

# *Efecto de la infección por Virus Sincitial Respiratorio (VSR) en el apnea producida por capsaicina en ratas Fischer -344 (F-344) recién destetadas.*

Dr. Carlos E. Sabogal Rosas

Departamento de Pediatría, División de Neumología Pediátrica  
Universidad de Miami, Facultad de Medicina, Miami-Florida

## **RESUMEN**

*La incidencia de apnea asociada a infección por virus sincitial respiratorio (VSR) puede ser hasta de un 20% y asimismo puede ser la primera manifestación de enfermedad. Palivizumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de fusión, llamada proteína F, del VSR, y su uso es recomendado en lactantes e infantes con riesgo de adquirir infección severa por VSR.*

*El propósito del presente estudio fue determinar si la infección por VSR afecta el apnea producida por capsaicina y si el uso de palivizumab protege contra ésta en ratas recién destetadas de 3 semanas de edad. El apnea inducida por capsaicina fue significativamente más prolongada a los dos y a los cinco días post-infección por VSR y la mortalidad asociada al apnea estuvo presente solamente en el grupo de ratas infectadas con VSR.*

*El uso profiláctico de palivizumab protegió contra el apnea inducida por capsaicina y contra la mortalidad asociada.*

*Los resultados sugieren que la infección por VSR produce una alteración significativa a nivel del control neuronal de la respiración y muy probablemente cuando sólo se encuentra a nivel del tracto respiratorio superior facilitando el desarrollo de apnea y mortalidad. Finalmente esta respuesta puede ser bloqueada con el uso preventivo de palivizumab.*

**Palabras claves:** *VSR, Apnea, Capsaicina, Palivizumab.*

## **SUMMARY**

*Apnea is a common manifestation of respiratory syncytial virus (RSV) infection in young infants. Its incidence can be as high as 20% and can be the first sign of disease.*

*Palivizumab is a monoclonal antibody against the fusion (F) protein of RSV and is recommended for infants at risk of developing a serious life-threatening RSV infection.*

*Purpose of this study was to determine if the RSV infection prolongs the apnea produced by capsaicin in weanling rats of three weeks of age.*

*Capsaicin induced apnea was longer in the RSV infected group at two and five days post-inoculation and apnea related mortality occurred only in the RSV infected group. Palivizumab was protective against both apnea and apnea-related mortality in the RSV infected group. Our result suggests that RSV infection alters the neuronal control of respiration and the sensorineural nerves stimulated by capsaicin. This response is seen early in the course of the infection and probably when the virus is only in the upper respiratory system. Finally this response can be blocked with the prophylactic use of palivizumab.*

**Key-words:** *RSV, Apnea, Capsaicin, Palivizumab*

## **INTRODUCCIÓN**

La infección por Virus Sincitial Respiratorio (VSR) ha sido identificada como la causa más común de infección del tracto respiratorio en infantes y niños pequeños. La mayoría de las infecciones tienen un curso benigno, sin embargo los lactantes más pequeños y los prematuros tienen un mayor riesgo de presentar apnea con la infección. Estudios epidemiológicos han demostrado que la incidencia de apnea puede ser hasta de un 20% y asimismo puede ser la primera manifestación de la enfermedad [1].

Trabajos anteriores por nuestro grupo de la universidad de Miami en la Florida, EEUU, han demostrado que el

apnea producida por estimulación nerviosa por capsaicina está incrementada en ratas adultas F-344 infectadas con VSR. [2].

Actualmente existe en el mercado un anticuerpo monoclonal contra el VSR llamado palivizumab. Este anticuerpo monoclonal está dirigido contra la proteína de fusión, llamada proteína F, del VSR, que es crucial en la etapa inicial de la infección. Su uso está recomendado para bebés prematuros, aquellos con displasia broncopulmonar o cardiopatía congénita u otra enfermedad que pueda poner en riesgo la vida del bebé al adquirir infección por VSR<sup>[3]</sup>. Este anticuerpo monoclonal es administrado mensualmente por vía intramuscular, durante los meses de otoño e invierno y provee inmunidad pasiva contra las formas graves de infección del VSR, específicamente contra las infecciones del tracto respiratorio bajo. Estudios recientes han demostrado que el uso de este anticuerpo disminuye la incidencia de admisiones en un 45 a 55% en los grupos de alto riesgo<sup>[4]</sup>. Sin embargo nada ha sido publicado acerca del uso de palivizumab y su potencial protección contra el apnea asociada a la infección por VSR.

## HIPÓTESIS

- 1) La infección por VSR prolonga el apnea producida por capsaicina en ratas F- 344 recién destetadas. Las ratas infectadas con vehículo libre de virus (VLV-placebo) deben tener menos apnea cuando se les administra capsaicina.
- 2) Las ratas recién destetadas infectadas con VSR tienen más complicaciones asociadas al apnea producida por capsaicina que las ratas adultas.
- 3) La infección por VSR produce más apnea y más complicaciones asociadas a ésta temprano en el curso de la infección por VSR y menos cuando la infección está totalmente instalada.
- 4) El apnea asociada a capsaicina debe ser menor en ratas pre-tratadas con palivizumab antes de la infección. Las ratas control tratadas con el vehículo de palivizumab deben tener más apnea y más complicaciones asociadas a ésta.

## METODOLOGÍA

Ratas F-344 de tres semanas de edad, recién destetadas y totalmente libres de patógenos en grupos de seis a nueve por grupo fueron inoculadas

intranasalmente con 40 µL de suspensión de VSR a una concentración de (5x10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>). Ratas control de la misma edad y peso fueron inoculadas con vehículo libre de virus (VLV-placebo) <sup>[5]</sup>. Un día antes del experimento (con la rata anestesiada con pentobarbital a la dosis de 50 mg/kg/intraperitoneal) se procedió a la colocación quirúrgica de un catéter intravascular en la vena yugular externa derecha para la administración de capsaicina durante el experimento.

En el grupo de ratas en que se estudio el efecto de palivizumab e infección por VSR, éste fue administrado intraperitonealmente a la dosis de 15mg/kg un día antes de la inoculación con VSR. Posteriormente las ratas fueron retadas con capsaicina dos días después de la inoculación. El grupo control recibió vehículo de palivizumab (0.9% NaCl, 1ml/kg).

A los dos y a los cinco días post-infección las ratas fueron colocadas despiertas, sin ningún tipo de sedación, en un pletismógrafo (BuxcoCo, Sharon, CT) para evaluar sus respuestas ventilatorias, específicamente tiempo de apnea, a las diferentes y sucesivas dosis de capsaicina (1, 2.5, 5, 10 µg/kg i.v.) diluida en 0.9% NaCl. La capsaicina fue administrada a través del catéter central con intervalos de 10 minutos entre las diferentes dosis.

La capsaicina es un derivado de los ajíes rojos del género capsicum y su administración a los seres vivos produce una serie de manifestaciones clínicas que incluyen apnea, dolor, tos, bradicardia, hipotensión e incremento de la permeabilidad vascular. Su efecto es mediado a través de la estimulación de las fibras no mielinizadas tipo C y a la posterior liberación de neurotransmisores que incluyen a la sustancia P, a péptido relacionado genéticamente a la calcitonina (a-CGRP), neurokininas A y B , péptido vasoactivo intestinal (VIP), GABA y somatostatina <sup>[6]</sup>.

Se escogieron dos y cinco días post-infección para evaluar el impacto de la infección por VSR en el tracto respiratorio alto y bajo respectivamente. Estos días fueron escogidos en base a estudios previos en roedores que indican que los títulos de VSR en los pulmones alcanzan un máximo entre 4 a 5 días post-inoculación <sup>[7]</sup>.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se reportan como promedio ± error standard. Los efectos de VSR y VLV se expresaron como promedios de tiempo de apnea expresada en segundos y fueron analizados con el test ANOVA de repetición de medidas y análisis post-hoc<sup>[8]</sup>. La mortalidad fue analizada en porcentajes y analizada por el test de Chi-cuadrado.

Comparaciones múltiples de los promedios fueron analizadas con el test de Fisher corregido para diferencias significativas mínimas.<sup>[9]</sup> El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Stat View versión 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Las diferencias con un valor de p menor de 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

### **VSR vs. VLV, 2 días después de la inoculación.**

A los dos días de inoculación ambos grupos de ratas mostraron una correlación directa entre la dosis de capsaicina y el tiempo de apnea a dosis mayores de 1 µg/kg de capsaicina. Sin embargo los animales infectados con VSR tuvieron un tiempo más prolongado de apnea y esta diferencia fue estadísticamente significativa a las dosis de 5 y 10 µg/kg.

A la dosis de 5 µg/kg de capsaicina, el tiempo de apnea para el grupo VSR fue de  $19.3 \pm 2.45$  seg. vs.  $12.6 \pm 0.6$  seg. para el grupo VLV ( $p=0.03$ ). Y a la dosis de 10 µg/Kg., el tiempo de apnea para el grupo VSR fue de  $48 \pm 4.6$  seg. vs.  $22.1 \pm 1.5$  seg., para el grupo VLV ( $p=0.0001$ ). Un hallazgo inesperado fue el de la mortalidad asociada al grupo infectado con VSR, que fue del 67% vs. 0% para el grupo control ( $p = 0.01$ ).

### **VSR vs. VLV, 5 días después de la inoculación.**

A los cinco días de inoculación ambos grupos de ratas mostraron también una correlación directa entre la dosis de capsaicina y el tiempo de apnea a dosis mayores de 1 µg/Kg. Nuevamente los animales infectados con VSR tuvieron un tiempo más prolongado de apnea y esta diferencia fue estadísticamente significativa a las dosis de 2.5, 5 y 10 µg/kg.

A la dosis de 2.5 µg/Kg. de capsaicina, el tiempo de apnea para el grupo VSR fue de  $21.8 \pm 0.4$  seg. vs.  $16.3 \pm 1.7$  seg. para el grupo VLV ( $p=0.005$ ). A la dosis de 5 µg/Kg. de capsaicina, el tiempo de apnea para el grupo VSR fue de  $29.7 \pm 2.3$  seg. vs.  $16.3 \pm 1.6$  seg. para el grupo VLV ( $p=0.01$ ). Y a la dosis de 10 µg/Kg. de capsaicina, el tiempo de apnea para el grupo VSR fue de  $45.4 \pm 7.8$  seg. vs.  $20.6 \pm 1.1$  seg. para el grupo VLV ( $p=0.0002$ ). El grupo infectado con VSR tuvo una mortalidad del 22% vs. 0% para el grupo control ( $p = 0.34$ ).

### **Comparación de ambos grupos VSR a los dos y a los cinco días post-inoculación**

Al comparar el tiempo de apnea en ambos grupos VSR de 2 y 5 días post-inoculación se encontró que a la única dosis a la cual hubo diferencia estadísticamente significativa fue a la de 2.5 µg/Kg. de capsaicina, siendo más prolongada en el grupo de cinco días post-inoculación.

El grupo VSR a los dos días tuvo  $7.6 \pm 3.3$  seg. vs.  $21.7 \pm 6.2$  seg. para el VSR de cinco días ( $p= 0.02$ ).

### **Apnea inducida por capsaicina y mortalidad asociada al apnea**

Todas las ratas que fueron retadas con capsaicina en el presente estudio presentaron una respuesta apneica bifásica. La primera parte de esta respuesta se manifestó por una cesación brusca de los movimientos respiratorios, sin evidencia de movimientos torácicos o abdominales. Después de un tiempo variable de apnea tipo central las ratas empezaban a respirar irregularmente con movimientos respiratorios profundos e irregulares (fase de recuperación). Esta última también era de duración variable para recuperar finalmente su frecuencia respiratoria regular.

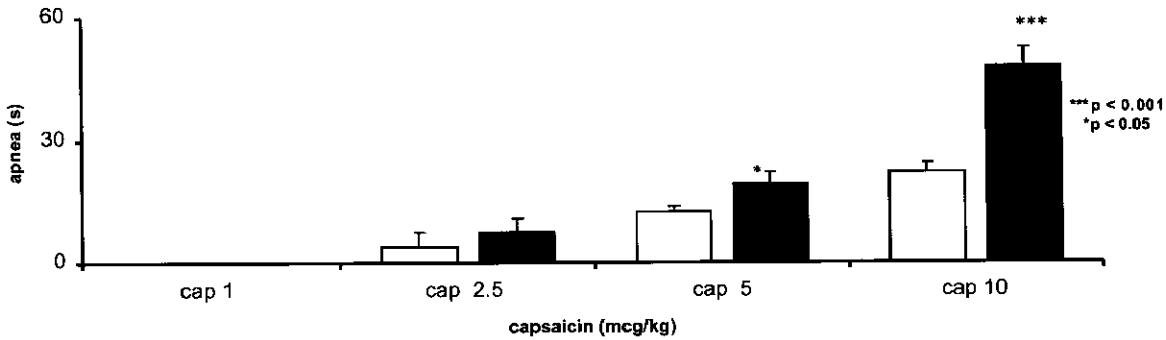
Todas las ratas que murieron fueron ratas infectadas con VSR y murieron después de un tiempo prolongado de apnea, en todos los casos mayores de 90 segundos. Estos animales nunca recuperaron el patrón regular de respiración y murieron en la fase de respiraciones irregulares.

### **Palivizumab vs. Vehículo, 2 días después de la inoculación**

Dos grupos de ratas fueron pre-tratadas con palivizumab o su vehículo (0.9% NaCl) un día antes de la inoculación con VSR. Ambos grupos fueron retados con capsaicina dos días después de la infección.

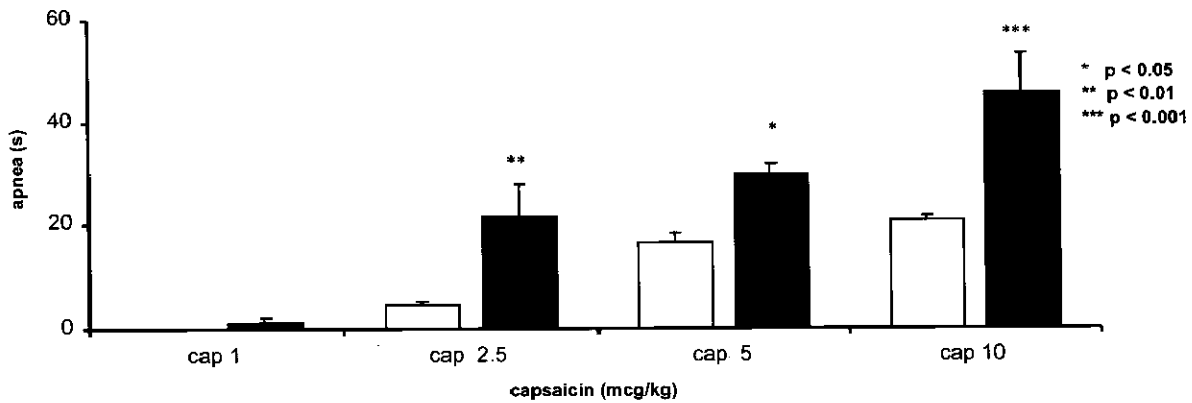
El grupo de ratas pre-tratadas con palivizumab no tuvo apnea a las dosis de 1 y 2.5 µg/Kg. de capsaicina y tuvo menor duración de apnea a las dosis de 5 y 10 µg/kg. A la dosis de 5 µg/Kg. de capsaicina, el tiempo de apnea para el grupo de palivizumab fue de  $8.1 \pm 0.9$  seg. vs.  $19.3 \pm 2.45$  seg. para el grupo control ( $p=0.0004$ ). A la dosis de 10 µg/Kg. de capsaicina, el tiempo de apnea para el grupo de palivizumab fue de  $16.8 \pm 1.3$  seg. vs.  $48 \pm 4.6$  seg. para el grupo control ( $p=0.0001$ ).

### VSR vs. VLV 2 días



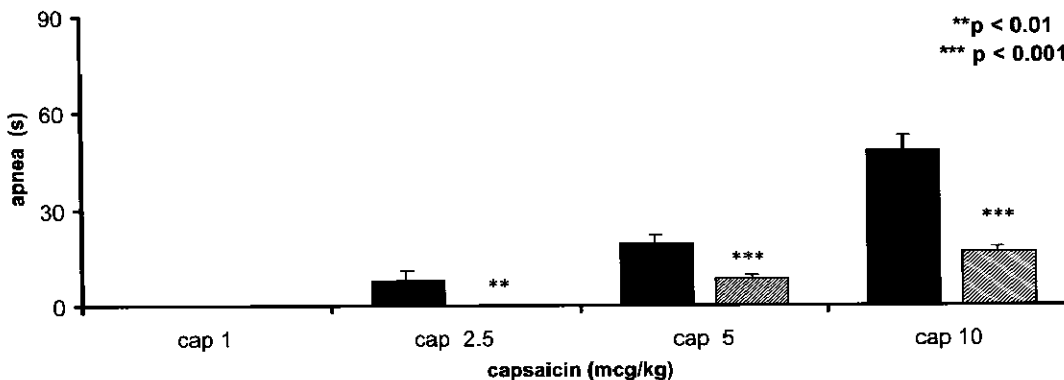
**Figura 1.** Efecto de la infección por VSR en el apnea inducida por capsaicina a los dos días post-inoculación. (barras negras, ratas infectadas con VSR / barras blancas, grupo control) El tiempo de apnea fue más prolongado en las ratas infectadas con VSR y fue significativo a las dosis de 5 y 10 µg/Kg. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### VSR vs. VLV 5 días



**Figura 2.** Efecto de la infección por VSR en el apnea inducida por capsaicina a los cinco días post-inoculación. (barras negras, ratas infectadas con VSR / barras blancas, grupo control) El tiempo de apnea fue más prolongado en las ratas infectadas con VSR y fue significativo a las dosis de 2.5, 5 y 10 µg/Kg. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### Palivizumab vs VSR 2 días



**Figura 3.** Efecto del tratamiento preventivo con palivizumab 24h antes de la inoculación con VSR en el apnea inducida por capsaicina a los dos días post-inoculación. (barras negras, ratas infectadas con VSR / barras a rayas, ratas tratadas con palivizumab) Las ratas pretratadas con palivizumab mostraron menos apnea que el grupo control. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

## DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra que las ratas recién destetadas infectadas con VSR tienen mayor tiempo de apnea y mortalidad asociada al apnea que las ratas inoculadas con VLV a los dos y a los cinco días post-infección. También demuestra que el uso preventivo de palivizumab bloquea y disminuye esta apnea y la mortalidad asociada a ésta.

El primer experimento fue a los cinco días post-infección, debido a nuestra experiencia previa que había demostrado la presencia de VSR por pruebas de inmunoperoxidasa en los pulmones de ratas adultas, cinco días después de la inoculación intranasal [10, 11]. A los cinco días encontramos prolongación significativa del tiempo de apnea a las dosis de 2.5, 5 y 10 µg/Kg. de capsaicina. En este grupo además la mortalidad fue de un 22%.

Posteriormente llevamos a cabo el experimento a los dos días post-inoculación, con el propósito de investigar los hallazgos basados en estudios epidemiológicos referentes a la infección por VSR, que mencionan que el apnea puede estar presente muy temprano en el curso de la infección, inclusive aún antes de cualquier otro signo o síntoma [1]. A los dos días encontramos prolongación significativa del tiempo de apnea a las dosis de 5 y 10 µg/Kg. de capsaicina y una mortalidad muchísimo más alta del 67%.

En este punto del estudio ya habíamos confirmado nuestras dos primeras hipótesis pero con referencia al tercer punto estábamos sorprendidos ya que nunca esperamos encontrar mortalidad asociada al apnea y menos aún de un nivel tan alto como el encontrado. Es importante señalar en este momento que nosotros no realizamos ningún tipo de intervención una vez que el animal presentaba apnea; nos limitamos a observar y a describir lo que ocurría, por lo tanto la recuperación o la muerte del animal en estudio fue totalmente espontánea. Con esto queremos decir que si hubiésemos intervenido con estimulación táctil o administrando oxígeno probablemente la mortalidad hubiera sido menor.

La diferencia principal en los dos grupos fue la mortalidad asociada a la infección y no el tiempo de apnea. Estos hallazgos confirman que el apnea asociada al VSR es un evento que ocurre temprano en el curso de la infección y que su severidad disminuye o mejora conforme pasan los días [1, 12, 13]. Lo que es nuevo en el presente estudio es que la mortalidad asociada al apnea es mayor temprano en el curso de la infección, sugiriendo que el VSR produce una alteración significativa a nivel del control

neuronar de la respiración y muy probablemente cuando sólo se encuentra a nivel del tracto respiratorio superior. Este efecto además es específico de los animales más pequeños ya que estudios previos realizados por nuestro grupo en ratas adultas no habían demostrado mortalidad asociada al apnea por VSR. [2]. Observamos que la mortalidad se produce por apnea per se y/o por falla en el período de recuperación post-apnea. Más aún con la información que poseemos podemos afirmar que para que el apnea ocurra requiere de un centro respiratorio inmaduro, como el que exhiben los neonatos, lactantes pequeños y en especial los prematuros.

La infección por VSR produce inflamación no sólo en la mucosa de la vía aérea, sino también de en la lámina propia que incluye a los vasos sanguíneos, nervios y demás células. Produce también inflamación neurogénica a través de un aumento de los receptores de la sustancia P provocando que la vía aérea sea más susceptible a los efectos pro-inflamatorios mediados por este péptido que es liberado por las terminaciones nerviosas [10]. Sabemos además que el uso profiláctico de palivizumab bloquea esta respuesta inflamatoria en la vía aérea de las ratas. [11]. En el presente estudio se demuestra también que el uso preventivo de palivizumab bloquea y disminuye el apnea inducida por capsaicina y la mortalidad asociada al apnea en ratas recién destetadas infectadas con VSR.

Especulamos pues que el apnea inducida por capsaicina en ratas recién destetadas infectadas con VSR sugiere la potenciación de ciertos neurotransmisores que controlan la respiración (inhibitorios y/o excitatorios). Asimismo podemos inferir que la infección por si misma no es suficiente para producir apnea, requiere de inmadurez del centro respiratorio y al parecer de un tercer factor, que en el presente estudio fue capsaicina y que en la práctica diaria puede ser, reflujo gastroesofágico, apnea del prematuro, exposición al humo del cigarrillo, posición prona, etc.; y sería la combinación de eventos los que producirían finalmente el apnea. El requerimiento de estos factores «extra» explicarían el porque sólo uno de cada cinco niños infectados con VSR tiene apnea.

Finalmente creemos que estudios epidemiológicos acerca del uso de palivizumab podrán arrojar más información en futuro cercano acerca de la protección contra el apnea inducida por el VSR en seres humanos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kneyber, M.C., et al., Risk factors for respiratory syncytial virus associated apnoea. *Eur J Pediatr*, 1998. 157(4): p. 331-5.
2. Napchan G., S.C., Piedimonte G., Early effect of Respiratory Syncytial Virus (RSV) infection on capsaicin-induced apnea in conscious F-344 rats [abstract]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2002. 165(8): p. A 204.
3. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The Impact-RSV Study Group. *Pediatrics*, 1998. 102(3 Pt 1): p. 531-7.
4. Meissner, H.C. and S.S. Long, Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*, 2003. 112(6 Pt 1): p. 1447-52.
5. King, K.A., et al., Exaggerated neurogenic inflammation and substance P receptor upregulation in RSV-infected weanling rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. 24(2): p. 101-7.
6. Holzer, P., Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev*, 1991. 43(2): p. 143-201.
7. Prince, G.A., et al., The pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *Am J Pathol*, 1978. 93(3): p. 771-91.
8. Zar, J.H., *Two - Factor Analysis of Variance: Biostatistical analysis*. 2nd ed. 1984, Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall. xiv, 718.
9. Wallestein, S., C. Zucker, and J. Fleiss, Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res*, 1980. 47: p. 1-9.
10. Piedimonte, G., et al., Respiratory syncytial virus upregulates expression of the substance P receptor in rat lungs. *Am J Physiol*, 1999. 277(4 Pt 1): p. L831-40.
11. Piedimonte, G., et al., A humanized monoclonal antibody against respiratory syncytial virus (palivizumab) inhibits RSV-induced neurogenic-mediated inflammation in rat airways. *Pediatr Res*, 2000. 47(3): p. 351-6.
12. Anas, N., et al., The association of apnea and respiratory syncytial virus infection in infants. *J Pediatr*, 1982. 101(1): p. 65-8.
13. Tobias, J.D., Caffeine in the treatment of apnea associated with respiratory syncytial virus infection in neonates and infants. *South Med J*, 2000. 93(3): p. 294-6.

### Agradecimiento

El autor expresa su profundo agradecimiento a todo el equipo de investigación del Servicio de Neumología Pediátrica de la Universidad de Miami por su apoyo en el presente proyecto de investigación.