



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

DETERMINACIÓN EN ASPIRADO BRONQUIAL DE PROTEÍNA
SECRETORA DE CELULAS CLARA (CC10) COMO FACTOR DE
RIESGO PREDICTOR DE FALLA A LA VENTILACIÓN MECANICA EN
NEONATOLOGÍA

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

NEONATOLOGÍA

P R E S E N T A

DRA. MARÍA ROSÍO TORRES SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ GUZMÁN BARCENAS

Febrero 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO


DR. JOSÉ GUZMÁN BARCENAS
ASESOR DE TESIS


DR. JOSÉ GUZMÁN BARCENAS
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE NEONATOLOGÍA

DEDICATORIA

A Dios por iluminarme y guiar mis pasos a esta Institución de Salud que me ha permitido llegar a cumplir una de mis más grandes metas en mi vida y ver realizado el sueño de asistir y procurar a los recién nacidos que representan el inicio de una gran aventura en la vida de ellos.

En especial a mis profesores de la Unidad de Cuidados Intensivos: Dr. José Guzmán Barcenas, Dr. Daniel Ibarra Ríos, Dra. Dina Villanueva, Dra. Edna Vázquez, Dra. Michelle Segundo a quienes agradezco la oportunidad que me brindaron de realizar la subespecialidad en neonatología en esta unidad a su cargo, haciéndome una persona disciplinada, responsable, y sobre todo a desarrollar una actitud de duda ante el manejo de los neonatos y pensar que puede existir algo más allá de lo aparentemente evidente. Así como todos los conocimientos adquiridos tanto en la práctica y académicamente.

Un reconocimiento y respeto a mis compañeras y amigas de generación Tere y Susy a quienes agradezco el hecho de brindarme su amistad y el haber aprendido de cada una de ellas su optimismo, su tenacidad, su entrega y su disciplina. Así mismo, una mención muy especial a mis amigos Dr. Toño, Dra. Claudia, Dra. Ivonne, Dra. Ale, Dra. Marce quienes me inculcaron la entrega, la disciplina y el gran amor que los recién nacidos requieren para su atención y manejo integral.

A todo el personal de enfermería que nos apoyan y se vuelven nuestras cómplices y compañeras en esas horas de trabajo y de angustia, además de transmitirnos sus conocimientos y entrega en el cuidado del recién nacido y esa actitud de protección en cada uno de ellos.

A mi familia en especial a mi mamá Sra. Cecilia Sánchez, mi papá Sr. Luis Torres y mis hermanos María del Consuelo, Silvia, Juan Luis, J. Guadalupe, Francisco Javier y Gustavo porque me han apoyado de una manera muy especial convirtiéndose en mis cómplices en esta aventura que inicie hace dos años y que me ha servido para no desistir y quebrantarme para lograr este sueño. A mis sobrinos que tanto amo Isabella Michelle, Francisco Alejandro y José Miguel porque en ellos veo reflejada la vida, el entusiasmo y las oportunidades que pueden llegar a tener los recién nacidos a nuestro cargo al brindarles una atención óptima y de calidad.

Por último y no menos importante un agradecimiento a todo el personal que colabora para que todo lo encaminado al cuidado y bienestar de los

neonatos se pueda lograr de manera exitosa, en especial a Srita. Lucy, Srita. Oli, Srita. Carmelita y Ceci de Trabajo Social.

ÍNDICE.

1.- ANTECEDENTES.....	7
2.- MARCO TEÓRICO.....	8
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	16
5.- JUSTIFICACIÓN.....	17
5.- OBJETIVOS.....	18
7.- METODOLOGÍA.....	19
8.- PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
9.- DESCRIPCION DE VARIABLES.....	27
9.-RESULTADOS.....	30
10.- DISCUSIÓN.....	34
11.- CONCLUSIÓN.....	37
12.- BENEFICIOS Y ESPECTATIVAS DEL ESTUDIO.....	38

13.-LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	39
12.- ASPECTOS ÉTICOS.....	40
13.- CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	41
14.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

ANTECEDENTES

Resulta imposible en la actualidad el mantenimiento de la vida de un paciente crítico sin el empleo de la Ventilación Mecánica (VM). Esta tiene el papel de sustituir la respiración del enfermo durante todo el tiempo necesario para que su sistema respiratorio sea capaz de hacerlo por sí sólo, manteniendo un adecuado intercambio de gases que asegure la oxigenación correcta de los tejidos y evite la retención de dióxido de carbono (CO₂). ⁽¹⁾

El cambio que produce la ventilación mecánica en la fisiología normal del sistema respiratorio implica el desarrollo de efectos indeseables, como repercusión hemodinámica y renal que hacen más complicado el manejo del enfermo. Es por ello, que se hace el esfuerzo en suspender la ventilación tan pronto el paciente sea capaz de mantener una respiración espontánea: “destete”. Esto se lleva a cabo en más del 77% de los pacientes en un período de alrededor de las 72hrs; sin embargo, existe un grupo de enfermos de entre el 9 y el 20% según diversas series en que la separación del ventilador se produce con dificultades serias que requieren el uso de diversas estrategias para lograr este objetivo. ⁽¹⁾

De acuerdo al criterio de algunos autores, la duración de la VM influye considerablemente en el destete por lo cual la dividen en dos grupos:

a).- VM de corta duración: aquella que se mantiene por períodos inferiores a siete días, se ve en enfermos sin afecciones pulmonares previas y tiene buena respuesta al destete que generalmente se produce en 72 horas.

b).- VM prolongada: tiene duración mayor a siete días, se ve en pacientes con afecciones pulmonares previas, en el curso de IRA severas como neumonías extensas, enfermedades neuromusculares, etc. En ellos el destete resulta más difícil y depende mucho de las condiciones clínicas del paciente.

Lo anterior ha obligado al estudio constante de los elementos fisiopatológicos de la insuficiencia respiratoria aguda (IRA) y el empleo de una serie de estudios clínicos y de laboratorio que han transformado el “arte” del destete en la “ciencia de la liberación”. ⁽¹⁾

MARCO TEORICO

Con el advenimiento de la asistencia mecánica ventilatoria en el neonato y las complicaciones posteriores al uso de estos instrumentos se han realizado diversos estudios como el realizado en el Centro Médico Nacional Siglo XXI con la finalidad de determinar los factores predictores de falla en la extubación en recién nacidos de pretérmino (RNPT) de 28-36 semanas de edad gestacional, se consideraron criterios clínicos y algunos de laboratorio de fácil acceso y al alcance de cualquier clínico que este en contacto con este grupo de pacientes. El estudio se llevó a cabo del 1º. de Septiembre al 31 de Diciembre del 2004. El estudio fue prospectivo de casos y controles anidados en una cohorte con los RNPT internados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Servicio de Neonatología de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital General Dr. Gaudencio González Garza del Centro Médico Nacional La Raza que cumplieron los criterios de inclusión. De acuerdo con el tamaño de la muestra, se formaron dos grupos: grupo A (casos) con RNPT que tuvieron falla en la primera extubación y un grupo B (control) con RNPT que no tuvieron fallas. Se seleccionaron RNPT de 28-36 semanas de edad gestacional (al nacer o corregidas) por el método de Capurro (de acuerdo con lo anterior, la edad extrauterina podía ser mayor a 28 días) que hubieran estado con asistencia mecánica ventilatoria durante 24 horas por lo menos y cuyos padres habían aceptado el ingreso de sus hijos al estudio. De acuerdo a resultados obtenidos en el estudio se concluyó que hay diversos factores predictores de falla a la extubación como son: un aporte calórico menor a 100 calorías/Kilogramo (Kg) de peso /día, Presión Media de la Vía Aérea (PMVA) en el ventilador mayor a 4.5 cm de Agua (H₂O). Además de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis bivariado, habrá que valorar en ese momento una extubación planeada en un paciente no menor de 1,200 gramos (g) de peso, corregir la anemia cuando sea menor de 12 g/dL, no extubar con parámetros ventilatorios de riesgo como Presión Inspiratoria Pico (PIP) \geq 14 cm H₂O, mantener oxemias iguales o mayores a 60 mmHg antes de la extubación, iniciando ciclo de esteroides y tratando el conducto arterioso significativo cuando exista y, por último, dar el tratamiento adecuado a las atelectasias postextubación cuando estén presentes. ⁽¹⁾

Otro estudio en el que intervino el servicio de Neonatología, Servicio de Endoscopia, UMAE Hospital General Dr. Gaudencio González Garza del Centro Médico Nacional La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social

(IMSS), la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, División de Evaluación de la Investigación, Coordinación de Investigación en Salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; en el cual nuevamente el objetivo fue determinar los factores que predicen la falla en la extubación de RNPT de 28 a 36 semanas de edad gestacional en dos o más ocasiones. Se consideró falla en la extubación cuando dentro de las primeras 72 horas de haberse extubado al paciente, hubo necesidad de reintubarlo, independientemente de la causa que lo originó. Durante el período de Septiembre a Diciembre del 2004 se incluyeron retrospectivamente a todos los RNPT que estuvieron internados en un hospital de tercer nivel que cumplieron con los criterios de inclusión (estudio previo realizado en 2004 donde sólo se tomó en cuenta la primera falla a la extubación) y en forma retrolectiva a los pacientes de Enero a Octubre del 2006 del mismo hospital. Se formaron dos grupos: A (casos con falla en la extubación en dos o más ocasiones) y el B (controles) falla en la extubación en una sola ocasión. En el análisis multivariado se encontró asociación como factores predictores para falla antes de la segunda extubación a la presencia de atelectasias postextubación con un OR (razón de momios) de 19.2 e intervalo de confianza (IC) al 95% de 3.1-117 (P de 0.001) y al índice de oxigenación (IO₂) con un valor >2, OR de 5.3, IC al 95% de 1.3-21.4 (P de 0.02). En la broncoscopia realizada únicamente a cinco pacientes cuatro del grupo A (19%) y uno en el B (5%) sin diferencia estadísticamente significativa (p de dos colas de 0.34). En el primer caso se reportó estenosis del bronquio izquierdo, en el segundo estenosis del bronquio principal derecho, en el tercero endobronquitis moderada, en el cuarto estenosis del bronquio izquierdo y en el grupo B, el único paciente al cual se le practicó, mostró laringomalasia, endobronquitis severa, con tapón de moco en bronquio derecho y atelectasia secundaria, sin haber complicaciones en ninguno de los pacientes durante el procedimiento. Con el estudio anterior se concluye que es importante planear una extubación en un RNPT, máxime cuando ha habido ya una falla previa, y evitar en lo posible los factores predictores de falla en la extubación conocidos y comentados en el estudio previo y de acuerdo a este estudio, no extubar con un IO₂>2, y manejar intensivamente las atelectasias postextubación. Posterior al seguimiento de esos lineamientos y después de una segunda falla en la extubación, probablemente sea necesario pasar a broncoscopia si las condiciones del paciente lo permiten. ⁽²⁾

Sin embargo, existen otros determinantes biológicos llamados biomarcadores que son proteínas específicas del epitelio pulmonar y que de acuerdo a lo revisado en la literatura su determinación representa una evaluación en diferentes desordenes pulmonares. ⁽³⁾ El epitelio pulmonar es heterogéneo, a nivel de los conductos proximales de la vía aérea están cubiertos por un epitelio pseudoestratificado que es progresivamente reemplazado por una cubierta de células cuboidales en la parte más distal de la superficie pulmonar en el alveolo. Mientras que numerosos tipos celulares, incluyendo ciliadas, basales, en copa y células clara, están presentes a lo largo de la vía aérea, solamente células escamosas tipo I y cuboidales tipo II cubren la superficie alveolar. ⁽³⁾ La función primaria del pulmón, y del epitelio alveolar en particular, es proveer una superficie extensa para intercambio gaseoso. El epitelio pulmonar también juega un rol activo en el metabolismo de mediadores endógenos y agentes xenobioticos, tiene capacidad de regeneración y restauración de la vía aérea y función alveolar después de daño pulmonar. ³ Más allá de lo anterior, el epitelio pulmonar produce secreciones, tales como la cubierta mucosa, un agente activo de superficie (surfactante), así como una variedad de proteínas importantes para diversos tipos de defensa. ⁽³⁾

Las muestras de la capa líquida del epitelio por lavado bronquioalveolar (BAL) es la medición más común de estudio de las proteínas secretadas por el epitelio pulmonar y la investigación de sus cambios ocurridos en enfermedades pulmonares. Una de estas proteínas es la proteína secretora de células clara 16-KD (CC16, CC10, CCSP). Debido a que esta proteína es principalmente, si no exclusivamente, secretada dentro del tracto respiratorio, su presencia en el compartimento vascular puede ser solo explicada por filtración del pulmón hacia el torrente sanguíneo. ⁽³⁾

La determinación de esta proteína muestra variaciones en el suero de pacientes con diferentes enfermedades pulmonares y en sujetos expuestos a diversos tóxicos pulmonares. ⁽³⁾

La proteína de células clara está constituida por 70 subunidades de aminoácidos en orientación antiparalelo conectados por dos enlaces bisulfitos. 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. La función exacta in vivo de cc10 se desconoce, la evidencia ha aumentado

sobre el papel que juega como factor protector del tracto respiratorio contra la respuesta inflamatoria (Broeckaert, 2000) ⁽¹⁾. 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, personal expuesto al asbesto así como contaminantes aéreos como consecuencia de la destrucción de células Clara.

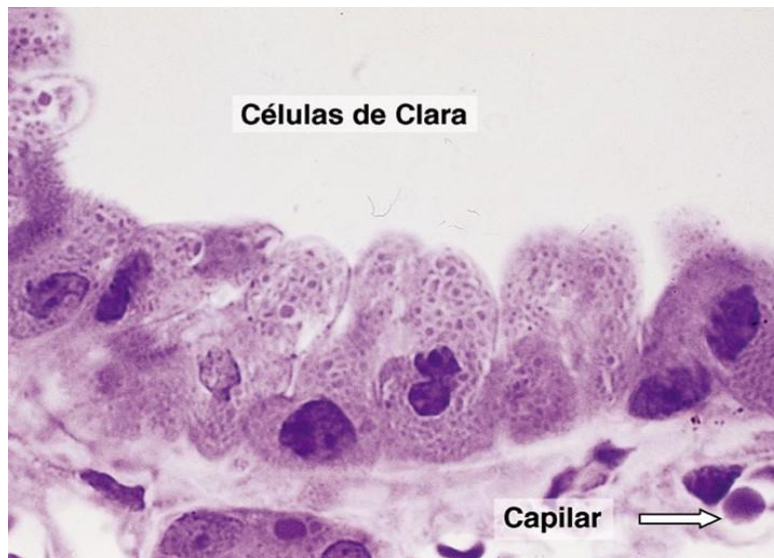


Figura 1.- Células Clara del bronquiolo que forman una especie de agente tensoactivo, además de regenerar el bronquiolo.

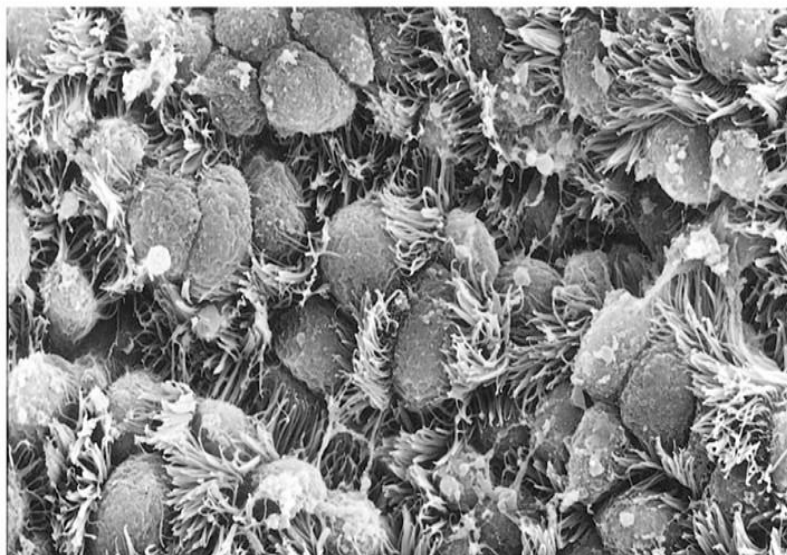


Figura 2.-Celulas de Clara y células cuboidales ciliadas de bronquiolos.

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⁾

Esta proteína ha sido estudiada en una extensa variedad de especies incluyendo ratas, ratones, conejos, perros y humanos.³ la producción de CC16 por células clara no ciliadas bronquiolares en humanos y roedores fue descrito en 1980 por Singh y colegas. Solo se detectó una mínima cantidad de CC16 en lavado bronquioalveolar, concluyendo que CC16 es un constituyente mínimo del aspirado bronquial, solamente 0.14% del contenido total de proteínas.⁽³⁾ En humanos el gen de la proteína CC16 ha sido localizado en el cromosoma 11, p12-q13, una región ocupada por genes involucrados en la regulación de la inflamación.⁽³⁾⁽⁴⁾

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⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾

La función exacta de CC16 es aún desconocida, pero hay una alta evidencia que juega un rol importante en inmunosupresión y antiinflamación a nivel pulmonar. CC16 ha mostrado una actividad de inhibición de fosfolipasa A₂ (PLA₂) una enzima clave en el fenómeno inflamatorio. Al inhibir PLA₂, CC16 podría también prevenir la degradación los fosfolípidos del surfactante pulmonar. Adicionalmente, CC16 puede inhibir la producción de interferón gama por células sanguíneas mononucleares y por tanto su capacidad de fagocitosis. El potencial rol de CC16 como un regulador de inflamación está apoyado por el sensible incremento en daño pulmonar inducido por hiperoxia o por ozono y una exagerada respuesta inflamatoria en ratones deficientes de CC16⁽³⁾. CC16 produce una inhibición dosis-dependiente de plaquetas-derivados de factores de crecimiento induciendo quimiotaxis de

fibroblastos pulmonares, y disminución en la disponibilidad de CC16 puede facilitar el reclutamiento de fibroblastos en desordenes fibrosos del pulmón. CC16 puede también jugar un importante rol en el aislamiento o aclaramiento de algunas sustancias toxicas depositadas en el tracto respiratorio. ⁽³⁾

Geerts, en 2001 ⁽⁷⁾ encontró una correlación en la concentración de la proteína cc10 (como inhibidor de la quimiotaxis de los neutrófilos) y angiogenina (como inhibidor de degranulación); así como Linnoila, 2000 ⁽⁸⁾, sugieren que cc10 tiene un papel importante en la carcinogenesis pulmonar como marcador de supresión tumoral debido a que se expresa inusualmente en células de pulmón humano a pesar de producirse abundantemente por las células de epitelio neoplásicas.

La disminución de CC16 es suero es un indicador del número e integridad de las células clara, un ejemplo de ello lo constituye la reducción que se ha encontrado del 15% respecto de la media de las concentraciones séricas de CC16 en pacientes fumadores de 10 cajetillas/año. También se han encontrado niveles séricos disminuidos en trabajadores asintomáticos con un funcionalismo pulmonar normal expuestos de forma crónica a sílice cristalina, polvos de fundiciones y humos metálicos procedentes de 9 soldaduras, así como en individuos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y cáncer de pulmón. ⁽⁹⁾

Por otra parte, el aumento de CC16 sérica permite constatar una alteración en la integridad de la barrera existente entre la sangre y la zona bronco-alveolar. De hecho se ha observado que una exposición aguda a humos provoca una elevación transitoria de dicha microproteína en suero debido a un incremento en la trasudación de CC16 procedente del tracto respiratorio al suero. En pacientes con síndrome de distress respiratorio del adulto también presentan una marcada elevación de la CC16 sérica, mostrando una grave alteración en la barrera sanguínea/broncoalveolar. ⁽⁹⁾

La determinación en aspirado bronquial de sujetos sanos, el rango en la concentración de CC16 fue de 0.5-1.5 mg/L, dependiendo del procedimiento usado para el lavado pulmonar. Esta concentración representa un promedio de 6.3% de lo de la albumina y un 2.3% del contenido total de proteínas en el lavado. Sin embargo, la concentración de CC16 en el lavado bronquial de sujetos sanos mostró una gran dispersión que no sólo es explicada por la

técnica de lavado bronquial, lo que sugiere que existe una variación entre individuos en la síntesis/secreción de CC16 en el tracto respiratorio. ⁽³⁾⁽⁴⁾

Una de las utilidades de la determinación de CC16 como marcador en humanos de daño pulmonar ha sido en casos de displasia broncopulmonar (DBP), usado como marcador biológico para la identificación temprana de los neonatos que posteriormente desarrollaran DBP, detectado en el aspirado traqueal, sangre y orina, limitado su valor en prematuros por la carencia de “valores normales”. El problema de estos estudios es que, en su mayoría, se realizan sobre un pequeño número de neonatos, por lo que se concluye en una revisión realizada en el 2009 por la Division of Pediatric Pulmonology, Connecticut Children’s Medical Center, Hartford, Connecticut, Estados Unidos, Division of Perinatal Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, Estados Unidos, que no existe al momento un marcador biológico “mágico” para la identificación temprana de los neonatos que posteriormente desarrollaran DBP. ⁽⁵⁾

Otro problema consiste en que la mayoría solo ha demostrado una asociación con la DBP. Para demostrar una relación causal, deben ser estudiados sobre modelos animales adecuados desde el punto de vista del desarrollo y sobre pulmones humanos con DBP y con otras patologías relacionadas con daño pulmonar generadoras de procesos inflamatorios. ⁽⁵⁾

Las propiedades inmunomoduladoras (función en la modulación de la inmunidad innata) y antiinflamatorias de la PCSC la hacen una candidata potencial para su uso en la prevención de la Enfermedad Pulmonar Crónica (EPC). La etiología de la EPC en lactantes prematuros es multifactorial. Los factores involucrados incluyen inmadurez pulmonar, restricción del crecimiento intrauterino, infección, estrés oxidativo, lesión pulmonar inducida por el respirador e inflamación intrauterina. La exposición del pulmón inmaduro a la hiperoxia, a la asistencia respiratoria mecánica y a la infección inician una cascada de las citosinas proinflamatorias que da lugar a inflamación pulmonar y lesión pulmonar crónica. Estos cambios inflamatorios se caracterizan por un infiltrado marcado de neutrófilos y macrófagos, necrosis y liberación de mediadores inflamatorios. Los lactantes con EPC también presentan una reducción de la capacidad antiinflamatoria que incluye la reducción en la producción de la proteína de células secretoras claras (PCSC). Los niveles de PCSC en los aspirados traqueales de los recién nacidos prematuros han mostrado ser dos a cuatro veces menores que en el

pulmón de los recién nacidos de término. Además la disminución en los niveles de PCSC en los aspirados traqueales de los lactantes prematuros con respiración asistida mostró estar correlacionados con el desarrollo de DBP. ⁽⁶⁾

Otro marcador bioquímico que juega un papel importante en el desarrollo de daño crónico pulmonar en el recién nacido (DBP) es el factor tensoactivo (surfactante) sintetizado por los neumocitos tipo II. Contiene una importante cantidad de fosfolípidos, siendo la fosfatidilcolina (lecitina) ⁽⁷⁾ el más abundante y responsable de la disminución de la tensión superficial.

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 (30.000-40.000) mientras que la SP-B y la SP-C son más pequeñas (5.000-18.000). La síntesis de fosfolípidos y las proteínas del surfactante está regulada por el pulmón a medida que avanza la gestación y se estimula mediante corticoides y otras hormonas.

MECANISMOS DE INMUNIDAD PULMONAR.

La integridad de las vías respiratorias depende 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. El componente celular natural del sistema inmunitario incluye fagocitos (neutrófilos o macrófagos), células agresoras naturales (basófilos, mastocitos, eosinófilos y otros). 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 contribuyen activamente al sistema inmunitario natural. Así la importancia del epitelio es contribuir a la defensa incluyendo la actividad de movimiento ciliar y la producción de quimosinas, citocinas, péptidos, inhibidores de la proteinasas y proteínas del surfactante (Speer, 2009) ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾. Al contar con estas propiedades inmunológicas constituye un mecanismo de defensa contra los agentes considerados como agresores de daño pulmonar crónico en los recién nacidos, contribuyendo a disminuir el riesgo de desarrollo de DBP.

MECANISMO FISIOPATOGENICO DE LA INFLAMACION EN DBP.

Hay evidencia del papel del proceso inflamatorio en los estadios iniciales de la DBP del neonato debido a un fallo en la regulación y control de la respuesta inflamatoria. Es un proceso en el que intervienen citocinas pro y antiinflamatorias, leucotrienos, prostaciclina y factor activador de plaquetas. En prematuros que desarrollan 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) ⁽¹⁰⁾. En condiciones de hiperoxia, reperfusión e inflamación se genera incremento de radicales libres que alteran el equilibrio oxidativo y generan daño de la membrana celular. El prematuro, en quien el sistema antioxidante suele estar ausente al nacimiento, tiene mayor riesgo de lesión si se somete a hiperoxia terapéutica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las células clara han sido identificadas como factor protector de la respuesta inflamatoria, dado que se ha comprobado la disminución en número celular como en su producción en los procesos inflamatorios crónicos, generando pérdida de su efecto antiinflamatorio. En RN no se ha establecido los niveles de proteína cc10, no así la disminución de la misma y por tanto de su efecto antiinflamatorio generando inestabilidad respiratoria, llevando con ello a prolongar el tiempo de soporte respiratorio.

JUSTIFICACIÓN.

Demostrar la utilidad de la proteína CC10 en aspirado bronquial como biomarcador de falla a la ventilación mecánica en etapa neonatal

Contribuir a ampliar el conocimiento sobre el papel que juega la proteína CC10 como factor antiinflamatorio y la utilidad que tiene como biomarcador en falla a la ventilación mecánica, considerando que hay pocos reportes en la literatura que correlacionan proteína CC10 y ventilación mecánica.

Se verán beneficiados los recién nacidos que presentan falla a la ventilación mecánica dado que el conocer la utilidad que tiene la proteína CC10 como factor antiinflamatorio en diversas patologías pulmonares puede generar que en un futuro se utilice como terapia de reemplazo exógeno en estos pacientes y considerarse como una opción de manejo para favorecer la disminución en la incidencia de falla a la ventilación mecánica y por consiguiente el desarrollo de DBP.

Los resultados podrán ser traslapados a recién nacidos que manifiestan falla a la ventilación mecánica por alguna patología respiratoria dado que el estudio no se limitará a alguna etiología determinada. Así mismo, podrá formar parte de las bases para generar la realización de más estudios que correlacionen proteína CC10 y falla a la ventilación mecánica en recién nacidos y desarrollo de DBP.

Demostrar los beneficios que representa la administración exógena de proteína cc10 considerando sus propiedades reconocidas en la inhibición de la inactivación del factor tensoactivo, su papel en la regulación de la respuesta inflamatoria ante el daño generado por la ventilación mecánica y al estímulo bioquímico de sustancia proinflamatorias.

OBJETIVOS

1).-GENERAL

Evaluar la utilidad de la determinación en aspirado bronquial de la concentración de la proteína CC10 como factor predictor de falla a la ventilación mecánica en recién nacidos, determinado en muestras de aspirado bronquial en dos tiempos diferentes al inicio de intubación orotraqueal y a los siete días de apoyo con soporte ventilatorio.

2).-ESPECIFICOS

2.1- Medir la concentración de proteína CC10 en secreción de aspirado bronquial en recién nacidos con falla a la ventilación mecánica.

2.2- Comparar los cambios en la concentración de proteína CC10 al día 1 y 7 de manejo con ventilación mecánica.

2.3- Analizar los cambios en la concentración de proteína CC10 y su correlación con falla a la ventilación mecánica.

METODOLOGÍA

TIPO DE INVESTIGACION: EXPERIMENTAL BÁSICA.

DISEÑO DEL ESTUDIO: DESCRIPTIVO, LONGITUDINAL, PROSPECTIVO.

MÉTODO:

1) Obtención de 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

CRITERIOS DE INCLUSION:

- a).- Recién nacido que amerita apoyo con intubación orotraqueal independientemente de la patología de base que origina el apoyo ventilatorio ingresado a sala de UCIN del Hospital Infantil de México Federico Gómez durante por lo menos 7 días.
- b).- Recién nacidos sexo masculino y femenino
- c).- Recién nacidos prematuros y de término
- d).- Edad cronológica menor a 28 días.
- e).- Necesidad de ventilación mecánica mínimo 7 días.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- a).- Recién nacidos en quienes se suspendió soporte ventilatorio con intubación orotraqueal antes de 7 días.
- b).- Recién nacidos fallecidos antes de cumplir 7 días de iniciado el soporte respiratorio con intubación orotraqueal.
- c).- Recién nacidos que ameriten apoyo con óxido nítrico durante los primeros 7 días de iniciado el soporte respiratorio con intubación orotraqueal

d).- Recién nacidos quienes hayan sido intubados orotraquealmente en instituciones de referencia fuera del Hospital Infantil de México Federico Gómez y no ser el primer día de apoyo respiratorio.

2) La obtención de muestras de aspirado bronquial se obtuvieron el día 1 y el 7 de intubación orotraqueal con equipo de aspiración y frasco de recolección especial para el estudio. La muestra fue rotulada con nombre y registro del paciente así como fecha de obtención. La muestra fue resguardada bajo refrigeración 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.

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.

Se realizó cultivo Primario de neumocitos de tipo II. (Haller, 1998)⁽¹⁰⁾, donde se aislaron células de epitelio pulmonar a partir de la muestra de aspirado bronquial. 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 0.1mM isobutylmetilxantina, 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 10⁶ células /por placa de 35 mm para uso de cultivos. Además, una parte de la suspensión se cultivó 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 o micro método.

Macro método: Diluir el reactivo de color 1:5 con agua desionizada, y construir una curva patrón de 10 a 100 de proteína (albúmina), ajustar el volumen de cada tubo a 100 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 g de proteína, ajustar el volumen de los tubos a 800, 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.

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 Micro Cal 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.

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 isoeléctrico, después de la corrida se pudieron guardar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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, Lisar las células con 1ml con reactivo Trizol. Resuspender el lisado 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 la 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.

4).- Una vez obtenida la concentración de proteína cc10 en aspirados bronquioalveolares 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, máximo y mínimo) para mencionar los niveles de proteína cc10 en los recién nacidos.

Según lo antes descrito tendremos dos grupos de estudio:

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

b).- Pacientes con niveles de cc10 menores en la segunda medición y que presentan progresión a DBP.

2. Modelo analítico (no paramétrico por las características de la población) 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.

VARIABLE DEPENDIENTE	TIPO DE VARIABLE	DESCRIPCION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	UNIDAD DE MEDIDA
Proteína cc10	Cuantitativa continua	Concentración de proteína cc10 en aspirado bronquioalveolar	- < de 500 - 500-1000 - > de 1000	mcg/ml

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.

Tabla 1. Variables.

VARIABLE INDEPENDIENTE	TIPO DE VARIABLE	DESCRIPCION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	UNIDAD DE MEDIDA
Control prenatal	Cualitativa ordinal	Realización de 1 consulta prenatal mensual y 1 USG obstétrico por trimestre por personal calificado	-Adecuado -No adecuado	-
Esteroides prenatales	Cualitativo ordinal	Aplicación de esteroide prenatal IM previo al nacimiento	-Si -No	-
Corioamnionitis	Cualitativa ordinal	Presencia de criterios de Gibbs para DX	-Si -No	-
Preeclampsia	Cualitativa ordinal	Criterios de Grupo de Trabajo del Programa Nacional de Educación en Presión Arterial y ACOG para diagnóstico	-Si -No	-
Diabetes gestacional	Cualitativa ordinal	Criterios Diagnósticos de Academia Americana de Diabetes	-Sí -No	-
Edad gestacional	Cualitativa discreta	Duración del embarazo desde el inicio de la última menstruación hasta el nacimiento	Pretérmino tardío	SDG
Genero	Cualitativa nominal	Característica que define al hombre y a la	-Masculino -Femenino	-

		mujer		
--	--	-------	--	--

VARIABLE INDEPENDIENTE	TIPO DE VARIABLE	DESCRIPCION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	UNIDAD DE MEDIDA
Vía de nacimiento	Cualitativa nominal	Modo de expulsión del RN del útero gestante	-Parto -Cesárea	-
Peso al nacer	Cuantitativa continua	Peso del RN al nacimiento	-Peso adecuado -Bajo peso (1500-2500) -Muy bajo peso (1000-1500) -Extremadamente bajo (<1000)	Gramos (gr)
Restricción del crecimiento intrauterino	Cualitativa ordinal	Presencia de peso y talla <p10 y perímetro cefálico <p3	-Si -No	-
Ministración de surfactante profiláctico	Cualitativa ordinal	Ministración de surfactante posterior a nacimiento antes de presencia de síntomas de SDR	-Si -No	-
Replicación de surfactante	Cualitativa ordinal	Ministración de surfactante pos segunda/tercera vez	-Si -No	-
Presión inspiratoria pico	Cuantitativa discreta	Presión inspiratoria máxima utilizada por el ventilador	12-30	cmH2O
Fuga aérea	Cualitativa ordinal	Presencia neumotórax, neumopericardio, neumomediastino, neumoperitoneo, corroborado por imagen radiológica	-Si -No	-
atelectasia	Cualitativa ordinal	Presencia de datos radiograficos de colapso alveolar	-Si -No	-

Hemorragia intraventricular	Cualitativa ordinal	DX por USG transfontanelar de HIV según Papille	-Si -No	-
Apnea	Cualitativa ordinal	Cese de respiración por 20 seg. o <tiempo acompañado de cianosis o bradicardia	-Si -No	-

VARIABLE INDEPENDIENTE	TIPO DE VARIABLE	DESCRIPCION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	UNIDAD DE MEDIDA
PCA significativo	Cualitativa ordinal	Criterios clínicos y por ecocardiograma de conducto arterioso Hemodinámicamente significativo	-Si -No	-
Uso de aminos (dopamina >5mcgKgmin)	Cualitativa ordinal	Uso de apoyo aminérgico con dopamina	-Si -No	-
Uso de xantinas	Cualitativa ordinal	Uso de metilxantinas	-Si -No	-
Uso de antibióticos	Cualitativa ordinal	Uso de antibioticoterapia	-Si -No	-
Creatinina al ingreso y segundo día	Cuantitativa continua	Valores de creatinina	0.1-2	Mg/dl
Enfermedad renal aguda	Cualitativa ordinal	Presencia de oligoanuria, elevación de azoados	-Si -No	-
Na al ingreso y segundo día	Cuantitativa continua	Niveles de Na por laboratorio	125-155	mEq/ml
pH sanguíneo	Cuantitativa discreta	Potencial de hidrogeniones en gases sanguíneos	< 7.25 > 7.25	pH
Displasia broncopulmonar	Cualitativa ordinal	Criterios de Bancalari según edad gestacional al nacer, días de vida y requerimiento de oxígeno	-Si (leve, moderada, grave) -No	-
Muerte	Cualitativa ordinal	Cese de funciones vitales	-Si -No	-

RESULTADOS.

Se lograron recolectar 14 muestras para la realización de esta tesis según el procedimiento descrito en metodología, correspondiendo a 7 pacientes, con obtención de dos muestras por cada paciente.

La distribución de la población estudiada y características fue de la siguiente manera:

Tabla 2. Distribución de la población (N= 7)

	N	MINIMO	MAXIMO	MEDIA
Semanas de gestación	7	27	39	32.5
Peso al nacimiento (gr)	7	854	3390	2122

Tabla 3. ANALISIS DE EDAD GESTACIONAL EN RELACION A NIVELES DE PROTEINA CC10 EN ASPIRADO BRONQUIOALVEOLAR

VARIABLE A ANALIZAR	SIGNIFICANCIA
DOSIS REAL ESTEROIDE APLICADA	0.042
PESO AL NACER	0.016

ANOVA de un factor, con significancia $p < 0.05$

Tabla 4. ANALISIS DE VARIABLES INTERCURRENTES ASOCIADAS A PROTEINA CC10 Y SEVERIDAD DE DBP

VARIABLE A ANALIZAR	SIGNIFICANCIA
Na. SERICO 2 ^a . DETERMINACION	0.017
PESO AL NACIMIENTO	0.016
DOSIS REAL ESTEROIDE	0.042

ANOVA de un factor, con significancia $p < 0.05$

Tabla 5. ANALISIS DE VARIABLES RELACIONADAS A PROCESOS INFLAMATORIOS Y PROTEINA CC10

VARIABLE ANALIZADA	SIGNIFICANCIA
ANTIBIOTICOS	0.007

ANOVA de un factor, con significancia $p < 0.05$

De la población el 57.1% de los pacientes estudiados (n=4) fueron recién nacidos pretérmino (RNPT) y 42.9% (n=3) recién nacidos de término lo cual fue documentado a su ingreso a la UCIN de acuerdo a lo expresado en hoja de nacimiento de referencia.

La distribución de género fue masculino 71.4% (n=5) y femenino 28.6% (n=2)

En cuanto a las características prenatales el 100% (n=7) de los neonatos tienen el antecedente de ser hijos de madres con un control prenatal regular con ministración de esteroides prenatales en el 42.9% (n=3).

De acuerdo a los reportes obtenidos no se detectó la presencia de Preeclampsia o diabetes gestacional ni otra patología a considerar como factor de riesgo asociado en el desarrollo de DBP. No fue posible determinar si en alguna de las madres se documentó cuadro de corioamnionitis debido a que no se contaba con criterios clínicos y bioquímicos requeridos para dicho diagnóstico en las notas de referencia de otros centros de salud.

La vía de nacimiento para la resolución de la gestación fue en un 57.1 por vía vaginal (n=4) y 42.9% vía abdominal (n=3).

De la población estudiada 28.6% (n=2) desarrollaron asfixia con calificación de APGAR al minuto menor a 5 y 71.4% (n=5) con APGAR al minuto >7.

De los recién nacidos el 71.4% (n=5) presentaron peso adecuado para la edad gestacional, mientras que la presencia de RCIU se documentó en el 28.6%(n=2) de los pacientes.

En relación al tratamiento y evolución posterior al nacimiento se ministró surfactante profiláctico en el 42.9% (n=3) de los neonatos de los cuales el 14.3% (n=1) requirió de re aplicación de factor tensoactivo en una dosis adicional.

3 de los pacientes (42.9%) requirió del uso de xantinas por eventos de apnea contra 57.1% (n=4) que nos desarrollaron esta complicación clínica.

En ninguno de los recién nacidos se documentó la presencia de eventos de fuga aérea como consecuencia del manejo respiratorio con ventilación mecánica y no se evidenció la formación de atelectasias en ninguno de ellos 100% (n=7).

Para la realización del estudio el 100% de los pacientes (n=7) considerados como se detalla en los criterios de inclusión requirió de intubación orotraqueal y apoyo con ventilación mecánica por diversas indicaciones inherentes a su condición clínica de ese momento por lapso mayor a 7 días.

Las presiones inspiratorias pico manejadas en promedio fueron de 18 cmH₂O con la máxima de 22 cmH₂O y la mínima de 16 cmH₂O correspondientes al inicio del apoyo respiratorio con ventilación mecánica.

Dentro de las co-morbilidades documentadas en los neonatos durante la etapa del estudio se encontró que en el 100% de ellos (n=7) cursaron con cuadro de sepsis por clínica y por pruebas bioquímicas, requiriendo de manejo con antibióticos, recibiendo cobertura con más de un esquema, siendo el máximo 7 y el mínimo de 2. De esta población de estudio la asociación Neumonía/Antibiótico en alguno de los diversos cuadros de sepsis desarrollados por estos pacientes se encontró en 3 de ellos correspondiente al 57.1%.

Así mismo, tres pacientes desarrollaron cuadro neumónico (42.9%) las cuales fueron de etiología viral contando con prueba de panel viral positiva en cada uno de ellos.

La asociación entre factores que modifican la cascada de la inflamación a nivel pulmonar tanto exacerbando como inhibiendo esta de acuerdo a sus diversos mecanismos de acción (se consideró uso de esteroides prenatales, asfixia, uso de antibiótico, administración de factor tensoactivo) esta relación se encontró en 28.6% (n=2)

La incidencia de DBP en el grupo de estudio fue de 71.4% (n=5), siendo encasillada como DBP leve, sin evidencia de desarrollo de DBP moderada o grave en este grupo de estudio, 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 14 muestras de los 7 pacientes que constituyeron la muestra de la tesis encontrando los siguientes resultados:

Tabla 6. Niveles de proteína cc10 en aspirado bronquioloalveolar en pacientes con falla a la ventilación mecánica.

PACIENTE	NIVEL DE PROTEINA CC10 1ª. DETERMINACION	NIVEL DE PROTEINA CC10 2ª. DETERMINACION	DBP	GRADO DE DBP
1	158.8 mcg/ml	1117 mcg/ml	SI	LEVE
2	28.2 mcg/ml	143.8 mcg/ml	SI	LEVE
3	1027 mcg/ml	1268 mcg/ml	SI	LEVE
4	135.4 mcg/ml	416.8 mcg/ml	SI	LEVE

5	846.6 mcg/ml	1113 mcg/ml	SI	LEVE
6	849 mcg/ml	923 mcg/ml	NO	-
7	672 mcg/ml	960 mcg/ml	NO	-

DISCUSIÓN.

Los resultados que se analizan son los obtenidos en 7 neonatos hospitalizados en la UCIN del Hospital Infantil de México Federico Gómez que requirieron ventilación mecánica convencional y que cumplieron con criterios de falla a la misma, requiriendo apoyo ventilatorio por más de 7 días.

La distribución de la muestra no fue homogénea dado que se contó con 71.4% de masculinos y 28.6% del sexo femenino, así como 57.1% fueron recién nacidos pretérmino (n=4) y 42.9% de término (n=3).

Se logró la determinación de los niveles de proteína CC10 en aspirado bronquioalveolar en el 100% de los pacientes considerados a través del método ya descrito previamente. Se evidenció que en algunos de los casos hubo asociación entre los niveles de proteína CC10 y algunas condiciones clínicas del paciente tanto prenatal como postnatal que generan cambios sobre todo a nivel de la cascada de inflamación y que repercute en los niveles de proteína CC10 a nivel bronquioalveolar.

Si bien los niveles normales de proteína cc10 en los neonatos no se han establecido, dado que los estudios mencionados en la literatura fueron realizados en adultos con diversas patologías que generan cambios a nivel del epitelio respiratorio y por tanto generan cambios en las concentraciones de proteína CC10 y son los valores referidos, en el presente estudio se observa una clara relación directamente proporcional entre los niveles de proteína cc10 y la aparición de DBP.

Los resultados evidenciaron una diferencia importante entre los niveles de proteína CC10 obtenidos en la primera y la séptima muestras de aspirado bronquioalveolar, siendo más elevados en la segunda determinación como se evidencia en los resultados descritos previamente.

Es importante hacer notar que los pacientes quienes desarrollaron DBP de acuerdo a los niveles de proteína CC10 al comparar la primera y la segunda muestra tienen el rango de diferencia mayor en los niveles de las mismas en

relación a los dos pacientes quienes no desarrollaron DBP. Estos dos últimos pacientes quienes no desarrollaron DBP tienen el antecedente común de ser hijos de madres con el mayor número de consultas prenatales registradas en nuestra población de estudio, recién nacidos de término, con peso adecuado, y que no desarrollaron cuadro neumónico durante su evolución, lo cual se cree que apoya que hay factores pre y post-parto que generan cambios en el proceso de cascada de la inflamación y por tanto que generan cambios en la concentración de proteína CC10.

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

El análisis ANOVA de un solo factor, de los niveles de proteína cc10 con todas las variables ya mencionadas arrojó los siguientes resultados importantes:

Existe una asociación evidente y estadísticamente significativa entre concentración de proteína CC10 en aspirado bronquioalveolar y factores que dependen de la edad gestacional tales como la administración de esteroides prenatales (madurez pulmonar) ($p=0.042$) y peso al nacimiento ($p=0.016$), lo cual es acorde con lo mencionado en la literatura, en donde dentro de los múltiples factores de riesgo conocidos para el desarrollo de DBP se encuentra la falta de administración de esteroide prenatal para favorecer maduración pulmonar y mejorar la producción de factor tensoactivo lo cual forma parte de la fisiopatología para desarrollo de DBP. Así mismo, es bien conocida la asociación de prematuridad y DBP lo cual se evidencia en los resultados obtenidos en este estudio, sustentado por lo referido en la literatura.

Así mismo, se encontró asociación entre administración de esteroide prenatal ($p=0.042$), peso al nacimiento (0.016) y la segunda medición de concentración sérica de sodio ($p=0.017$) en relación con severidad de displasia broncopulmonar. Esta última variable confirma el rol que juega el sodio ya mencionado anteriormente dentro de la hemostasia a nivel pulmonar y los niveles de proteína CC10 en aspirado bronquioalveolar y la relación con desarrollo de DBP.

Al analizar variables dicotómicas con los niveles de proteína cc10 y DBP se encontró significancia estadística con el uso de antibióticos ($p=0.007$) en asociación con procesos inflamatorios confirmando que dentro de la evolución de los pacientes los niveles de proteína CC10 en aspirado bronquioalveolar se ven modificados por el uso de los mismos, sugiriendo

que al modificar la cascada inflamatoria genera menor daño pulmonar y comportándose como factor protector para la evolución de DBP.

Es necesario continuar el estudio para intentar determinar los factores prenatales y perinatales que contribuyeron a los niveles más altos de proteína cc10 al momento de la intubación en pacientes que desarrollaron DBP y los factores que influyeron en la elevación posterior de estos niveles en el 100% 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. Sería conveniente al término del estudio en su tercera etapa el dar continuación al estudio para contar con resultados amplios y considerar los modos ventilatorios y asociación con desarrollo de DBP y niveles de proteína CC10 en aspirado bronquioalveolar.

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, concentración de proteína CC10 y aparición de DBP.

CONCLUSIONES

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 7 neonatos sometidos a ventilación mecánica invasiva con falla a la misma (7 días de ventilación). Así mismo la relación entre niveles de proteína cc10 y gravedad de la DBP fue directamente 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 y niveles de proteína cc10 y por lo tanto aparición de DBP. Sin embargo, existen posibles asociaciones ya descritas que deberán ser estudiadas en la tercera fase de este protocolo.

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.

BENEFICIOS Y ESPECTATIVAS DEL ESTUDIO.

Al realizar este proyecto estamos considerando la relación que guarda la medición de los niveles de proteína CC10 en aspirado bronquial de recién nacidos y la posibilidad que de acuerdo a la literatura se ha encontrado como factor determinante entre otros con la progresión de DBP en pacientes con soporte respiratorio prolongado.

Estos resultados representan la segunda etapa del estudio iniciado hace un año en el cual fueron analizadas las muestras de aspirado bronquial de 10 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, considerándose una tercera etapa con la finalidad de contar con una muestra de pacientes estadísticamente significativa con la finalidad de poder comprobar la relación que guarda niveles de proteína CC10/progresión DBP como ha sido mencionado en investigaciones previas.

El estudio se realiza en una sola Institución de Salud, la cual no cuenta con servicio de tococirugía; por lo que siendo un hospital de tercer nivel de referencia constituye un factor limitante para la captura de pacientes que cumplan con criterios de inclusión, considerando que muchos de estos niños que ingresan a la sala de UCIN son pacientes ya con varios días de vida y con días previos de soporte respiratorio.

El beneficio que ha demostrado el estudio de la proteína CC10 y su relación con progresión y comportamiento de displasia broncopulmonar en estudios experimentales con modelo animal (corderos), es que al ser administrada esta en forma exógena impide la progresión a DBP y disminuye los días de ventilador. Tomando como base la evidencia de estos resultados se planea en un futuro contando con una muestra suficiente de pacientes estudiados lograr analizar y considerar la posibilidad de administrar en forma exógena proteína CC10 en humanos (recién nacidos) e impedir con ello la progresión a

DBP y lograr disminuir los días de ventilador considerado un factor de riesgo para desarrollo de la misma.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

Claramente el contar con una muestra pequeña de aspirados bronquiales analizados, debido a la falta de pacientes que cumplieren con criterios de inclusión el poder del estudio y su validez externa es bajo, por tal motivo se consideró una tercera etapa en la que se conjuntaran los resultados obtenidos en la primera, segunda y la tercera etapa para posteriormente analizar la asociación de proteína CC10 y DBP. Al contar con un tamaño de muestra estadísticamente significativo se podrá lograr el realizar la correlación anteriormente mencionada.

Otra limitante en nuestro estudio es el tiempo considerado para la realización del estudio dado que el número de pacientes que cumplen con criterios de inclusión es bajo generando con ello que el tiempo de estudio se alargue; dado que se planea contar con un tamaño de muestra de 50 pacientes como mínimo para generar resultados estadísticamente significativos.

Así mismo, el estudio se realiza por ahora en tercer nivel únicamente por lo que al contar con resultados estadísticamente significativos, se valorará la posibilidad de realizar el estudio en forma multicéntrica considerando centros de atención a la salud no exclusivos de tercer nivel, con la finalidad de lograr un estudio con validez estadística y posteriormente considerar la posibilidad de un estudio comparativo entre grupos y contribuir al sustento científico sobre la utilidad de la administración de proteína CC10 exógena y DBP, demostrado al momento en modelo animal únicamente.

ASPECTOS ÉTICOS.

El presente estudio se apeg a los principios éticos expuestos en la Declaración de Helsinki para la Investigación Médica en donde participen sujetos humanos. No representó ningún riesgo asociado para el estado de salud del paciente ni en su evolución clínica y las muestras que se obtuvieron para realización del estudio se tomaron al momento de las aspiraciones del tubo endotraqueal que se requirieron para el tratamiento regular de los pacientes. Todos los pacientes contemplados en el estudio estaban bajo apoyo ventilatorio, sin que ninguno de ellos fuera intubado orotraquealmente en forma exclusiva para la toma de las muestras de aspirado bronquial.

No generó ningún costo económico para los padres del paciente la realización del estudio, dado que se cuenta con apoyo de laboratorio para proveer los dispositivos para la recolección de muestras, así como para el procesamiento de las mismas para la determinación de la concentración de proteína CC10 en aspirado bronquioalveolar, así como para el traslado de los especímenes a laboratorio del procesamiento de muestras.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:

FECHA	PRESENTACION ANTEPROYECTO	RECOLECCION MUESTRAS	ENVIO MUESTRAS A LABORATORIO	ANALISIS DE RESULTADOS Y REDACCION DE TESIS	PRESENTACION DE TESIS
28-Octubre-2013	X				
01-Octubre-2013		X	X		
01-Octubre-2014		X	X		
01-Octubre-2014				X	
31-Diciembre-2014				X	
01-Enero-2015					X

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Gaceta Médica México. Vol. 143 No. 2, 2007; 101-108

- 2.-Revista de Investigación Clínica; Vol. 62. No 5, Septiembre-Octubre 2010; 412-423

- 3.- American Journal Critical Care Med; Vol. 159, 1999; 646-678

- 4.- European Respiratory Journal 1999; 13: 1014-1021

- 5.-Pediatrics 2009; 67 (6): 332-343

- 6.-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.

- 7.-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

8.-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.

9.-Bernard A, Gonzalez-Lorenzo JM, Siles E, Trujillano G, Lauwerys R (1994). Early decrease of serum Clara cell in silica-exposed workers. *Eur Res J* 7: 1932-1937.

10.-Speer, C.P. Chorioamnionitis, Postnatal factors and Proinflammatory Response in the Pathogenetic Sequence of Bronchopulmonary Dysplasia. *Neonatology* 2009; 95:353–361.

11.-Coalson Jaqueline, Pathology of Bronchopulmonary Dysplasia, *Semin Perinatol* 30:179-184, 2006.