

Respuesta inmune respiratoria al año de vida en el niño prematuro

V. Matías¹, V. Iglesias², L. San Feliciano³, J.E. Fernández⁴, S. Lapeña⁵, J. Ardura⁶, M.J. Soga⁷, M.P. Aragón¹, A. Remesal³, F. Benito³, J. Andrés⁴, J.M. Eiros⁸, D. Varillas², F. Centeno⁷, V. Marugán⁹, N. Hernández⁹, R. Bachiller¹⁰, R. Almansa², R. Ortiz de Lejarazu⁸, O. Ramilo¹¹, J.F. Bermejo-Martín²

¹Servicio de Pediatría. Hospital Clínico Universitario. SACYL. ²Unidad de Investigación Médica en Infección e Inmunidad (IMI). Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario-IECSCYL. Valladolid. ³Servicio de Pediatría. Hospital Clínico Universitario. SACYL. Salamanca. ⁴Servicio de Pediatría. Complejo Hospitalario de Palencia. SACYL. Palencia. ⁵Servicio de Pediatría. Complejo Asistencial Universitario de León. ⁶Departamento de Pediatría. Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina. ⁷Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Río Hortega. SACYL. Valladolid. ⁸Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario. SACYL. Valladolid. ⁹Servicio de Pediatría. Complejo Asistencial de Zamora. SACYL. Zamora. ¹⁰Centro de Salud «Pilarica-Circular». SACYL. Valladolid. ¹¹Nationwide Children's Hospital. Ohio State University. The Ohio State University College of Medicine. Estados Unidos

Resumen

Introducción: Existe un gran desconocimiento acerca de la evolución del sistema inmune en la mucosa respiratoria del niño prematuro a largo plazo. La inmadurez y las infecciones respiratorias pueden influir sobre la respuesta inmune de las mucosas. El propósito de este estudio era evaluar la secreción respiratoria de los mediadores inmunológicos al año de vida en niños prematuros.

Pacientes y métodos: Desde octubre de 2008 hasta abril de 2009 se reclutaron 77 prematuros nacidos en 6 servicios de pediatría de Castilla y León, así como 14 controles sanos a término. Los prematuros fueron citados al año de edad gestacional corregida y los niños a término al año de vida, momento en el cual se les realizó un lavado nasal para determinar los niveles de 27 mediadores inmunológicos mediante un ensayo de Biorad®.

Resultados: Los niños prematuros tenían niveles más elevados de quimiocinas (eotaxina, IP-10), citocinas Th-1 (IFN- γ), Th-2 (IL-13), Th-17 (IL-17) y factores de crecimiento celular (PDGF-bb, VEGF, FGF-b, G-CSF y GM-CSF) que los niños a término. Cuando se compararon los niveles de mediadores entre los niños que habían recibido profilaxis para el virus respiratorio sincitial con palivizumab y los que no, los segundos tenían niveles significativamente más altos de MCP-1, IL-1RA, IL-10, IL-12p70 y VEGF ($p < 0,05$) que los primeros.

Conclusiones: Este trabajo demuestra por vez primera la influencia de la prematuridad sobre los perfiles de secreción respiratoria de las citocinas y quimiocinas a largo plazo. Por otra parte, nuestros resultados indican que la evaluación del impacto de la profilaxis de la infección respiratoria es un camino interesante para comprender la maduración de la respuesta inmune de la mucosa respiratoria del prematuro.

©2012 Ediciones Mayo, S.A. Todos los derechos reservados.

Palabras clave

Palivizumab, citocinas, virus respiratorio sincitial

Abstract

Title: Respiratory immune response in first year of a preterm infant

Introduction: There is a big unawareness about a long term respiratory mucous immune system evolution in the preterm infant. Immaturity and respiratory infections can have a big influence on the mucous immune responses. This investigation's purpose is the evaluation of respiratory secretion of inflammatory immunological mediators in the first year of a preterm infant.

Patients and methods: Between October 2008 and April 2009, 77 preterm infants were born in 6 pediatric services of Castilla y Leon, plus to another 14 healthy controls results. Children were invited on their first corrected gestational age and the ones of healthy controls results. Nasal washing were applied to determine 27 immunological mediators' levels by applying a Biorad test.

Results: The preterm infants has higher chemokine (eotaxin, IP-10), cytokines Th-1 (IFN- γ), Th-2 (IL-13), Th-17 (IL-17) and cell growing factors (PDGF-bb, VEGF, FGF-b, G-CSF and GM-CSF) levels than a healthy control results children. When a comparison was made between children that received prophylaxis for their respiratory syncytial virus with palivizumab and the ones that did not receive it, the second group showed higher MCP-1, IL-1RA, IL-10, IL-12p70 and VEGF ($p < 0,05$) levels.

Conclusions: This work proves, for the first time, the influence of the premature birth on chemokine and cytokines respiratory secretion levels in a long term concepts. On other hand, our results indicate that prophylaxis impact in the respiratory infection is an interesting way to understand respiratory mucous immune response maturation in the preterm infant.

©2012 Ediciones Mayo, S.A. All rights reserved.

Keywords

Palivizumab, cytokines, respiratory syncytial virus

Fecha de recepción: 2/05/11. Fecha de aceptación: 10/06/11.

Correspondencia: J.F. Bermejo-Martín. Unidad de Investigación Médica en Infección e Inmunidad (IMI). Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario-IECSCYL. Ramón y Cajal, 3. 47005 Valladolid. Correo electrónico: jfbermejo@saludcastillayleon.es

Lista de abreviaturas

EGC	Edad gestacional corregida
FGF-b	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
IP-10	Proteína inducible por interferón 10
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocito 1
MIP-1 α	Proteína inflamatoria derivada de macrófago-1 alfa
MIP-1 β	Proteína inflamatoria derivada de macrófago-1 beta
PVZ	Palivizumab
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VRS	Virus respiratorio sincitial

Introducción

Existe un gran desconocimiento sobre la evolución de la respuesta inmune respiratoria de los recién nacidos pretérmino. Estos niños tienen una respuesta inmunológica inmadura al nacer^{1,2}. Los pretérmino, incluso los que no presentan ninguna enfermedad pulmonar crónica, tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones graves debidas a la infección por el virus respiratorio sincitial (VRS) durante el primer año de vida³. Además, estos pacientes tienen un mayor riesgo de desarrollar episodios recurrentes de sibilancias y/o asma^{3,4} y muestran signos persistentes de una función pulmonar alterada⁵. Tanto el tracto respiratorio como el sistema inmune sufren un proceso de rápida maduración durante el primer año de vida. Sin embargo, el desarrollo posnatal de ambos está afectado por la respuesta a las infecciones virales⁶. También se ha descrito una fuerte asociación entre la bronquiolitis causada por el VRS en la infancia y la existencia de episodios recurrentes de sibilancias a largo plazo⁷⁻⁹. Las citocinas y las quimiocinas son mediadores inmunológicos solubles que reclutan células de serie blanca al foco de infección, causando inflamación¹⁰. Estos mediadores se pueden detectar en muestras de lavado nasofaríngeo y suero de los niños¹¹⁻²¹. Por otra parte, la aparición de terapias profilácticas de la infección por el VRS en niños pretérmino se ha generalizado en nuestro medio, y el palivizumab (PVZ) es el fármaco más comúnmente empleado^{22,23}.

El propósito de este estudio era evaluar los perfiles de secreción respiratoria de los mediadores inmunológicos al año de vida en niños prematuros, comparados con los de niños a término sanos, teniendo en cuenta la potencial influencia de haber o no recibido profilaxis con PVZ en dichos perfiles.

Pacientes y métodos

Se trata de un estudio multicéntrico y prospectivo, que contó con la colaboración de seis servicios de pediatría del Sistema

Público de Salud de Castilla y León. El reclutamiento comenzó en octubre de 2008 y terminó en abril de 2009. En este periodo se incluyeron todos los pretérmino nacidos en los servicios de pediatría participantes, cuyos padres o tutores legales accedieron a firmar el consentimiento informado (n= 77). A todos los niños se les citó al año de vida, en función de la edad gestacional corregida (EGC), para disminuir la influencia que el grado de maduración individual de la mucosa respiratoria pudiera tener en la evaluación de la respuesta inmune. El cálculo de la EGC se realizó según la siguiente fórmula:

$$\text{EGC} = 12 \text{ meses} + (9 \text{ meses} - [\text{edad gestacional, en meses}])$$

Durante este periodo, se reclutaron en paralelo controles a término, que tras la firma del consentimiento informado por parte de los padres o tutores legales, fueron citados al año exacto de vida (n= 14). A todos los niños reclutados se les realizó en el momento de la revisión al cabo de un año un lavado nasal bilateral, mediante la instilación de 2,5 mL de suero salino isotónico en cada narina y aspiración con un sistema estándar de vacío, como el utilizado en la recogida de muestras para el diagnóstico de infecciones por virus respiratorios. La recogida de las muestras se realizó en los servicios hospitalarios participantes en el estudio, por parte de enfermeras especializadas, sin producir molestias significativas a los niños. Se comprobó que durante el momento de la toma de la muestra ningún niño presentara signos de infección respiratoria, inflamatoria o fiebre, ni que estuviera recibiendo ningún tratamiento. Para recoger los datos de una manera homogénea se utilizó un protocolo común en todos los centros colaboradores. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, centro coordinador.

Detección de mediadores inmunológicos en lavados nasales

Todos los lavados fueron centrifugados apropiadamente, y el sobrenadante fue recogido para la determinación de mediadores inmunológicos. Se utilizó un equipo multiplex basado en micropocillos (panel Biorad® Bio-Plex human Th1/Th2 27-plex, Hercules, CA, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante, mediante una plataforma Luminex® (Austin, TX, Estados Unidos). Con ello, se consiguió la detección simultánea de 27 citocinas sobre la misma muestra.

Análisis estadístico

Para el análisis de mediadores inmunológicos se utilizó un estadístico no paramétrico, ya que el test de Saphiro Wilk demostró la ausencia de una distribución normal de los valores de mediadores analizados, y el test de Levene demostró la falta de homogeneidad de varianzas. Así, para las comparaciones se utilizó el test de Mann-Whitney. Los niños pretérmino se dividieron en dos grupos, según hubieran recibido o no profilaxis con PVZ. Los niños que recibieron menos de tres dosis de PVZ fueron excluidos del análisis. El nivel de significación estadística se fijó en un valor de $p < 0,05$.

TABLA 1
Datos descriptivos de los niños del estudio (I)

	Prematuros sin PVZ (n= 30)	Prematuros con PVZ (n= 47)	A término (n= 14)
Edad de la madre (años) (media, DE)	31,8 (5,2)	33,9 (5,1)	33,8 (4,2)
Madre fumadora durante el embarazo (%)	24,1	0,0	0,0
Edad gestacional (semanas) (media, DE)	33,9 (1,1)	30,6 (2,9)	38,1 (2,2)
Peso al nacimiento (kg) (media, DE)	2,1 (0,4)	1,5 (0,4)	3,1 (0,5)
Longitud al nacimiento (cm) (media, DE)	44,6 (2,4)	40,5 (4,3)	50,4 (1,9)
Sexo (M/V) (%)	46,7/53,3	47,8/52,2	57,1/42,9
Test de Apgar 1' (mín, máx)	8 (5,9)	7 (3,9)	8 (6,9)
Test de Apgar 5' (mín, máx)	9 (8,10)	9 (4,10)	10 (9,10)
Ventilación no invasiva (%)	13,3	67,5	0,0
Días con ventilación no invasiva (media, DE)	0,1 (0,3)	3,2 (5,6)	NA
Ventilación invasiva (%)	13,3	40	0,0
Días con ventilación invasiva (media, DE)	0,4 (1,6)	3,3 (6,9)	NA
O ₂ (%)	33,3	72,5	0,0
Días con O ₂ (media, DE)	1,1 (2,1)	16,9 (31,1)	NA
Edad al alta (días) (media, DE)	14,3 (8,6)	44,6 (33,9)	3,2 (1,2)

DE: desviación estándar; M: mujer; NA: no aplicable; V: varón; PVZ: palivizumab.

Resultados

Características clínicas (tablas 1 y 2)

La edad gestacional media de los pretérmino que recibieron PVZ era menor que la de los que no recibieron profilaxis con este fármaco, como era de esperar, debido a las recomendaciones nacionales sobre el uso de PVZ²⁴; por tanto, los primeros presentaron peores puntuaciones en el test de Apgar, así como un peso y una talla menores al nacer. Los pretérmino del grupo PVZ presentaron un peor estado respiratorio que los pretérmino que no recibieron PVZ, y requirieron ventilación invasiva, no invasiva y oxigenoterapia con más frecuencia y durante más tiempo. El antecedente de displasia broncopulmonar fue más frecuente en los niños que recibieron PVZ. En todos los grupos el número promedio de episodios de sibilancias fue anecdótico (en torno a 1). Ninguno de los niños estudiados requirió ingreso hospitalario por bronquiolitis causada por el VRS.

Comparación de niveles de mediadores entre niños pretérmino con PVZ, pretérmino sin PVZ y niños a término (tablas 3 y 4)

Las interleucinas IL-9, IL-15, IL-2, IL-4 e IL-5 se encontraban por debajo del límite de detección del método de cuantificación empleado en la práctica totalidad de los casos estudiados. Por tanto, estos mediadores no fueron considerados en el análisis.

La comparación entre grupos de los niveles de mediadores que pudieron ser detectados reveló que los niños pretérmino, independientemente de haber recibido o no PVZ, tenían niveles más elevados de quimiocinas (eotaxina, IP-10), citocinas Th-1

(IFN- γ), Th-2 (IL-13) y Th-17 (IL-17) y factores de crecimiento (PDGF-bb, VEGF, FGF-b, G-CSF y GM-CSF) que los niños a término.

Por otra parte, los pretérmino no tratados tenían niveles significativamente más altos de quimiocina MCP-1, citocina inmunomoduladora IL-1RA, citocina Th-17 (IL-6) y citocina Th-1 (IL-12) que los niños a término. Además, los pretérmino que no recibieron PVZ tenían niveles más altos de MCP-1, IL-1RA, IL-10, IL-12p70 y VEGF ($p < 0,05$), y de IL-6 y MIP-1 β ($p < 0,1$) que los que recibieron PVZ.

Discusión

La comparación con los niños a término demostró que, en general, la respuesta inmunológica en el árbol respiratorio en niños pretérmino se caracterizaba por una secreción más activa de mediadores solubles participantes en la génesis de respuestas inflamatorias que los niños a término. La eotaxina es una quimiocina con capacidad de atraer eosinófilos, y puede inducir la proliferación de células de músculo liso en la mucosa respiratoria²⁴. La IP-10 es otra quimiocina que es capaz de atraer linfocitos T. Su secreción parece estar relacionada con la respuesta de IL-17, una citocina ligada a la patogenia del asma y las enfermedades autoinmunes²⁵, y también aparece aumentada nasalmente en los prematuros de nuestro estudio. El IFN- γ es un mediador proinflamatorio secretado por las células T-helper 1 y *natural killer*, que induce el reclutamiento de leucocitos, el procesamiento y la presentación de antígeno, la

TABLA 2

Datos descriptivos de los niños del estudio (II)

	Prematuros sin PVZ (n= 30)	Prematuros con PVZ (n= 47)	A término (n= 14)
Patología cardiovascular (%)	3,3	4,3	0,0
Inmunodeficiencia (%)	0	0	0
Displasia broncopulmonar (%)	0	19,1	0
Dermatitis (%)	3,3	27,7	28,6
Atopia (%)	50	37	42,9
Lactancia materna (%)	56,7	61,4	69,2
Duración de la lactancia (meses) (media, DE)	3,3 (4,3)	2,6 (3,7)	6,3 (5,4)
Número de convivientes en casa (media, DE)	3,6 (0,7)	4,2 (0,9)	4,4 (1,6)
Número de dosis de Synagis® (media, DE)	NA	4,1 (1,4)	NA
Tabaquismo (%)	50	37	42,9
Asistencia a la guardería (%)	31	19,6	50
Hermanos en la guardería (%)	20,7	17,4	15,4
Hermanos en la escuela (%)	31	19,6	0
Sibilancias con tratamiento (%)	37,9	53,2	50
Sibilancias observadas por el pediatra (%)	37,9	53,2	50
Número de episodios (media, DE)	0,6 (1,7)	1,2 (2,2)	0,5 (0,5)
Ingresos por causa respiratoria (%)	10	14,9	7,1
Ingresos por otra causa (%)	13,3	19,1	7,1

DE: desviación estándar; M: mujer; NA: no aplicable; V: varón; PVZ: palivizumab.

proliferación celular y la apoptosis. El IFN- γ se ha relacionado con el asma inducida por virus²⁶.

La IL-13 es una citocina T-helper 2 relacionada también con la patogénia del asma²⁷.

El PDGF-bb es un factor de crecimiento celular relacionado con la inducción de hiperplasia de músculo liso bronquial²⁸, mientras que el VEGF está relacionado con la formación de vasos *de novo* en el árbol respiratorio, así como con el aumento de la permeabilidad vascular²⁹. El FGF es necesario para la formación de nuevos alvéolos y la protección de las células alveolares epiteliales, así como para inducir la reparación pulmonar³⁰. El G-CSF y el GM-CSF estimulan la proliferación y la maduración de células progenitoras mieloides y, por tanto, promueven la movilización de células progenitoras sanguíneas³¹.

La mayor inmadurez del árbol respiratorio de los prematuros podría explicar el aumento en los niveles de secreción de citocinas y quimiocinas en el tracto respiratorio superior al año de vida. De hecho, ya se conocía la asociación entre prematuridad y estado proinflamatorio usando células de sangre de cordón³². Por otra parte, se desconoce cómo reacciona la mucosa respiratoria del prematuro ante las infecciones respiratorias, comparada con la mucosa del niño pretérmino. En este sentido, es interesante destacar que los niños que recibieron PVZ tenían menores niveles de

MCP-1, IL-1RA, IL-10, IL-12p70 y VEGF que los que no habían recibido profilaxis con este fármaco. La MCP-1 es una molécula quimiotáctica para los monocitos. La IL-12p70 es una molécula fundamental para coordinar el paso desde la inmunidad innata a la adaptativa. La IL-10 y la IL-1-RA son dos moléculas inmunomoduladoras que, por una parte, intentan contrarrestar respuestas inflamatorias exageradas pero, por otra, pueden constituir un mecanismo de escape a la respuesta inmune. Estos mediadores participan en la respuesta frente a virus^{20,21,33}.

Si bien es cierto que entre los dos grupos de niños (los que recibieron profilaxis con PVZ y los que no) existía una diferencia en la edad gestacional, la potencial influencia de esta diferencia sobre el grado de maduración de la mucosa respiratoria entre los niños prematuros del estudio se corrige al haberlos citado al año de EGC, lo que permite comparar los dos grupos. Aunque nuestro estudio es meramente descriptivo por la naturaleza de su diseño, sería interesante comprobar en futuros estudios, con un mayor tamaño muestral, si existe un potencial efecto protector del PVZ sobre la secreción de citocinas y quimiocinas por el árbol respiratorio a largo plazo en los prematuros que lo reciben, asociado a su perfil de prevención de la infección por el VRS durante el primer año de vida.

En conclusión, este trabajo demuestra por vez primera la influencia de la prematuridad sobre los perfiles respiratorios de secreción de citocinas y quimiocinas a largo plazo. Por otra

TABLA 3 Comparación de niveles de citocinas entre grupos (I)

	0: prematuros sin PVZ (n= 30)	1: prematuros con PVZ (n= 47)	2: a término (n= 14)	0 frente a 1	0 frente a 2	1 frente a 2
IL-1RA	6.807,6 (14.270,0)	1.753,8 (2.525,1)	916,6 (2.967,4)	0,028	0,012	0,337
Eotaxina	187,8 (538,5)	271,0 (482,4)	59,8 (338,3)	0,595	0,046	0,018
FGFB	40,5 (70,1)	27,2 (80,8)	0,7 (2,6)	0,316	0,002	0,003
IP-10	173.923,4 (303.200,6)	84.830,2 (747.834,8)	10.291,0 (17.897,4)	0,958	0,000	0,000
MIP-1 α	5,7 (9,6)	4,0 (9,7)	5,9 (13,7)	0,206	0,405	0,487
PDGF-bb	83,5 (207,3)	43,0 (130,5)	1,3 (35,4)	0,152	0,001	0,006
RANTES	147,9 (316,0)	52,8 (112,2)	111,9 (263,4)	0,149	0,650	0,449
VEGF	15.036,8 (24.855,2)	5.609,8 (15.747,5)	1.580,9 (3.129,6)	0,011	0,000	0,003
IL-1 β	66,5 (270,8)	48,2 (107,9)	28,8 (106,9)	0,111	0,208	0,986
IL-6	118,2 (430,0)	48,6 (151,9)	15,8 (25,4)	0,061	0,006	0,107
IL-8	1.626,0 (3.800,8)	881,9 (3.942,5)	1.954,2 (2.239,4)	0,232	0,980	0,353
IL-7	82,8 (62,9)	38,3 (47,6)	79,8 (105,5)	0,007	0,821	0,093
IL-17	6,4 (28,1)	2,2 (11,2)	0,54 (0,0)	0,113	0,000	0,000
G-CSF	2.444,0 (8.563,3)	1.514,8 (8.716,4)	71,9 (1.095,9)	0,397	0,000	0,001

Los resultados se expresan en pg/mL como mediana (rango intercuartílico). En las tres últimas columnas se muestra el valor de p para cada comparación.

TABLA 4 Comparación de niveles de citocinas entre grupos (II)

	0: prematuros sin PVZ (n= 30)	1: prematuros con PVZ (n= 47)	2: a término (n= 14)	0 frente a 1	0 frente a 2	1 frente a 2
MCP-1	42 (50,3)	21 (37,7)	15,6 (48,4)	0,019	0,046	0,440
MIP-1 β	67,4 (147,9)	37,1 (119,9)	48 (158,9)	0,062	0,378	0,471
IL-10	21,9 (53)	7 (14,2)	12,1 (28,5)	0,020	0,473	0,223
IL-12	97,9 (65)	66,9 (54,5)	50,9 (85,7)	0,039	0,030	0,120
IL-13	6,6 (5,9)	5,6 (3,6)	2,3 (0,7)	0,288	0,000	0,000
GM-CSF	1,3 (29,3)	9,2 (42,3)	0,84 (0,0)	0,318	0,002	0,000
IFN- γ	258,9 (461,8)	171,7 (368,4)	1,4 (96)	0,104	0,000	0,004
TNF- α	18,2 (125,9)	4,8 (36,3)	4,8 (173)	0,103	0,296	0,932

Los resultados se expresan en pg/mL como mediana (rango intercuartílico). En las tres últimas columnas se muestra el valor de p para cada comparación.

parte, nuestros resultados indican que la evaluación del impacto de la profilaxis de la infección respiratoria es un camino interesante para comprender la maduración de la respuesta inmune de la mucosa respiratoria del prematuro.

Agradecimientos

El equipo de investigadores quiere expresar su agradecimiento al personal de enfermería que ha recogido las muestras de este estudio. Este trabajo ha sido posible gracias al Fondo de Investigaciones Sanitarias, del Ministerio de Ciencia e Innovación, y la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León (programa para favorecer la incorporación de grupos de investigación en las

Instituciones del Sistema Nacional de Salud, EMER07/050), que financian los contratos de J.F.B.M., V.I., R.A. y L.R. El estudio contó con la colaboración de Abbott Laboratorios S.A. ■

Bibliografía

1. Sadeghi K, Berger A, Langgartner M, Prusa AR, Hayde M, Herkner K, et al. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. *J Infect Dis.* 2007; 195(2): 296-302.
2. Simoes EA. RSV disease in the pediatric population: epidemiology, seasonal variability, and long-term outcomes. *Manag Care.* 2008; 17 Supl 12: 3-6 [discusión: 18-19].
3. Kumar R. Prenatal factors and the development of asthma. *Curr Opin Pediatr.* 2008; 20(6): 682-687.

4. Chan KN, Noble-Jamieson CM, Elliman A, Bryan EM, Silverman M. Lung function in children of low birth weight. *Arch Dis Child*. 1989; 64(9): 1.284-1.293.
5. Mai XM, Gaddlin PO, Nilsson L, Finnstrom O, Bjorksten B, Jenmalm MC, et al. Asthma, lung function and allergy in 12-year-old children with very low birth weight: a prospective study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2003; 14(3): 184-192.
6. Openshaw PJ, Yamaguchi Y, Tregoning JS. Childhood infections, the developing immune system, and the origins of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114(6): 1.275-1.277.
7. Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B, Robinson PD, Sigurbergsson F, Bjarnason R, et al. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax*. 2005; 65(12): 1.045-1.052.
8. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171(2): 137-141.
9. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161(5): 1.501-1.507.
10. Culley FJ, Pennycook AM, Tregoning JS, Hussell T, Openshaw PJ. Differential chemokine expression following respiratory virus infection reflects Th1- or Th2-biased immunopathology. *J Virol*. 2006; 80(9): 4.521-4.527.
11. Chung HL, Kim WT, Kim JK, Choi EJ, Lee JH, Lee GH, Kim SG. Relationship between atopic status and nasal interleukin 10 and 11 levels in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005; 94(2): 267-272.
12. Fernández JA, Tapia L, Palomino MA, Larranaga C, Pena M, Jaramillo H. Plasma interferon-gamma, interleukin-10 and soluble markers of immune activation in infants with primary adenovirus (ADV) and respiratory syncytial virus (RSV) infection. *Eur Cytokine Net*. 2005; 16(1): 35-40.
13. Kristjansson S, Bjarnarson SP, Wennergren G, Palsdottir AH, Arnadottir T, Haraldsson A, et al. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses during the first 3 months of life promote a local TH2-like response. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 116(4): 805-811.
14. Laham FR, Israele V, Casellas JM, García AM, Lac Prugent CM, Hoffman SJ, et al. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *J Infect Dis*. 2004; 189(11): 2.047-2.056.
15. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168(6): 633-639.
16. Noah TL, Ivins SS, Murphy P, Kazachkova I, Moats-Staats B, Henderson FW. Chemokines and inflammation in the nasal passages of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Immunol*. 2002; 104(1): 86-95.
17. Pinto RA, Arredondo SM, Bono MR, Gaggero AA, Díaz PV. T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol. *Pediatrics*. 2006; 117(5): e878-e886.
18. Tahan F, Ozcan A, Koc N. Clarithromycin in the treatment of RSV bronchiolitis: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Eur Respir J*. 2007; 29(1): 91-97.
19. Van Bentem IJ, Van Drunen CM, Koevoet JL, Koopman LP, Hop WC, Osterhaus AD, et al. Reduced nasal IL-10 and enhanced TNF-alpha responses during rhinovirus and RSV-induced upper respiratory tract infection in atopic and non-atopic infants. *J Med Virol*. 2005; 75(2): 348-357.
20. Bermejo-Martín JF, García-Arévalo MC, Alonso A, De Lejarazu RO, Pino M, Resino S, et al. Persistence of proinflammatory response after severe respiratory syncytial virus disease in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119(6): 1.547-1.550.
21. Pino M, Kelvin DJ, Bermejo-Martín JF, Alonso A, Matías V, Tenorio A, et al. Nasopharyngeal aspirate cytokine levels 1 yr after severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009; 20(8): 791-795.
22. Simoes EA, Groothuis JR, Carbonell-Estrany X, Rieger CH, Mitchell I, Fredrick LM, et al. Palivizumab prophylaxis, respiratory syncytial virus, and subsequent recurrent wheezing. *J Pediatr*. 2007; 151(1): 34-42, 42 e31.
23. Simoes EA, Carbonell-Estrany X, Rieger CH, Mitchell I, Fredrick L, Groothuis JR. The effect of respiratory syncytial virus on subsequent recurrent wheezing in atopic and nonatopic children. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 126(2): 256-262.
24. Halwani R, Al-Abri J, Beland M, Al-Jahdali H, Halayko AJ, Lee TH, et al. CC and CXC chemokines induce airway smooth muscle proliferation and survival. *J Immunol*. 2011; 186(7): 4.156-4.163.
25. Kawaguchi M, Kokubu F, Huang SK, Homma T, Odaka M, Watanabe S, et al. The IL-17F signaling pathway is involved in the induction of IFN-gamma-inducible protein 10 in bronchial epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119(6): 1.408-1.414.
26. Van Schaik SM, Tristram DA, Nagpal IS, Hintz KM, Welliver RC 2nd, Welliver RC. Increased production of IFN-gamma and cysteinyl leukotrienes in virus-induced wheezing. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103(4): 630-636.
27. Thavagnanam S, Parker JC, McBrien ME, Skibinski G, Heaney LG, Shields MD. Effects of IL-13 on mucociliary differentiation of pediatric asthmatic bronchial epithelial cells. *Pediatr Res*. 2011; 69(2): 95-100.
28. Hirota JA, Ask K, Farkas L, Smith JA, Ellis R, Rodríguez-Lecompte JC, et al. In vivo role of platelet derived growth factor-bb in airway smooth muscle proliferation in mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 45(3): 566-572.
29. Detoraki A, Granata F, Staibano S, Rossi FW, Marone G, Genovese A. Angiogenesis and lymphangiogenesis in bronchial asthma. *Allergy*. 2010; 65(8): 946-958.
30. Warburton D, Bellusci S. The molecular genetics of lung morphogenesis and injury repair. *Paediatr Respir Rev*. 2004; 5 Suppl A: 283-287.
31. Liang DC. The role of colony-stimulating factors and granulocyte transfusion in treatment options for neutropenia in children with cancer. *Paediatr Drugs*. 2003; 5(10): 673-684.
32. Neta GI, Von Ehrenstein OS, Goldman LR, Lum K, Sundaram R, Andrews W, et al. Umbilical cord serum cytokine levels and risks of small-for-gestational-age and preterm birth. *Am J Epidemiol*. 2010; 171(8): 859-867.
33. Bermejo-Martín JF, Martín-Loeches I, Rello J, Antón A, Almansa R, Xu L, et al. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2010; 14(5): 167R.