

179



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCION DEL VIRUS SINICIAL RESPIRATORIO Y OTROS VIRUS EN NIÑOS CON ASMA E INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

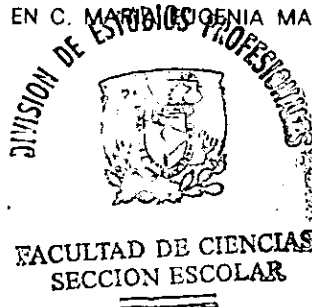
P R E S E N T A :

DORA PATRICIA ROSETE OLVERA



DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. MARIBEL GENIA MANJARREZ ZAVALA

MEXICO, D.F.,



2001

296315



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

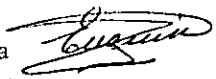
Detección de virus sincitial respiratorio y otros virus en niños con
asma e infecciones respiratorias agudas.

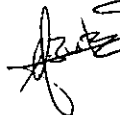
realizado por Dora Patricia Rosete Olvera


con número de cuenta 8431485-9 , pasante de la carrera de Biología


Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.


Atentamente

Director de Tesis M. en C. Maria Eugenia Manjarrez Zavala 
Propietario

Propietario Dr. en C. Jaime Bustos Martínez 

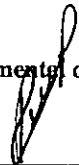
Propietario Med. Cir. Jorge Evaristo Alejandro Cruz 

Suplente M. en C. Fernando Ramos Reyes 

Suplente M. en C. Carlos Ramos Abraham 

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamento de Biología





DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

A mi abuela María Eugenia Manjarrez Zavala por su dirección y apoyo que me brindó durante estos años.

A todos mis sinodales por sus enseñanzas, sugerencias y conocimientos que me brindaron durante el desarrollo de este trabajo.

A Margarita Lezama Cohen y al Doctor Ignacio Calderón por su ayuda y colaboración.

A mis compañeros de laboratorio y amigos. De manera especial a Manuel Miranda Cruz por su afecto y apoyo que siempre me brindó.

A mis padres que siempre están conmigo y para ellos dedicó esta tesis:

GUSTAVO ROSETE OLIVAREZ

Y

TRINIDAD OLVERA DE ROSETE

A mis hermanos que me han apoyado en todo momento, Gustavo, Salvador, Hugo, Francisco, Leonila, Pilar, Gustavo, Laura, Armando y Trinidad.

INDICE

Resumen	3
Introducción	4
Antecedentes	5
Objetivos e Hipótesis	27
Material y Métodos	28
Resultados	38
Discusión	55
Conclusiones	61
Bibliografía	62

ABREVIATURAS Y SIGLAS MAS COMUNES.

ADE.- Adenovirus

ECP.- Efecto Citopático

GM-CSF.- Factor estimulante de la colonia de macrófagos granulocíticos

IA.- Influenza A

IB.- Influenza B

ICAM.- Moléculas de adhesión intercelular

IFN.- Interferón

IL.- Interleucinas

IRA.- Infecciones respiratorias agudas

LTC.- Leucotrienos

MBP.- Proteína básica principal

MIP.- Proteína inflamatoria de macrófagos

PAF.- Factor activador de plaquetas

PI.- Parainfluenza

TNF.- Factor de necrosis tumoral

VSR.- Virus sincitial respiratorio

RESUMEN

Las infecciones respiratorias virales pueden exacerbar el asma principalmente en niños. Por tal motivo en el Departamento de Investigación en Virología y en el Servicio de Pediatría del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) se realizó el estudio y se trabajó con 79 niños menores de 15 años de edad con crisis asmática, 79 niños con infecciones respiratorias agudas (IRA) y 79 niños sanos, a los cuales se les tomó un exudado nasofaríngeo con el fin de confirmar la presencia de antígenos virales por aislamiento en cultivo celular por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa para los siguientes virus: influenza A (IA), influenza B (IB), parainfluenza (PI), adenovirus (AD) y sincitial respiratorio (VSR). A los pacientes con asma también se les tomó una muestra de sangre para detectar anticuerpos contra los mismos virus.

De las 79 muestras estudiadas 38 (48%) tuvieron infección viral y de éstas 18 (47%) se identificó VSR que se detectó en casi todos los grupos de edad de los niños asmáticos. En los niños con IRA 40 (51%) tuvieron infección viral y también el VSR se detectó en mayor proporción 18 (45%). 44 (56%) de los niños con asma tuvieron anticuerpos contra uno o más virus, siendo los más altos los anticuerpos contra el virus de PI con 24 (33%) casos y el de IA con 18 (23%). La incidencia viral se correlacionó con la frecuencia de crisis asmática, en los niños con asma la época de mayor incidencia viral durante el año corresponde a la estación de lluvias y en los niños con IRA la frecuencia de las infecciones virales corresponde a la estación de primavera y otoño.

INTRODUCCION

Se han realizado estudios en pacientes con asma ~~que relacionan~~ fuertemente a los virus respiratorios con el desarrollo de hiperreactividad de las vías respiratorias . Algunos estudios han demostrado que el VSR es el virus más importante como desencadenante de asma, ya que provoca sibilancias particularmente en niños menores de 3 años de edad. Otros virus involucrados son los rinovirus, los virus de parainfluenza, influenza y adenovirus.

En México poco se conoce acerca de las infecciones respiratorias por VSR en la población infantil y menos aún su relación con el asma. En el Servicio de Pediatría del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias la frecuencia de los pacientes con asma es alta por lo que se considera que es necesario realizar estudios sobre la incidencia del VSR y su relación con dicha enfermedad, lo que en un futuro permitirá establecer medidas de prevención tanto en el control de la infección como en la disminución de las exacerbaciones asmáticas y mejorar el manejo de los pacientes.

ANTECEDENTES.

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO

El VSR fue aislado por primera vez en 1956 y se le conoció como agente de la coriza y resfriado de los chimpancés (50). Posteriormente Chanock (10) aisló virus similares en niños con bronquitis y neumonía. Más tarde otros estudios revelaron que se trataba del mismo virus y se le llamó VSR y que es un agente causal importante de enfermedades respiratorias en niños (15).

El virus se incluye en la familia Paramixoviridae, dentro del género Pneumovirus. El virus tiene forma redondeada y mide 150-300 nm aunque a veces es pleomórfico y dentro de las características principales están: una envoltura con glicoproteínas; una nucleocápside helicoidal que mide 13.5 nm de diámetro y 1,000 nm de longitud; su genoma está constituido por una cadena lineal de RNA con polaridad negativa que codifica proteínas de 7.5 a 200 kDa de las cuales 8 proteínas son estructurales y 3 no estructurales que se han observado dentro de células infectadas (15, 36, 64) (Figura 1).

Las proteínas estructurales se designan como: G (glicoproteína), F (de fusión), M y M2 (22K) (de membrana o de matriz), NP (nucleoproteína), P (polimerasa) y L (grande).

La proteína G tiene un peso molecular de 33 kDa, pero debido a que la forma madura está altamente glicosilada tiene un peso molecular de 84 a 90 kDa. Es necesaria para la adsorción del virus a la célula huésped y es parecida a la hemaglutinina-neuraminidasa de otros paramixovirus; tiene 298 residuos de aminoácidos (5, 42, 44, 45, 47, 68).

La proteína F tiene un peso molecular de 68 kDa está compuesta por dos polipéptidos, unidos por puentes disulfuro que pesan 48 kDa y 20 kDa; ésta glicoproteína es considerada como la responsable de la entrada del virus a la célula, ya

que provoca la fusión de la partícula viral a la membrana celular y en los cultivos celulares induce la formación de sincitios, es sensible a la tripsina y tienen 574 aminoácidos (15, 42, 54, 62).

Estas dos glicoproteínas (F y G) se localizan en la superficie externa del virión e inducen la formación de anticuerpos neutralizantes con acción protectora *in vitro* (15, 42, 54, 67).

La proteína M tiene un peso molecular de 23-28 kDa está localizada en el interior del virión y su importancia como inmunógeno es menor. Su función principal es estabilizar la envoltura viral y participar en el ensamblaje, es una proteína básica y puede interactuar con la membrana de la célula infectada, contiene 256 residuos de aminoácidos (15, 42).

Hay una segunda proteína de membrana M2 con un peso molecular de 22 kDa, también se localiza en el interior del virión, es muy básica. Estudios recientes han mostrado que su función es incrementar el procesamiento de la polimerasa viral, evitando una terminación prematura durante la transcripción. Tiene 194 residuos de aminoácidos (15, 26, 42).

La nucleocápside del virus se constituye de tres proteínas junto con el genoma viral de RNA:

1) La nucleoproteína NP es una proteína estructural de la nucleocápside con un peso molecular de 40 a 44 kDa esta asociada con el RNA y presenta 391 residuos de aminoácidos (15, 42).

2) La polimerasa P que tiene un peso molecular de 32 a 38 kDa está fosforilada y es relativamente ácida y se cree que es un componente del complejo de la polimerasa. Tiene 241 residuos de aminoácidos (15, 42).

3) La proteína L con un peso molecular de 160 a 200 kDa, no ha sido caracterizada y no se conoce su función, pero se piensa que esta implicada en la

transcripción y que está asociada con la nucleocápside, se ha sugerido corresponde a la RNA polimerasa del virión. Tiene 2,165 aminoácidos (15, 42).

Otra proteína de membrana SH (1A) es una proteína pequeña hidrofóbica que se localiza en la superficie de las células infectadas, aparece tanto en forma glicosilada como no glicosilada, parece ser la octava proteína estructural del virión. Tiene un peso molecular de 7.5 a 30 kDa. Se conoce poco a cerca de sus funciones biológicas e inmunológicas, pero se cree que es un inmunógeno débil, presenta de 64 a 185 residuos de aminoácidos (1, 15).

Proteínas no estructurales:

- 1) La proteína 1C (NS1) tiene un peso molecular de 15.6 kDa es ligeramente ácida y está constituida por 139 aminoácidos, su función es desconocida (15, 36).
- 2) La proteína 1B (NS2) tiene un peso molecular de 14.7 kDa es básica tiene 124 aminoácidos, su función también se desconoce (15, 36).
- 3) La proteína M2-II es codificada por un marco de lectura alternativo a la proteína M2 (22K).

El VSR es muy lábil, su infectividad es destruida por éter, cloroformo, tripsina y por cambios de pH, es termolábil, se inactiva en cada ciclo de congelación y descongelación. En un tiempo de 2 a 4 horas a temperatura ambiente o 4° C el virus pierde del 90 a 99% de su infectividad y desaparece por completo entre 15 y 25° C. Sin embargo, puede conservarse en suspensiones añadiendo proteína como albúmina y congelando rápidamente a -70° C. Hay algunas sustancias como magnesio, calcio, sacarosa y glucosa que pueden preservar la infectividad del virus (19, 20, 43, 61).

En cuanto a la multiplicación el virus se ha propagado en líneas celulares humanas y animales, las más utilizadas son las HEP-2, Vero y HeLa, en las cuales puede establecer infecciones persistentes (3, 21, 43). Se multiplica en el citoplasma de las células infectadas apareciendo cuerpos de inclusión eosinofílicos cerca del núcleo. En algunos tipos de células aparecen filamentos de superficie que altera su apariencia

celular, característica de los pneumovirus. La principal característica del virus es su capacidad para fusionar membranas celulares produciendo sincitios o células multinucleadas en cultivos celulares, de ahí su nombre (15).

En cultivos *in vitro*, el daño celular o efecto citopático (ECP) es causado por la fusión de membranas de las células infectadas, resultando la formación de sincitios. Estas células posteriormente mueren despegándose de la superficie de plástico o vidrio (15).

En el organismo los sincitios se observan en las células epiteliales del aparato respiratorio superior. En el ser humano el virus se replica en la nasofaringe propagándose de célula a célula del epitelio por medio de las secreciones hasta vías respiratorias inferiores. A pesar de que en individuos normales no es común la viremia, el virus se ha detectado en cultivos de leucocitos mononucleares, además en cultivos *in vitro* puede replicarse en células mononucleares y macrófagos (6, 13, 55). En individuos inmunosuprimidos el virus se propaga fuera del aparato respiratorio y se extiende a otros órganos como riñón, hígado y miocardio (15).

Un rango amplio de especies animales son infectados por este virus como: chimpancés, hurones, bisontes, chinchillas, cobayos, ratas, ratones, perros, terneras, bovinos etc., sin embargo no hay un modelo animal adecuado que explique los mecanismos para entender la patogenicidad e inmunidad, ya que los cambios patológicos o clínicos no son inducidos en su totalidad. En experimentos recientes con diversos primates (chimpancés, mono cebú, mono rhesus, mono ardilla, mono lechuza y mono verde africano) sólo los chimpancés, el mono lechuza y el mono verde africano desarrollan signos clínicos y lesiones similares a los descritos en humanos como rinorrea, estornudos, tos, necrosis del epitelio bronquial con una respuesta inflamatoria peribronquial y neumonía intersticial (14, 15, 29, 37, 40).

Hay dos grupos de VSR los cuales fueron definidos con anticuerpos monoclonales (A y B), circulan simultáneamente y varían en proporción a

través de los años. Se han observado algunas variaciones antigénicas, sin embargo la variación inmunológica cruzada entre las variantes es demasiado pequeña por lo que no se justifica una separación en distintos tipos (33, 51).

El VSR en zonas templadas tiene una clara estacionalidad, ocurre anualmente a finales de invierno o en la primavera (15).

La función del sistema inmune en el control de la infección y la reinfección por este virus hasta el momento no está bien definida. Se han sugerido varios mecanismos inmunológicos para explicar la protección, la reinfección y la patogénesis de la infección por VSR entre los cuales se encuentran:

1. La respuesta celular es importante en la resolución de la enfermedad. Niños con defectos en la inmunidad celular desarrollan infecciones por VSR persistentes, severas y muestran una liberación prolongada de virus, lo que implica que las células T son importantes en el control y resolución de la infección (4, 25, 34). Además se ha mostrado que los humanos adultos desarrollan una respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos contra el VSR y que lactantes menores de 3 meses tienen una respuesta poco detectable, esto puede ser causa de la alta incidencia en este grupo de edad. Se ha sugerido que en niños más grandes infecciones repetidas han contribuido a inducir una respuesta celular, que ha influido en la recuperación de la infección (11).

Sin embargo, otros autores consideran que la respuesta celular contribuye a la patogénesis de la enfermedad, ya que infantes con una respuesta celular exagerada se asocia a una enfermedad pulmonar grave cuando hay una infección natural por VSR y cuando previamente han sido inmunizados. Además, después del inicio de la infección son más propensos a sibilancias (4, 57).

Al parecer, aunque una respuesta celular incrementada es más necesaria para eliminar al virus, el daño a las vías respiratorias ocurre conforme dicho virus es erradicado (4).

- 2) Varios investigadores le dan importancia a los macrófagos alveolares en la restricción de la replicación viral, a través de su capacidad para producir una amplia

variedad de citocinas y mediadores con actividad anti-viral como: interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (6, 7, 13). Trabajos recientes con macrófagos y monocitos expuestos a VSR han demostrado que producen tanto IL-1 como un inhibidor de IL-1. Un balance adecuado entre estos permite una respuesta inmune efectiva contra el VSR. Se ha demostrado que la respuesta linfoproliferativa específica para el VSR no se detecta en la fase aguda de la enfermedad, lo que hace pensar que inhibidores de IL-1 son producidos en respuesta a la infección viral provocando una respuesta tardía (56).

3) El VSR es un pobre inductor de interferon (IFN) en suero, secreciones nasales y macrófagos alveolares. Por lo que se cree que el IFN juega un papel mínimo en la recuperación, ya que se produce en cantidades insuficientes para inducir inmunidad efectiva (12, 15, 55).

4) También hay mucha controversia acerca de si los anticuerpos maternos tienen un efecto protector o patológico contra una infección por VSR. Los anticuerpos maternos adquiridos pasivamente en el suero de los lactantes, pueden tener un efecto inmunosupresor sobre el desarrollo de la respuesta inmune propia del lactante. Se ha sugerido la hipótesis de que debido a la falta de IgA secretora específica durante la infección inicial por el VSR, la IgG materna puede difundirse hacia la luz de las vías respiratorias del lactante y formar complejos inmunes, estimulando la liberación de mediadores inflamatorios, lo que podría contribuir al proceso patológico (2, 4, 40). Por el contrario, hay pruebas de que los anticuerpos maternos tienen un efecto protector ya que algunos estudios demuestran que niños menores de 6 meses de edad infectados con VSR, con bajos niveles de anticuerpos maternos contra el virus presentan enfermedad más severa, en comparación con aquellos con altos niveles de anticuerpos (2, 4, 40).

5) En una infección primaria por VSR el título de anticuerpos secretorios y séricos en infantes menores de 8 meses de edad, es bajo y disminuye rápidamente; cuando ocurre una reinfección los títulos de anticuerpos se incrementan persistiendo por más

tiempo por lo que proporcionan una mayor protección contra la enfermedad (15). Se ha observado que en infecciones repetidas se aprecia una disminución de la severidad de la infección y esto generalmente se observa hasta la tercera reinfección (54, 63).

6) Los títulos de anticuerpos de las subclases IgG2 e IgG4 contra VSR en una infección natural son bajos, por lo que la inmunidad es incompleta, condición propicia para una reinfección (42). Por otro lado el papel de la IgG4 no es muy claro, un estudio mostró que lactantes infectados con VSR tenían concentraciones altas de IgG4 específica contra el virus y presentaban sibilancias, en comparación con aquellos que solo tenían síntomas en vías respiratorias superiores, por lo que se cree que la IgG4 pueda actuar como anticuerpo reagínico (4).

7) El sistema inmune de infantes y niños jóvenes es inmaduro debido a que se ha observado que los anticuerpos en suero y secretorios (IgA) locales producidos en respuesta a la infección por VSR, están reducidos en cantidad y por lo tanto son incapaces de neutralizar al virus de manera efectiva (15).

8) Se han detectado varios componentes del complemento en la superficie de las células epiteliales infectadas por VSR, lo que sugiere que los complejos antígeno-anticuerpo locales pueden inducir daño durante la infección. Así las células infectadas por virus o cuando se forman los complejos antígeno-anticuerpo, pueden disparar tanto la vía clásica como la alterna del complemento, ya que se han detectado componentes del complemento (C4 y C5) en la superficie de células epiteliales infectadas. Además estudios *in vitro* han mostrado que los complejos antígeno-anticuerpo activan el metabolismo oxidativo y del ácido araquidónico de neutrófilos (15, 58).

9) Los títulos de anticuerpos fijadores de complemento y neutralizantes no se correlacionan con la severidad de la enfermedad o con la resistencia a la infección, esto se ha observado cuando hay una infección natural o cuando se utilizan vacunas y se estimulan estos tipos de anticuerpos, que no han logrado protección (35, 42).

A los anticuerpos IgA, IgM e IgG se les relaciona con un efecto protector. Las inmunoglobulinas IgA se cree que son las más importantes por la vía de entrada del virus. Se les ha encontrado en células epiteliales en una etapa temprana de la enfermedad y disminuyen después de que la enfermedad se resuelve. La IgG e IgM aparecen irregularmente en células epiteliales y en secreciones, la concentración de IgM es alta en la etapa temprana y disminuyen durante la etapa de convalecencia y de forma viceversa ocurre con la IgG (38, 39, 46).

La infección por el virus es restringida por macrófagos alveolares, sin embargo se sugiere que la inmunidad celular y la humoral tienen una función importante en la protección de las enfermedades causadas por este virus (6, 13, 15).

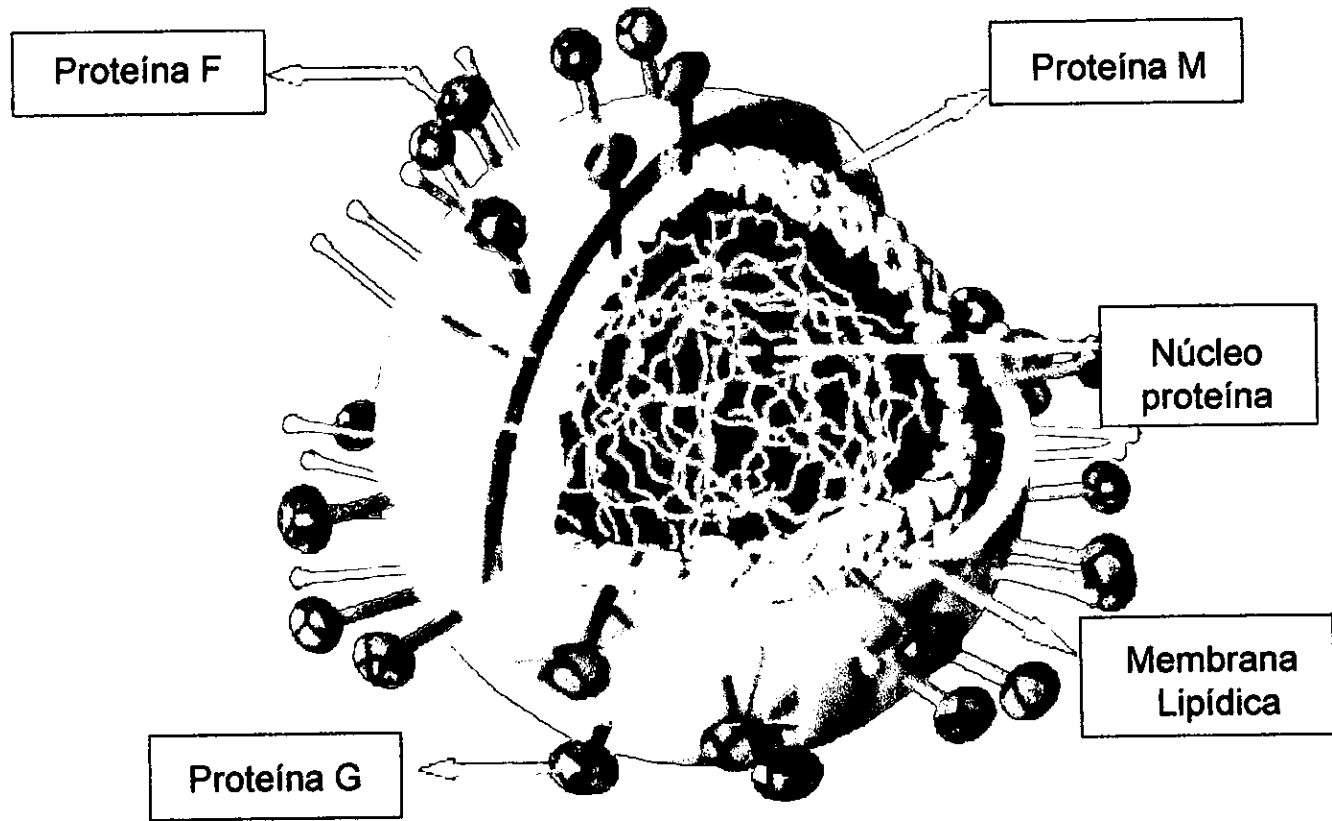


Figura 1. Estructura y genoma del VSR. El genoma del virus está formado por ARN de una sola cadena con sentido negativo que codifica para su polimerasa y otras 10 proteínas más, en el esquema se muestra las proteínas principales.

MECANISMOS DE HIPERREACTIVIDAD INDUCIDOS POR VIRUS.

1) Producción de IgE específica.

Welliver en varios estudios en infantes con infecciones respiratorias con VSR, encontró altos niveles de IgE específica para el VSR en células epiteliales y secreciones nasofaríngeas, las cuales se asocian a sibilancias y a una obstrucción en las vías respiratorias. Además observó una correlación entre concentraciones altas de histamina en secreciones y concentraciones bajas de presión parcial de oxígeno (PO₂ hipoxia), con el virus de parainfluenza observó un comportamiento similar (8, 9, 18, 66).

Con estos trabajos que se han realizado se puede postular que durante la infección por VSR se estimula la producción de anticuerpos IgE específicos, causando la sensibilización de las células cebadas. Al ocurrir una subsecuente infección, el VSR interactúa con los anticuerpos IgE específicos y activa la liberación de los mediadores de las células cebadas con el eventual desarrollo de hiperreactividad y obstrucción de las vías respiratorias (22, 65).

2) Disminución de sensibilidad beta-adrenérgica inducida por virus.

Los receptores β -adrenérgicos están localizados en el músculo liso de las vías respiratorias y en las membranas de las células polimorfonucleares, los cuales están regulados por el sistema nervioso autónomo. La estimulación con los agonistas β -adrenérgicos relajan el músculo liso de las vías respiratorias, inhiben la liberación de mediadores y disminuyen la respuesta inflamatoria (8, 9, 18).

Szentivanyi propone que la disminución de la sensibilización β -adrenérgica es una característica del asma en todas sus variedades. También sugiere que durante una enfermedad respiratoria de tipo viral además de disminuir la sensibilidad β -adrenérgica se intensifica la hiperreactividad y obstrucción de las vías respiratorias (9, 60).

Busse demostró que leucocitos de individuos con asma durante una infección respiratoria viral y después de incubarlos con rinovirus e influenza, los leucocitos sufren una disminución de la actividad β -adrenérgica y más aún durante una exacerbación. Lo que hace sugerir que por este mismo mecanismo algunos virus colaboren en la inducción de asma (9).

Otros estudios en cobayos y ratas sugieren que en la infección viral puede disminuir la regulación β -adrenérgica aumentando la liberación de mediadores por granulocitos los cuales amplifican la inflamación. Se supone que la degranulación es similar a la que ocurre en el músculo liso bronquial humano, aunque aún no ha sido demostrado (8, 17, 18).

3) Estimulación Colinérgica.

La estimulación colinérgica es realizada por fibras periféricas del sistema nervioso autónomo, las cuales sintetizan y liberan acetilcolina, a éstas se les denominan fibras colinérgicas, es decir, actúan mediante la liberación de dicha sustancia. En el asma se ha encontrado un incremento colinérgico del reflejo broncoespásmico (48).

El efecto de la estimulación colinérgica es constreñir el músculo liso de las vías respiratorias, aumentar la respuesta inflamatoria por leucocitos y la liberación de mediadores (8).

La generación colinérgica excesiva puede ser un mecanismo por medio del cual el virus induce un incremento de hiperreactividad bronquial al estimular el nervio vago (17). Ya que las fibras sensitivas y motoras del nervio vago, se distribuyen por las vías respiratorias (faringe, laringe y tráquea). La infección por virus respiratorios causa inflamación en las vías respiratorias y estimulación de las fibras sensitivas del músculo liso promoviendo un broncoespasmo (22).

Buckner trabajando con cobayos infectados con virus y sin infectar demostró que la estimulación eléctrica del nervio vago en los animales infectados, produce una mayor

sensibilidad de las vías respiratorias a la histamina, lo que sugiere que las infecciones virales sensibilizan la rama aferente del arco reflejo y también aumentan la actividad vagal eferente (8, 9, 18).

Además en animales y en el humano se ha demostrado que las infecciones respiratorias virales incrementan la actividad colinérgica por medio de la liberación de gran cantidad de sustancias como: histamina, tromboxanos, serotonina, taquininas entre otros, causando la disminución o disfunción de la afinidad de los receptores M2 muscarínicos, lo que conduce a un incremento en la hiperreactividad y broncoconstricción de las vías respiratorias (8, 17, 18, 59). Los receptores muscarínicos se encuentran en todas las células efectoras estimuladas por neuronas posganglionares del sistema nervioso parasimpático, así como en las estimuladas por terminaciones colinérgicas del sistema simpático (24).

4) Daño Epitelial.

El daño de las células epiteliales de las vías respiratorias es una característica importante en el asma. El epitelio respiratorio tiene dos funciones; una es pasiva funcionando a través de la barrera protectora; la otra es activamente produciendo sustancias que modulan la sensibilidad y el tono muscular. La destrucción de la barrera protectora del epitelio aumenta la exposición de las terminaciones nerviosas sensitivas y receptores que se encuentran en la membrana basal, permitiendo la penetración de irritantes o alérgenos y la probabilidad de que se activen mediadores inflamatorios (8, 18, 59).

El daño epitelial puede ser resultado directo del efecto citopático del virus o bien ser causado por una respuesta inflamatoria secundaria que da como resultado la alteración de la actividad de algunas sustancias como neuropéptidos, factor relajante del epitelio u otros metabolitos (59).

5) Células inflamatorias.

Estudios en animales y humanos indican que las infecciones virales pueden activar las funciones biológicas de las células inflamatorias, ya que numerosas células como eosinófilos, neutrófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, células cebadas, linfocitos T al ser activadas liberan mediadores, citocinas u otros sustratos biológicos que causan incremento en la respuesta inflamatoria (4, 8, 18).

a) *Neutrófilos*

Después de una infección viral, los neutrófilos desempeñan un papel importante en la hiperreactividad transitoria de las vías respiratorias. Se les ha encontrado en concentraciones altas en secreciones bronquiales de niños con infección por VSR y virus de parainfluenza y también en biopsias nasales de sujetos con infección con rinovirus. Los neutrófilos liberan una serie de metabolitos tóxicos de oxígeno que dañan el tejido de las vías respiratorias lo cual provoca descamación, inflamación, obstrucción e hiperreactividad. Los neutrófilos al ser activados por virus, son reclutados en las vías respiratorias y probablemente generan metabolitos de oxígeno u otros metabolitos inflamatorios o citocinas que causan daño (4).

b) *Eosinófilos.*

La inflamación eosinofílica es una característica del asma y también puede participar en sibilancias durante una infección viral. Trabajos *in vitro* han mostrado que el VSR activa eosinófilos humanos. En un estudio se midió la concentración de la proteína catiónica eosinofílica en secreciones nasofaríngeas de lactantes con infecciones respiratorias inferiores y se encontraron valores mayores en aquellos con sibilancias inducidas por VSR comparado con lactantes con infecciones respiratorias superiores. Los eosinófilos liberan mediadores como leucotrienos (LTC₄), factor activador de

plaquetas (PAF), proteína básica principal y la proteína catiónica eosinofílica, los cuales cuando son activados por virus dañan el epitelio de las vías respiratorias y desarrollan una reacción tardía (4, 41).

c) *Basófilos.*

El papel de los basófilos en el asma no ha sido totalmente establecido. Se cree que las infecciones virales pueden inducir sibilancias y causar obstrucción e hiperreactividad de vías respiratorias y con ello exacerbación de asma (4, 8, 18).

Estudios *in vitro* de basófilos infectados con virus de pacientes asmáticos han mostrado que varios virus entre ellos el VSR, adenovirus, influenza A, parainfluenza, y rinovirus inducen un aumento en la liberación de histamina, cuando hay una estimulación por anticuerpos IgE en la fase aguda comparada con la fase de convalecencia (8, 17, 22).

Busse demostró que el grado de liberación de histamina por basófilos está directamente asociada con el grado de sensibilidad de las vías respiratorias en individuos con asma. Sugiere que la hiperreactividad de las vías respiratorias con infección viral puede ser causada en parte por la liberación de histamina por células basófilas directamente o a través de la generación de productos inducidos por el virus como el IFN. Sin embargo los mecanismos de activación de los basófilos siguen sin aclararse, pocos basófilos pueden estar en contacto con el virus en el tracto respiratorio superior y la propagación sistemática del virus no se ha demostrado. La activación podría involucrar otros mediadores liberados localmente por el aparato respiratorio superior, algunos estudios sugieren que los interferones actúan para aumentar la liberación de histamina (18).

d) *Células cebadas.*

Las células cebadas poseen receptores con alta afinidad de IgE y participan en reacciones de hipersensibilidad, liberan histamina y leucotrienos, ambos se incrementan en secreciones respiratorias de lactantes con sibilancias de origen viral (4, 17).

e) *Mácrofagos.*

Los macrófagos abundan en las vías respiratorias, se piensa que los macrófagos alveolares constituyen la primera línea de defensa celular contra las infecciones respiratorias virales. Cuando un virus se replica en un macrófago estimula la liberación de interferones u otras citocinas. La infección de macrófagos alveolares por VSR conduce al incremento de la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como interleucinas IL-8 e IL-6. Los macrófagos expresan altos niveles basales de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y actúan como constituyentes de la respuesta antiviral (4, 17, 18).

f) *Monocitos.*

Los monocitos también expresan altos niveles de ICAM-1. Los monocitos humanos de lavados nasales al ser infectados con virus se activan, produciendo y liberando IFN- α , IFN- β , IL-1, IL-6 y TNF- α . La producción de estas citocinas (con la excepción de IFN- β) potencializa la producción del factor estimulante de la colonia de macrófagos granulocitos (GM-CSF). Por otro se ha observado que hay liberación de IFN- α , IFN- β y del TNF- α en respuesta tanto en virus inactivado con luz ultravioleta como con virus vivo. El incremento de IFN- α induce exacerbaciones de asma, o bien puede tener un efecto protector cuando inhibe la producción de IL-4 e IL-5 por células T CD4 humanas, las cuales están asociadas a procesos de inflamación. La IL-10 es

producida por monocitos humanos infectados *in vitro* con VSR, la cual es una citocina anti-inflamatoria que inhibe la producción de IL-4 e IL-5 (17).

g) *Linfocitos.*

Los linfocitos T desempeñan una función importante en la patogenia del asma, tanto en adultos como en niños, particularmente como inmunorreguladores y en la producción de citocinas. Hay dos tipos de células T cooperadoras (Th) definidas por sus patrones de secreción de citocinas. Las células Th1 secretan IL-2, IFN- γ y linfoxina, mientras que las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y existen otras citocinas secretadas por ambos tipos celulares. La respuesta en procesos asmáticos esta mediada por citocinas Th2 en particular las relacionadas con la producción de IgE y la activación de eosinófilos y células cebadas. La respuesta Th1 se asocia con la inmunidad antiviral. La proteína G del VSR estimula la respuesta tipo Th2 y esto explicaría la sintomatología asmática de las vías respiratorias inferiores causadas por VSR (4, 17).

Varios estudios con células mononucleares en sangre periférica han creado controversia a cerca del efecto viral. Unos sugieren que el virus puede inducir una respuesta de citocinas ya sea Th1 o Th2, otros sugieren que ambas. Esto puede ser debido a las diferentes proteínas virales que pueden inducir respuestas diferentes, al tipo de virus y la vía en la que es procesado y presentado el antígeno, sin embargo ambas respuestas pueden explicar las exacerbaciones del asma inducida por el virus. El IFN- γ citocina importante del tipo Th1 puede contribuir a las exacerbaciones por incremento en la liberación de histamina por las células cebadas y basófilos, mientras que la producción de IL-4 e IL-5 se incrementan amplificando la respuesta inflamatoria (17).

6) *Estimulación de mediadores químicos.*

Los mediadores inflamatorios inducidos por virus se han encontrado en concentraciones altas en secreciones nasofaríngeas y en el plasma de individuos con

infección por virus respiratorios. Se cree que juegan un papel importante en episodios de sibilancias e hiperreactividad de las vías respiratorias y provocación de asma (4, 8, 22, 59).

Los virus respiratorios promueven la liberación de mediadores inflamatorios directamente o a través de sustancias secretadas por células activadas por los propios virus, esto trae como consecuencia una gran inflamación, obstrucción de las vías respiratorias y exacerbación de asma. Se han encontrado varios mediadores por lo que es posible que sean varios los que participan. Entre los que se han estudiado están:

a) *Histamina.*

La histamina es un mediador químico que es liberado por varias células (basófilos, leucocitos, células cebadas etc.). Estudios *in vitro* e *in vivo* han revelado concentraciones altas de histamina en secreciones nasofaríngeas y en el plasma de individuos infectados por VSR y otros virus respiratorios. La secreción de este mediador tiene como consecuencias potenciales: aumentar la inflamación y causa obstrucción de las vías respiratorias. Sin embargo, el éxito terapéutico con antihistamínicos no ha sido confirmado (4).

b) *Leucotrienos*

Los leucotrienos constituyen un grupo de mediadores inflamatorios lipídicos derivados del ácido araquidónico a través de la vía de la enzima 5-lipoxigenasa. Son broncoconstrictores muy potentes que afectan las vías respiratorias superiores como inferiores. También se ha demostrado que aumenta la permeabilidad vascular y la producción de moco (4, 8).

Los leucotrienos son liberados por las células inflamatorias primarias que participan en la inflamación, así como las células endoteliales y epiteliales de las vías

respiratorias. Varios virus respiratorios (VSR, parainfluenza 3 e influenza A) inducen la liberación de leucotrienos hacia las secreciones nasofaríngeas. Altas concentraciones de leucotrienos se han encontrado en lactantes infectados con VSR principalmente en aquellos que presentan sibilancias. Varios estudios parecen indicar que los leucotrienos desempeñan un papel importante en las sibilancias (4).

c) *Productos de la ciclooxigenasa del ácido araquidónico.*

Los productos de la ciclooxigenasa del ácido araquidónico incluyen a las prostanglandinas (D2, E y F2a) y tromboxanos. Son broncoconstrictores potentes y se ha demostrado un aumento en las concentraciones del metabolito primario de la prostaglandina del tipo 2a en células plasmáticas de lactantes con bronquiolitis por VSR, y más aún en aquellos con sibilancias recurrentes. La prostanglandina del tipo E2 parece tener un efecto inhibitorio que podría proteger a las vías respiratorias de un efecto broncoconstrictor. Se sugiere que el daño viral del epitelio puede dar como resultado la pérdida de estas prostanglandinas protectoras. También se ha comprobado que los complejos de anticuerpos contra el VSR causan un aumento en la liberación de tromboxano, el cual es liberado por neutrófilos (4).

d) *Factor activador de plaquetas.*

El factor activador de plaquetas induce una respuesta inflamatoria, estimula la producción de moco en las vías respiratorias, altera la depuración mucociliar y aumenta la permeabilidad microvascular pulmonar. Es liberado por macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. Estudios *in vitro* con fagocitos mononucleares han mostrado que el VSR estimula la síntesis del factor activador de plaquetas que ocurre cuando hay replicación viral, se ha sugerido que este factor puede tener un papel importante en la respuesta inflamatoria por VSR, aunque la evidencia es aún incierta (4).

e) *Complemento.*

Las anafilotóxicas (C3a y C5a) del complemento inducen la liberación de histamina, prostanglandinas y leucotrienos los cuales producen broncoconstricción. La anafilotóxina C5a es un factor quimiotáctico para diversas células inflamatorias. C5a y C3a durante una infección por virus de la influenza A, se han encontrado en concentraciones altas en las vías respiratorias superiores. Se ha comprobado que células infectadas por VSR activan el complemento incrementando la adherencia de los neutrófilos a las células infectadas aumentando su citotoxicidad (4, 15, 58).

f) *Cininas.*

Las cininas son péptidos vasoactivos potentes que se forman en los tejidos o fluidos y que pueden estar involucrados en la patogénesis del asma por medio de su acción inflamatoria y broncoconstrictora. Es un potente estímulo para las fibras C y por lo tanto del reflejo axónico (4, 17, 59).

La sustancia P es un neuropéptido muy potente del grupo de las taquicininas que esta contenida en los nervios sensitivos no mielinizados de las vías respiratorias y que puede ser liberada por reflejo axónico local pudiendo potenciar la neurotransmisión colinérgica (17, 59).

Se han descrito una variedad de efectos pro-inflamatorios para la sustancia P: regulación de la secreción de la glándula submucosa y aumento en la liberación de acetilcolina de los nervios parasimpáticos y aumento en la permeabilidad vascular, constricción del músculo liso, estimulación de la degranulación de las células cebadas y adhesión eosinofílica y neutrofílica al endotelio vascular etc. (17, 18).

Además otro efecto muy importante ha sido observado en estudios con animales en los cuales se ha sugerido que la modulación del catabolismo de la sustancia P puede ser un mecanismo por medio del cual los virus inducen exacerbaciones de asma. La infección de virus de parainfluenza I en cobayos ha mostrado un incremento en la

sustancia P que induce contracción del músculo liso de las vías respiratorias y en rata se observa una amplificación de la sustancia P que induce un incremento de flujo sanguíneo de las vías respiratorias. Cambios similares ocurren en humanos sin embargo tienen que ser mejor estudiados (9, 17, 18).

El efecto en el músculo liso parece estar mediado a través de la disminución de la actividad de la endopeptidasa neutral, enzima responsable del catabolismo de la sustancia P. Se sugiere que la destrucción del epitelio de las vías respiratorias por una infección viral expone a las fibras C no mielinizadas del nervio aferente disparando la liberación de mediadores y neuropéptidos sensitivos (sustancia P); además el mismo daño epitelial reduce la acción de la enzima degradadora de la sustancia P dando como resultado un aumento en la respuesta contráctil, hipersensibilidad y broncoconstricción de las vías respiratorias (4, 8, 9, 18).

g) *Oxido nítrico.*

El óxido nítrico tiene la función de mediador, derivado del epitelio involucrado en el asma. Se le atribuyen varios efectos como: antiviral, incrementa el flujo sanguíneo bronquial, infiltración eosinofílica, daño epitelial, potente vasodilatador, inhibe la proliferación de las células Th1 por cambio de fenotipo a Th2 y en pacientes con asma, después de una infección experimental con rinovirus se les encontró un incremento en los niveles de NO exhalado (17).

h) *Citocinas*

Las citocinas son proteínas señalizadoras extracelulares secretadas por células efectoras específicas y que tienen la capacidad de modificar el comportamiento de células adyacentes. Interactúan a través de una red compleja en la respuesta inmune e inflamatoria, existe una gran variedad de citocinas y continuamente son identificadas otras (4).

La infección viral promueve la producción de una gran variedad de citocinas (IL-8, IL-1, IL-2, IL-6, IL-11, TNF e IFN etc.), por lo que es difícil de precisar su acción de manera individual. Varias de ellas participan en la inflamación de las vías respiratorias que se presentan en el asma, principalmente aquellas que promueven la actividad de los eosinófilos y la síntesis de IgE (IL-4, IL-5, IL-8), otras como la IL-2, IL-6, IL-8 e IL-11 se les ha encontrado en altas concentraciones y se cree que están involucradas en sibilancias de origen viral (4).

Entre los virus que inducen la liberación de citocinas se puede mencionar a: el VSR, rinovirus y parainfluenza 3. El VSR en líneas celulares aumenta la producción de IL-6, IL-8, RANTES, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1a), GM-CSF y la IL-11 (17).

La IL-8 es una citocina quimiotáctica para neutrófilos y eosinófilos, estudios en expectoración sugieren un papel importante en las exacerbaciones de asma y es la responsable del reclutamiento de las células inflamatorias en las vías respiratorias (17).

Otras citocinas que tienen funciones importantes son: el interferón (IFN) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

El IFN aumenta la liberación de histamina mediada por IgE después de la exposición con varios virus respiratorios. El VSR es muy sensible al IFN- α así como al IFN- γ y ambas sustancias inhiben su proliferación. Algunos estudios han mostrado que la producción de IFN parece estar suprimida por el VSR, aunque en la fase de convalecencia regresa a su estado normal. Se sugiere que este efecto puede ser específico del virus, puesto que ha sido detectado en concentraciones pequeñas en niños con infección por VSR en comparación con niños infectados con otros virus como influenza, parainfluenza. Además, lactantes con sibilancias e infecciones virales recurrentes no produjeron IFN- α , aunque esto no afectó la gravedad de la enfermedad (4).

i) *Moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1).*

Las ICAM-1 son receptores localizados en el endotelio vascular, epitelio de las vías respiratorias y en las células presentadoras de antígenos y sus ligandos se encuentran en leucocitos en circulación (4, 18).

Varios estudios han demostrado que células epiteliales de las vías respiratorias humanas en cultivo producen un incremento en los niveles de ICAM-1 y en la adhesión de eosinófilos y neutrófilos en respuesta a citocinas inflamatorias y a la infección de varios virus respiratorios como VSR, parainfluenza y rinovirus (4, 18).

Diversos investigadores han encontrado que los rinovirus se adhieren a la superficie de las células por medio del receptor ICAM-1, sugieren que la infección por rinovirus conduce a un aumento en la expresión de ICAM-1 en las vías respiratorias superiores, induciendo al reclutamiento de eosinófilos y neutrófilos, incrementando así la actividad inflamatoria ocasionando hiperreactividad y sibilancias, lo que puede explicar la persistencia o severidad de la inflamación en sujetos con asma o en sujetos susceptibles a la infección viral. El ICAM-1 en las células presentadoras de antígenos es necesaria para que los linfocitos T sean reconocidos por el antígeno. La interacción virus-linfocito activa a las células T promoviendo la liberación de citocinas (IFN- γ y TNF), que incrementan la cantidad de receptores ICAM-1 de la superficie celular por los rinovirus, propagando la infección y amplificando la respuesta inflamatoria (4, 8, 18).

j) *Beta-defensinas.*

Las β -defensinas son un grupo de proteínas producidas por las células epiteliales con propiedades antivirales. Trabajos recientes indican que la infección con VSR disminuye los niveles de las β -defensinas predisponiendo al niño a una infección secundaria pudiendo también estar implicadas en la patogénesis de la bronquiolitis por VSR (32).

HIPOTESIS

Si el virus sincitial respiratorio u otros virus respiratorios inducen diversos mecanismos de inflamación y el asma se caracteriza por inflamación aumentada puede ser que estos virus sean un factor asociado o desencadenante de crisis asmáticas.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

Correlacionar la crisis de los pacientes con asma con las infecciones virales durante el año y comparar la incidencia de la infección viral en los pacientes con asma e IRA.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Estimar la frecuencia del VSR y de los otros virus respiratorios en niños con asma e IRA por grupo de edad.
- 2) Analizar si la frecuencia de las infecciones virales en pacientes con asma e IRA dependen de la estación del año.
- 3) Analizar si la severidad de la infección viral depende de el tipo de virus con el que es infectado un paciente con asma o IRA.
- 4) Detectar la presencia de anticuerpos contra los virus respiratorios en niños con asma.

MATERIAL Y METODOS

GRUPO DE TRABAJO:

Se trabajaron tres grupos de niños: uno con posible infección en vías respiratorias y asma, el otro grupo con infecciones respiratorias agudas y el grupo control sin asma ni infecciones en vías respiratorias.

I. El primer grupo estuvo formado por 79 pacientes de 0-15 años de edad con diagnóstico de asma que fueron atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en una etapa temprana de una probable infección viral.

Se selecciono a los pacientes de acuerdo a antecedentes de infección recurrente, durante el inicio de la infección en vías respiratorias superiores con evolución en horas de complicaciones de vías respiratorias inferiores, con sugerencia de un proceso asmático, descartando a los pacientes que no presentaban crisis asmática.

II. El segundo grupo estuvo integrado por 79 pacientes con infección respiratoria aguda (IRA) sin asma.

III. El grupo control estuvo integrado por 79 pacientes sanos, sin infecciones respiratorias aparentes ni asma.

En cada grupo se formaron subgrupos según la edad:

Grupo I: Subgrupo 1: <1 a 3 años; subgrupo 2: 4 a 7 años, subgrupo 3: 8 a 11 años; subgrupo 4: 12 a 15 años.

Grupo II: Subgrupo 1: <1 a 3 años y subgrupo 2: 4 a 5 años.

Grupo III: Subgrupo I: <1 a 3 años; subgrupo 2: 4 a 7 años; subgrupo 3: 8 a 11 años; subgrupo 4: 12 a 15 años.

NATURALEZA DE LA MUESTRA:

Exudado nasofaríngeo para aislamiento viral de los pacientes del primer y segundo grupo y controles sanos. Además a los pacientes con asma se les tomó sangre para valorar la presencia de anticuerpos contra los virus respiratorios: Influenza A(IA), Influenza B (IB), Parainfluenza (PI), Adenovirus (AD) y virus sincitial respiratorio (VSR).

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

I) SANGRE:

Colección de la muestra.

A cada niño se le extrajo 7 ml de sangre mediante punción venosa y se depositó en tubos de 13X100 mm estériles, se dejó formar el coágulo durante 30 minutos en refrigeración y se removió con un hisopo estéril, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4° C para separar el suero que fue almacenado a 4° C hasta el momento de realizar la prueba.

II) EXUDADO

Colección de la muestra.

A cada niño se le tomó un exudado nasofaríngeo con un hisopo que luego se depositó en un tubo que contenía medio Lebovitz L-15 (In vitro) con 0.5% de albúmina bovina (Sigma) y antibióticos (penicilina/estreptomicina 10,000 UI/10,000 µg.) (Sigma), se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4° C el sobrenadante se utilizó para inocularlo en cultivo celular para el aislamiento viral.

1) **AISLAMIENTO VIRAL:**

Se utilizó la línea celular HEp-2 (células de carcinoma de laringe humana) (In vitro) y la línea celular Vero (células de riñón de mono verde africano) (In vitro). Las células se crecieron en botellas de cultivo de 25 cm². Una vez formada una monocapa confluyente se retiró el medio por succión y se lavó con buffer salino de fosfatos (PBS) (NaCl 0.8%, NaHPO₄ 0.1% y KHPO₄ 0.2%. pH 7.2) que también se retiró por succión, posteriormente las células se desprendieron de la superficie de crecimiento con 0.5 ml de tripsina (tripsina-verseno al 0.05%) (In vitro), y una vez que se observó a simple vista el desprendimiento de la monocapa, se agregó 15 ml de Medio Esencial Mínimo (MEM) (Sigma) con 10% de suero fetal de bovino (SFB) (Sigma) y penicilina/estreptomocina 10,000 UI/10,000 µg/ml. (Sigma) (Medio Completo). Se homogeneizó la suspensión celular y las células fueron sembradas en cubreobjetos de 18X18 mm. en cajas de petri estériles, incubando a 37° C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta que formaron una monocapa confluyente, se retiró el medio y se lavó con PBS, el sobrenadante de la muestra del exudado nasofaríngeo se inoculó por 90 minutos para que el virus se adsorbiera. Se retiró el medio, se lavó con PBS y se agregó medio incompleto (medio MEM sin suero) y se incubó durante 10 días observando diariamente para detectar las células con efecto citopático (ECP) cambiando el medio 2-3 veces por semana. Una vez que pasaron los 10 días se colectó el sobrenadante y las células se lavaron con PBS, se retiró el PBS y se dejó secar. Finalmente se fijaron con acetona fría durante 5 minutos y se almacenaron hasta que se llevó a cabo la inmunofluorescencia.

2) **INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA:**

Para la realización de esta prueba la muestra del paciente ya fijada en los cubreobjetos se lavó con agua destilada y se retiró el exceso de agua. Una vez secas las células de cada laminilla se cubrieron con 15 μ l de anticuerpo monoclonal contra cada virus buscado, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Dako), se incubaron durante 30 minutos a 37° C en la oscuridad en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo se lavaron primero con PBS para eliminar el conjugado que no se pegó y posteriormente se pusieron en un recipiente con PBS durante 10 minutos dos veces con ligera agitación se quitó el exceso de PBS y se agregó isopropidium a una concentración de 2 μ l/ml (Sigma) por 5 minutos para disminuir la inespecificidad y resaltar la inmunofluorescencia, finalmente se lavó con PBS-Tween al 0.05% (Sigma), se secaron y se montaron con glicerol en portaobjetos. Finalmente se observaron en el microscopio de epifluorescencia (Zeiss Modelo III RS).

Los controles positivos consistieron en células Vero infectadas con VSR cepa Long y los controles negativos se realizaron en células Vero sin infectar, estos se procesaron de la misma manera que las muestras.

3) **FIJACION DE COMPLEMENTO**

a) **REACTIVOS**

Antígenos :

Se usaron antígenos de los siguientes virus: IA, IB, PI, VSR y AD. Todos preparados en cultivo celular (Bio-Whittaker).

Anticuerpos:

Se usaron anticuerpos liofilizados de cobayo (IgG) contra los antígenos mencionados (Bio-Whittaker), que se hidrataron con 2 ml de agua destilada en el momento de utilizarlos

Veronal:

El veronal es una solución amortiguadora preparada con ácido dietil-barbitúrico, dietil-barbiturato de sodio, calcio y magnesio, es utilizado para diluir los reactivos que se utilizaron durante la prueba.

Eritrocitos de carnero:

Se sangró un carnero por punción venosa de la yugular externa, la sangre se depositó en una bolsa de plástico que contenía una solución Alsever, se homogeneizó esta mezcla muy bien y se dejó en refrigeración durante 3-5 días con objeto de que los eritrocitos maduraran, se repartió en tubos de vidrio 13X100 mm estériles en alícuotas de 1 ml y se guardaron en refrigeración a 4° C (fueron obtenidos en el Bioterio del INER).

Complemento:

Se sangraron 3 cobayos por punción cardíaca y se les extrajo de 5 a 10 ml de sangre, la cual se paso a tubos de vidrio estériles 13X100 mm y se mantuvieron en refrigeración por 30 minutos, se separó el suero utilizando una centrifuga refrigerada (Beckman- Modelo TJ-6) a una velocidad de 1500 rpm y se distribuyó en alícuotas de 0.2 a 0.3 ml en tubos ependor, se congeló inmediatamente a -70° C; en estas condiciones el título se mantuvo estable hasta que se acabó el lote de complemento titulado.

Hemolisina:

La hemolisina es un anticuerpo de conejo antieritrocitos de carnero obtenido de conejo que se utilizó para sensibilizar los eritrocitos de carnero y que funcionó como sistema hemolítico para revelar la reacción antígeno-anticuerpo. Tiene glicerol como conservador y se colocó en alícuotas de 0.5 ml en refrigeración a 4° C para preservar su título (Microlab).

b) ESTANDARIZACION DE REACTIVOS.

Eritrocitos de carnero.

El paquete celular se lavó 3 veces con solución amortiguadora de veronal. Del paquete celular final se desechó el sobrenadante y se ajustó al 2 % con veronal, se hizo una dilución de eritrocitos (0.170 ml de agua destilada y 0.030 ml de eritrocitos) se homogeneizó la solución y se leyó en un espectro a una densidad óptica de 405 nm. Tomando en cuenta la dilución y la densidad óptica obtenida, la solución de eritrocitos se ajustó a una densidad óptica de 2.287.

Titulación de Hemolisina.

Se hicieron diluciones seriadas de 1:2 hasta 1: 32,768 de hemolisina. A 30 µl de cada una de estas diluciones se agregó 60 µl de eritrocitos de carnero previamente estandarizados como se menciona anteriormente. La mezcla se incubó 10 minutos a 37° C posteriormente se agregó 30 µl de complemento previamente diluido (1:15) y se

incubó a 37 ° C durante 30 a 45 minutos. Finalmente se leyó el título de la hemolisina como la dilución más alta que presentó hemólisis total.

Complemento

El complemento fue diluido 1:30 en solución amortiguadora de veronal. A partir de esta dilución, se iniciaron diluciones en una placa de microtitulación colocando (0, 3, 6, 9, 12, 15, 30 μ l), se llevó a un volumen final de 90 μ l con veronal. Posteriormente se agregó 60 μ l de sistema hemolítico (eritrocitos y hemolisina) y se incubó una hora a 37 ° C. La tercera dilución se ajusta para que de 50% de hemólisis.

Titulación de antígeno.

La titulación de antígeno se efectuó probando diluciones seriadas del antígeno contra diluciones seriadas de suero positivo de cobayo (estándar) con un título conocido. Las diluciones que se realizaron fueron de 1:2 a 1:256 para ambos casos. En una placa de microtitulación de fondo redondo se agregó 25 μ l de solución amortiguadora de veronal en todos los pozos y 25 μ l de suero positivo en la fila A1-A8 (Cuadro 1), se hicieron las diluciones seriadas de suero de forma vertical, descartando la última dilución. En otra placa de microtitulación se agregó 25 μ l de veronal a todos los pozos y 25 μ l de antígeno en la columna A1-H1 y se hicieron las diluciones seriadas de forma horizontal descartando la última dilución. Posteriormente de cada dilución de antígeno se agregó 25 μ l a la primera placa en la que se hicieron las diluciones del suero positivo. Posteriormente se agregó 25 μ l de complemento y se incubó a 37° C por una hora, finalmente se agregó el sistema hemolítico (eritrocitos y hemolisina) y se incubó 45 minutos a 37° C. El título del antígeno fue leído como la dilución más alta de

antígeno que fija complemento frente a la dilución más alta de suero positivo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Titulación de antígeno. Se muestra un ejemplo de la interpretación del título de un antígeno.

DILUCIONES DE ANTIGENO		DILUCIONES DE SUERO							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
A	1:2	+	+	+	-	-	-	-	-
B	1:4	+	+	+	-	-	-	-	-
C	1:8	+	+	+	-	-	-	-	-
D	1:16	+	+	+	-	-	-	-	-
E	1:32	+	+	+	-	-	-	-	-
F	1:64	-	-	-	-	-	-	-	-
G	1:128	-	-	-	-	-	-	-	-
H	1:256	-	-	-	-	-	-	-	-
		1	2	3	4	5	6	7	8

+ Sedimentación

- Hemólisis

Título de suero 1:32

Título de antígeno 1:8

Titulación de los sueros de los pacientes para determinar la presencia de anticuerpo contra los virus trabajados.

Los sueros de los pacientes se incubaron en baño maría a una temperatura de 56° C durante 30 minutos para inactivar el complemento natural, después los sueros se colocaron sobre hielo. Toda la técnica se realizó en frío.

Las placas fueron rotuladas y se colocaron 25 µl de veronal en los pozos que se usaron. Se agregó 25 µl de suero del paciente por duplicado en los primeros pozos A1 y A2 (Cuadro 2) y se hicieron diluciones seriadas de 1:2 a 1:128 eliminando la última dilución.

A la primera fila (A1-H1) se le agregó el antígeno a la dilución resultante de la titulación de antígeno. A la segunda fila (A2-H2) se le agregó 25 µl de veronal quedando como control negativo. A todos los pozos se les agregó 25 µl de complemento titulado y se incubó a 37 ° C por 1 hora, finalmente se agregó 50 µl de sistema hemolítico y se incubaron a 37° C por 45 minutos.

Para el control de antígeno se agregó 25 µl de veronal, 25 µl de antígeno, 25 µl de complemento y 50 µl de sistema hemolítico. Para el control de complemento se agregó 50 µl de veronal, 25 µl de complemento y 50 µl de sistema hemolítico. El control de eritrocitos se agregó 75 µl de veronal y 50 µl de eritrocitos. El título de anticuerpos de los sueros de los pacientes fueron determinados visualmente por la última dilución que presentó sedimentación o bien con un lector de ELISA (Cuadro 2).

Cuadro 2. Prueba de diagnóstico para detectar anticuerpos contra los virus respiratorios de los pacientes.

DILUCIONES De SUERO		PACIENTE 1		PACIENTE 2		PACIENTE 3		CONTROL SUERO(+)		CONTROL ERITROCI TOS	CONTROL COMPLE MENTO
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
A	1:2	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
B	1:4	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
C	1:8	-	-	+	-	-	-	+	-		
D	1:16	-	-	-	-	-	-	+	-		
E	1:32	-	-	-	-	-	-	+	-		
F	1:64	-	-	-	-	-	-	-	-		
G	1:128	-	-	-	-	-	-	-	-		
H	1:256	-	-	-	-	-	-	-	-		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Paciente 1. 1: 1 25 µl de cada dilución de suero de paciente
25 µl de antígeno (1:8)
25 µl de complemento (1:30)
50 µl de sistema hemolítico

Paciente 1.1: 2 25 µl de cada dilución de suero de paciente
25 µl de veronal
25 µl de complemento

50 μ l de sistema hemolítico
Título de anticuerpos del paciente 1: (1:4)

Control de suero (+)

7: 25 μ l de cada dilución del suero de referencia (1:32)

25 μ l de antígeno (1:8)

25 μ l de complemento

50 μ l de sistema hemolítico

8: 25 μ l de cada dilución de suero de referencia (1:32)

25 μ l de veronal

25 μ l de complemento

50 μ l de sistema hemolítico

Título del control del suero + (1:32)

Control de eritrocitos:

9: 75 μ l de veronal

50 μ l de sistema hemolítico

(+) Sedimentación

Control de complemento:

10: 50 μ l de veronal

25 μ l de complemento

50 μ l de sistema hemolítico

(-) Hemólisis

PRINCIPIO

La reacción se lleva a cabo en dos etapas: en la primera etapa, el suero del paciente se incuba con antígeno en presencia de complemento. Si el suero del paciente contiene anticuerpos contra el antígeno, el complemento se consume y en la segunda etapa donde se agrega el sistema hemolítico (eritrocitos-hemolisina) los eritrocitos no son lisados, en cambio si el paciente no tienen anticuerpos contra el antígeno el complemento queda libre produciendo lisis de eritrocitos.

RESULTADOS

Se estudiaron tres grupos de 79 pacientes con edades de < 1 a 15 años, de ambos sexos.

1. El primer grupo formado por niños con diagnóstico de asma y con crisis en el momento de tomarle la muestra. De ambos sexos (tabla 1). Se referirá, como grupo de asma.
2. El segundo grupo integrado por niños con diagnóstico de infección respiratoria aguda (IRA), con edades de < de 1 año a 5 , ya que también se incluyó a los de 6 a 15 años pero no se contó con casos (tabla 1). Se referirá como grupo de IRA.
3. Como grupo control se formó un grupo de 79 niños sanos.

Tabla 1. Características de los grupos.

Grupo de asma	Edad (años)	Sexo		Total
		Fem	Mas	
	<1 a 3	6	17	23
	4-7	15	15	30
	8-11	10	14	14
	12-15	9	3	12
Grupo de IRA				
	<1 a 3	28	39	67
	4 a 5	3	9	12
Controles sanos				
	<1 a 3	33	22	55
	4-7	13	4	17
	8-11	2	0	2
	12-15	3	2	5

Se formaron cuatro subgrupos en cada grupo (tabla 2).

Tabla 2. Infecciones virales en pacientes de acuerdo al subgrupo y sexo.

PACIENTES CON ASMA				
SUBGRUPOS	EDAD (AÑOS)	INFECCIONES VIRALES POR SEXO		% CON INFECCIONES VIRALES
SEXO				
		FEM	MAS	
1	<1-3	1	9	43
2	4-7	6	9	50
3	8-11	7	1	57
4	12-15	3	2	42
TOTAL		17	21	
PACIENTES CON IRA				
SUBGRUPOS	EDAD (AÑOS)	INFECCIONES VIRALES POR SEXO		% CON INFECCIONES VIRALES
SEXO				
		FEM	MAS	
1	<1-3	16	17	49
2	4-5	1	6	58
TOTAL		17	23	
PACIENTES CONTROLES SANOS				
SUBGRUPOS	EDAD (AÑOS)	INFECCIONES VIRALES POR SEXO		% CON INFECCIONES VIRALES
SEXO				
		FEM	MAS	
1	<1-3	0	0	0
2	4-7	0	0	0
3	8-11	0	0	0
4	12-15	0	0	0

l) Infección viral.

A los niños de cada grupo se les tomó muestra de exudado nasofaríngeo. La muestra se inoculó en cultivo celular y para identificar los virus aislados, se realizó inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales para cada virus estudiado (IA, IB, PI, AD, y VSR).

En el grupo de asma se encontró que 38 niños presentaron infección por virus, esto representa el 48% del total del grupo.

En el grupo de IRA la infección por virus se identificó en 40 niños que representa el 51% del total del grupo.

En el grupo control no se aisló ni se identificó ningún virus.

II) El VSR se identificó en el 47% de los niños del grupo de asma (figura 2A), y el 45% en los niños del grupo de IRA (figura 2B).

III) Frecuencia de virus respiratorios.

Además del VSR se buscaron otros virus que causan infección en vías respiratorias (IA, IB, PI y AD).

En el grupo de asma se encontró que el virus de IB fue identificado en el 18% de los niños, IA en el 13%, PI y AD en el 11% (figura 2A).

En el grupo de IRA, el virus más frecuente después del virus VSR fue el de PI que se identificó en el 18%, seguido del AD con 15% (figura 2B).

Como se mencionó en el grupo control no se detectó infección viral.

No se observó diferencias significativas de la frecuencia de la infección viral entre el grupo I y el grupo II (Prueba estadística: P Fisher: 0.623). Pero si hay diferencias significativas entre el grupo I y el grupo III (Prueba estadística: P Fisher 0.00001).

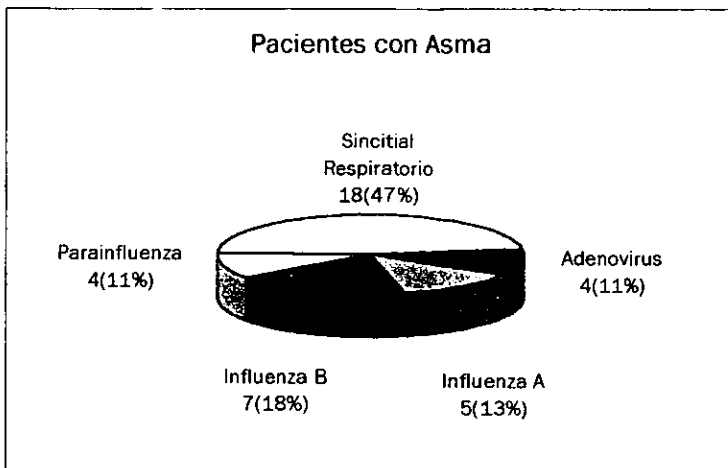


Figura 2 A. Porcentaje de virus aislados en niños con asma.

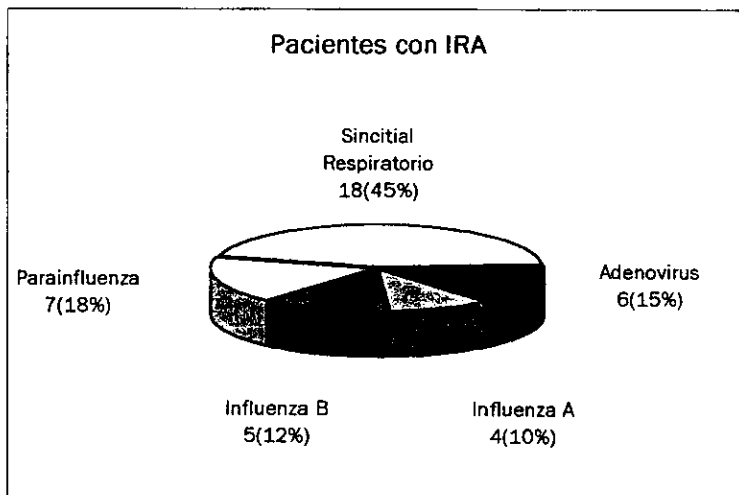


Figura 2B. Porcentaje de virus aislados en pacientes con IRA.

IV) Frecuencia de la infección viral por edad.

Cada grupo fue ordenado en cuatro subgrupos de acuerdo a la edad (tabla 2) y se analizaron los virus identificados en cada subgrupo.

Las figuras 3A a la 3D muestran los virus identificados en cada subgrupo.

En el grupo de asma, el subgrupo 1 (niños de <1 a 3 años) el virus más frecuente fue el de IA con 3 pacientes (figura 3A). Para los otros subgrupos el VSR fue el más frecuente (figuras 3B-3D).

Para el grupo de IRA, en el subgrupo 1 el VSR fue el virus más frecuente con 16 pacientes (figura 3A). En el subgrupo 2 el virus mas frecuente fue el de IA con 3 pacientes (figura 3B).

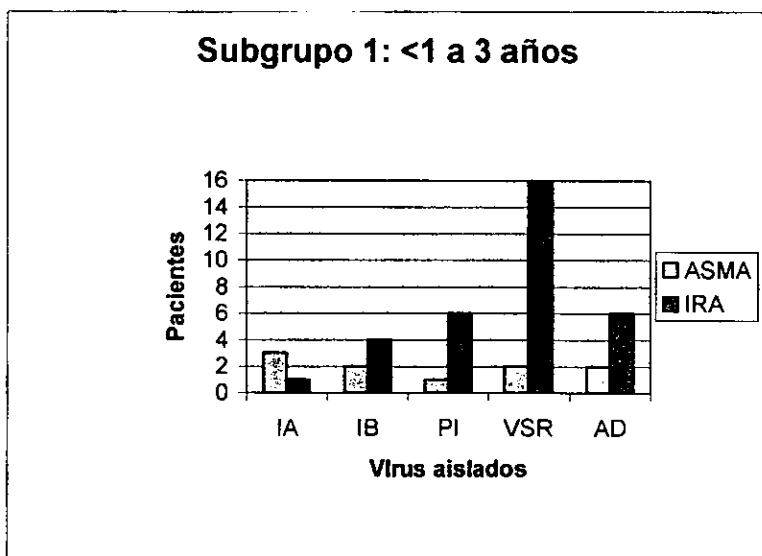


Figura 3A

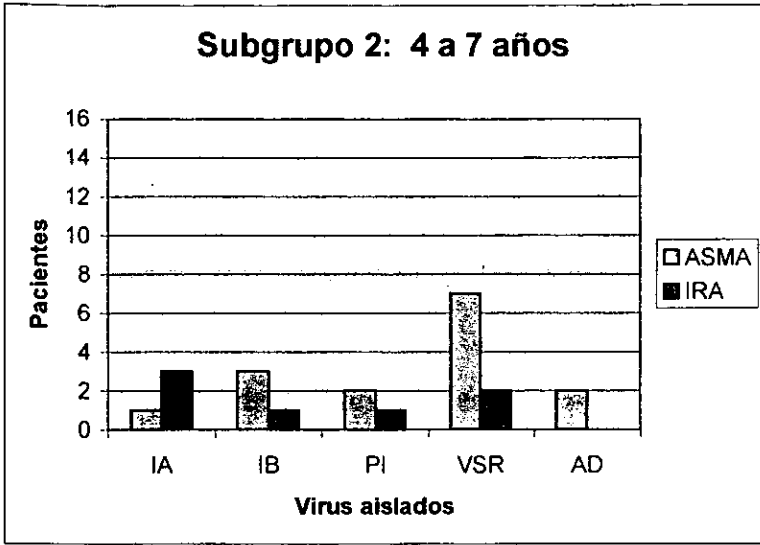


Figura 3B.

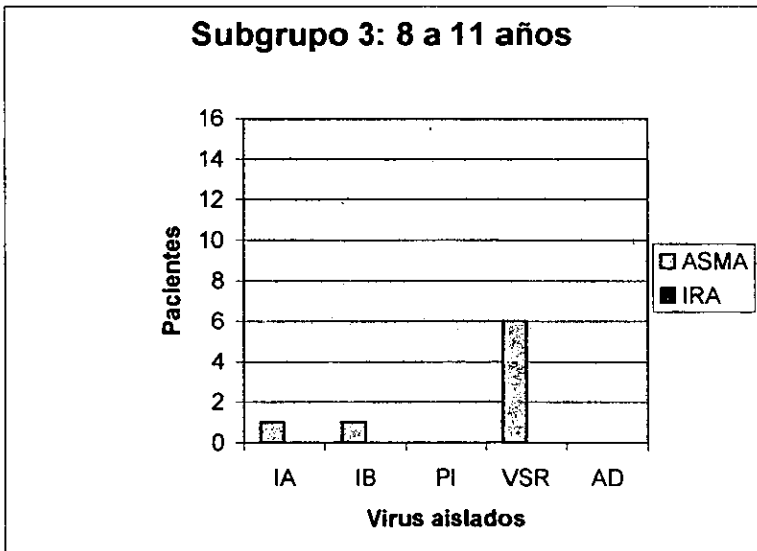


Figura 3C

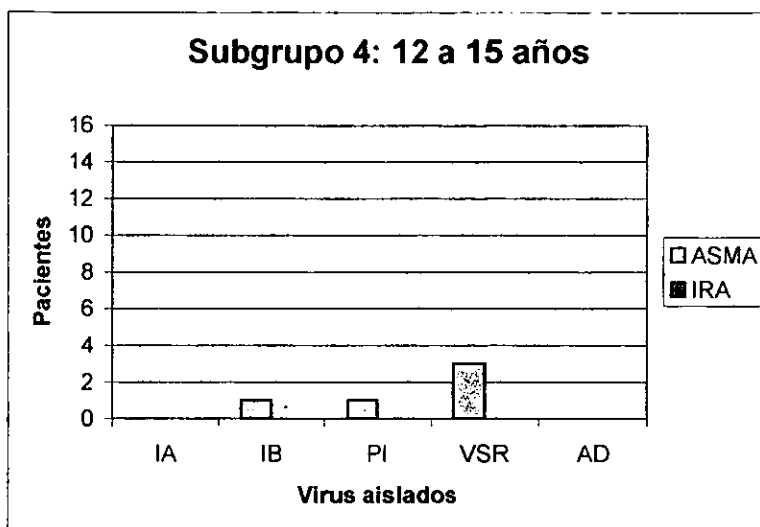


Figura 3D

Figura 3A-3D. Frecuencia de la infección viral por edad.

V) Análisis de la frecuencia de cada virus.

Con el fin de analizar de manera individual la frecuencia de cada virus, en las figuras 4A a la 4E se ordenaron los resultados del inciso anterior pero por virus.

Virus de IA

En los niños del grupo de asma fue más frecuente en el subgrupo 1 (niños de < 1 a 3 años) con 3 pacientes (8%), mientras que en los subgrupos 2 y 3 la frecuencia fue similar de 1 paciente (3%), en el subgrupo 4 no se detectó (figura 4A).

En los niños del grupo de IRA, en el subgrupo 2 (niños de 4 a 11 años) fue más frecuente con 3 pacientes (8%).

Virus de IB

En el grupo de asma, el subgrupo 2 fue más frecuente con 3 pacientes (8%) (figura 4B).

En el grupo de IRA, en el grupo 1 fue más frecuente con 4 pacientes (10%) (figura 4B).

Virus de PI

En el grupo de asma, el virus de PI tuvo mayor frecuencia en el subgrupo 2 (niños de 4 a 7 años) con 2 pacientes (5%), en los subgrupos 1 y 4 fue similar con solo 1 paciente (3%) y en el subgrupo 3 no se identificó (figura 4C).

En el grupo de IRA, fue más frecuente en el subgrupo 1.

VSR

Este virus fue el más frecuente en ambos grupos y por subgrupo se observa lo siguiente:

Grupo de asma, de los cuatro subgrupos el subgrupo 2 (niños de 4 a 7 años) fueron los niños más frecuentemente infectados con 7 pacientes (18%), le sigue el subgrupo 3 con 6 pacientes (15%) (figura 4D).

Grupo de IRA, la frecuencia más alta fue en el subgrupo 1 con 16 pacientes (40%) (figura 4D).

Adenovirus

La frecuencia en cada subgrupo fue de:

Grupo de asma: solo se detecto en los subgrupos 1 y 2 con 2 pacientes (5%), no se identificó en el 3 ni en el 4 (figura 4E). Grupo de IRA: solo se identifico en el grupo 1 con 6 pacientes con 15% (figura 4E)..

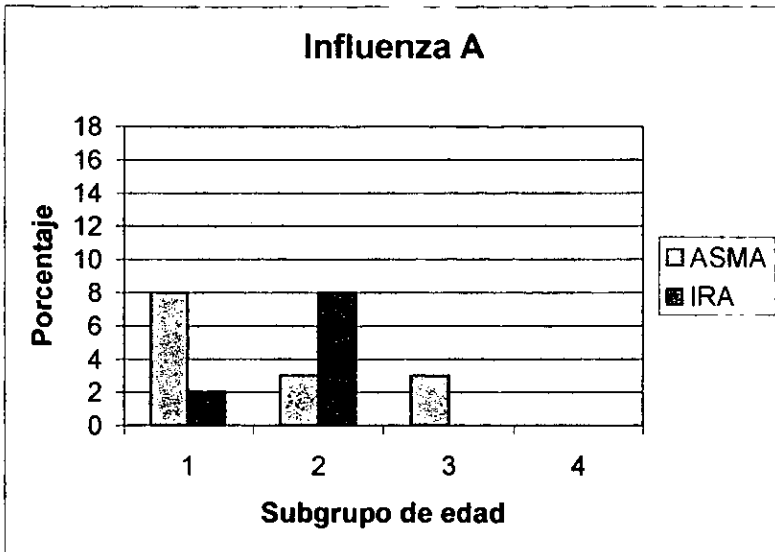


Figura 4 A

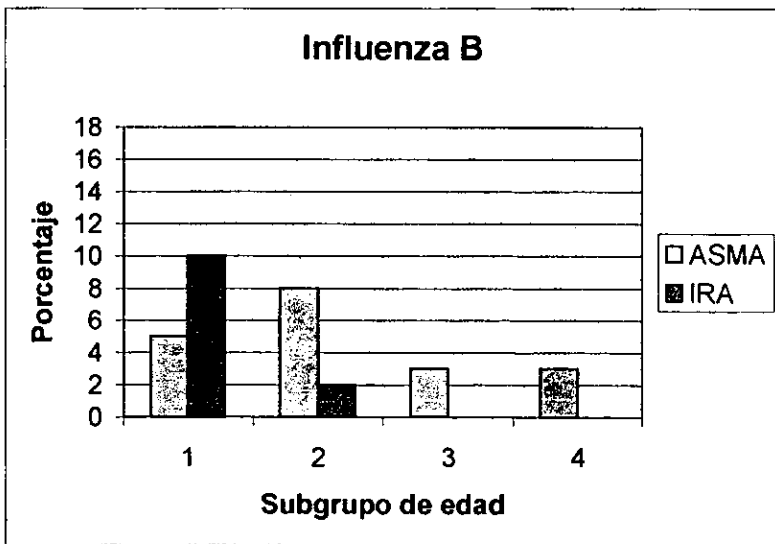


Figura 4 B

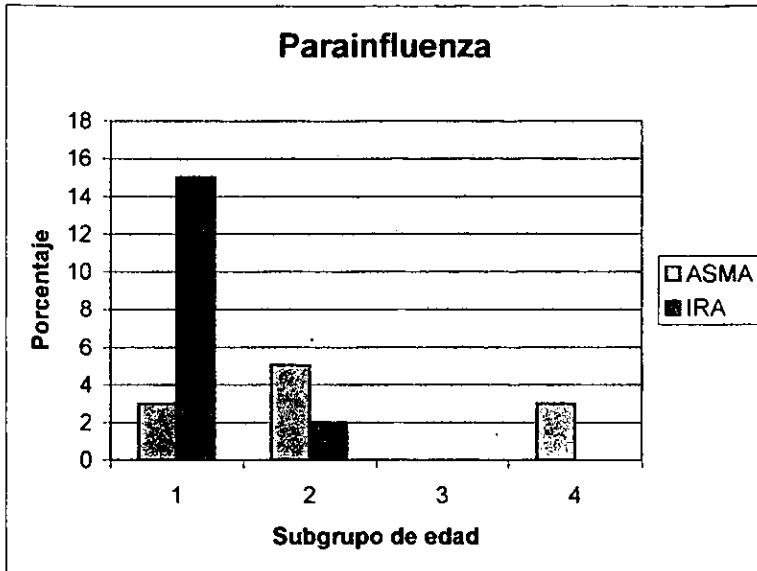


Figura 4 C

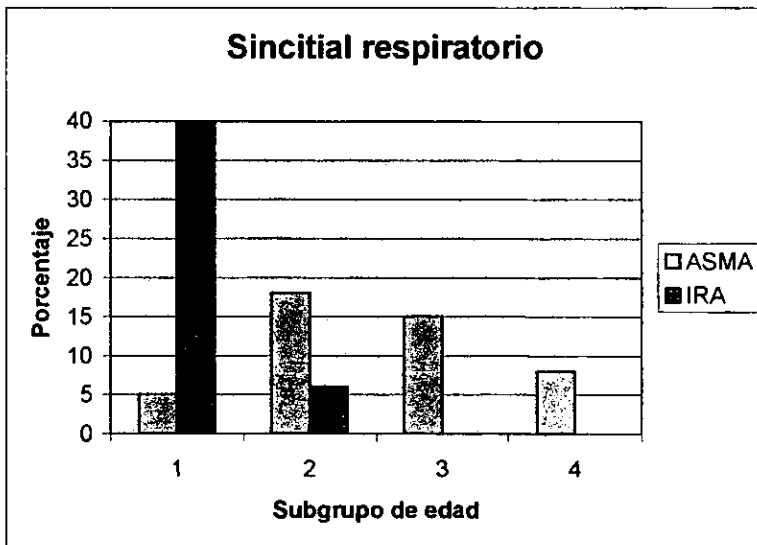


Figura 4 D

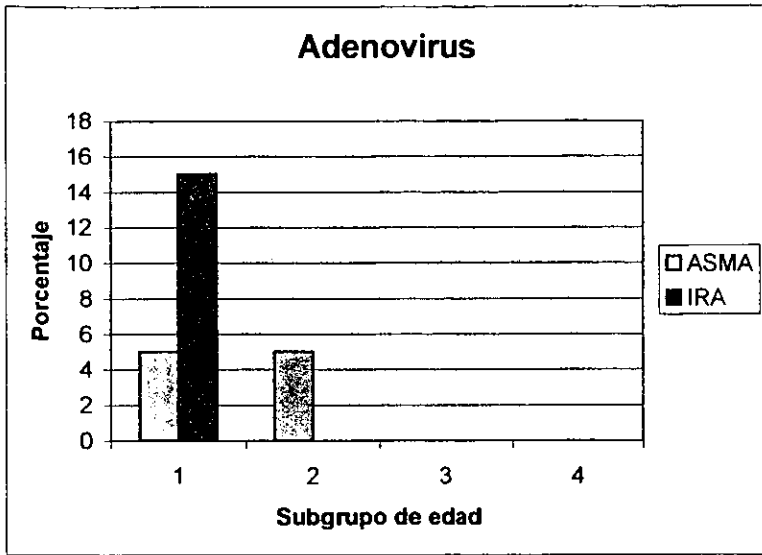


Figura 4 E

Figura 4A-4E. Tipo de virus por cada grupo de edad.

En la figura 5 se resume el porcentaje de virus aislados e identificados por subgrupo. Se puede apreciar que en el grupo de asma, el mayor número de niños infectados se encuentra en el subgrupo 3, niños de 8 a 11 años.

Mientras que en el grupo de IRA el mayor número de infecciones es en los niños de 4 a 5 años que corresponden al subgrupo 2.

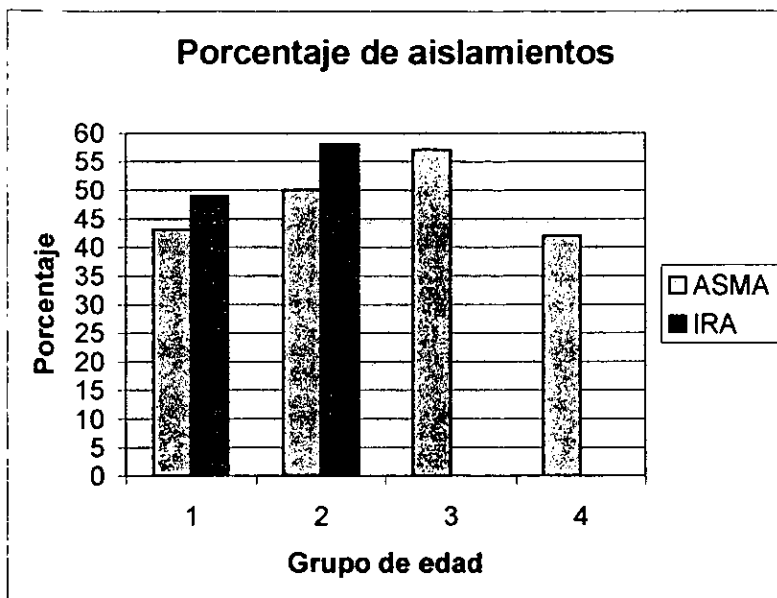


Figura 5. Frecuencia de aislamientos de virus en cada subgrupo .

VI) Infección viral durante el año.

Para conocer la presencia de virus durante el año el estudio se siguió por un año, durante el cual se observó lo siguiente:

Grupo de asma. El virus de IA se aisló con más frecuencia durante la época de verano, el virus de IB en verano y otoño; el de PI en verano, el VSR durante verano y otoño y el de adenovirus en otoño (figura 6A).

En el grupo de IRA: el virus de IA se aisló con más frecuencia en primavera; IB en primavera; PI en primavera; el VSR en primavera y otoño y AD en primavera (figura 6B).

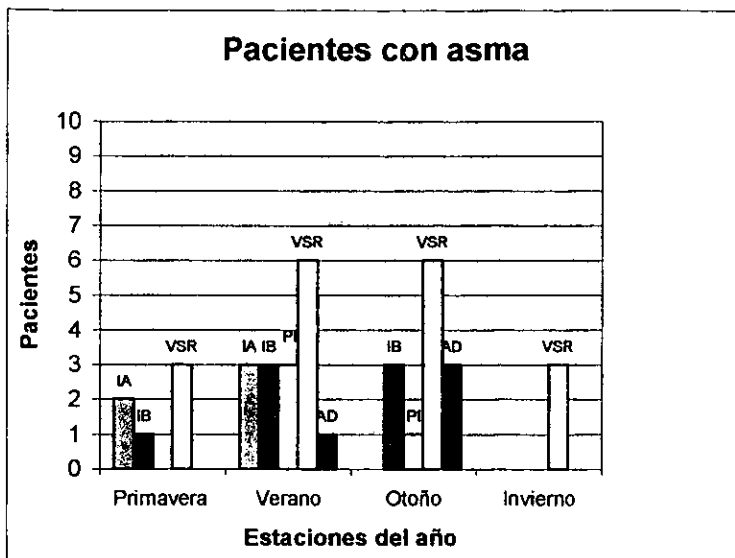


Figura 6A. Infección viral durante el año en pacientes con asma.

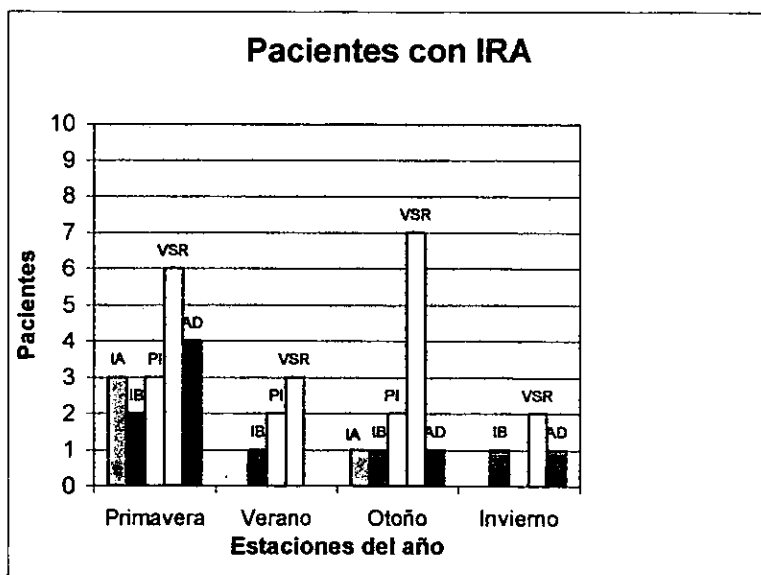


Figura 6B. Infección viral durante el año en pacientes con IRA.

Por medio de una prueba de χ^2 se determinó lo siguiente:

La frecuencia de las infecciones virales en pacientes con asma e IRA son independientes de la estación del año.

El valor calculado para $\chi^2 = 10.67$; $P = 0.014$ es significativo por lo que la frecuencia de las infecciones virales en pacientes con asma e IRA dependen de la estación del año (tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de las infecciones virales en pacientes con asma e IRA durante las estaciones del año.

ESTACION DEL AÑO					
	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Total
PACIENTES					
ASMA	6	16	13	3	38
IRA	18	6	12	4	40
TOTAL	24	22	25	7	78

La infección viral en un paciente con asma e IRA no depende del tipo de virus con el que es infectado.

El valor de $\chi^2 = 1.6$; $P = 0.807$ no es significativo (tabla 4).

Tabla 4. Tipos de virus con que es infectado los pacientes con asma e IRA.

TIPO DE VIRUS						
	Influenza A	Influenza B	Parainfluenza	Sincitial Respiratorio	Adenovirus	Total
ASMA	5	7	4	18	4	38
IRA	4	5	7	18	6	40
TOTAL	9	12	11	36	10	78

La severidad de la crisis de los pacientes con asma no dependen de una infección viral durante alguna época del año.

El valor de $\chi^2 = 1.79$; $P = 0.618$ no es significativo (tabla5).

Tabla 5. Crisis de los pacientes con asma e infecciones virales durante el año.

PACIENTES	ESTACIONES DEL AÑO				
	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Total
Crisis s/ infección	12	21	39	7	79
Crisis c/ infección	3	9	21	5	38
TOTAL	15	30	60	12	117

Para comprobar lo anterior se aplicó el análisis de varianza de H Kruskal Wallis resultando una $P = 0.0663$, por lo tanto se comprueba lo anterior siendo no significativo el valor (figura 7).

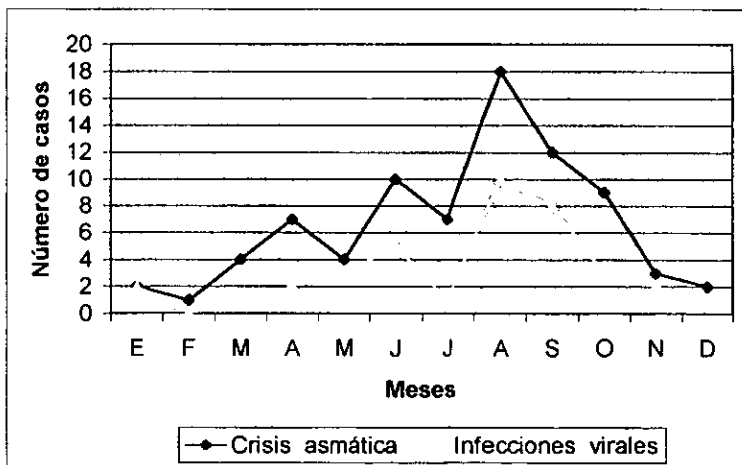


Figura 7 . Correlación de crisis asmática e infecciones virales durante el año.

VII) Valoración de la respuesta inmune ante virus respiratorios en pacientes con asma.

Para evaluar si los niños, han producido una respuesta contra alguno o todos los virus que se trabajaron en este estudio, se buscó la presencia de anticuerpos IgG. No fue posible tomar dos muestras para demostrar la elevación del título de anticuerpos, por lo tanto no se puede considerar como prueba de diagnóstico. Pero si podemos valorar si los niños ya tenían una respuesta montada para un determinado virus.

Se observó que para el virus de PI el mayor porcentaje de niños (33%) presentaron anticuerpos (tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de niños con respuesta inmune humoral (IgG) contra los diferentes virus en pacientes con asma.

TIPO DE VIRUS	PRESENCIA DE ANTICUERPOS (%)
Influenza A	23
Influenza B	9
Parainfluenza	33
Sincitial respiratorio	14
Adenovirus	10

Por último, ya que un alto porcentaje de niños tiene anticuerpos contra el virus de parainfluenza y son 3 los serotipos principales, se decidió ver contra cual de estos tiene mayor respuesta. En la tabla 7 se puede observar que los pacientes con asma han montado una respuesta mayor contra el virus de PI-3. Además se puede observar que en

los niños de 4 a 7 años (subgrupo 2), la respuesta humoral es mayor que en los otros subgrupos. En los niños de 8 a 11 años la respuesta por anticuerpos fue menor (8%).

Tabla 7. Serotipos de anticuerpos contra el virus de parainfluenza.

GRUPO DE EDAD (AÑOS)	PI-1	PI-2	PI-3	%
<1 a 3	2	2	7	46
4-7	1	7	7	62
8-11	0	1	1	8
12-15	0	1	3	17
TOTAL	3	11	18	
%	12	46	75	

DISCUSIÓN

En los últimos años la importancia de detectar y registrar las infecciones por el VSR en humanos se ha incrementado debido a que origina una alta morbilidad y mortalidad en infantes y niños (42). Varios autores han postulado que las infecciones virales particularmente del VSR, contribuyen en el desarrollo de procesos asmáticos (59), además, es el principal agente casual de bronquiolitis y neumonías en niños con IRA (15).

Al igual que en trabajos previos, en los que el VSR es considerado como el patógeno más importante en infantes y niños (15), en este trabajo se observó que el VSR fue el más frecuente, tanto en los pacientes con asma como en los pacientes con IRA. En ambos la frecuencia fue similar (figura 2A y 2B), no se obtuvo diferencias significativas ($P = 0.623$) entre estos dos grupos, pero si con respecto al grupo control.

La alta frecuencia de aislamientos del VSR además de ser el principal patógeno en estas edades, también puede ser porque: 1) las técnicas de laboratorio usadas fueron las adecuadas para el aislamiento, 2) que la edad en el éxito del aislamiento influye, ya que los virus se liberan en mayor cantidad en personas menores de 7 años que en personas mayores (15). 3) o también porque los títulos virales de las muestras inicialmente se encontraban altos, por lo cual el virus pudo sobrevivir al transporte.

Con respecto a las infecciones por otros virus, se observó que en los pacientes asmáticos las infecciones por los virus PI y AD se encontraron con una frecuencia menor; mientras

que en los pacientes con IRA las infecciones que se detectaron con menor frecuencia fueron las de los virus IA e IB (tabla 2A y 2B).

En los pacientes con asma, el VSR se presentó en todos los grupos de edad (figura 4D), y considerando que estos niños presentaron crisis asmática, podríamos pensar en una infección primaria, pero principalmente podría tratarse de la reactivación de una infección previa, ya que varios autores han sugerido, que el VSR puede ocasionar mecanismos de hiperreactividad y ante una segunda infección desencadenar un proceso inflamatorio severo e investigadores han asociado al VSR y el virus de PI con sibilancias (4). Cabe mencionar que aunque en este trabajo no se identificó una asociación directa con el VSR, podemos decir que por su alta frecuencia en pacientes con crisis asmática, pudiera tener una característica intrínseca que pudiera estar relacionada con la hiperreactividad de las crisis asmáticas.

En los pacientes asmáticos en los subgrupos 2 y 3 (4 a 11 años) la infección con VSR se detectó en el 18% y 15% respectivamente; en el subgrupo 1 (<1 a 3 años) solo se detectó en un 5%, en este subgrupo se esperaba que estos pacientes fueran más susceptibles a la infección y con mayor severidad (4), sin embargo no se observó así. Esto puede deberse a que muchos de estos niños pudieron presentar títulos altos de anticuerpos maternos, los cuales los protegieron de la infección viral (4, 40).

En cuanto a la presencia de otros virus por subgrupo de edad, hay algunas concordancias con lo reportado por otros autores (4, 18, 59). Se ha reportado que el virus de influenza A es uno de los virus más frecuentes. En este trabajo se observó que, en el subgrupo 1 (<1 a 3 años) de niños asmáticos se presentó en un 8% (figura 4A) y en los pacientes con IRA en el subgrupo 2 (4 a 7 años) con un 8%, sin embargo en los otros subgrupos de edad (8 a 15 años) fue menor o igual que el virus de IB. Se ha

reportado que, aunque el virus de influenza es más frecuente, hay edades específicas en las que la tendencia por las infecciones por el virus de IB es mayor (27, 52).

Se sabe que las infecciones por adenovirus puede establecer infecciones persistentes en vías respiratorias superiores, provocando procesos inflamatorios crónicos que pueden ser responsables de inducir asma (30, 31, 59).

En la literatura internacional se reporta que la mayor incidencia de adenovirus se ha observado en niños menores de 5 años con un 5-10% de todas las infecciones respiratorias (31). En este trabajo fue de 11% . Los adenovirus solo se presentaron en los primeros grupos de edad (<1 a 7 años) (figura 4E) en los pacientes con asma y en los pacientes con IRA en el grupo 1 (<1 a 3 años).

Esto tal vez se pudo deber a que se trate de la reactivación de una infección persistente adquirida, principalmente en los niños menores de 5 años de edad, por lo que los niños de menor edad fueron los más susceptibles.

En el grupo de asma el subgrupo de edad con mayor número de infecciones virales se presentó en el 3 (8 a 11) y en los pacientes con IRA fue en el subgrupo 2 (4 a 5 años). la explicación de la frecuencia en estos grupos de edad puede ser que, son niños que van a la escuela y que al estar en contacto con otros niños infectados contraen la infección y la introducen al hogar infectado a sus hermanos menores y que los niños con daño previo (asma o hiperreactividad) que son mayores de (4 a 7 años) son blanco fácil para este tipo de infecciones.

Para valorar si ya existía una respuesta humoral contra alguno o algunos de los virus, se detectaron y titularon anticuerpos IgG para todos los virus estudiados.

A pesar de que el VSR fue el agente etiológico aislado con mayor frecuencia, hubo una detección de anticuerpos muy baja (tabla 6). El número tan bajo de anticuerpos detectados pudo deberse a que la respuesta inmune ante una infección primaria por VSR tiende a ser muy débil y de corta duración. Esta respuesta tan débil algunos autores la

atribuyen a tres factores : 1) a la presencia de anticuerpos maternos puede interferir de alguna manera con la producción de anticuerpos anti-VSR, como sucede con el virus del sarampión que además es de la misma familia, 2) el sistema inmune a esa edad es inmaduro, 3) no hay una protección eficiente de anticuerpos, ya que en una infección primaria los títulos de anticuerpos son bajos y disminuyen rápidamente hasta alcanzar títulos no detectables y van aumentando con las reinfecciones, para producir títulos mayores que persisten por más tiempo proporcionando mayor protección, es por ello que las infecciones por este virus son más severas en infantes (28,42).

Por ultimo hay que considerar que la técnica de fijación de complemento no detecta títulos muy pequeños de anticuerpos sobre todo en infantes (15, 28, 53).

Para el virus de IB, el cual se aisló en un 18% de los casos con asma y en el 12% de casos con IRA, también la presencia de anticuerpos se detectó bajo, sólo en un 9% (tabla 5). Puede deberse a que el virus infecta a edad temprana, induciendo la producción de anticuerpos protectores pero de corta duración, por lo que la detección de anticuerpos es baja. En el caso de IA, la detección de anticuerpos fue frecuente, pero también la identificación de virus. Para explicar este hecho, hay que considerar que el virus de IA es un virus con alta frecuencia de variación. Variación que se da por diferentes mecanismos, los más conocidos son la mutación y la recombinación. Al haber diferentes virus de IA, la respuesta de anticuerpos aunque sea alta es ineficiente para neutralizar o evitar la reinfección con los diferentes virus de IA.

Con el virus de PI en niños con asma hay un bajo porcentaje de aislamientos (11%) pero la respuesta de anticuerpos fue la mayor (32%). Esto concuerda ya que nos indica que la protección por anticuerpos es efectiva, por eso hay menos infecciones severas por este virus. El virus afecta principalmente niños produciendo epidemias, además hay 3 serotipos los cuales pueden producir infecciones recurrentes con el mismo serotipo después de un periodo corto de tiempo (16, 49), esto pude explicar, porque hay una alta

frecuencia de anticuerpos contra el virus de PI. Como se puede observar el virus de PI tipo 3 fue el más frecuente, ya que se detectaron anticuerpos en un 75% de los niños y el grupo de edad con mayor presencia de anticuerpos contra este virus fue el 2 (4 a 7 años) con un 62%. Los otros dos serotipos fueron menos frecuentes, estos resultados concuerdan con reportes por otros autores (16, 49).

De acuerdo a la χ^2 (tabla 3) la frecuencia de las infecciones virales en pacientes con asma e IRA dependen de la estación del año, como se puede ver en la figura 6 A y 6B, la infección viral en pacientes con asma es más frecuente en verano y en los pacientes con IRA en primavera, puede deberse a que en verano existen factores ambientales como la humedad y las bajas temperaturas, que permiten que se presenten algunos virus y estos pueden favorecer la exacerbación de asma, además estas condiciones hacen más susceptibles al hospedero sobre todo a los pacientes con asma (23, 68). En los pacientes con IRA la frecuencia fue mayor en primavera, lo que concuerda con reportes que mencionan que en esta época del año hay virus que circulan infectando con alta frecuencia (23).

Hay dos tipos de virus, los cuales se ha reportado que tienen una ocurrencia estacional mas marcada y son el VSR y el virus de influenza, los cuales presentan brotes en invierno y en primavera (15, 52). En nuestros resultados la ocurrencia es más marcada en primavera (tabla 6A y 6B).

Por otro lado se observan valores menores en invierno tanto en pacientes con asma y con IRA, como el estudio se realizó con niños que ingresaron al pabellón, pudiera ser que en esta época del año coincide con los periodos vacacionales por lo que hay poca recepción de muestras.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

También se observó que en una infección viral tanto en un paciente con asma como con IRA no depende del tipo de virus con que es infectado (tabla 4) es decir, según nuestros

resultados ya sea un virus de IA, IB, PI, VSR o AD pueden provocar una enfermedad tanto en un paciente con asma como con IRA. La única diferencia que encontramos entre los pacientes con infección viral con asma y con IRA es que, los pacientes con asma presentan mayor obstrucción de las vías respiratorias con crisis que hacen que el paciente tenga que ser internado y su recuperación sea más lenta que la de un paciente con una IRA.

Finalmente se observó que la severidad de la crisis de los pacientes con asma no depende de una infección viral durante alguna época del año.

Sin embargo, varios estudios relacionan fuertemente a los virus respiratorios sobre todo al VSR como desencadenantes del desarrollo de procesos de asma (59). Esto tal vez pudiera deberse a que el número de muestras estudiadas fue pequeña, por lo cual las diferencias son poco significativas, para ello si se incrementa el número de muestras estudiadas y se relacionan más factores que involucran a los procesos de hiperactividad y a los virus podríamos ver claramente esta relación.

CONCLUSIONES

- * El VSR fue aislado e identificado con mayor frecuencia en los pacientes con asma y con IRA.
- * El VSR fue aislado en todos los grupos de edad en los niños con asma y con IRA.
- * Los virus de parainfluenza y adenovirus fueron aislados con menor frecuencia en los niños con asma y en los niños con IRA los virus de menor frecuencia fueron los de influenza.
- * En los pacientes con asma el mayor número de infecciones virales se detectó en niños de 8 a 11 años de edad y en los pacientes con IRA en niños con 4 a 5 años .
- * La mayor parte de niños con asma presentó anticuerpos contra el virus de parainfluenza, siendo más frecuente contra el serotipo 3.
- * La frecuencia de las infecciones virales en pacientes con asma e IRA dependen de la estación del año.
- * La infección viral tanto en un pacientes con asma como con IRA no depende del tipo de virus con que es infectado
- * La severidad de la crisis de los pacientes con asma no dependen de una infección viral durante alguna época del año, la diferencia que se encontró es que en los pacientes con asma con una infección viral puede llegar a desencadenar un cuadro severo con necesidad de hospitalización y con tiempo de recuperación más lenta que en los pacientes con IRA.

BIBLIOGRAFIA

1. **Akerlind SB et al.** 1993. Antibody responses of children to the C-terminal peptide of the SH protein of respiratory syncytial virus and the immunological characterization of this protein. *J Med Virol.* 40:112-120.
2. **Baker JC** 1991. Human and bovine respiratory syncytial virus: immunopathologic mechanisms. *Vet Quart.* 13:47-59.
3. **Baldrige P y Senterfit LB.** 1976. Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus (39286). *Proc Soc Exp Biol Med.* 151: 684-688.
4. **Balfour-Lynn IM.** 1996. Porqué los virus provocan sibilancias en los niños?. *Br Med J.* 4:11-19.
5. **Ball LA et al.** 1986. Expression of the major glycoprotein G of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:246-250.
6. **Becker S et al.** 1991. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6 and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol.* 147:4307-4312.
7. **Becker S et al.** 1993. Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 8:20-27.
8. **Bjornsdottir US y Busse WW.** 1992. Respiratory infections and asthma. *Med Clin North Am.* 76:895-915.
9. **Busse WW.** 1990. Respiratory infections: Their role in airways responsiveness and the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 85:671-683

10. **Chanock RM et al.** 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg.* 66:281-290.
11. **Chiba Y et al.** 1989. Development of cell-mediated cytotoxic immunity to respiratory syncytial virus in human infants following naturally acquired infection. *J Med Virol.* 28: 133-139
12. **Chonmaitree T et al.** 1981. Interferon production by human mononuclear leucocytes: differences between respiratory syncytial virus and influenza viruses. *Infect Immun.* 32: 300-303.
13. **Cirino NM et al.** 1993. Restricted replication of respiratory syncytial virus in human alveolar macrophages. *J Gen Virol.* 74:1527-1537.
14. **Collins PL et al.** 1990. Evaluation in chimpanzees of vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of human respiratory syncytial virus. *Vaccine.* 8:164-168.
15. **Collins PL et al .** 1996. Respiratory syncytial virus. In: Fields BN et al editors. *Virology.* 3d . Raven Press. New York, pp 1313-1351.
16. **Collins PL et al.** 1996. Parainfluenza virus. In: Field BN et al editors. *Virology.* 3d ed. Raven Press. Philadelphia, E.U. pp 1205-1241.
17. **Corne JM y Holgate ST.** 1997. Mechanisms of virus induced exacebations of asthma. *Thorax.* 52:380-389.
18. **Cypcar D et al.** 1992. The impact of respiratory infections on asthma. *Pediatr Clin Noth Am.* 39: 1259- 1273.
19. **Dulbecco R et al.** 1978. Tratado de Microbiología. 2ª ed. Salvat. Barcelona, pag 1372-1376.
20. **Fernie BF y Gerin JL.** 1980. The stabilization and purification of respiratory syncytial virus using MgSO4. *Virology.* 106:141-144.

21. Fernie BF et al. 1981. The development of Balb/c cells persistently infected with respiratory syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on the cell surface (41129). *Proc Soc Exp Biol Med.* 167:83-86.
22. Frick WE y Busse WW. 1988. Respiratory infections: their role in airway responsiveness and pathogenesis of asthma. *Clinic Chest Med.* 9:539-549.
23. Graham NMH. 1990. The epidemiology of acute respiratory infections in children and adults: a global perspective. *Epidemiologic Reviews.* 12:149-178.
24. Guyton AC. 1977. Tratado de Fisiología Médica. 5ª ed. Interamericana. México, pag 771
25. Hall CB et al. 1986. Respiratory syncytial virus infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med.* 315: 77-81.
26. Hardy RW y Wertz GW. 2000. The Cys3-His, motif of the respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein function. *Journal of Virology.* 74: 5880-5885.
27. Harmon MW. 1992. Influenza Viruses. Lennette EH ed. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. 2nd ed. New York, pp 515-534.
28. Hendry RM. 1992. Respiratory syncytial virus. Lennette EH ed. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. 2nd ed. New York, pp 689-707.
29. Hildreth SW et al. 1993. Lack of detectable enhanced pulmonary histopathology in cotton rats immunized with purified F glycoprotein of respiratory syncytial virus (RSV) when challenged at 3-6 months after immunization. *Vaccine.* 1993; 11:615-618.
30. Hogg JC 1992. Persistent and latent viral infections in the pathology of asthma. *Am Rev Respir Dis.* 145:57-59.
31. Horwitz MS. 1996. Adenovirus. In Field BN et al aditors. *Virology.* 3d ed. Raven Press. New York, pp 2149-2171.
32. Hussain IR et al. 1998. Down regulation of human beta-defensins in respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Car Med.* 157: A287.

33. Hwa Chai E y Jong Lee H. 2000. Genetic diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroups A and B respiratory syncytial viruses isolated over a consecutive epidemics in Korea. *J Infec Dis.* 18:1547-1556.
34. Isaacs D et al. 1987. Cell-mediated cytotoxic response to respiratory syncytial virus in infants with bronchiolitis. *Lancet.* 2, 769.
35. Johnson KM et al. 1961. Correlation of virus shedding , serologic response and illness in adult volunteers. *JAMA.* 176:113-117.
36. Johnson PR y Collins PL. 1989. The 1B (NS2), 1C (NS1) and proteins of human respiratory syncytial virus (RSV) of antigenic subgroups A and B: sequence conservation and divergence within RSV genomic RNA. *J Gen Virol.* 70:1539-1547.
37. Kakuk TJ et al. 1993. A human respiratory syncytial virus (RSV) primate model of enhanced pulmonary pathology induced with a formalin-inactivated RSV vaccine but not a recombinant FG subunit vaccine. *J Infec Dis.* 167:553-561.
38. Kanasaki T et al. 1991 . Effectiveness of enteric immunization in the development of secretory immunoglobulin A response and the outcome of infection with respiratory syncytial virus. *J Virol.* 65: 657-663.
39. Kimman TG et al. 1989. Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: Morphologic and serologic findings. *Am J Vet Res.* 50:684-693.
40. Kimman TG y Westenbrink KF. 1990. Immunity to human and bobine respiratory syncytial virus. *Arch Virol.* 112:1-25.
41. Koller DY et al. 1997. High levels of eosinophil cation protein in wheezing infants predict the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 99:752-756.
42. Manjarrez Zavala ME. 1991. Virus sincitial respiratorio y su participación en las infecciones respiratorias agudas. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx.* 4:161-169.
43. Manjarrez Zavala ME et al. 1991. Virus sincitial respiratorio, condiciones óptimas para su propagación y conservación. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx.* 4:203-208.

44. **Martin-Gallardo A et al.** 1993. Expression of the G glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus in *Salmonella typhimurium*. *J Gen Virol.* 74:453-458.
45. **Martínez I. et al.** 1997. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hipermutation events for the generation of antigenic variants. *J Gen Virol.* 78: 2419-2429.
46. **McIntosh K et al.** 1979. Cell-free and cell-bound antibody in nasal secretions from infants with respiratory syncytial virus infection. *Infec Immun.* 23 :276-281.
47. **Melero JA et al.** 1997. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol.* 78: 2411-2418.
48. **Meyers FH et al.** 1982. *Farmacologia Clínica.* 7ª ed. El Manual Moderno. México, pag 55-59.
49. **Monto AS y Shaw MW.** 1992. *Parainfluenza Viruses.* Lennette EH ed. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections.* 2nd ed. New York. pp 573-589.
50. **Morris JA et al.** 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.* 92:544-550.
51. **Mufson MA et al.** 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 66:2111-2124.
52. **Murphy BR et al.** 1996. Orthomyxoviruses. In Field BN et al editors. *Virology.* 3d. ed. Raven Press. New York, pp 1397-1445.
53. **Parrot RH et al.** 1961. II Serologic studies over a 34-month period of children with bronchiolitis, pneumonia, an minor respiratory diseases. *JAMA.* 176:103-107.
54. **Popow-KT et al.** 1989. Immunoglobulin-class-specific immune response to respiratory syncytial virus structural proteins in infants, children, and adults. *J Med Virol.* 27: 215-223.
55. **Roberts NJ.** 1982. Different effects of influenza virus, respiratory syncytial virus, and sendai virus on human lymphocytes and macrophages. *Infec Immun.* 35:1142-1146.

56. Salkind AR et al. 1991. Interleukin-1-inhibitor activity induced by respiratory syncytial virus: abrogation of virus-specific and alternate human lymphocyte proliferative responses. *J Infect Dis.* 163:71-77.
57. Scott R et al. 1978. Development of in vitro correlates of cell-mediated immunity to respiratory syncytial virus infection in humans. *J Infect Dis.* 137:810-817.
58. Smith TF et al. 1981. Activation of complement by cells infected with respiratory syncytial virus. *Infection and Immunity.* 33: 43-48.
59. Sterk PJ. 1993. Virus-induced airway hiperresponsiveness in man. *Eur Respir J.* 6:894-902.
60. Szentivanyi A. 1968. The b-adrenergic theory of atopic abnormality is asthma. *J Allergy.* 42: 203.
61. Tannock GA et al. 1987. Freeze-drying of respiratory syncytial viruses for transportation and storage. *J Clin Microbiology.* 25:1769-1771.
62. Taylor G et al. 1992. Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies. *J Gen Virol.* 73:2217-2223.
63. Wagner DK et al. 1989. Serum immunoglobulin G antibody subclass response to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins after first, second, and third infections. *J Clin Microbiol.* 27:589-592.
64. Walsh EE et al. 1986. Analysis of respiratory syncytial virus fusion protein using monoclonal and polyclonal antibodies. *J Gen Virol.* 67:505-513.
65. Welliver RC et al. 1980. The appearance of cell-bound IgE in respiratory-tract epithelium after respiratory-syncytial-virus infection. *New Engl J Med.* 303:1198-1202.
66. Welliver RC et al. 1981. The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the realease of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. *N Engl J Med.* 305:841-846.

67. Welliver RC et al. 1989. Respiratory syncytial virus-specific antibody responses in immunoglobulin A and E isotypes to the F and G proteins and to intact virus after natural infection. *J Clin Microbiol.* 27: 295-299.

68. Welliver RC. 1995. RSV and chronic asthma. *The Lancet.* 34: 789-790.