

IMPLICACIONES DE LA APOPTOSIS EN EL DENGUE GRAVE Y NO GRAVE: NUEVAS EVIDENCIAS EN SANGRE Y TEJIDOS

Autoría principal: Daniel de Jesús Limonta Velázquez

Otros autores: Viviana Falcón, Griselda Torres, Virginia Capó, Ivón Menéndez, Delfina Rosario, Yinet Castellanos, Mayling Álvarez, Rosmari Rodríguez, Raichel Molina, Ledy López, Kenia González, José L. Pelegrino, Gerardo Guillén y María G. Guzmán

Colaboradores: Nilvia Herrada, Amanda Torrentes-Carvalho, Cíntia Ferreira Marinho, Elzinandes Leal de Azeredo, Ana Rita C. Motta-Castro, Luiz José de Souza, Rivaldo Venâncio da Cunha, Claire Fernandes Kubelka, Rita Maria Nogueira, Luzia Maria de-Oliveira-Pinto

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

Autor para la correspondencia:

Dr. Daniel Limonta. Laboratorio de Arbovirus. Departamento de Virología. Centro Colaborador de la OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su Vector. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Autopista del Mediodía Km 6, Marianao 13, La Lisa, La Habana, Cuba. Télef. 53-7-2553552, Fax: 53-7-2046051
E-mail: dlimonta@ipk.sld.cu; dlimonta@infomed.sld.cu

Dr. Daniel Limonta (16 %). Llevó a cabo directamente los principales estudios en tejidos del fallecido por dengue y en la sangre de los pacientes con dengue. Interpretó primariamente todos estos resultados y realizó la escritura del trabajo.

Viviana Falcón (15%). Participó directamente en el estudio de microscopia electrónica de tejidos del fallecido por dengue, en la interpretación de los resultados, en la revisión y en la confección de este trabajo.

Griselda Torres (15%). Participó directamente en la preparación de los tejidos para el estudio de microscopia electrónica de tejidos del fallecido por dengue, en la interpretación de estos resultados, en la revisión y en la confección de este trabajo.

Virginia Capó (15%). Participó directamente en la preparación de los tejidos para el estudio de microscopia electrónica de tejidos del fallecido por dengue, en la interpretación de estos resultados, en la revisión y en la confección de este trabajo.

Ivón Menéndez (4%). Participó directamente en el estudio de microscopia electrónica de tejidos del fallecido por dengue y en la interpretación de los resultados.

Delfina Rosario (2%). Participó directamente en el diagnóstico virológico del fallecido por dengue y en la interpretación de los resultados.

Yinet Castellanos (2%). Participó directamente en el diagnóstico virológico del fallecido por dengue y en la interpretación de los resultados.

Mayling Álvarez (2%). Participó directamente en el diagnóstico virológico del fallecido por dengue y en la interpretación de los resultados.

Rosmari Rodríguez (2%). Participó directamente en el diagnóstico virológico del fallecido por dengue y en la interpretación de los resultados.

Raychel Molina (2%). Participó directamente en el estudio de microscopia electrónica de tejidos del fallecido por dengue.

Ledy López (2%). Participó directamente en la preparación de los tejidos para el estudio de microscopia electrónica de tejidos del fallecido por dengue.

Kenia González (2%). Realizó la necropsia y toma de tejidos del fallecido por dengue para el estudio de microscopia electrónica.

Jose L. Pelegrino (2%). Supervisó la preparación de los tejidos controles para el estudio de microscopia electrónica de tejidos del fallecido por dengue.

Gerardo Guillén (4%). Supervisó directamente los estudios de microscopia electrónica de tejidos del fallecido por dengue y participó en la interpretación de los resultados.

María G. Guzmán (15%). Supervisó directamente el diagnóstico virológico y los estudios de microscopia electrónica de tejidos del fallecido por dengue, participó en la interpretación de los resultados, la revisión y la confección del trabajo.

Listado de abreviaturas

AcM: anticuerpos monoclonales

AcP: anticuerpos policlonales

ADE: inmuno-amplificación dependiente de anticuerpos del inglés *antibodydependent enhancement*

ADN: ácido desoxirribonucleico

Arbovirus: enfermedades transmitidas por artrópodos del inglés *arthropodeborne Viruses*

ARN: ácido ribonucleico

ALAT: alanina aminotransferasa

ASAT: aspartato aminotransferasa

BSA: albumina de suero bovino del inglés *bovine serum albumin*

Caspasas: del inglés *cysteiny-**asp**artate-cleaving proteases*

CE: células endoteliales

CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

DCSA: dengue con signos de alarma

DG: dengue grave

DM: diabetes mellitus

DSSA: dengue sin signos de alarma

ELISA: ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida del inglés *enzyme linked immunosorbent assay*

FasL: ligando de Fas del inglés *Fas ligand*

FFIP: fijados en formalina e incluidos en parafina

FD/FHD/SCD: fiebre dengue/fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue

HLA: antígenos leucocitarios humanos del inglés *human leukocyte antigen*

IHQ: inmunohistoquímica

IFN: interferon/es

IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

MAC-ELISA: del inglés *IgM antibody capture ELISA*

MEI: método de ELISA de inhibición

MET: microscopía electrónica de transmisión

NS: proteínas no estructurales del inglés *non structural*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: solución tampón salina fosfatada del inglés *phosphate buffer saline*

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa del inglés *reverse transcription polimerase chain reaction*

TNF: factor de necrosis tumoral del inglés *tumor necrosis factor*

TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF del inglés *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

TUNEL: marcaje por dUTP de extremos finales cortados mediado por Transferasa deoxinucleotídica Terminal del inglés *Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick-end labeling*

VDEN: virus dengue

VEGF: factor de crecimiento de células endoteliales vasculares del inglés *vascular endothelial cell growth factor*

RESUMEN

Antecedentes: En la compleja fisiopatología del dengue se ha sugerido la participación de la apoptosis por estudios en pacientes y en fallecidos por dengue. Nuestro grupo demostró previamente apoptosis por microscopia convencional en tejidos de fallecidos por dengue de epidemias cubanas de los años 1997 y 2001; este resultado obtuvo Premio de la Academia de Ciencias en el 2009. **Objetivos:** Determinar las relaciones entre las concentraciones plasmáticas de proteínas apoptóticas con el dengue grave y no grave y visualizar la apoptosis por microscopia electrónica en tejidos de un fallecido por dengue del año 2006. **Resultados:** Se cuantificaron en plasma tres proteínas proapoptóticas (TNF- α , FasL, TRAIL) y una proteína antiapoptótica (Survivin) en los pacientes con dengue. La concentración plasmática de las proteínas apoptóticas estudiadas no se asoció con la gravedad del dengue en todos los casos usando la nueva clasificación clínica de dengue de la Organización Mundial de la Salud. Sin embargo, se encontró una disminución en plasma del TRAIL en los casos de dengue grave. Las correlaciones de las proteínas apoptóticas en plasma con el recuento de las células sanguíneas de los pacientes sugieren que el TRAIL induce

apoptosis de linfocitos y que en cambio el Survivin brinda protección contra la apoptosis de leucocitos. El aumento en plasma del TRAIL se correlacionó con el incremento del número de plaquetas. Por otro lado, en tejido del bazo del fallecido por dengue se observó en un macrófago, mediante microscopía electrónica, una vacuola fagocítica con virus dengue en su interior muy sugestiva de ser un cuerpo apoptótico fagocitado. También se observaron virus dengue en tejidos de hígado, pulmón y cerebro. **Conclusiones:** Por primera vez a nivel mundial, se encontraron correlaciones entre la concentración en la circulación de proteínas apoptóticas con el recuento de células sanguíneas de pacientes con dengue grave y no grave y además se observaron virus dengue y apoptosis por microscopía electrónica en tejidos de un fallecido por dengue. Los resultados obtenidos sugieren que la apoptosis está implicada en el dengue grave y no grave.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

El dengue se considera la enfermedad viral transmitida por mosquitos de mayor importancia en el mundo. Recientemente, se estimó que cada año ocurren 390 millones de infecciones por dengue. De hecho, la mayoría de los países latinoamericanos son endémicos o hiperendémicos de dengue. El dengue es causado por cualquiera de los cuatro serotipos del virus dengue (VDEN-1 al 4) y puede causar una enfermedad potencialmente fatal llamada fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) según la clasificación tradicional de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sin embargo, debido a la complejidad de la aplicación de esta clasificación la OMS propuso una nueva clasificación en el 2009: dengue sin o con signos de alarma (DSSA y DCSA) y dengue grave (DG).

La fisiopatología del dengue no está completamente esclarecida. Sin embargo, existen estudios que indican la interacción de factores virales y del hospedero como la inmuno-amplificación dependiente de anticuerpos, la hiper-activación de células T de memoria, el serotipo viral infectante y la hiper-producción de citocinas proinflamatorias. Dentro de este complejo contexto, existen también algunas evidencias de la participación de la apoptosis en el dengue.

Un grupo de investigación del Instituto Pasteur en Francia estudió casos fatales por dengue y mostró la apoptosis primeramente en cortes de tejidos del hígado. Sin embargo, posteriormente nuestro grupo de investigaciones del dengue del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) demostró apoptosis en cortes de tejidos provenientes de cerebro, pulmón e intestino. Ese trabajo se realizó mediante microscopía de luz convencional y recibió en el año 2009 un Premio de la Academia de Ciencias de Cuba.

A pesar de los diversos estudios realizados, no se comprende bien la relación de la apoptosis con la fisiopatología del dengue. En la actualidad no está aclarado cómo la interacción entre las proteínas pro y antiapoptóticas está relacionada con

la gravedad del dengue. Además, no se ha evaluado la apoptosis en pacientes con dengue utilizando la reciente clasificación de dengue de la OMS. Por otra parte, la apoptosis no se ha estudiado en tejidos de casos fatales por dengue mediante microscopía electrónica.

Materiales y métodos

En este trabajo se realizaron dos estudios. En uno se cuantificaron proteínas apoptóticas en el plasma de pacientes brasileños con dengue. El otro estudio de apoptosis se realizó mediante microscopía electrónica en tejidos de un caso cubano fatal por dengue.

En 62 casos brasileños con dengue clasificados según la nueva clasificación de dengue de la OMS (27 con DSSA, 20 con DCSA, 17 con DG) se cuantificaron los niveles plasmáticos de TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF), FasL (ligando de FasL), Survivin (R&D Systems, USA) y TNF- α (Pepro Tech, USA) mediante ELISA. El TRAIL, FasL y TNF- α son proteínas proapoptóticas, en cambio el Survivin es una proteína antiapoptótica. Se tomaron de las historias clínicas los datos de los hemogramas completos y del recuento por citometría de flujo de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y monocitos CD14+.

De un fallecido cubano por FHD/SCD de una epidemia por VDEN-4 en el año 2006 en La Habana se recolectaron tejidos procedentes de bazo, hígado, cerebro y pulmón para realizar microscopía electrónica de transmisión (JEOL Ltd., Japan) y detectar células apoptóticas y antígenos de VDEN por inmunomicroscopía. También se incluyeron en este estudio tejidos provenientes de cerebro, riñón, corazón, hígado y bazo para detectar antígenos de VDEN por inmunohistoquímica. Los tejidos controles positivos y negativos de ambas técnicas se realizaron como ha sido descrito previamente.

Resultados y discusión

Un trabajo *in vitro* anterior demostró una acción antiviral de TRAIL, independiente de la apoptosis, en células dendríticas y monocitos infectados por VDEN. Otro estudio detectó concentraciones sanguíneas elevadas de TRAIL en pacientes venezolanos con dengue. En ese estudio no se realizó una comparación de las concentraciones de TRAIL con la gravedad de los pacientes venezolanos con dengue. En cambio, en el presente estudio sí se contrastaron las concentraciones de TRAIL en los diferentes grupos de casos brasileños con dengue clasificados según la clasificación clínica reciente de la OMS. De forma interesante, los pacientes clasificados como DSSA presentaron concentraciones plasmáticas más aumentadas de TRAIL en comparación con los casos controles y los pacientes graves. Este hallazgo apoya el posible papel antiviral de TRAIL si consideramos que esta proteína pudo ejercer una acción antiviral en los casos de DSSA.

En una investigación previa se detectó que las concentraciones plasmáticas de Fas (receptor soluble de FasL) era mayor en casos con FHD que en casos sin FHD en Tailandia. Sin embargo, en el presente estudio se cuantificó el ligando de

Fas (FasL) que se une a su receptor específico Fas en la membrana celular. La concentración plasmática mayor de FasL se encontró en un caso brasileño grave el día antes de fallecer mientras que el grupo DG presentó significativamente menores concentraciones de esta proteína que los casos de DSSA. De este modo, el presente trabajo aborda por primera vez la participación de FasL en la infección por VDEN, su posible asociación con la fisiopatología del dengue y particularmente con la del dengue fatal.

Se encontró una concentración plasmática más elevada de TNF- α en los pacientes brasileños con DSSA comparada con los individuos controles. No encontramos diferencias del TNF- α entre los tres grupos de pacientes con dengue (DSSA, DCSA, DG). El TNF- α es una de las citocinas más estudiadas en el dengue, sin embargo, mientras unos estudios internacionales relacionan el aumento en la sangre de TNF- α con la FHD otros no encuentran la misma asociación. Estas discrepancias pueden estar relacionadas a los polimorfismos genéticos de TNF- α , la influencia del serotipo viral y la cinética diaria de producción de TNF- α durante la enfermedad del dengue.

Se evaluaron además los niveles plasmáticos de Survivin por primera vez en la infección por VDEN. Al cuantificarse esta proteína se observó una variabilidad marcada de las concentraciones plasmáticas entre los individuos brasileños.

En este estudio las concentraciones de TRAIL se correlacionaron positivamente con el recuento de plaquetas. De forma interesante observamos una correlación inversa entre las concentraciones de TRAIL con el recuento de linfocitos, específicamente linfocitos T. Es notable que el Survivin estaba correlacionado positivamente con el número de leucocitos, linfocitos y el recuento de monocitos CD14+.

La correlación inversa entre la cuantificación de TRAIL y el número de linfocitos sanguíneos indica que esta proteína participa posiblemente en la inducción de apoptosis de los linfocitos. Un hallazgo similar fue descrito anteriormente en pacientes infectados con diferentes virus como el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus sincitial respiratorio, el coronavirus y el virus del sarampión. También en nuestro estudio se observó una correlación positiva entre el TRAIL y el recuento de plaquetas. Otros estudios *in vitro* han demostrado que el TRAIL participa en la regulación de la megacariopoyesis, induce el desarrollo de megacarioblastos en plaquetas y que además las plaquetas activadas liberan TRAIL. Se necesitan más estudios para determinar si el TRAIL está asociado al incremento de plaquetas o si las plaquetas liberan esta proteína en el dengue. Sin embargo, **no podemos descartar la posibilidad de que la plaquetopenia en los casos graves de dengue estudiados esté relacionada a una concentración menor de TRAIL en la sangre.**

Un hallazgo notable de este estudio fue la correlación positiva entre la proteína antiapoptótica Survivin y el número de leucocitos, linfocitos y monocitos CD14+.

Por lo tanto, **postulamos que en los casos con dengue evaluados el Survivin podría estar brindando protección contra la apoptosis a estas células sanguíneas.**

En los cortes ultra-finos de tejidos procedentes de cerebro, riñón, hígado, bazo y pulmón del caso fatal de la epidemia cubana del año 2006 no se observaron células apoptóticas mediante microscopía electrónica de transmisión. Sin embargo, **sí se visualizaron partículas de 50-60 nm sugestivas de pertenecer a VDEN en cortes de tejidos del bazo, hígado, cerebro y pulmón.** Además, se confirmaron por inmuno-microscopía electrónica, utilizando anticuerpos anti-VDEN, que se encontraban poli-péptidos de VDEN en hepatocitos, neuroglías y células pulmonares. Sin embargo, no se detectaron antígenos virales en otros cortes de tejidos provenientes de cerebro, riñón, corazón, hígado y bazo analizados por inmunohistoquímica.

Se debe resaltar que **es la primera vez que se visualizan partículas de VDEN por microscopía electrónica en tejidos de un caso fatal por dengue.** También es la primera ocasión en que se utiliza la inmuno-microscopía electrónica para confirmar la presencia de polipéptidos de VDEN en tejidos humanos. Anteriormente, se habían observado partículas virales por microscopía electrónica de transmisión en casos no fatales de dengue solo en cortes de tejido del riñón y en una muestra de sangre. **Resultó también interesante en nuestro trabajo que visualizamos partículas virales en una gran vacuola fagocítica de un macrófago esplénico. Esta estructura es sugestiva de corresponder con la fagocitosis de un cuerpo apoptótico o tal vez una célula apoptótica** debido a su gran tamaño, la presencia en su interior de organelos y el hallazgo en el interior de partículas virales.

En resumen, este trabajo describe por primera vez la posible inducción de apoptosis por el TRAIL en linfocitos sanguíneos de pacientes con dengue. Hasta donde conocemos, no se habían evaluado las concentraciones en la circulación de FasL y Survivin en pacientes con dengue y también este trabajo constituye el primero que estudia proteínas circulantes de apoptosis usando la reciente clasificación de dengue de la OMS. Una protección contra la apoptosis podría ser ejercida por el Survivin en leucocitos sanguíneos. Por otro lado, es la primera vez que se utiliza la microscopía electrónica para estudiar tejidos de un caso fatal por dengue y no se observaron células apoptóticas sino una célula fagocítica en el bazo con una vacuola conteniendo posiblemente un cuerpo apoptótico con partículas virales. El análisis integrado de estos resultados sugiere que la apoptosis juega un papel en la compleja fisiopatología del dengue.

Referencias bibliográficas

Limonta D, et al. Infection, Dec;40(6):689-94, **2012**.

Limonta D, et al. Infection, Jun;41(3):743-4, **2013**.

Limonta D, et al. J Med Virol **2013** (en imprenta).