítico en el cual mediante T de student para muestras independientes y ANOVA para análisis de un factor politómico se relacionará las concentraciones obtenidas de proteína cc10 y las variables de la base de datos, con el fin de establecer probables asociaciones entre la presencia de una variable y el nivel de proteína cc10.

Al utilizar ANOVA de un factor se ajusta a comparaciones múltiples post hoc con los métodos de Bonferroni y Scheffe buscando un valor alfa de 0.05, identificándose a su vez relaciones sin significancia estadística que pudieran adquirirla si se incrementa la muestra analizada.

Cabe la pena mencionar que la presente tesis es el estudio inicial del protocolo para captación de un mayor número de muestras con el fin de lograr una muestra significativa y asociaciones con validez externa.

VARIABLE INDEPENDIENTE	Tipo de Variable	Descripción conceptual	Definición operacional	Unidad de medida
Vía de nacimiento	Cualitativa nominal	Sitio de nacimiento del recién nacido	Parto Cesárea	-
Peso al nacer	Cuantitativa continua	Peso del recién nacido al nacimiento	Peso adecuado Bajo peso (1500-2500) Muy bajo peso (1500-2500) Extremado bajo peso (-1000)	Gramos
Restricción del crecimiento intrauterino	Cualitativa ordinal	Presencia de peso y talla por debajo de p10 y perímetro cefálico por debajo de p3	Sí No	-
Ministración de surfactante profiláctico	Cualitativa ordinal	Ministración de surfactante posterior a nacimiento antes de presencia de síntomas de SDR	Sí No	-
Reaplicación de surfactante	Cualitativa Ordinal	Ministración de surfactante por segunda/tercera vez	Sí No	-
Presión inspiratoria pico	Cuantitativa discreta	Presión inspiratoria máxima utilizada por el ventilador	12 a 30	cmH2O
Fuga aérea	Cualitativa ordinal	Presencia de neumotórax, neumopericardio, neumomediastino o neumoperitoneo corroborado por imagen	Sí No	-
Atelectasia	Cualitativa ordinal	Presencia de datos radiográficos de colapso alveolar	Sí No	-
Hemorragia intraventricular	Cualitativa ordinal	Diagnóstico por USG transfontanelar de HIV según Papille	Sí No	-
Apnea	Cualitativa ordinal	Cese de respiración por 20 segundos o por menos tiempo acompañado de cianosis o bradicardia	Sí No	-

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.

Tabla 1. Variables.

VARIABLE DEPENDIENTE	Tipo de Variable	Descripción conceptual	Definición operacional	Unidad de medida
Proteína cc10	Cuantitativa continua	Concentración de proteína cc10 en aspirado bronquioloalveolar	Menor de 500 De 500-1000 Más de 1000	Mcg/ml

VARIABLE INDEPENDIENTE	Tipo de Variable	Descripción conceptual	Definición operacional	Unidad de medida
Control prenatal	Cualitativa ordinal	Realización de una consulta prenatal mensual y un USG obstétrico por trimestre por personal calificado	Adecuado No adecuado	-
Esteroides prenatales	Cualitativa ordinal	Aplicación de esteroide prenatal IM previo al nacimiento	Sí No	-
Corioamionitis	Cualitativa ordinal	Presencia de criterios de Gibbs para diagnóstico	Sí No	-
Preeclampsia	Cualitativa ordinal	Criterios de Grupo de Trabajo del Programa Nacional de Educación en Presión Arterial y ACOG para diagnóstico	Sí No	-
Diabetes gestacional	Cualitativa ordinal	Criterios Diagnósticos de Academia Americana de Diabetes	Sí No	-
Edad gestacional	Cuantitativa discreta	Duración del embarazo desde el inicio de la última menstruación hasta el nacimiento	Pretérmino Término	SDG
Género	Cualitativa nominal	Característica que define al hombre y a la mujer	Masculino Femenino	-

VARIABLE INDEPENDIENTE	Tipo de Variable	Descripción conceptual	Definición operacional	Unidad de medida
Persistencia conducto arterioso significativo	Cualitativa ordinal	Criterios clínicos y por ecocardiograma de conducto arterioso hemodinámicamente significativo	Sí No	-
Uso de aminas (dopamina + 5mcgkgmin)	Cualitativa ordinal	Uso de apoyo aminérgico con dopamina	Sí No	-
Uso de xantinas	Cualitativa ordinal	Uso de metilxantinas	Sí No	-
Uso de antibióticos	Cualitativa ordinal	Uso de antibioticoterapia	Sí No	-
Creatinina al ingreso y segundo día	Cuantitativa continua	Valores de creatinina	0.1 a 2	mg/dl
Enfermedad renal aguda	Cualitativa ordinal	Presencia de oligoanuria, elevación de azoados	Sí No	-
Sodio al ingreso y segundo día	Cuantitativa continua	Niveles de sodio por laboratorio	125 a 155	mEq/ml
pH sanguíneo	Cuantitativa discreta	Potencial de hidrogeniones en gases sanguíneos	Menor 7.25 Mayor 7.25	pH
Displasia broncopulmonar	Cualitativa ordinal	Criterios de Bancalari según edad gestacional al nacer, días de vida y requerimiento de oxígeno	Sí (leve, moderada, grave) No	-
Muerte	Cualitativa ordinal	Cese de funciones vitales	Sí No	-

RESULTADOS.

Se obtuvieron 20 muestras para la realización de esta tesis según el procedimiento descrito en metodología, lo cual corresponde a 10 pacientes, con dos muestras por paciente.

La distribución de la población estudiada y sus características fueron las siguientes:

Tabla 2. Distribución de la población. (No. 10)					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Semanas Gestación	10	28.00	39.00	34.5	4.18644
Peso al nacimiento (g)	10	750.00	3250	2193	942.1369

El 50% de los pacientes estudiados (5 pacientes) fueron recién nacidos pretérmino (RNPT) y 50% recién nacidos de término. La distribución de género fue 1:1 masculino: femenino. De los recién nacidos el 40% presentaban peso adecuado para edad gestacional mientras el 60% presentaban un peso menor a los 2500g. La presencia de RCIU se documentó en el 50% de los pacientes.

En cuanto a las características prenatales el 60% de los neonatos tuvo un control prenatal regular con ministración de esteroides prenatales en el 20% de los neonatos obtenidos pretérmino. Las patologías maternas más frecuentemente encontradas fueron en un 40% (n=4) preeclampsia, seguida en 20% (n=2) de diabetes gestacional y 20% de corioamnionitis materna. La vía de nacimiento fue en un 50% por parto y 50% por vía abdominal.

En relación al tratamiento y evolución posterior al nacimiento se ministró surfactante profiláctico en el 20% (n=2) de los neonatos (40% de los RNPT) y de rescate en otro 20%, requiriendo estos 4 neonatos la administración de una segunda dosis del mismo.

La ventilación mecánica en la totalidad de los neonatos no presentó como consecuencia la presencia de fugas aéreas, se presentaron atelectasias en el 40% de los neonatos y la presión inspiratoria pico rebasó 17cmH₂O en el 60% de los

pacientes. Como ya había sido descrito en la metodología el 100% de los neonatos requirió intubación y ventilación mecánica por más de 7 días.

Dentro de las morbilidades que presentaron los neonatos se encuentran atelectasias con repercusión ventilatoria en un 40%, enfermedad renal aguda 30%, como las más frecuentes.

La incidencia de DBP en el grupo de estudio fue de 50% (n=5), presentándose en un 10% como DBP leve, 30% como DBP moderada y 10% como DBP grave, presentando la misma distribución que la reportada en la literatura.

Mediante la metodología comentada previamente se logró identificar los niveles de proteína cc10 en las 20 muestras de los 10 pacientes que constituyeron la muestra de la tesis encontrando los siguientes resultados:

Tabla 3. Niveles de proteína cc10 en aspirados bronquioloalveolares en pacientes con falla a la ventilación mecánica.

PACIENTE	NIVELES DE PROTEÍNA CC10		DBP	
	Muestra 1 (1d)	Muestra 2 (2d)		
1	891.48 mcg/ml	350.99 mcg/ml	SÍ	MODERADA
2	2327 mcg/ml	275.18 mcg/ml	NO	
3	4897 mcg/ml	1534 mcg/ml	NO	
4	346.82 mcg/ml	234.93 mcg/ml	SÍ	MODERADA
5	2130 mcg/ml	1325 mcg/ml	NO	
6	2840 mcg/ml	490.45 mcg/ml	NO	
7	362.81 mcg/ml	258.35 mcg/ml	SÍ	MODERADA
8	446.86 mcg/ml	473.65 mcg/ml	SÍ	LEVE
9	1630.56 mcg/ml	1732.76 mcg/ml	NO	
10	97 mcg/ml	119 mcg/ml	SÍ	GRAVE

Una vez obtenidos los valores de proteína cc10 en aspirados bronquiales se realizó el análisis estadístico con t de student y ANOVA de variables dicotómicas y politómicas para determinar si existe alguna relación entre las variables estudiadas, la disminución de proteína cc10 y la aparición de DBP. Las tablas en extenso se encuentra en anexo 2 y 3 y la discusión de estos resultados se realizará en el siguiente apartado.

DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son los obtenidos en 10 neonatos hospitalizados en la UCIN del Hospital Infantil de México que requirieron ventilación mecánica convencional y que presentaron falla a la misma, requiriendo apoyo ventilatorio por más de 7 días.

La distribución de la muestra fue homogénea presentando 50% de pacientes pretérmino y la misma relación de género (1:1).

La determinación de niveles de proteína cc10 mediante el método ya descrito fue exitosa en el 100% de los casos observando resultados interesantes. Si bien los niveles normales de proteína cc10 en los neonatos no se han establecido, con los niveles obtenidos en el presente estudio se observa una clara relación inversamente proporcional entre los niveles de proteína cc10 y la aparición de DBP. Cabe la pena mencionar que en el 80% de los neonatos existe diferencia entre los niveles obtenidos en la primer y segunda toma, esta última al séptimo día de encontrarse sometidos a ventilación mecánica, con valores inferiores a los obtenidos en la primera toma. Así mismo la tabla 3 resalta los niveles más bajos de proteína cc10 en la primera toma (primer día de ventilación mecánica) que presentan los pacientes que desarrollaron DBP comparado con los que no la desarrollaron.

Al realizar análisis para variables independientes y multivariado encontramos los siguientes puntos clave sobre los que debe continuarse esta investigación.

El análisis ANOVA (post hoc) de los niveles de proteína cc10 con todas las variables ya mencionadas arrojó los siguientes resultados importantes:

- Asociación con significancia estadística entre niveles bajos de proteína cc10 con el uso de dopamina (p 0.021), niveles de sodio altos al segundo día de vida (p 0.56) y poliuria segundo día de vida (p 0.44), pérdida de peso a los 7 días mayor al 15% (p 0.55) y DBP (p 0.006). Lo cual sugiere que estados

hipovolémicos y requerimiento de dopamina tienen una influencia negativa en los niveles de proteína cc10 y confirma la asociación de niveles bajos y aparición de DBP.

- Al analizar las siguientes variables dicotómicas con los niveles de proteína cc10 y DBP se encontró significancia estadística (p menor a 0.05) en la asociación con procesos inflamatorios pre y postnatales como Preeclampsia, RCIU, Apgar bajo a los 5 minutos (como reflejo de asfixia perinatal).

Es necesario continuar el estudio para intentar determinar los factores prenatales y perinatales que contribuyeron a los niveles más bajos de proteína cc10 al momento de la intubación en pacientes que desarrollaron DBP y los factores que influyeron en la disminución posterior de estos niveles en el 80% de los neonatos en la segunda toma a los 7 días de ventilación mecánica, siendo necesario establecer el daño pulmonar que conlleva en sí la ventilación invasiva en el neonato.

En la presente tesis no se valoró la posible relación entre diversos modos de ventilación invasiva (controlado por presión o controlado por volumen), la presencia de DBP y los niveles de cc10, lo cual constituye un amplio campo de oportunidades y generación de conocimiento.

Así mismo la asociación de procesos inflamatorios tanto a nivel fetal como postnatal a nivel sistémico presentan valores cercanos a la significancia estadística por lo que con una mayor muestra debe de valorarse la posible relación que puede existir entre procesos inflamatorios sistémicos pre y postnatales y la posterior disminución de proteína cc10 y aparición de DBP.

CONCLUSIÓN.

Las propiedades antiinflamatorias de la proteína cc10 en el epitelio del tracto respiratorio se encuentran ampliamente descritas en la literatura.

Con la presente tesis se logró determinar los niveles de proteína cc10 en 10 neonatos sometidos a ventilación mecánica invasiva con falla a la misma (7 días de ventilación), observando niveles menores de proteínas cc10 en aquellos pacientes que presentaron posteriormente DBP. Así mismo la relación entre niveles de proteína cc10 y gravedad de la DBP fue inversamente proporcional, lo cual sugiere la gran importancia que tiene esta proteína en la mediación de la respuesta inflamatoria en las vías aéreas inferiores, pudiendo contribuir la pérdida de este efecto antiinflamatorio en el desarrollo posterior de DBP.

Debido al tamaño de la muestra del presente estudio no es posible afirmar asociación estadísticamente significativa entre procesos inflamatorios pre y postnatales en el neonato que conlleven a niveles bajos de proteína cc10 y por lo tanto aparición de DBP sin embargo existen posibles asociaciones ya descritas que deberán ser estudiadas en la segunda fase de este protocolo con el fin de, al contar con una muestra mayor (alfa 0.05), poder establecer asociaciones estadísticamente significativas.

La incidencia de DBP en las últimas dos décadas permanece igual según lo publicado por la Red Vermont Oxford en el 2009, con una incidencia de 23% aproximadamente. La posible asociación entre niveles bajos de proteína cc10 y aparición de DBP abre un nuevo campo de estudio en la Neonatología con el fin de ofrecer nuevos tratamientos para evitar el desarrollo de DBP.

BENEFICOS Y EXPECTATIVAS DEL ESTUDIO.

Al ser un proyecto de investigación básica novedoso se realizó un método adecuado para cuantificar las concentraciones de proteína cc10 en aspirados bronquiales de neonatos.

Al tratarse de la primera fase de un estudio para identificar los niveles de proteína cc10 en pacientes recién nacidos con soporte respiratorio prolongado y la posible relación con progresión a DBP, este estudio se realizará en un solo Hospital por lo que el número de pacientes y por lo tanto muestras que se analizarán será pequeño, pudiendo limitar el poder del estudio, teniendo contemplada una segunda parte del estudio en la cual se triplicará el número de muestras y se volverá a analizar la posible asociación entre los niveles de proteína cc10, características clínicas del paciente y presencia de Displasia broncopulmonar.

En modelos animales, principalmente de cordero, se ha utilizado la suplementación de proteína cc10 exógena para impedir la progresión a DBP y disminuir los días de soporte ventilatorio por lo que en un futuro se planea continuar este estudio y analizar la posibilidad de esta ministración exógena en neonatos.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

Al contar con una muestra pequeña de aspirados bronquiales el poder del estudio y su posibilidad de validez externa es bajo por lo que se considera esta tesis como la primera parte del protocolo de estudio de asociación entre proteína cc10 y DBP. Se hace un análisis descriptivo de lo observado, sin poder asegurar, en múltiples observaciones, la asociación con DBP por lo que un mayor número de muestra es necesario para obtener significancia estadística. Así mismo se valorará la posibilidad de realización en forma multicéntrica para evitar la toma de muestras y análisis de pacientes únicamente de tercer nivel de atención de salud.

ASPECTOS ÉTICOS.

El presente estudio se apega a los principios éticos expuestos en la Declaración de Helsinki para la Investigación Médica en donde participen sujetos humanos. No representó ningún riesgo para el estado de salud del paciente y las muestras que se obtuvieron para realizarlo se tomaron en las mismas aspiraciones del tubo endotraqueal que se requirieron para el tratamiento regular de los pacientes.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Nº	ACTIVIDAD												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Planteamiento del problema, establecimiento de metodología.							X					
2	Obtención de material								X				
3	Obtención de muestras (20).									X	X	X	
4	Envío de muestras al INPer para identificación de proteínas.												X
5	Obtención del segundo kit de muestras (20).				X								
6	Envío de muestras al INPer para análisis e identificación de proteínas. (EN PROCESO)					X							
7	Análisis estadístico y resultados.					X							
8	Entrega de tesis.					X							

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- (1) Broeckaert F, Clippe A, Knoop B, Hermans C, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;923:68-77. Review.
- (2) Beth N. Shashikant,¹ Thomas L. Miller,^{1,2} Richard W. Welch Dose response to rhCC10-augmented surfactant therapy in a lamb model of infant respiratory distress syndrome: physiological, inflammatory, and kinetic profiles, *J Appl Physiol* 99: 2204–2211, 2005.
- (3) Singh G, Katyal SL, Brown WE, Kennedy AL, Singh U, Wong-chong ML. Clara cell 10 kDa protein (cc10): comparison of structure and function to uteroglobin. *Biochim Biophys Acta.* 1998 6;1039(3): 348-55.
- (4) Carlomagno T, Mantile G, Bazzo R, Miele L, Paolillo L, Mukherjee AB, Barbato G, Resonance assignment and secondary structure determination and stability of the recombinant human uteroglobin with heteronuclear multidimensional NMR. *J Biomol NMR* 1997; 1:35-46.
- (5) Mantile GL, Miele E, Cordella-Miele G, Singh S, Katyal and Mukherjee. Human Clara cell 10 Kda protein in the counterpart of rabbit uteroglobin. *J Biol Chem.* 1993; 27:20343-20351.
- (6) Pieri A, Dibin NH, Dhanireddy R, Mukherjee AB. Uteroglobin gene expression in the rabbit uterus throughout gestation and in the fetal lung. Relationship between uteroglobin and eicosanoid levels in the developing fetal lung. *J Clin Invest* 1995; 96:343.53.
- (7) Shijub N, Itoh Y, Yamaguchi T, Shibuya Y, Morita Y, Hirasawa M, Okutani R, Kawai T and Abe S. Serum and BAL Clara cell 10 kDa protein (CC10) levels and

- CC10-positive bronchiolar cells are decreased in smokers. *Eur. Respir. J.* 1997; 10:1108-1114.
- (8) Bernard A, Marchandise F, Depelchin S, Lauwers R, and Sibille Y. Clara cell protein in serum and bronchoalveolar lavage. *Eur. Respir. J.* 1992; 5:1231-1238.
- (9) Nomort H, Horio H, Fuyuno G, Kobayashi R, Morinaga S, Hirabayashi Y. Protein 1 (Clara cell protein) serum levels in healthy subjects and patients with bacterial pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1995; 152:746-750.
- (10) Arsalane K, Broeckaert F, Knoop B, Wiedig M, Toubreau G, Bernard A. Clara cell specific protein (CC16) expression after acute lung inflammation induced by intratracheal lipopolysaccharide administration. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:1624-1630.
- (11) Chabot S, Koumanov K, Lambeau G, Gelb MH, Balloy V, Chignard M, Whitsett JA, Touqui L. Inhibitory effects of surfactant protein a on surfactant phospholipid hydrolysis by secreted phospholipases A2. *J Immunol.* 2003 Jul 15;171(2):995-1000.
- (12) Geerts L, Jorens PG, Willems J, De Ley M, Slegers H. Natural inhibitors of neutrophil function in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2001 Oct;29(10):1920-4.
- (13) Linnoila RI, Szabo E, DeMayo F, Witschi H, Sabourin C, Malkinson A. The role of CC10 in pulmonary carcinogenesis: from a marker to tumor suppression. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;923:249-67. Review.
- (14) Haller T, Ortmayr J, Friedrich F, Völkl H, Dietl P. Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 17; 95(4): 1579-1584.

- (15) Speer, C.P. Chorioamnionitis, Postnatal factors and Proinflammatory Response in the Pathogenetic Sequence of Bronchopulmonary Dysplasia. *Neonatology* 2009;95:353–361.
- (16) Coalson Jaqueline, Pathology of Bronchopulmonary Dysplasia, *Semin Perinatol* 30:179-184, 2006.
- (17) Ramsay PL, DeMayo FJ, Hegemier SE, Wearden ME, Smith CV, and Welty SE. Clara cell secretory protein oxidation and expression in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 155–161, 2001.
- (18) Anne Greenough, Md, Steven Donn, Ventilatory support strategies accord to pathophysiology, *Clinics in Perinatology*, March 2007, 35-53.
- (19) Jobe AH and Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1723–1729, 2001.

ANEXOS.

ANEXO 1. TABLAS DE FRECUENCIAS.

Control Prenatal

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos Si	12	15.4	60.0	60.0
No	8	10.3	40.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Género

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos Masculino	10	12.8	50.0	50.0
Femenino	10	12.8	50.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Semanas de Gestación

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 28.00	2	2.6	10.0	10.0
29.00	2	2.6	10.0	20.0
30.00	2	2.6	10.0	30.0
32.00	2	2.6	10.0	40.0
36.00	2	2.6	10.0	50.0
37.00	4	5.1	20.0	70.0
38.00	2	2.6	10.0	80.0
39.00	4	5.1	20.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Vía de nacimiento

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos cesarea	10	12.8	50.0	50.0
Válidos vaginal	10	12.8	50.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Peso al nacimiento

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 750.00	2	2.6	10.0	10.0
900.00	2	2.6	10.0	20.0
1430.00	2	2.6	10.0	30.0
1500.00	2	2.6	10.0	40.0
2200.00	2	2.6	10.0	50.0
Válidos 2850.00	2	2.6	10.0	60.0
2900.00	2	2.6	10.0	70.0
3000.00	2	2.6	10.0	80.0
3150.00	2	2.6	10.0	90.0
3250.00	2	2.6	10.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

RCIU

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos No	10	12.8	50.0	50.0
Válidos Si	10	12.8	50.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Corioamnionitis

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos No	18	23.1	90.0	90.0
Válidos Sí	2	2.6	10.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Preeclampsia

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos No	16	20.5	80.0	80.0
Válidos Si	4	5.1	20.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Diabetes gestacional

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos No	18	23.1	90.0	90.0
Válidos Si	2	2.6	10.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Surfactante profiláctico

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos No	18	23.1	90.0	90.0
Válidos Si	2	2.6	10.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Surfactante de rescate

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos No	18	23.1	90.0	90.0
Válidos Si	2	2.6	10.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Reaplicación de surfactante

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos No	16	20.5	80.0	80.0
Válidos Si	4	5.1	20.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Presión inspiratoria pico

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos Si	6	7.7	30.0	30.0
Válidos No	14	17.9	70.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Fuga aérea

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos No	20	25.6	100.0	100.0

Atelectasia

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos No	12	15.4	60.0	60.0
Válidos Si	8	10.3	40.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Apneas

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos No	14	17.9	70.0	70.0
Válidos Si	6	7.7	30.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Enfermedad renal aguda

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos No	14	17.9	70.0	70.0
Válidos Si	6	7.7	30.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

36SDGC o 56 dias DBP

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No	10	12.8	50.0	50.0
leve	2	2.6	10.0	60.0
Válidos moderada	6	7.7	30.0	90.0
severa	2	2.6	10.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

Pcc10

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
200-500	11	14.1	55.0	55.0
500-1000	2	2.6	10.0	65.0
Válidos mayor de 1000	7	9.0	35.0	100.0
Total	20	25.6	100.0	

ANEXO 2. PRUEBA ANOVA PARA ANÁLISIS DE VARIABLE POLITÓMICA DBP.

		F	Sig.
Cpn	Inter-grupos	1.318	.294
	Intra-grupos		
	Total		
Gener	Inter-grupos	3.990	.038
	Intra-grupos		
	Total		
Sdg	Inter-grupos	1.507	.611
	Intra-grupos		
	Total		
vianac	Inter-grupos	8.544	.003
	Intra-grupos		
	Total		
pesonac	Inter-grupos	1.735	.206
	Intra-grupos		
	Total		
estpren	Inter-grupos	7.367	.005
	Intra-grupos		
	Total		
nacimien	Inter-grupos	7.367	.005
	Intra-grupos		
	Total		
RCIU	Inter-grupos	1.727	.208
	Intra-grupos		
	Total		
corioamnioitis	Inter-grupos	2.210	.140
	Intra-grupos		
	Total		
preeclam	Inter-grupos	10.540	.001
	Intra-grupos		
	Total		
diabges	Inter-grupos	2.210	.140
	Intra-grupos		
	Total		
surfprof	Inter-grupos	2.210	.140
	Intra-grupos		
	Total		
reaplicx	Inter-grupos	2.210	.140
	Intra-grupos		
	Total		
surfresc	Inter-grupos	.850	.445
	Intra-grupos		
	Total		
reaplic	Inter-grupos	.375	.693
	Intra-grupos		
	Total		
mas de 2 dosis de	Inter-grupos	.	.
	Intra-grupos		

Surfactante	Total		
	Inter-grupos	2.155	.147
PIP	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	1.318	.294
atelectasia	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	.241	.789
hivgradados	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	2.155	.147
	Intra-grupos		
apneas	Total		
	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	39.100	.000
dopamina	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	2.155	.147
xantin	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	.850	.445
amikacina,va	Intra-grupos		
ncomicina	Total		
	Inter-grupos	.158	.855
1a creatinina	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	.753	.486
2a creat	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	.526	.600
1er sodio	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	.846	.446
2o sodio	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	.483	.625
ira	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	7.663	.004
Pcc10	Intra-grupos		
	Total		
	Inter-grupos	2.210	.140
muerte	Intra-grupos		
	Total		

ANEXO 3. TABLA COMPARATIVA T DE STUDENT VARIABLES DICOTÓMICAS

Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		
	F	Sig.
ERA	259.200	.000
uresis 48h	24.000	.000
prim 24hrs	2.943	.103
perdida maxima de peso a los 7 días 15% pp	1.615	.220
hiperglicemia	100.800	.000
displasia broncopulmonatr	1.598	.222
estposnat	5.184	.035
primeras 24hrs de vida	100.800	.000
xantin	2.943	.103
amikacina,vancomicina	100.800	.000
apneas	2.943	.103
hivgrados	.244	.627
temprana	100.800	.000
atelectasia	.148	.705
reaplic	2.943	.103
horasaplic	5.184	.035
surfresc	5.184	.035
hora	100.800	.000
reaplicx	100.800	.000

surfprof	100.800	.000
diabges	100.800	.000
preeclam	24.000	.000
corioamnioitis	100.800	.000
nacimien	100.800	.000
estpren	100.800	.000
dopamina	.148	.705
diuresis prim24h	.062	.806
cpn	.713	.410
vianac	.713	.410
sdg	.130	.723
pesonac	.442	.514
1a creatinina	.074	.788
2a creat	19.001	.000
1er sodio	4.063	.059
2o sodio	.923	.349
Pcc10	.038	.848
gener	.713	.410
RCIU	.713	.410