

Asma y virus respiratorio sincitial. Nuevas oportunidades de intervención terapéutica

A. Mejías, S. Chávez-Bueno, A.M.^a Ríos, M. Fonseca-Aten, A.M.^a Gómez,
H.S. Jafri y O. Ramilo

Division of Infectious Diseases, Department of Pediatrics and Department of Pathology.
The University of Texas Southwestern Medical Center and Children's Medical Center, Dallas, Texas, Estados Unidos.

Numerosos estudios han descrito la asociación entre la infección por virus respiratorio sincitial (VRS) en la infancia y el desarrollo posterior de hiperreactividad bronquial (HRB). Además de la respuesta inmunitaria exagerada y las alteraciones de los mecanismos neuronales, estudios recientes han relacionado la posible "persistencia" del VRS en el tracto respiratorio inferior con la patogenia de la HRB. Varios investigadores han analizado si el tratamiento de la bronquiolitis con fármacos antivirales o inmunosupresores podría disminuir las secuelas pulmonares ocasionadas por el VRS. El modelo experimental de VRS en el ratón ha permitido estudiar la inmunopatogenia de la infección por VRS. Una vez que se resuelve la fase aguda de obstrucción de la vía aérea y no se puede detectar el virus en cultivo celular, los ratones progresan hacia una fase crónica caracterizada por HRB e inflamación persistente de la vía aérea. La utilización de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) ha permitido, de forma inesperada, la detección de ARN de VRS en el tracto respiratorio en esta fase crónica. Como ejemplo de intervención, la administración del anticuerpo neutralizante anti-VRS (palivizumab) se asoció a una reducción significativa de la replicación viral, de la inflamación pulmonar y de las citocinas inflamatorias y a una mejoría significativa en las pruebas de función pulmonar en las fases aguda y crónica de la enfermedad. Estos resultados llevan a proponer la realización de estudios clínicos para evaluar el papel de palivizumab en la prevención de las secuelas pulmonares causadas por el VRS en la población pediátrica.

Palabras clave:

VRS. Hiperreactividad bronquial. Anticuerpos anti-VRS.

ASTHMA AND RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS. NEW OPPORTUNITIES FOR THERAPEUTIC INTERVENTION

Numerous studies have described an association between respiratory syncytial virus (RSV) infection in infancy and the subsequent development of airway hyperresponsiveness (AHR). Besides the exaggerated immune response and the abnormal neurogenic mechanisms induced by RSV, recent studies have correlated the "persistence" of RSV in the lower respiratory tract with the development of AHR. Several investigators have evaluated whether treatment with antiviral or immunosuppressive agents could decrease the long term respiratory abnormalities induced by RSV. The RSV murine model has allowed us to study the immunopathogenesis of RSV-induced AHR. Once the airway obstruction, typical of acute disease, is resolved and no virus is longer detected by cell cultures, mice progress into a chronic phase characterized by AHR and persistent airway inflammation. The use of polymerase chain reaction assay for RSV quantitation has demonstrated, quite unexpectedly, the presence of RSV RNA in the lower respiratory tract of mice during the chronic phase of the disease. As an example of intervention, the administration of an anti-RSV neutralizing antibody (palivizumab) was associated with a significant reduction in viral replication, pulmonary inflammation and inflammatory cytokines, as well as a significant improvement in the pulmonary function both in the acute and chronic phases of the disease. Future clinical studies to determine whether therapy with palivizumab can prevent the long-term morbidity associated with RSV in children are warranted.

Key words:

RSV. Airway hyperresponsiveness. Anti-RSV antibodies.

Correspondencia: A. Mejías, MD.
University of Texas Southwestern Medical Center.
Department of Pediatrics-Room F3.202.
5323 Harry Hines Blvd.
Dallas, Texas 75390-9063, Estados Unidos.
Correo electrónico: asuncion.mejias@utsouthwestern.edu

Recibido en junio de 2004.
Aceptado para su publicación en junio de 2004.

INTRODUCCIÓN

El asma es la enfermedad crónica más frecuente en la infancia. En Estados Unidos se calcula que aproximadamente 5 millones de niños padecen asma, y ésta afecta a más de 155 millones de personas en todo el mundo¹. El asma es una enfermedad compleja y variable y en su génesis contribuyen diversos factores, genéticos y ambientales que actuando de forma conjunta influyen en la progresión y expresión de esta enfermedad tan heterogénea caracterizada por inflamación, obstrucción de la vía aérea e hiperreactividad bronquial recurrente.

El virus respiratorio sincitial (VRS) es un virus ARN, perteneciente al género *Pneumovirus* y la familia *Paramyxoviridae*. Es un virus no segmentado, estable, formado por una única cadena de ARN en sentido negativo, constituido por 11 proteínas de diferentes pesos moleculares². Sólo dos de ellas son proteínas no estructurales (NS1, NS2) y se encuentran por tanto presentes únicamente en las células infectadas, no en los viriones. Entre las proteínas estructurales, las glucoproteínas G y F, asociadas a la envoltura, son las más importantes desde el punto de vista inmunológico. Desempeñan funciones de adhesión y fusión, respectivamente, y son responsables del mantenimiento de la replicación viral de una célula a otra. Constituyen los mayores determinantes antigénicos del virus induciendo la formación de anticuerpos neutralizantes. Variaciones antigénicas en la proteína G, y también en las proteínas F, N, P, son responsables de que existan dos tipos distintos de VRS: A y B^{3,4}.

EPIDEMIOLOGÍA

El VRS, identificado inicialmente en 1956 como el agente causal de un brote de infección respiratoria en una colonia de chimpancés⁵, fue aislado por primera vez en lactantes con bronquiolitis en 1957 y en 1975 se le asignó el nombre de "virus respiratorio sincitial", por su capacidad de formar sincitios en cultivos celulares *in vitro*.

En la actualidad, el VRS constituye la primera causa de bronquiolitis y hospitalización secundaria a infección respiratoria de la pequeña vía aérea (IRPVA) en niños menores de 2 años⁶. El VRS además es una causa importante de infección respiratoria grave no sólo en ancianos o pacientes inmunocomprometidos^{7,8}, sino también en adultos previamente sanos^{9,10}. En Estados Unidos es responsable de más de 150.000 hospitalizaciones anuales y su incidencia está en aumento^{11,12}.

Además de la morbilidad aguda causada por el VRS, numerosos estudios desde hace más de 40 años han descrito la asociación entre la infección por VRS en la infancia y el desarrollo posterior de sibilancias recurrentes e hiperreactividad bronquial (HRB)¹³⁻¹⁷. Rooney y Williams¹⁶ siguieron hasta los 7 años de vida a un grupo de 62 pacientes diagnosticados de bronquiolitis por VRS en la época de lactante. Observaron que el 57% de los pacientes desarrollaron posteriormente episodios de sibilan-

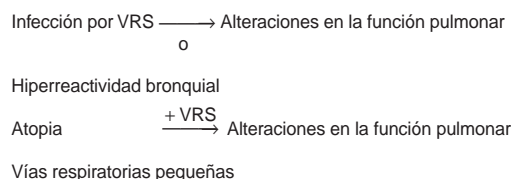
cias recurrentes y, entre ellos, el 71% tenían antecedentes familiares de asma. Por otro lado, el 38% de los pacientes no desarrollaron episodios posteriores de hiperreactividad bronquial, y sólo existía historia familiar de asma en un 18%. Estos hallazgos iniciales se han ido consolidando a lo largo de los años, y existe evidencia reciente que la infección por VRS se asocia de forma significativa con un riesgo aumentado de padecer sibilancias recurrentes, no sólo en los lactantes que desarrollaron bronquiolitis grave y necesitaron hospitalización¹⁴, sino también en niños con bronquiolitis que no requirieron hospitalización y fueron seguidos de forma ambulatoria¹⁸. Pero independientemente del tipo de estudio realizado (en pacientes hospitalizados frente a ambulatorios; prospectivo frente a retrospectivo), la mayoría llegan a una conclusión consistente: la IRPVA por VRS en la época de lactante se asocia con episodios de sibilancias recurrentes posteriores hasta en el 71% de los pacientes y se acompañan de alteración en las pruebas de función pulmonar a largo plazo. Tanto el FEV₁ (volumen espirado máximo en el primer segundo) como en el FEF₂₅₋₇₅ (flujo espiratorio entre el 25-75% de la capacidad vital forzada [CVF]) son menores en niños de edad escolar que padecieron una IRPVA por VRS en edades tempranas de la vida en comparación con el grupo control^{13,14,18-21}.

El VRS no sólo ocasiona agudizaciones de bronquitis crónica en adultos o episodios de HRB recurrente en la infancia^{14,18,22}. Hall et al¹⁰ estudiaron de forma prospectiva una cohorte de adultos previamente sanos con infección aguda por VRS adquirida en el hospital (personal sanitario con una media de 30 años al cuidado de una sala de lactantes ingresados por bronquiolitis). Esta cohorte de pacientes, además de desarrollar síntomas del tracto respiratorio superior (fiebre, rinorrea, congestión nasal, tos y/o ronquera) en la fase aguda, también desarrollaron HRB documentada tras provocación con carbacol, que persistió hasta pasadas 8 semanas de la infección por VRS, cuando ya no existían ni signos ni síntomas de infección aguda.

¿CAUSALIDAD O ASOCIACIÓN?

Aún no está claro si el VRS es el agente causal principal o si por el contrario, es la existencia previa de predisposición genética en estos pacientes en los que el que el VRS desencadena el desarrollo de HRB posterior^{23,24}, ya que la mayoría de estudios que han descrito la asociación, VRS e HRB, han sido observacionales. ¿Es la infección por VRS en etapas tempranas de la vida responsable por sí sola de las alteraciones en la función pulmonar que se observan posteriormente? O, por el contrario, ¿es la combinación de la infección por VRS en ciertas etapas de la vida con factores propios del huésped, como ciertos polimorfismos en los genes que codifican o regulan la expresión de la IL-8 y de la proteína A del surfactante^{25,26}, que parecen alterar o aumentar la predisposición a pa-

decer asma al producir cambios en la fisiología pulmonar? Hay datos que indican que el riesgo de HRB es mayor en lactantes que tienen la vía respiratoria más pequeña, han estado expuestos al tabaco o tienen historia familiar de asma o atopia^{27,28}. Sin embargo, la mayoría de lactantes infectados por VRS que desarrollan posteriormente HRB no tienen asociados factores de riesgo evidentes.



PATOGENIA

La patogenia de la inflamación pulmonar inducida por el VRS es multifactorial. Además del efecto citopático directo del virus sobre el epitelio respiratorio, la inflamación mediada por mecanismos neuronales (sustancia P y neurocinina) y la inmunidad, innata y adaptativa a través de distintos mecanismos, desempeñan un papel primordial. Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la asociación entre la infección por VRS en etapas tempranas de la vida y el desarrollo posterior de HRB; sin embargo, los mecanismos específicos y tipos celulares responsables de estas secuelas a largo plazo no están aún completamente definidos. Entre ellos destacan los siguientes mecanismos patogénicos:

1. Neuropeptidos y sensibilización aumentada de ciertos receptores (sustancia P y neurocinina 1 [NK1]) que además de ocasionar HRB actúan como moléculas proinflamatorias, atrayendo y activando leucocitos^{29,30}.
2. Prostaglandinas, leucotrienos y otros metabolitos celulares.
3. Activación de mastocitos y eosinófilos e IgE debido a una desviación persistente hacia una respuesta Th2³¹. Parece que la mayoría de niños durante el primer episodio de bronquiolitis producen inmunoglobulina E (IgE) anti-VRS. Pero es sobre todo la cantidad, persistencia y duración de esta respuesta la que parece estar directamente relacionada con el desarrollo posterior de sibilancias recurrentes y/o asma³¹.
4. Liberación de citocinas inmunorreguladoras proinflamatorias como interleucina 4 (IL-4), IL-6, RANTES (*regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*), MIP-1 α , IL-8, y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que movilizan otras células al lugar de la infección³².

Respuesta inmunitaria al VRS: balance desfavorable

En general la respuesta inmunitaria primaria a la infección por VRS es pobre e incompleta, de ahí que las reinfecciones sean frecuentes a lo largo de la vida. Segundos contactos con el virus determinan una mejor respuesta

inmunitaria tanto local como sistémica, a expensas sobre todo de IgG e IgA. El VRS no se replica normalmente fuera del aparato respiratorio, y la infección queda restringida a la mucosa respiratoria. Sin embargo, ciertos estados de inmunosupresión de células B o T favorecen el desarrollo de viremia y/o manifestaciones extrapulmonares³³⁻³⁵.

En condiciones normales, las dos ramas de la inmunidad mantienen un perfecto equilibrio. Existe un balance muy refinado entre la inmunidad innata, que se caracteriza por su respuesta inmediata en reconocer y eliminar al agente extraño a través de una serie de mediadores no específicos y la adaptativa caracterizada, porque además del reconocimiento inmunitario y eliminación efectiva del patógeno, induce la formación de células específicas de memoria. En la infección por VRS existe un desequilibrio entre ambas ramas de la inmunidad: la inmunidad innata a través de la producción de mediadores proinflamatorios y el reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos y monocitos en la vía respiratoria, y la adaptativa gracias a una respuesta celular excesiva de linfocitos CD8+ y producción por parte de los linfocitos CD4+ de citocinas Th1 y Th2 que llevan a la producción de inflamación pulmonar, bronquiolitis y sibilancias recurrentes.

Inmunidad innata (citocinas/quemocinas)

Es extremadamente raro que la primoinfección por VRS curse de forma asintomática. Entre el 30 y el 70% de los pacientes con infección primaria por VRS desarrollan neumonía o bronquiolitis. Se ha sugerido que el balance en la producción de citocinas/quemocinas Th1 frente a Th2 podría relacionarse con la gravedad de la infección, aunque los datos en la literatura médica son contradictorios, probablemente por el diseño de los estudios realizados. Las citocinas Th1 como el interferón gamma (IFN- γ), IL-12 e IL-18 promueven la respuesta inmunitaria celular y son necesarias para una respuesta eficaz frente a patógenos intracelulares como los virus, mientras que los linfocitos Th2 producen fundamentalmente IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9, medidores estrechamente relacionados con la inflamación alérgica.

Inicialmente se observó en pacientes hospitalizados por bronquiolitis inducida por VRS que el cociente IL-4/IFN- γ en células mononucleares en sangre periférica (CMSP) era mayor en lactantes con formas graves de la enfermedad frente a un grupo control con formas leves de bronquiolitis³⁶. Posteriormente se observó que lactantes con formas graves de bronquiolitis se asociaban a una respuesta Th1-Th2 más equilibrada, que no difiere de la observada en lactantes con infección del tracto respiratorio superior únicamente, mientras que aquellos con formas leves de bronquiolitis parecían tener una respuesta predominante Th1³⁷. Recientemente, en una cohorte de niños que fue seguida prospectivamente desde el nacimiento con al menos un antecedente familiar de atopia, se estudió la respuesta inmunitaria *in vivo* a la infección

natural por VRS. En esta cohorte seleccionada de pacientes se obtuvieron muestras de lavados nasales los primeros 2 días tras documentar infección por VRS, así como los días 5 y 7. Los pacientes se subdividieron en dos grupos según la gravedad de la infección: bronquiolitis frente a infección del tracto respiratorio superior (ITRS). El cociente IL-4/IFN- γ fue significativamente mayor en muestras nasofaríngeas de lactantes con bronquiolitis por VRS ($p < 0,01$) frente al grupo con ITRS. Las concentraciones de IFN- γ e IL-18 en CMSP fueron significativamente menores en el grupo de pacientes con bronquiolitis independientemente de la edad³⁸.

Diferentes quemocinas como RANTES, MCP-1, eotaxina o MIP-1 α se han relacionado con la patogénesis de la infección por VRS. Recientemente la proteína inflamatoria de los macrófagos, MIP-1 α , se ha correlacionado con el grado de hipoxia en lactantes hospitalizados con formas severas de bronquiolitis por VRS. La MIP-1 α estimula la producción IgE a partir de células B y actúa activando basófilos y eosinófilos. El papel de MIP-1 α en la infección por VRS ha sido previamente estudiado en el modelo murino, en el que se observó que ratones con una delección para el gen de MIP-1 α desarrollaron una respuesta inflamatoria menos grave tras la infección por VRS^{39,40}. Otras quemocinas como MCP-1 y RANTES se han relacionado también con la infección por VRS, y se encuentran en mayores concentraciones en formas graves de bronquiolitis³⁷.

No se conocen aún los mecanismos por los que niños con antecedentes de bronquiolitis por VRS en la época de lactante desarrollan posteriormente episodios de sibilancias recurrentes. Hay datos recientes experimentales que sugieren que el VRS podría permanecer en "estado latente" en lugares inmunológicamente privilegiados del pulmón, evadiendo al sistema inmunitario. Esto ha llevado a algunos investigadores a proponer que quizá los efectos a largo plazo que se observan tras la infección por VRS se podrían explicar en parte por la persistencia del VRS en el aparato respiratorio. El VRS mantendría una estimulación constante del sistema inmunitario y sería responsable de la inflamación crónica, de los cambios en el patrón de la respuesta del IFN, citocinas y quemocinas que se observan en niños con HRB inducida por VRS. Este virus persistente podría además de ser una importante fuente de nuevas epidemias de VRS en la comunidad⁴¹.

Cubie et al⁴² detectaron el VRS por hibridización *in situ* en autopsias de pulmón de niños que habían fallecido con el síndrome de muerte súbita del lactante (SMSL) durante los meses de invierno, cuando la infección es mucho más prevalente, pero también en aquellos niños que habían fallecido por SMSL en verano. Esto sugiere la persistencia del VRS en el pulmón de esos niños⁴². En otro estudio realizado en el Reino Unido en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), con el fin de determinar la asociación entre exacerbaciones de la enfermedad e infecciones virales, se observó, usando

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de aspirado nasal, que el VRS sorprendentemente se aisló con mayor frecuencia en pacientes con EPOC y enfermedad estable comparado con pacientes con exacerbación de la enfermedad (24% frente a 14,2%) en los que además no se detectaron títulos superiores del virus, reflejando probablemente bajo grado de infección. Lo que es aún más interesante es que en el grupo de pacientes con EPOC estable y VRS persistente además de desarrollar con mayor frecuencia exacerbaciones, las concentraciones séricas de algunos marcadores inflamatorios no específicos (fibrinógeno e IL-6) fueron más elevados que en pacientes con EPOC estable en los que no se detectó el VRS⁴³. Recientemente en el modelo murino, también con técnicas de PCR, se ha demostrado la persistencia del virus en el pulmón de ratones infectados con VRS hasta pasados 100 días del inóculo intranasal. No se aisló ARN viral en otras localizaciones (tejido linfático, cerebral, bazo o en la médula ósea)⁴¹. Su localización intracelular podría explicar en parte los mecanismos por los cuales el VRS evade la respuesta humoral, ya que las inmunoglobulinas circulantes no pueden acceder a los virus intracelulares y, por lo tanto, no pueden ejercer su acción neutralizante⁴¹.

Los mecanismos por los que el VRS evade la respuesta celular no son bien conocidos. ¿Podría encontrarse el VRS de forma latente en lugares privilegiados como neuronas o en ciertas células presentadoras de antígeno donde induce cambios conformacionales en la expresión de ciertos genes del virus o en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH-I)? Hay evidencia experimental que la infección *in vitro* de macrófagos y células dendríticas derivadas de sangre de cordón con VRS estimula la producción de IL-10, que podría modificar la presentación de antígenos creando un estado de anergia, o apoptosis de los linfocitos CD8+ citotóxicos específicos frente al VRS, e incluso algún grado de tolerancia al VRS.

NUEVAS INTERVENCIONES TERAPÉUTICAS

Diferentes estudios sugieren que existe una correlación directa entre la concentración de VRS en el tracto respiratorio y la gravedad de la infección⁴⁴⁻⁴⁶. Sin embargo, cuando la enfermedad progresa parece que es sobre todo la respuesta inmunitaria, más que la replicación viral, la responsable de las manifestaciones clínicas y la gravedad de la infección. Muchos estudios han tratado de investigar si el tratamiento inicial de la bronquiolitis por VRS podría tener algún impacto o modificar las consecuencias a largo plazo que este virus ocasiona en el aparato respiratorio. En algunos estudios, no en todos, el uso precoz de ribavirina redujo el número de episodios de HRB posteriores tras la infección por VRS^{47,48}. Los datos con respecto al uso de corticoides en la infección por VRS, administrados tanto de forma sistémica o inhalada, también son contradictorios. Previamente demostramos en niños intubados por bronquiolitis grave secundaria a VRS que la

administración de corticoides sistémicos no modificó el curso agudo de la enfermedad, ni tuvo ningún impacto en los parámetros inflamatorios (recuento de leucocitos en aspirados nasales y traqueales, y concentraciones de citocinas y quemocinas) o de gravedad clínica (días de hospitalización, estancia en la unidad de cuidados intensivos y necesidad de ventilación mecánica). Además, los pacientes que recibieron placebo en las primeras 48 h aclararon el virus en el tracto respiratorio inferior más rápidamente ($p < 0,05$) que el grupo que recibió dexametasona⁴⁴.

Recientemente se ha publicado un estudio piloto en el que se evaluaron los efectos a largo plazo de la administración profiláctica de inmunoglobulina intravenosa frente al VRS (IgIV-VRS). El estudio incluyó 13 niños con displasia broncopulmonar (DBP) que recibieron IgIV-VRS mensual de forma profiláctica durante la temporada de invierno y 26 controles de la misma edad gestacional y con los mismos factores de riesgo que no recibieron IgIV-VRS. En 6 de los 13 niños con DBP que recibieron IgIV-VRS se documentó historia de infección por VRS frente a 21 de los 26 controles ($p < 0,001$). Tanto los parámetros de función respiratoria, FEV₁/CVF ($p < 0,02$), como la incidencia de atopia ($p < 0,04$), días perdidos de colegio ($p = 0,006$) y agudizaciones de asma ($p = 0,03$) fueron significativamente menores en el grupo de pacientes que recibió IgIV-VRS frente a los controles. Estos datos iniciales sugieren que la profilaxis de la infección por VRS podría tener efectos beneficiosos a largo plazo en parámetros respiratorios e inmunológicos relacionados con el asma⁴⁹. Los resultados de otro estudio que se está llevando a cabo (protocolo W00-353) sobre los efectos a largo plazo del uso profiláctico de palivizumab en los parámetros de función respiratoria y prevalencia de asma e HRB en lactantes de alto riesgo que recibieron la profilaxis de forma mensual no están aún disponibles⁵⁰.

Durante la bronquiolitis por VRS se liberan cisteinil-leucotrienos, potentes moléculas proinflamatorias que aumentan la permeabilidad de la mucosa respiratoria favoreciendo la producción de edema, broncoconstricción y desarrollo de HRB. Se han realizado diferentes estudios con antagonistas de leucotrienos, tanto en seres humanos como en modelos animales con diferentes resultados^{51,52}. El único estudio realizado en seres humanos se llevó a cabo en lactantes ingresados con bronquiolitis por VRS con una media de edad al diagnóstico de 9 meses. Sesenta y un pacientes frente a 55 controles recibieron comenzando el día 3-7 de hospitalización y durante 28 días, 5 mg diarios de montelukast, un antagonista del receptor de los cis-leucotrienos. Los efectos de montelukast empezaron a ser evidentes a las 2 semanas del inicio del tratamiento. Así, los lactantes que recibieron el antileucotrieno tuvieron más días libres de síntomas una vez pasada la fase de bronquiolitis en comparación con el grupo placebo (6/28 frente a 1/28, $p = 0,015$), menos tos, y tarda-

ron más tiempo en desarrollar exacerbaciones de la enfermedad. Los pacientes que recibieron montelukast tardaron 23 días en tener una exacerbación frente a 8 días en el grupo placebo. No se observaron diferencias a largo plazo entre placebo y montelukast, a partir de las 4 semanas de finalizado el tratamiento⁵¹.

LECCIONES DEL MODELO ANIMAL

Con el fin de estudiar la inmunopatogénesis de la infección por VRS, tanto en la fase aguda de la enfermedad como a largo plazo, hemos adaptado en nuestro laboratorio un modelo experimental de VRS en ratones, que permite estudiar de forma más controlada la dinámica de la infección por VRS. Utilizando este modelo se ha podido cuantificar la replicación viral y la producción de mediadores inflamatorios en el tracto respiratorio inferior, y valorar el impacto de estos cambios inflamatorios en la función pulmonar. Estos análisis están basados en:

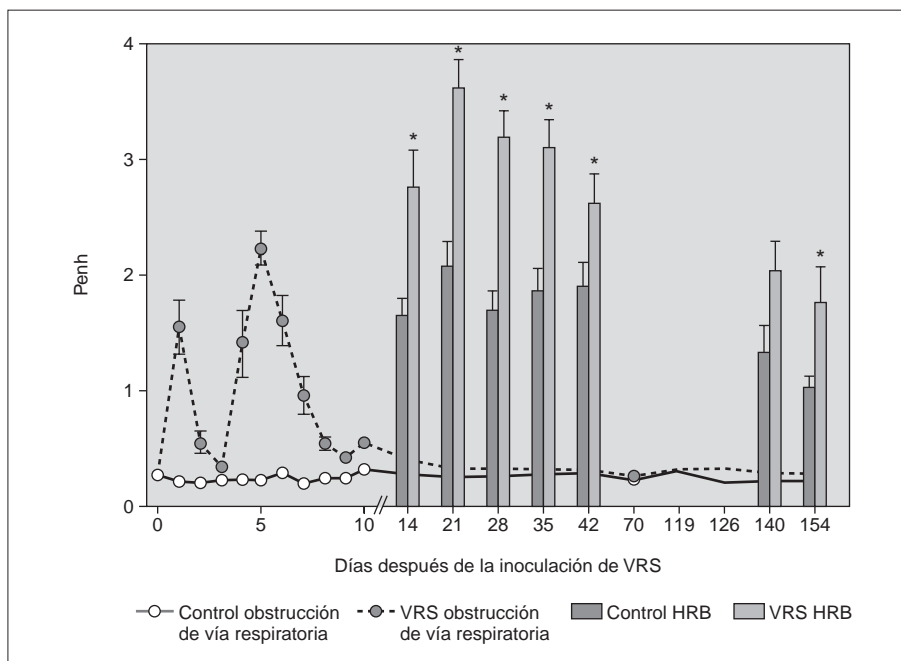
1. Una valoración histopatológica estandarizada de los cambios inflamatorios del pulmón, tanto en la fase de bronquiolitis como en la fase crónica, y la producción exagerada de moco en la vía aérea.

2. Utilización del pletismógrafo para medir la obstrucción de la vía aérea, tanto de forma basal (fase de bronquiolitis) como tras estímulo con metilcolina (fase de asma) con el fin de evaluar la HRB, definida por el tiempo de pausa espiratorio o Penh, un valor calculado adimensional que refleja el grado de resistencia de la vía aérea.

Utilizando este modelo hemos demostrado que después del aclaramiento del virus, documentado por cultivos celulares, y la recuperación de la fase aguda de la enfermedad⁵³, los ratones progresan hacia una fase crónica caracterizada por HRB e inflamación persistente de la vía aérea⁴⁰. En comparación con ratones control libres de infección, la inflamación pulmonar persiste hasta 154 días después de la inoculación con VRS (fig. 1). Pero lo que quizás es más importante es que estos cambios histológicos persistentes se acompañan de cambios funcionales en los parámetros de función pulmonar.

Con el fin de estudiar si la posible persistencia del VRS en el tracto respiratorio tiene un papel en la cronicidad de estos cambios histológicos y funcionales observados a largo plazo, hemos decidido medir las concentraciones de VRS por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) en muestras de pulmón de ratones infectados con VRS, tanto en la fase aguda de la enfermedad (días 1-5) como a largo plazo (días 12-42). A diferencia de los cultivos celulares que fueron consistentemente negativos después de la primera semana de la inoculación, la RT-PCR para VRS permaneció positiva en ratones infectados hasta 6 semanas después de la inoculación. Además, demostramos que el número de copias de ARN del

Figura 1. Hiperreactividad bronquial (HRB) (fase de secuela). Tras la primera fase de obstrucción aguda de la vía respiratoria, que se resuelve en 14 días, se evaluó la HRB tras inhalación con metacolina, un irritante inespecífico de la vía respiratoria. Los cambios que se producen tras inhalación con metacolina, objetivados como un incremento en el Penh (representado en barras) comienzan a ser evidentes una vez pasada la fase de bronquiolitis, a los 14 días de la infección, y persisten en el tiempo hasta 154 días tras el inóculo. Aunque se observaron también mínimos incrementos en el Penh en animales no infectados tras el estímulo con metacolina, la magnitud de la respuesta fue marcadamente superior en animales infectados con virus respiratorio sincitial (VRS). * $p \leq 0,05$.



VRS se correlacionó significativamente con la HRB observada en ese momento ($p < 0,001$; $r = 0,83$)⁵⁴.

La fase aguda (fase de bronquiolitis/neumonía) se caracteriza histológicamente por el desarrollo un denso infiltrado inflamatorio a nivel perivascular y peribronquial/bronquiolar compuesto fundamentalmente de células mononucleares y algunos neutrófilos. En la fase de máxima inflamación (días 4-7), el infiltrado inflamatorio está compuesto fundamentalmente de macrófagos y algunos linfocitos y neutrófilos, se va extendiendo a los alvéolos y septos alveolares con afectación parcheada del parénquima, sin que se observen exudados intraluminales. En la fase crónica (fase de asma) no se observa afectación de los septos alveolares ni alvéolos. El infiltrado inflamatorio está compuesto de linfocitos, macrófagos y algunas células plasmáticas pero no neutrófilos o eosinófilos. En ocasiones se observan macrófagos cargados de hemosiderina. Con el tiempo, desde el día 21 hasta el día 154, los infiltrados inflamatorios cambian morfológicamente, rodean vasos y bronquios de forma parcial, y no circunferencialmente como se observa al principio. En esta fase crónica, el infiltrado inflamatorio, más que en los paquetes broncovasculares de pequeño diámetro, se localiza fundamentalmente en los grandes vasos y bronquios principales. Los ratones controles libres de infección evaluados asimismo a lo largo del tiempo, desarrollan únicamente un leve infiltrado inflamatorio a expensas de linfocitos afectando de forma homogénea pequeñas secciones de los grandes vasos o bronquios principales. En cuanto a la producción de moco, en la fase aguda (día 5), los ratones infectados con VRS tienen un incremento de células PAS-positivo productoras de moco que apare-

cen con mayor grado de hipertrofia, tanto en la vía aérea principal como en los bronquios periféricos. Hacia el día 14, sigue habiendo más células productoras de moco en la vía aérea central; sin embargo, no se detectan células PAS-positivo en la vía aérea periférica. Estos hallazgos demuestran claramente la presencia de cambios inflamatorios crónicos, así como la hiperproducción de moco que probablemente contribuyen de forma significativa a las manifestaciones que el VRS ocasiona, tanto en la fase aguda como a largo plazo⁴⁰.

Con el fin de determinar el impacto de la disminución de la replicación de VRS en los parámetros de gravedad de la infección, distintos grupos de ratones fueron tratados con palivizumab⁵⁵, un anticuerpo monoclonal neutralizante frente a la glucoproteína F del VRS, recientemente aprobado en Estados Unidos y Europa para la prevención de la infección grave por VRS en niños de alto riesgo^{56,57}. Administramos una dosis única de palivizumab bien: *a*) 24 h antes de la infección a modo de profilaxis, o *b*) 48 h después del inóculo intranasal de VRS como tratamiento. En la figura 2 se puede observar cómo, independientemente del momento en el que se administró el anticuerpo monoclonal, la supresión de la replicación viral medida por cultivo celular fue completa en comparación con el grupo control de ratones infectados con VRS que no recibieron ningún tipo de tratamiento (realmente recibieron suero salino por vía intraperitoneal a modo de placebo). También se evaluaron concentraciones de distintas citocinas en el lavado broncoalveolar (LBA) de los ratones infectados con VRS tras la administración de palivizumab. Únicamente en el grupo de ratones que recibió palivizumab como profilaxis se observa-

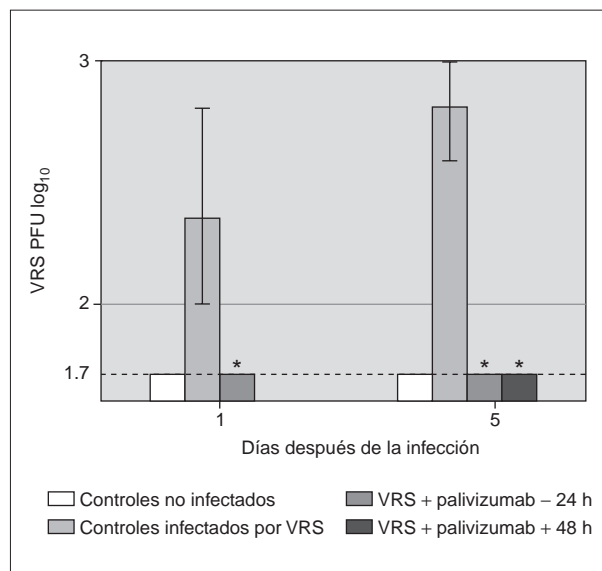


Figura 2. La administración de palivizumab 24 h antes (profilaxis) o 48 h después (tratamiento) de la inoculación redujo en más de un logaritmo el número de placas formadoras de colonias (PFC) de virus respiratorio sincitial (VRS) en comparación al grupo que no recibió ningún tratamiento. * $p < 0,001$ frente a controles infectados por VRS (no tratados).

ron reducciones significativas de las concentraciones de RANTES, eotaxina, MIP-1 α , IL-10 e IFN- γ ($p < 0,01$) en la fase aguda de la enfermedad (fase de bronquiolitis) en comparación con los otros grupos evaluados. Asimismo se analizaron las alteraciones histológicas presentes en la fase aguda (día 5) y tardía (día 70). Se observó que, aunque los ratones inoculados con VRS desarrollaron alteraciones histológicas persistentes, la administración de pali-

vizumab 24 h antes de la infección se asoció con una disminución significativa de la intensidad de la inflamación pulmonar en la fase aguda ($p < 0,007$, en el día 5) (fig. 3). A pesar de que los ratones recibieron una dosis única del anticuerpo, la reducción de la inflamación pulmonar, en comparación con ratones infectados no tratados, continuó demostrando una marcada tendencia favorable en los ratones tratados con palivizumab hasta 10 semanas después de la infección. Por tanto, estos estudios demuestran que la reducción de la replicación viral obtenida por la administración de palivizumab, disminuyó de manera significativa el efecto citopático directo del virus sobre el epitelio respiratorio y la magnitud de la respuesta inmunitaria inflamatoria desencadenada por el VRS.

Posteriormente se evaluó el efecto del anticuerpo monoclonal en los parámetros de función respiratoria. En la figura 4A se puede observar cómo los ratones que recibieron palivizumab 24 h antes de la infección no desarrollaron signos de obstrucción de la vía aérea ($p < 0,001$) en comparación con los otros grupos evaluados. Es más, este grupo de ratones se comportó clínicamente como ratones no infectados inoculados únicamente con medio de cultivo. Cuatro semanas después de la infección, la provocación con metilcolina desencadenó incrementos en el Penh (HRB) en el grupo de ratones infectados no tratados que fueron significativamente mayores en comparación con los ratones tratados con palivizumab antes o después de la infección. Sin embargo, el día 70, 10 semanas después de la inoculación intranasal de VRS, únicamente los ratones que recibieron palivizumab como profilaxis demostraron una reducción significativa de la HRB en comparación con el resto de los grupos (fig. 4B).

Estos hallazgos demuestran que existe una correlación significativa entre las reducciones de la replicación viral,

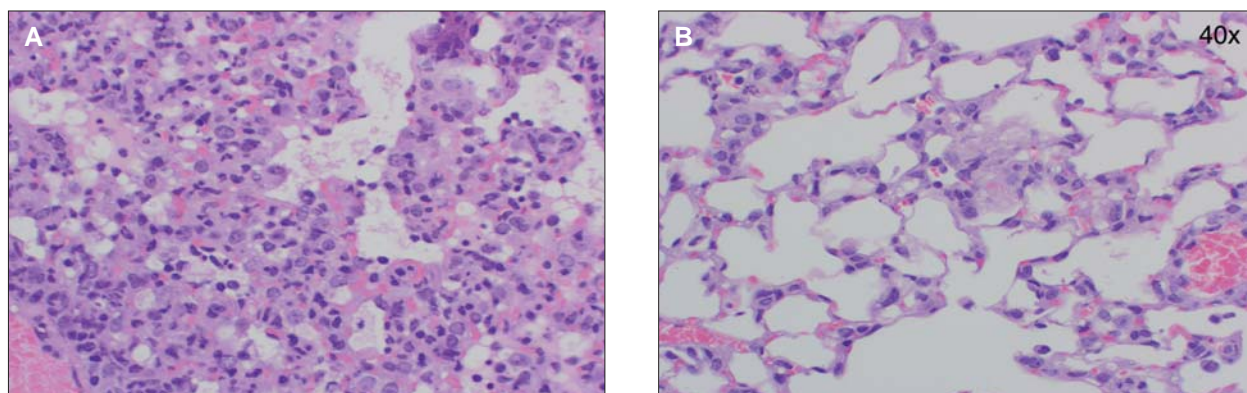


Figura 3. **A)** En la fase de neumonía/bronquiolitis (día 5 después de la inoculación) se puede observar en secciones de pulmón de ratones infectados con virus respiratorio sincitial no tratados un denso infiltrado inflamatorio a expensas de mononucleares a nivel peribronquial. Se puede observar también cómo los espacios aéreos contienen numerosos monocitos, neutrófilos y material proteináceo. **B)** Los ratones que recibieron palivizumab 24 h antes de la infección demostraron una reducción significativa de la inflamación, caracterizada sobre todo por macrófagos intraalveolares en los espacios aéreos. El edema intraalveolar observado en este grupo de ratones fue también significativamente menor.

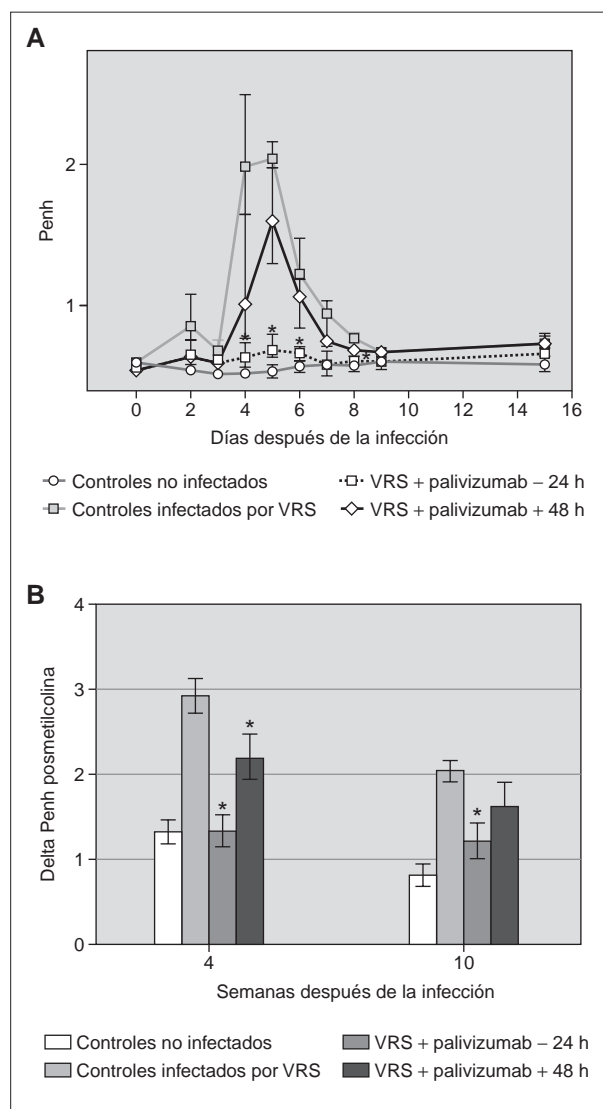


Figura 4. Inicialmente se evaluó diariamente la obstrucción basal de la vía aérea durante las primeras 2 semanas de la infección (A), después determinamos la hiperreactividad bronquial (HRB) tras provocar a los ratones ($n = 8$) con metilcolina semanalmente. En barras están representados los valores del delta Penh que reflejan la diferencia entre valores del Penh antes y después de la provocación con metilcolina ($n = 12$) (B). $*p < 0,001$ frente a controles infectados por el VRS (no tratados).

lesiones inflamatorias pulmonares, concentraciones de citoquinas inflamatorias y obstrucción de la vía aérea documentadas durante la fase aguda de la enfermedad y una mejoría de las alteraciones de las pruebas de función pulmonar a largo plazo inducidas por el VRS.

Estos resultados experimentales llevan a proponer la realización de estudios clínicos para evaluar el papel de palivizumab en la prevención de las secuelas pulmonares a largo plazo causadas por el VRS en la población pediátrica.

BIBLIOGRAFÍA

- Martínez FD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(2 Suppl):76-82.
- Dickens LE, Collins PL, Wertz GW. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol* 1984;52:364-9.
- Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev* 2004;5(Suppl A):119-26.
- Collins PL, Dickens LE, Buckler-White A, Olmsted RA, Spriggs MK, Camargo E, et al. Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4594-8.
- Blount RE Jr., Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;92:544-9.
- Psarras S, Papadopoulos NG, Johnston SL. Pathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis-related wheezing. *Paediatr Respir Rev* 2004;5(Suppl A):179-84.
- Falsey AR, Cunningham CK, Barker WH, Kouides RW, Yuen JB, Menegus M, et al. Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J Infect Dis* 1995;172:389-94.
- Dowell SF, Anderson LJ, Gary HE Jr, Erdman DD, Plouffe JF, File TM Jr, et al. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J Infect Dis* 1996;174:456-62.
- Hashem M, Hall CB. Respiratory syncytial virus in healthy adults: the cost of a cold. *J Clin Virol* 2003;27:14-21.
- Hall WJ, Hall CB, Speers DM. Respiratory syncytial virus infection in adults: clinical, virologic, and serial pulmonary function studies. *Ann Intern Med* 1978;88:203-5.
- Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* 1999;282:1440-6.
- Vicente D, Montes M, Cilla G, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Hospitalization for respiratory syncytial virus in the paediatric population in Spain. *Epidemiol Infect* 2003;131:867-72.
- Pullan CR, Hey EN. Wheezing, asthma, and pulmonary dysfunction 10 years after infection with respiratory syncytial virus in infancy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;284(6330):1665-9.
- 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;161:1501-7.
- Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995;332:133-8.
- Rooney JC, Williams HE. The relationship between proved viral bronchiolitis and subsequent wheezing. *J Pediatr* 1971;79:744-7.
- Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001;344:1917-28.
- Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354:541-5.
- Hall CB, Hall WJ, Gala CL, McGill FB, Leddy JP. Long-term prospective study in children after respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1984;105:358-64.
- Mok JY, Simpson H. Outcome for acute bronchitis, bronchiolitis, and pneumonia in infancy. *Arch Dis Child* 1984;59:306-9.
- Bont L, Aalderen WM, Kimpen JL. Long-term consequences of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Paediatr Respir Rev* 2000;1:221-7.

22. Sommerville RG. Respiratory syncytial virus in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Lancet* 1963;47:1247-8.
23. Castro J, Telleria JJ, Blanco-Quiros A. Susceptibility genes for asthma and allergy: hits and questions. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2001;11:73-8.
24. Goetghebuer T, Isles K, Moore C, Thomson A, Kwiatkowski D, Hull J. Genetic predisposition to wheeze following respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Allergy* 2004;34:801-3.
25. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 2000;55:1023-7.
26. Lofgren J, Ramet M, Renko M, Marttila R, Hallman M. Association between surfactant protein A gene locus and severe respiratory syncytial virus infection in infants. *J Infect Dis* 2002;185:283-9.
27. McBride JT. Pulmonary function changes in children after respiratory syncytial virus infection in infancy. *J Pediatr* 1999;135 (2 Pt 2):28-32.
28. Pardos Martínez C LCV, González Pérez-Yarza E, Isanta Pomar C, Fuertes Fernández-Espinar J, Meriz Rubio J. Factores de riesgo de asma, alergia e hiperreactividad en niños de 6 a 8 años. *An Esp Pediatr* 2001;55:205-12.
29. Piedimonte G. Neural mechanisms of respiratory syncytial virus-induced inflammation and prevention of respiratory syncytial virus sequelae. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163 (3 Pt 2):S18-21.
30. Silvestri M, Sabatini F, Defilippi AC, Rossi GA. The wheezy infant-immunological and molecular considerations. *Paediatr Respir Rev* 2004;5(Suppl A):81-7.
31. Welliver RC, Duffy L. The relationship of RSV-specific immunoglobulin E antibody responses in infancy, recurrent wheezing, and pulmonary function at age 7-8 years. *Pediatr Pulmonol* 1993;15:19-27.
32. Sheeran P, Jafri H, Carubelli C, Saavedra J, Johnson C, Krisher K, et al. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:115-22.
33. Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, Gala CL, Menegus ME, Sufin SC, et al. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med* 1986;315:77-81.
34. Delage G, Brochu P, Robillard L, Jasmin G, Joncas JH, Lapointe N. Giant cell pneumonia due to respiratory syncytial virus. Occurrence in severe combined immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1984;108:623-5.
35. Whimbey E, Couch RB, Englund JA, et al. Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adult patients with leukemia. *Clin Infect Dis* 1995;21:376-9.
36. Aberle JH, Aberle SW, Dworzak MN, Mandl CW, Rebhandl W, Vollnhöfer G, et al. Reduced interferon-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells of infants with severe respiratory syncytial virus disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1263-8.
37. Garofalo RP, Patti J, Hintz KA, Hill V, Ogra PL, Welliver RC. Macrophage inflammatory protein-1alpha (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2001;184:393-9.
38. 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;168:633-9.
39. Haeberle HA, Kuziel WA, Dieterich HJ, Casola A, Gatalica Z, Garofalo RP. Inducible expression of inflammatory chemokines in respiratory syncytial virus-infected mice: role of MIP-1alpha in lung pathology. *J Virol* 2001;75:878-90.
40. Jafri HS, Chávez-Bueno S, Mejías A, Gómez AM, Ríos AM, Nassi SS, et al. Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis* 2004;189:1856-65.
41. Schwarze J, O'Donnell DR, Rohwedder A, Openshaw PJ. Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:801-5.
42. Cubie HA, Duncan LA, Marshall LA, Smith NM. Detection of respiratory syncytial virus nucleic acid in archival postmortem tissue from infants. *Pediatr Pathol Lab Med* 1997;17:927-38.
43. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1618-23.
44. Buckingham SC, Jafri HS, Bush AJ, Carebelli CM, Sheeran P, Hardy RD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of dexamethasone in severe respiratory syncytial virus (RSV) infection: effects on RSV quantity and clinical outcome. *J Infect Dis* 2002;185:1222-8.
45. Malley R, DeVincenzo J, Ramilo O, Dennehy PH, Meissner HC, Gruber WC, et al. Reduction of respiratory syncytial virus (RSV) in tracheal aspirates in intubated infants by use of humanized monoclonal antibody to RSV F protein. *J Infect Dis* 1998;178:1555-61.
46. Malley R, Vernacchio L, DeVincenzo J, Ramilo O, Dennehy PH, Meissner HC, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay to assess respiratory syncytial virus concentration and correlate results with inflammatory mediators in tracheal secretions. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:1-7.
47. Edell D, Khoshoo V, Ross G, Salter K. Early ribavirin treatment of bronchiolitis: Effect on long-term respiratory morbidity. *Chest* 2002;122:935-9.
48. Edell D, Bruce E, Hale K, Khoshoo V. Reduced long-term respiratory morbidity after treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis with ribavirin in previously healthy infants: A preliminary report. *Pediatr Pulmonol* 1998;25:154-8.
49. Wenzel SE, Gibbs RL, Lehr MV, Simoes EA. Respiratory outcomes in high-risk children 7 to 10 years after prophylaxis with respiratory syncytial virus immune globulin. *Am J Med* 2002;112:627-33.
50. Kimpen JL. Prevention and treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis and postbronchiolitic wheezing. *Respir Res* 2002;3(Suppl 1):40-5.
51. Bisgaard H. A randomized trial of montelukast in respiratory syncytial virus postbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:379-83.
52. Welliver RC 2nd, Hintz KH, Glori M, Welliver RC. Sr. Zileuton reduces respiratory illness and lung inflammation, during respiratory syncytial virus infection, in mice. *J Infect Dis* 2003;187:1773-9.
53. Mejías A, Ramilo O. Asthma and respiratory syncytial virus. Myth or reality? *An Esp Pediatr* 2002;57:199-204.
54. Chavez-Bueno S, Mejías A OK, Ríos AM, Fonseca-Aten M, Hatfield J, Gómez AM, Ramilo O, et al. Respiratory syncytial virus (RSV)-induced long term airway hyperresponsiveness (AHR) is associated with viral persistence detected by real time polymerase chain reaction (RLT-PCR). *Pediatric Res* 2004;1:335A (1908).
55. Mejías A, Chávez-Bueno S, Ríos AM, Saavedra-Lozano J, Fonseca Aten M, Hatfield J, et al. Anti-respiratory syncytial virus (RSV) neutralizing antibody decreases lung inflammation, airway obstruction, and airway hyperresponsiveness in a murine RSV model. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1811-22.
56. Tsutsumi H. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics* 1998;102:531-7.
57. Carbonell-Estrany X, Quero Jiménez J. Recomendaciones para la prevención de la infección por virus respiratorio sincitial: revisión. *An Esp Pediatr* 2002;56:334-6.