

Inmunomoduladores: anticuerpos monoclonales, inhibidores de la calcineurina

M.A. Martín Mateos

Profesora Titular de Pediatría. Sección de Inmunología y Alergia. Servicio de Pediatría. Hospital Sant Joan de Déu-Hospital Clínic. Universidad de Barcelona. España.

RESUMEN

El término inmunomodulación, define la acción de cambiar la respuesta inmunológica, inmunosupresión, es suprimir la respuesta. La inmunomodulación, se utiliza para cambiar una respuesta inmunológica negativa, en el ser humano, generalmente se tratará de un exceso de respuesta con producción de anticuerpos anómalos y células sensibilizadas que van a producir enfermedad.

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) son proteínas producidas por células híbridas (hibridomas) resultado de la fusión de un linfocito B (LB), capaz de producir anticuerpos específicos para un antígeno, pero de manera limitada con una célula de mieloma, capaz de producir de manera ilimitada anticuerpos pero no específicos. En la actualidad se utilizan AcMo en diagnóstico inmunológico, en el diagnóstico y tratamiento de los tumores, en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, en el tratamiento de las enfermedades alérgicas, y en la profilaxis de la infección por VRS y asma del lactante. En el tratamiento del cáncer, se utilizan AcMo unidos a fármacos antineoplásicos, específicos para receptores de células tumorales, solo y que no dañan células sanas. Son ejemplos, AcMo anti-DC20 (LB) (Rituximab) usado en el tratamiento de los linfomas no Hodgkin y en la leucemia crónica linfocítica; AcMo anti-CD38 unido a una toxina en el tratamiento del mieloma múltiple; AcMo anti-RIL2- α , unido a toxina diftérica a pequeñas dosis en el tratamiento de la leucemia de células T.

En la actualidad el uso clínico de AcMo en enfermedades autoinmunes se ha extendido, tanto en niños como en adultos y son arma eficaz en pacientes resistentes a otros tratamientos. En el tratamiento

del rechazo agudo de trasplantes de órganos, se utilizan AcMo dirigidos contra antígenos de superficie del LT, con la finalidad de inhibir su función y que el órgano trasplantado, no sea rechazado. Las enfermedades alérgicas, por hipersensibilidad tipo I, resistentes a los tratamientos habituales, se benefician del tratamiento con AcMo humanizados, selectivos frente a los mediadores de la reacción alérgica: IgE, IL-5, IL-4, TNF- α y otros.

Profilaxis de la Bronquiolitis por VRS y del asma del lactante: Se utiliza con criterios clínicos estrictos y en ambiente hospitalario, AcMo humanizados de clase IgG (Palivizumab) que inhibe específicamente, el epítipo antigénico A de la proteína F del virus, (proteína de fusión), que impide al virus, fusionarse con las células a las que debe infectar para replicarse en su interior.

Inhibidores de la calcineurina: La calcineurina es una fosfatasa intracitoplasmática que activa mediante desfosforilación, el factor de transcripción NFAT (factor nuclear de los linfocitos T activados), necesario para la expresión de genes de citocinas (IL-2, IL-4, TNF y otros). El factor NFAT, se encuentra en el citoplasma de los LT. La activación de la calcineurina depende de señales de calcio, generadas como respuesta del receptor de LT (RCT). De estos fármacos, se utilizan en clínica dos: ciclosporina-A y FK-506. Las indicaciones de uso clínico de tacrolimus (FK-506) son prevención y tratamiento del rechazo de trasplantes, sobre todo hepático, cardíaco, pulmonar y renal. También se ha usado en enfermedades autoinmunes sistémicas, síndrome nefrótico y psoriasis. De forma tópica se utiliza en el tratamiento de la dermatitis atópica. La ciclosporina se utiliza en la prevención del rechazo de los trasplantes, sobre todo de riñón, hígado, corazón y pulmón. También se utiliza en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes:

uveitis, psoriasis, diabetes tipo I, con buenos resultados, así como en el síndrome nefrótico corticorresistente.

Palabras clave: Inmunomodulación. Anticuerpos monoclonales. Inhibidores de la Calcineurina. Ciclosporina. Tacrolimus. Neoplasias. Enfermedades autoinmunes. Enfermedades alérgicas. Bronquiolitis.

El enorme desarrollo de la tecnología científica, ha permitido conocer aspectos de la inmunidad, que casi no se sospechaban hace unos años. La evolución de los conocimientos es tan rápida, que se asimilan con dificultad y se olvidan pronto, sustituidos por nuevos hallazgos.

El tema que se desarrolla en esta ponencia, hace referencia a una parte de las herramientas de que disponemos para cambiar la respuesta inmunológica: Los anticuerpos monoclonales (AcMo) y los inhibidores de la calcineurina: ciclosporina y tacrolimus.

El término inmunomodulación, define la acción de cambiar la respuesta inmunológica, inmunosupresión, es suprimir la respuesta. La inmunomodulación, en general, se utiliza para cambiar una respuesta inmunológica que está produciendo consecuencias negativas en el ser humano, generalmente se tratará de un exceso de respuesta con producción de anticuerpos anómalos y células sensibilizadas que van a producir enfermedad: Enfermedades autoinmunes y enfermedades alérgicas. Pero en ocasiones interesa también modular o cambiar una respuesta normal como el rechazo de un tejido u órgano trasplantado que el sistema inmune lo reconoce como no propio y lo rechaza, para que pueda ser tolerado. También se puede modular la respuesta para mejorar la respuesta inmunitaria frente a infecciones o hacer profilaxis, en niños que tienen alteración de la inmunidad por defecto, bien sean inmunodeficiencias de la inmadurez o inmunodeficiencias primarias.

ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) son proteínas producidas por células híbridas (hibridomas) resultado de la fusión de un linfocito B (LB), capaz de producir anticuerpos específicos para un antígeno, pero de manera limitada con una célula de mieloma, capaz de producir de manera ilimitada anticuerpos pero no específicos. Del resultado de la fusión de LB y células de mieloma, se produce una mezcla de células de las que se seleccionan solo las células productoras de Ac específicos de manera casi ilimitada

llamadas hibridomas, que son las que producirán AcMo, es decir todos iguales, específicos para un antígeno. El resto de células se destruyen.

La producción en laboratorio de estos AcMo es sencilla. Se inmuniza a un roedor (rata, hámster, conejo) con un antígeno y después se extraen del bazo o de un ganglio linfático, linfocitos B que producirán anticuerpos específicos para el antígeno al que se inmunizó al roedor. Este LB se fusiona con las células de mieloma y se seleccionan células fusionadas capaces de producir de forma ilimitada AcMo frente al antígeno con el que se inmunizó al roedor. La capacidad de producir AcMo es enorme y depende solo de la identificación y aislamiento de las proteínas antigénicas y la inmunización al animal de soporte (roedor) con dichos antígenos.

Los AcMo así obtenidos contienen secuencias de ADN del roedor que se inmunizó para obtener el LB sensibilizado, por lo que al administrarlo a humanos, son reconocidos como extraños y pueden ser rechazados mediante la formación de Ac humanos anti-ratón, produciendo fenómenos de hipersensibilidad y anulando la función del AcMo. Para obviar esto se han modificado por ingeniería genética las cadenas de AcMo, la parte responsable de la unión al antígeno (región variable) es mínima y de roedor y la parte constante o región de soporte es de origen humano con lo que su tolerancia es mucho mejor. A estos AcMo modificados se les llama AcMo humanizados, ya que contienen un 90 % de material humano. Son los que se utilizan en clínica, mientras que los AcMo no humanizados, se utilizan sobre todo en laboratorio.

La capacidad del hibridoma para producir AcMo permanece indefinida, se pueden guardar congeladas y reconstituirlas en cualquier momento.

Los AcMo se utilizan para gran variedad de situaciones, en que se necesite sensibilidad, alta afinidad y precisión tanto en diagnóstico como en tratamiento en medicina, en veterinaria, alimentación, agricultura etc.

En Medicina se emplean como identificación de células, mediante detección de Ag. Celulares de superficie, identificación de líneas hematopoyéticas de células humanas, diagnóstico y tratamiento de infecciones víricas o bacterianas, diagnóstico y tratamiento de tumores, preparación de vacunas, modulación de la hiperrespuesta inmunológica, tolerancia de los trasplantes, y mas posibilidades aún por descubrir¹.

En esta actualización, haremos mención de algunos aspectos del uso de AcMo en diagnóstico inmunológico, en el diagnóstico y tratamiento de los tumores, en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, en el tratamiento de las enfermedades alérgicas, y en la profilaxis de la infección por VRS y asma del lactante.

AcMo para diagnóstico

Identificación de marcadores fenotípicos

Se han producido AcMo frente a todas las proteínas y marcadores de superficies celulares, que han permitido la identificación y clasificación de numerosas células, así como estudiar su función. En el año 2000 se habían producido y reconocido oficialmente 247 antígenos celulares. Los primeros AcMo frente a determinantes de las superficies celulares, se denominaron con las letras CD y un número que identifica células básicas del sistema inmunitario. Así AcMo anti-CD16 identifican células naturales citotóxicas (NK), AcMo anti-CD3 linfocitos T, AcMo anti-CD19-20 linfocitos B, AcMo anti-CD4 linfocitos T cooperadores, AcMo anti-CD2 linfocitos T supresores. Una vez fijado el AcMo específico frente al receptor celular, se evidencia mediante técnicas de inmunofluorescencia y otras.

Diagnóstico de enfermedades neoplásicas

Se han producido AcMo frente a antígenos de superficie de células tumorales y moléculas secretadas por células neoplásicas de gran variedad de tumores, lo que ha permitido un mejor conocimiento de la biología de las células tumorales, el desarrollo de nuevos métodos de clasificación y diagnóstico, la localización de las células tumorales y la identificación de Ag específicos de tumor, exclusivo de las células tumorales. Estos Ag asociados a tumor, son marcadores fenotípicos de función celular que han permitido la clasificación de leucemias y linfomas.

Tabla I

AcMo usados en el tratamiento de tumores

AcMo específico de tumor	AcMo	Neoplasia
RIL2- α	Murino humanizado Inmunotoxina	Leucemia T
Her-2/Neu	Murino humanizado	Cancer de mama
CD20 (LB)	Murino humanizado	Linfoma B
CD10	Murino humanizado Inmunotoxina	Linfoma B
CEA (Ag carcinoembrionario)	Murino humanizado	Cáncer digestivo Cáncer de pulmón
CD38	Murino humanizado	Mieloma múltiple
CA-125	Murino	Cáncer de ovario
Gangliósido CD3	Murino humanizado	Melanoma

AcMo usados en terapéutica

Es un terreno en pleno desarrollo aunque ha obtenido ya resultados prometedores. Expondremos los AcMo usados en el tratamiento del cáncer, en las enfermedades autoinmunes, en las enfermedades alérgicas, y en el rechazo de injertos de los pacientes trasplantados.

Tratamiento del cáncer

Se utilizan AcMo unidos a fármacos antineoplásicos, específicos para receptores de células tumorales, solo y que no dañan células sanas. Los AcMo generan también respuestas biológicas en el sistema inmunológico, por lo que además de la citotoxicidad directa, pueden generar respuestas antitumorales por mecanismos indirectos².

Ejemplos de AcMo usados en neoplasias son: AcMo anti-DC20 (LB) (Rituximab) usado en el tratamiento de los linfomas no Hodgkin y en la leucemia crónica linfocítica. AcMo anti-CD38 unido a una toxina en el tratamiento del mieloma múltiple. AcMo anti-RI-L2- α , unido a toxina diftérica a pequeñas dosis en el tratamiento de la leucemia de células T. La unión de AcMo con una toxina inhibe la síntesis proteica del tumor, recibe el nombre de Inmunotoxina³.

Para tratar linfomas B que expresan inmunoglobulinas de superficie con idiotipos determinados, se han producido y utilizado como tratamiento AcMo anti-idiotipo.

Los AcMo antitumorales, se han usado también para eliminar células neoplásicas de la médula ósea de pacientes con cáncer antes de realizar el autotrasplante, la médula tratada con inmunotoxinas, y limpia de células neoplásicas se trasplanta de nuevo al paciente para reconstituir su sistema hematopoyético, destruido por la quimioterapia o la radioterapia. En la tabla I se exponen ejemplos de AcMo usados en el tratamiento del cáncer⁴.

Tratamiento de las enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes se producen por activación anómala del LT. Para frenar esta activación, se puede actuar mediante AcMo de varias formas: Con AcMo anti-CD4 que actúan inhibiendo la función de los LT cooperadores (T4); pero también es posible bloquear la unión de CD40 y el CD40 ligando (CD40L), AcMo anti-CD40L impiden la unión al CD40 y por ello la coestimulación, función muy aumentada en las enfermedades autoinmunes y en el rechazo de injertos. Además en la patogenia de las enfermedades

autoinmunes, se libera factor de necrosis tumoral (TNF) y los AcMo anti-TNF bloquean la acción.

En la actualidad el uso clínico de AcMo en enfermedades autoinmunes se ha extendido, tanto en niños como en adultos y son arma eficaz en pacientes resistentes a otros tratamientos. Se administran por vía IV, son de uso hospitalario y la tolerancia en general es excelente. En la tabla II, se relacionan los AcMo usados en el tratamiento de las Enfermedades autoinmunes, con las indicaciones precisas.

Tratamiento del rechazo de los trasplantes

En el tratamiento del rechazo agudo, se utilizan AcMo dirigidos contra antígenos de superficie del LT, con la finalidad de inhibir su función y que el órgano trasplantado, no sea rechazado. El más usado es el AcMo OKT3, específico para el antígeno CD3 de la superficie del LT al que se une, como resultado de la unión se activa el Complemento y se produce una destrucción del LT.

Otro AcMo usado en la práctica clínica es el anti-CD25 que es la subunidad alfa del receptor de la IL-2. Se bloquea la unión de la IL-2 a los LT y estos LT no se activan.

Ambos AcMo anti-CD3 y anti-CD25, son murinos humanizados y de amplio uso en clínica.

Tratamiento de las enfermedades alérgicas

Las enfermedades alérgicas, por hipersensibilidad tipo I, resistentes a los tratamientos habituales, se benefician del tratamiento con AcMo humanizados, selectivos frente a los mediadores de la reacción alérgica: IgE, IL-5, IL-4, TNF- α y otros.

En el momento actual los AcMo humanizados (5 % murinos, 95 % humanos) anti-IgE (omalizumab) se utilizan en clínica con especiales indicaciones y en mayores de 12 años. El AcMo anti-IgE, rhu MAb-E25, Omalizumab, (Xolair r) se une selectivamente al dominio C3 épsilon, de la IgE libre, bloqueando la unión al receptor de alta afinidad; no se une a la IgE fijada a mastocitos y basófilos y no induce liberación de mediadores. Se une solo a la IgE circulante pero no a otras inmunoglobulinas, formando complejos inmunes, que no precipitan ni producen patología^{5,6,9}.

El fármaco se puede utilizar por vía IV y subcutánea a dosis variables según el nivel de IgE en suero y el peso del paciente, oscilando las dosis según distintos autores entre 0,016 y 0,50 mg/kg cada 2 o 4 semanas. Se ha utilizado en el asma y rinitis alérgica, produce un rápido descenso de las concentraciones de IgE sérica, correlacionado con la mejoría de

Tabla II
AcMo usados en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes

AcMo	Nombre	Indicación
Anti-TNF	Infliximab	Enfermedad de Crohn
	Etanercept	Artritis reumatoide Psoriasis
Anti-C5	h5G1.1-mAb	Artritis crónica
	Ecilizumab	Lupus E.S. Anemia H. autoinmune
Anti-CD20	Rituximab (Mabthera R)	Anemia H. autoinmune asociada a LES
Anti-CD52	Alentuzumab (Campath R)	Anemia H. autoinmune refractaria

los síntomas clínicos y la calidad de vida de los pacientes. Es bien tolerado y como efectos secundarios se han descrito cefaleas y urticaria leve.

AcMo humanizados anti-IL-5 (mepolizumab). La IL-5 es esencial para el reclutamiento, diferenciación y maduración de los eosinófilos, células que tienen un papel crucial en la reacción alérgica tanto en la alergia respiratoria como en la alimentaria y cutánea. AcMo anti-IL-5 se han utilizado en ensayos clínicos de asma, rinitis y dermatitis atópica. El resultado en cuanto al descenso del n.º de eosinófilos en sangre periférica fue excelente, pero no se correlaciona el descenso del n.º de eosinófilos con la mejoría clínica de los pacientes^{7,8}.

Profilaxis de la Bronquiolitis por VRS y del asma del lactante

Los niños recién nacidos con enfermedad pulmonar crónica, cardiopatías congénitas, prematuros de menos de 28 semanas de gestación, prematuros entre 29 y 35 semanas de gestación, pero con factores de riesgo, deben ser protegidos de la primoinfección por VRS, en el primer año de vida, ya que por su especial inmunidad y situación clínica, tendrán si se infectan, una bronquiolitis grave y bronquitis diseminante posterior.

Se utiliza con criterios clínicos estrictos y en ambiente hospitalario, AcMo humanizados de clase IgG (Palivizumab) que inhibe específicamente, el epitopo antigénico o A de la proteína F del virus, (proteína de fusión), que impide al virus, fusionarse con las células a las que debe infectar para replicarse en su interior¹⁰.

Se administra por vía IM, pero en prematuros de muy bajo peso se puede aplicar por vía IV, a la dosis

de 15 mg/kg/mes, en los meses previos a la estación en que se presenta la infección, se ponen 4 o 5 dosis en total. No interfiere con el calendario vacunal. La tolerancia y efectividad es excelente, evitando la infección en la mayoría de los casos y disminuyendo los episodios de sibilancias recurrentes en el primer año de vida, así como los ingresos hospitalarios.

INHIBIDORES DE LA CALCINEURINA

La calcineurina es una fosfatasa intracitoplasmática que activa mediante desfosforilación, el factor de transcripción NFAT (factor nuclear de los linfocitos T activados) necesario para la expresión de genes de citocinas (IL-2, IL-4, TNF y otros). El factor NFAT, del que existen cuatro formas diferentes, codificadas por distintos genes, se encuentran en el citoplasma de los LT. La activación de la calcineurina depende de señales de calcio, generadas como respuesta del receptor de LT (RCT) al reconocimiento de un antígeno. Esta secuencia de activación es necesaria para la respuesta del LT frente a antígenos extraños (Agentes infectantes, tumores, trasplantes) que tendrá lugar mediante la activación del Linfocito T y la producción de citocinas IL-2, IL-4, TNF, entre otras.

Los fármacos que bloquean la actividad de la calcineurina producen una inhibición de la activación del LT, que no responderá frente a antígenos extraños.

De estos fármacos, llamados inmunomoduladores, porque cambian la respuesta del LT, pero no lo destruyen, se utilizan en clínica dos: ciclosporina-A y FK-506.

El FK-506 (tacrolimus) actúa fijándose a una proteína del citosol, llamada proteína de unión al FK-506, y una vez fijada se une a la calcineurina inhibiendo la activación del factor de transcripción nuclear del LT activados (NFAT), que no responderá frente a los antígenos extraños.

Las indicaciones de uso clínico son prevención y tratamiento del rechazo de trasplantes, sobre todo hepática, cardíaco, pulmonar y renal. También se ha usado en enfermedades autoinmunes sistémicas, síndrome nefrótico y psoriasis.

La forma de administración en estos casos es por vía oral o intravenosa. La vía intravenosa produce una elevación rápida en plasma y caída también rápida de los niveles en 2-3 h, difunde bien en los tejidos y los efectos secundarios descritos son: hiperpotasemia, cefaleas, náuseas, dolor abdominal y otros. La administración oral tiene una absorción mas uniforme y menos efectos secundarios.

Mención aparte merece el uso tópico de tacrolimus y pimecrolimus en la dermatitis atópica. El ta-

crolimus, es el primer inmunomodulador tópico no esteroideo desarrollado para el tratamiento de la dermatitis atópica, el principio activo es el FK-506, y su acción sobre la piel inflamada, es el bloqueo de la activación del LT y de la producción de citocinas, a través de la inactivación de la calcineurina. Actúa en la piel también a través de las células presentadoras de antígeno epidérmicas: eosinófilos, mastocitos, basófilos y queratinocitos.

Los estudios de penetración cutánea del fármaco, demuestran que el efecto es local, sobre la piel inflamada y es mínimo o nulo sobre la piel intacta. La absorción general a través de la piel inflamada es mínima, aun en aplicaciones extensas y cuando se ha detectado, es transitoria y no se ha asociado a efectos adversos. A medida que desaparece la inflamación de la piel, la absorción es menor, ya que la capa córnea de la piel, constituye una barrera para su absorción.

Ciclosporina (ciclosporina A)

La ciclosporina es un péptido, producido por un hongo, que tiene la capacidad de unirse a una proteína del citosol, llamada ciclofilina. La unión ciclosporina-ciclofilina, inhibe a la calcineurina suprimiendo así la activación del factor de transcripción nuclear del LT (NFAT), e inhibiendo la respuesta del LT desde el punto de vista funcional, ya que bloquea la producción de citocinas (IL-2, IL-4, TNF). La función de las células B (LB) y la formación de anticuerpos, no se afecta. La función macrófagica incluyendo la presentación de antígeno, la fagocitosis y la citotoxicidad, tampoco se alteran.

La indicación de uso es la prevención del rechazo de los trasplantes, sobre todo de riñón, hígado, corazón y pulmón. Ha sido un gran avance en la tolerancia de injertos de órganos permitiendo la supervivencia del injerto mas de 5 años de forma espectacular. Comparada con otros inmunosupresores, la ciclosporina reduce la incidencia de infecciones virales, bacterianas y fúngicas en pacientes trasplantados. También se utiliza en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes: uveitis, psoriasis, diabetes tipo I, con buenos resultados.

Debe aplicarse a dosis altas para conseguir el efecto inmunosupresor, por lo que los efectos secundarios son frecuentes, predominando las alteraciones renales, también se ha descrito hirsutismo y aumento de enfermedades linfoproliferativas y neoplasias cutáneas. Se administra por vía oral y intravenosa, requiere control de los niveles séricos al inicio del tratamiento, así como de la tensión arterial, creatinina sérica, ácido úrico y potasio.

En la tabla III se expone un resumen de las indicaciones y efectos secundarios de los inhibidores de la calcineurina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mikuls TR, Moreland LV. Monoclonal antibodies and soluble proteins receptors. En: Rich RE, editor. Clinical Immunology. London: Mosby; 2003.
2. Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. Nature. 2001;411:380-4.
3. Kreitman RJ. Immunotoxins in cancer therapy. Current opinion in immunology. 1999;11:570-8.
4. Cristillo AD, Bierner BE. Immunophilins and immunophilin-binding agents. En: Rich RE, editor. Clinical Immunology. London: Mosby; 2003.
5. Fabry IV, Fleming HE, Wong HH. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early and late phase, response to allergens inhalation in asthmatic subjects. Am J Res Crit Care Med. 1997;155:1828-34.
6. Fahy JV, Mccockcroft DW, Boulet LP. Effect of aerosolized anti-IgE (E25) on airway responses to inhaled allergens in asthmatic subjects. Am J Res Crit Care Med. 1999;160:1023-9.
7. Boulet LP, Chapman KR, Cote J. Inhibitory effects of an anti-IgE antibody E25 on allergen-induced early asthmatic response. Am J Res Crit Care Med. 1997;155:1835-9.
8. Oldhoff JM, Darsow V, Werfel T, et al. El AcM humanizado anti-IL5 (Mepolizumab) para el tratamiento de la dermatitis atópica. Allergy. 2005;5(5):52-64.

Tabla III

Indicaciones y efectos secundarios de los inhibidores de la calcineurina

	Ciclosporina	Tacrolimus
Indicaciones		
Trasplante de hígado	+	+
Trasplante renal	+	+
Trasplante de CPH	+	+
Enfermedades autoinmunes	+	+
Efectos secundarios		
Neurotoxicidad	+	+
Nefrotoxicidad	+	+
Hipertensión	+	+
Infecciones graves	+	-
Hipertrofia gingival	+	-
Hirsutismo	+	-
Enfermedades hematológicas	-	-
Neoplasias	+	+

9. Toledo F, Martínez R, Negro JM, Ramírez M, Mérida C. Anti-IgE (omalizumab) en el tratamiento de la rinitis alérgica. Allergol Immunol Clin. 2004;19:133-9.
10. Figueras J, Quero J, y Comité de estándares de la Sociedad Española de Neonatología. Recomendaciones para la prevención de la infección por V.R.S. An Pediatr. 2005;63(4):357-62.