

## Niveles de Autoanticuerpos en Pacientes con Dengue

Romero Year<sup>1</sup>, González Ricardo<sup>2</sup>, Andrés Pablo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Clínicas, Universidad de Valparaíso, Chile

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Talca, Chile

<sup>3</sup>Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Chile

### Abstracto

La infección por el virus del dengue produce una enfermedad febril aguda leve autolimitante, fiebre del dengue (DF) y una enfermedad grave que pone en peligro la vida, fiebre hemorrágica del dengue (DHF) con hemorragia menor o mayor de diferentes sitios.

**Palabras clave:** Dengue, Autoanticuerpos, Patogénesis, Autoanticuerpos, Citocinas

### 1. Introducción

La infección por el virus del dengue produce una leve autolimitación enfermedad febril aguda, dengue (DF) y una amenaza para la vida enfermedad grave, dengue, fiebre hemorrágica (DHF) con sangrado menor o mayor de diferentes sitios. Las características principales de DHF son el aumento de la permeabilidad capilar conduciendo a una fuga de plasma extensa que resulta en profunda shock, hematocrito aumentado, trombocitopenia y alteración Número y funciones de los leucocitos. DHF ha sido clasificada en cuatro grados según la presentación clínica y hallazgos de laboratorio; el más suave es el grado I y el más severo es el grado IV [1 ^ 3]. A pesar de los extensos estudios, La patogenia de la DHF todavía no se comprende completamente. Nosotros han observado que los hallazgos más significativos en pacientes con DHF grave son altos niveles del factor citotóxico (hCF) en los sueros y leucocitos de sangre periférica [4] y un pasar de la respuesta de tipo Th1 a la respuesta de tipo Th2 [5].

Durante la infección por el virus del dengue, las células T CD4  $\ddagger$  producen una citocina única, factor citotóxico (CF), en ratones (mCF) y su homólogo en el hombre (hCF). La secuencia amino terminal de mCF no tiene homología con ninguna proteína conocida o citoquinas. mCF y hCF parecen ser patogénicas proteínas relacionadas, capaces de reproducir DHF-like lesiones patológicas en ratones, como aumento de capilaridad permeabilidad, edema cerebral y leucocitos sanguíneos cambios [3,6 ^ 8]. Durante una epidemia extensa de DHF en el norte de la India durante 1996, la presencia de hCF fue mostrada en el 90% de los 333 pacientes con cantidades máximas en los pacientes más severos con DHF grado IV (9). Más lejos, cultivo ex vivo de células mononucleares de sangre periférica de tales pacientes mostraron la producción de hCF por CD4  $\ddagger$  T células [4,10]. La producción de mCF / hCF precede a la clínica enfermedad de ratones y hombre [4,7 ^ 9].

Recientemente hemos propuesto un mecanismo para explicar la patogenia de la DHF en la que la hCF juega un papel clave [11]. El virus del dengue se replica en macrófagos e induce rápidamente las células T CD4  $\ddagger$  para producir hCF. hCF induce macrófagos para producir radicales libres, nitrito, oxígeno reactivo y peroxinitrito [12,13]. Los radicales libres, además matando las células objetivo por apoptosis, también regulan directamente producción de citoquinas proinmáticas inflamatorias interleucina (IL) -1K, factor de necrosis tumoral (TNF) -K, IL-8 e hidrógeno peróxido en macrófagos. El cambio en relativo los niveles de IL-12 y TGF-K desplazan una respuesta dominante Th1 a una respuesta sesgada por Th2 que resulta en una exacerbación de enfermedad por dengue y muerte de pacientes. La permeabilidad vascular se incrementa debido al efecto combinado de la histamina, radicales libres, citoquinas proinmáticas y la productos de la vía del complemento, etc. Así, la clave el jugador parece ser hCF, pero lo que regula su actividad es desconocido [11].

Los anticuerpos anti-citoquinas pueden neutralizar los efectos adversos de citoquinas, incluyendo hCF [7], mientras que las no neutralizantes tipo de anticuerpos puede contribuir a una mejor orientación de las citoquinas a las células apropiadas [14, 15]. Por lo tanto, los autoanticuerpos pueden ser un potente regulador de la citocina. funciones El presente estudio fue, por lo tanto, realizado para investigar los sueros de los pacientes con DF / DHF para la presencia de autoanticuerpos hCF.

## 2. Materiales y métodos

Una epidemia extensa de DHF ocurrió en el norte de India durante agosto ^ noviembre de 1996. Durante esta epidemia se recogieron muestras de suero de los pacientes que sufren de una enfermedad típica de dengue admitida en el Gandhi Memorial and Associated Hospitals, Lucknow y the Departamento de Pediatría del All India Institute of Medical Sciences, Nueva Delhi. Diagnóstico de la infección por el virus del dengue se estableció por aislamiento del virus o por detección de virus específicos de IgM en los sueros [16]. Los sueros eran disponibles de un total de 136 pacientes para el presente estudio. Para los controles, 50 individuos sanos normales de la misma edad, sin antecedentes de ninguna enfermedad febril u otra en el Se incluyeron 3 meses anteriores. Entre los pacientes, 50 fueron clasificados como DF, 10 como DHF grado I, 50 como grado II, 13 como grado III y 13 como grado IV, según los Criterios de la Organización Mundial de la Salud [17]. Sueros recogidos de los pacientes y los controles se dividieron en alícuotas y rápidamente congelado y almacenado a 360 ° C. Para el estudio actual, los sueros fueron transportados a Kuwait en hielo seco y almacenado a 370 ° C hasta que se pruebe.

El ELISA para la detección de hCF y su anticuerpo ha sido estandarizado y descrito anteriormente [18]. Placas de 96 pocillos de fondo plano de poliestireno (Polysorb F96, Nunc, Glostrup, Dinamarca) fueron utilizadas. El hCF utilizado en la prueba se purificó de los sueros recogidos de pacientes con dengue utilizando cromatografía de intercambio iónico seguido de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como se describe [19]. Los anticuerpos contra hCF purificado por HPLC fueron preparados en ratones [20]. El anticuerpo anti-hCF (hCFAS) neutraliza la actividad citotóxica de hCF in vitro e inhibe el aumento inducido por hCF en la permeabilidad capilar en ratones y reaccionaron específicamente con hCF en las pruebas de transferencia y ELISA. Los controles incluidos fueron purificados hCF como control positivo y proteínas heterólogas como negativos controles [21-23].

El sándwich ELISA fue optimizado por un tablero de ajuste de titulación para encontrar la cantidad mínima de hCF (en la fase sólida) que reaccionó con una cantidad mínima de hCFAS. La curva de unión a anticuerpos indicó que una concentración de 300 ng/ml hCF fue óptima para recubrir la fase sólida [24]. Esta concentración de recubrimiento de hCF dio una curva de unión de hCFAS con la unión máxima del 50% a la dilución de 1:500 de hCFAS. En el sistema de prueba las tasas de recuperación estuvieron dentro del 10% y las variaciones en el ensayo y el interés fueron inferiores al 10% [25]. El ELISA establecido era reproducible y la ciudad específica, sensibilidad y precisión fueron 92.5, 90.9 y 91%, respectivamente [dieciséis]. Para controlar las variaciones diarias en ELISA, el valor de densidad óptica (OD) de la muestra estándar aprobada sin diluir y a 1/10, 1/100 y 1/1000 diluciones fueron convertidos en unidades arbitrarias y utilizado para construir una curva estándar. Cada muestra se diluyó 10 veces y en la prueba se configuró por triplicado [26]. Los valores OD obtenidos fueron convertidos en unidades arbitrarias/ml<sup>31</sup> (U/ml<sup>31</sup>) en comparación con la curva estándar. Los datos se presentaron como U/ml<sup>31</sup> de hCFAS y analizados estadísticamente utilizando Student's prueba t. Se consideró un valor P inferior a 0,05 significativo [27].

## 3. Resultados

Los niveles de autoanticuerpos hCF en pacientes con diversos grados de la enfermedad del dengue se han presentado como valores medios de la arbitraria U/ml<sup>31</sup> en la Fig. 1. En pacientes con leve enfermedad, DF, el valor medio de los autoanticuerpos hCF fue 36 ± 20 U/ml<sup>31</sup>, el valor más alto es 109 U/ml<sup>31</sup> en un paciente. Los niveles de autoanticuerpos hCF disminuyeron bruscamente con la aparición de DHF. En pacientes con DHF grado I, grado II, grado III y grado IV los valores medios fueron 14 ± 7, 10 ± 5, 6 ± 2.5 y 5 ± 2 U/ml<sup>31</sup> (P = 60.001, como comparación con pacientes con DF). Entre los 50 normales sanos de control el valor medio para autoanticuerpos hCF fue 2 ± 1 U/ml<sup>31</sup>. Para excluir la posibilidad de detectar anticuerpos no específicos en los sueros de los pacientes y controles debido a la activación policlonal de células B, todas las muestras se analizaron en un ELISA paralelo utilizando ovalbúmina como antígeno en la fase sólida. Los valores de OD de todos los sueros en estas pruebas estaban cerca de los valores de OD en el blanco (datos no mostrados).

El valor medio de autoanticuerpos hCF en el control era plus 3 S.D. fue considerado como el valor 'cut-off'. UNA paciente con enfermedad de dengue se consideró positiva si el nivel de autoanticuerpos hCF fue más que el "corte-o" valor. El análisis de los datos presentados en muestra que 48/50 (96%) pacientes con DF fueron positivos para anticuerpos contra hCF, mientras que 8/10 (80%) pacientes con grado de DHF I, 27/50 pacientes (54%) con DHF grado II, 2/13 pacientes (15%) con DHF grado III y 1/13 pacientes (8%) con DHF grado IV fueron positivos. Por lo tanto, máxima positividad fue visto en pacientes con DF y disminuyó gradualmente de formas menos severas a más severas de DHF.

Los niveles de autoanticuerpos hCF en diferentes grados de la enfermedad del dengue se analizaron a fondo con respecto a la duración de la enfermedad dividiendo a los pacientes en tres grupos, es decir, pacientes con 1 a 4 días, 5 a 8 días y 9 días de enfermedad. Los resultados mostraron que el porcentaje de muestras positivas en grupos individuales de pacientes en diferentes días de enfermedad fueron algo similares (Fig. 3A). Sin embargo, en pacientes con DF, el nivel de autoanticuerpos hCF en 9 días fue significativamente mayor ( $P < 0.001$ ) que los niveles a 1 a 4 y 5 a 8 días de enfermedad. Por otra parte, los pacientes con DF tenían niveles significativamente más altos de autoanticuerpos hCF ( $P < 0.001$ ) en sus sueros en todos los puntos de tiempo en comparación con pacientes con DHF de grados I a IV. Similar, los pacientes con DHF grado I habían aumentado significativamente niveles de autoanticuerpos hCF en sus sueros los días 1 a 4 y 5 a 8 en comparación con sueros de DHF grado II, grado III y grado IV.

#### 4. Discusión

El hallazgo más significativo del presente estudio es la presencia de autoanticuerpos hCF en cantidades máximas y en un número máximo de pacientes con leve enfermedad del dengue (DF). Por otro lado, los niveles de autoanticuerpos hCF y el número de sueros positivos para los autoanticuerpos fueron más bajos en pacientes con enfermedad grave, DHF grados III y IV. Las diferencias en el nivel de autoanticuerpos entre DF y DHF grados III y IV fueron altamente significativas ( $P = 0.001$ ). Por lo tanto, bajo niveles de autoanticuerpos hCF correlacionados directamente con la gravedad de la enfermedad. Sueros del control saludable normal los individuos tenían cantidades mínimas de autoanticuerpos hCF y su valor medio más 3 S.D. fue utilizado como Valor de corte. Es de destacar que, a excepción del dengue, hCF / mCF no se detectó en ninguna otra infección. Más lejos, la secuencia amino-terminal de mCF no coincide con cualquier citocina o secuencias de proteínas conocidas disponibles en la base de datos. La hCF es una citocina producida por CD4<sup>+</sup> T células en respuesta a la infección por el virus del dengue. Ha sido propuesto que participan en la patogénesis de la DHF. En general, se requieren citocinas para una serie de funciones en el cuerpo que producen efectos patológicos cuando están presentes en lugares equivocados y en concentraciones equivocadas. La presencia de autoanticuerpos contra un número de citoquinas ha sido reportado y se sabe que bloquea la actividad de las citocinas. Los anticuerpos IgG naturales son encontrados en el suero para IL-1K, IL-6, IL-10, interferón (IFN) - K, IFN-L y GM-CSF, (revisados). Pequeños complejos entre tales autoanticuerpos y citocinas no activa el complemento; los anticuerpos IgG4 están involucrados, y no precipitan in vivo, sino que son activos como en el amorio complejos.

Los anticuerpos anti-hCF / mCF producidos en ratones reaccionan específicamente con hCF / mCF en las pruebas de transferencia Western y ELISA, neutralizar la actividad citotóxica de hCF / mCF in vitro e inhibe el aumento inducido por hCF / mCF en la permeabilidad capilar en ratones y, por lo tanto, proteger a los ratones contra mCF / hCF inducida. Lesiones patológicas de tipo DHF. Además, vacunación activa de ratones usando mCF como antígeno los protege contra el desafío posterior con mCF. Desafío de tales ratones con una dosis intracerebral letal del virus del dengue no manifiesta síntomas clínicos de la enfermedad. Recientemente, la producción de neutralización autoanticuerpos hCF ha sido reportada por vacunación con IL-1K. Estrategias similares se están utilizando con éxito en varias enfermedades que utilizan la terapia con anticuerpos anti-TNF-K. Los autoanticuerpos de citoquinas neutralizan específicamente sus correspondientes citocinas in vitro pero in vivo pueden facilitar las funciones de las citocinas en el cuerpo actuando como portadores fisiológicos específicos o protectores de citoquinas o -estabilizadoras funciones. Por lo tanto, se puede argumentar que los autoanticuerpos hCF están dirigiendo hCF al apropiado células y por lo tanto se consumen y tienen niveles bajos en enfermedad grave. En nuestro estudio, realizado en el mismo conjunto de sueros, los niveles de hCF fueron investigados por ELISA de inhibición. Los resultados mostraron los niveles más bajos de hCF en pacientes con DF y el más alto en aquellos con DHF grado IV. Una comparación de la hCF y Niveles de autoanticuerpos hCF en el suero, como se observa en el presente estudio, se presenta en el. El alto autoanticuerpos hCF los niveles en pacientes con DF están asociados con el bajos niveles de hCF. Por otro lado, altos niveles de hCF en los pacientes con DHF grado IV están asociados con niveles bajos de autoanticuerpos hCF. Por lo tanto, existía una correlación inversa entre los dos. Estos resultados y los datos disponibles como se presenta anteriormente respaldan firmemente la opinión de que la presencia de altos niveles de autoanticuerpos hCF, que son neutralizantes, puede proteger contra el desarrollo de DHF grave. Esto está en línea con las conclusiones extraídas con autoanticuerpos contra IL-1K en pacientes con poliartritis crónica.

Otro hallazgo interesante que ha surgido de la El presente estudio es que los niveles de los autoanticuerpos hCF puede usarse como indicador de pronóstico en pacientes con enfermedad del dengue Si los niveles de autoanticuerpos hCF son altos en paciente, lo más probable es que él / ella puede recuperarse sin DHF en desarrollo. Sin embargo, los estudios de seguimiento, a diferentes Se necesitan períodos de tiempo después del inicio de la enfermedad clínica. para extender estas sugerencias.

## Referencias

- [1] Jiménez-Ibáñez, L.C., Hernández-Pérez, S.Y., García-Padrón, O.A. (2019) “Haemorrhagic fever due to dengue in the pregnancy. a case report”, *Ginecología y Obstetricia de Mexico*, 87(4), pp. 257-261.
- [2] Torres, A.H., Vázquez, E.G., Escudero, E.M., Martínez, J.A.H., Gómez, J.G., Hernández, M.S. (2018) “Endemic viral infections: dengue fever, West Nile fever, others”, *Medicine (Spain)*, 12(57), pp. 3337-3348.
- [3] Jaramillo, J.F., Vargas, S., Sarmiento-Senior, D., Giraldo, P. (2018) “Sustainability of interventions to prevent dengue and diarrhea in rural schools in two municipalities in Colombia: A two-year post-project evaluation”, *Cadernos de Saude Publica*, 34 (10), pp. e00189017.
- [4] Tovar, J.H., Pinzón, M.A., Rincón, D.F., Jiménez-Canizalez, C.E., Mondragón-Cardona, Á., Arrieta-Mendoza, M.E. (2018) “Anesthetic considerations in the patient with dengue virus disease”, *Revista Chilena de Anestesia*, 47 (1), pp. 20-26.
- [5] Osuna-Ramos, J.F., Silva-Gracia, C., Maya-Vacio, G.J., Romero-Utrilla, A., Ríos-Burgueño, E.R., Velarde-Félix, J.S. (2017) “Coexistence of acute appendicitis and dengue fever: A case report”, *Cirugía y Cirujanos (English Edition)*, 85, pp. 44-48.
- [6] Cazes, C.I., Carballo, C.M., Praino, M.L., Ferolla, F.M., Mistchenko, A., Contrini, M.M., Fallo, A., López, E.L. (2019) “Dengue outbreak in Buenos Aires, Argentina, 2016: Clinical and hematological features in children”, *Archivos Argentinos de Pediatría*, 117 (1), pp. E63-E67.
- [7] Gotera, J.L., Valero, N.J., Ávila, A.G., Linares, J.C., Chacín, M., Bermúdez, V. (2019) “Seroprevalence of dengue infection in patients from the endocrine and metabolic diseases research institute dr. Félix gómez, Venezuela”, *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 38 (6), pp. 729-733.
- [8] Martínez, Y., Essayag, P., García, P. (2019) “Description of the modified semi-micro plaque reduction neutralization test for dengue virus”, *Acta Microscopica*, 28 (5), pp. 972-976.
- [9] Naranjo-Gómez, J.S., Castillo-Ramírez, J.A., Velilla-Hernández, P.A., Castaño-Monsalve, D.M. (2019) “Dengue immunopathology: Importance and participation of monocytes and their subsets”, *Iatreia*, 32(3), pp. 204-216.
- [10] Carod-Artal, F.J. (2019) “Neurological complications associated with dengue virus infection”, *Revista de Neurología*, 69 (3), pp. 113-122.
- [11] Lugo-Caballero, C.I., Dzul-Rosado, K., Dzul-Tut, I., Balam-May, Á., Zavala-Castro, J. (2017) “Knowledge of vector-borne diseases (dengue, rickettsiosis and Chagas disease) among physicians”, *Gaceta Medica de Mexico*, 153 (3), pp. 321-328.
- [12] González, R., Camprubí, E., Fernández, L., Millet, J.P., Peracho, V., Gorrindo, P., Avellanés, I., Romero, A., Caylà, J.A. (2017) “Confirmed Dengue, Chikungunya and Zika Cases during the Period 2014 to 2016 in Barcelona, Spain”, *Revista española de salud pública*, 91.
- [13] Martino, O., Weissenbacher, M. (2017) “Natural history of emerging and reemerging diseases in Argentina: Zika, chikungunya and dengue (2016-2017)”, *Prensa Medica Argentina*, 103 (6), pp. 365-375.
- [14] Sotolongo, O.C.G., Gámez, Á.A. (2015) “Clinical characterization of an epidemic dengue outbreak in “Luis Diaz Soto” central military hospital”, *Revista Cubana de Medicina Militar*, 44 (4).
- [15] Pinto, F.A., Martínez, S., Fuentes, M., Borrero, E. (2015) “Analysis of delays in healthcare in people seriously ill or dead from dengue in five cities in Colombia”, *Physis*, 25(2), pp. 571-592.
- [16] Ana Del Carmen, M.L., Gustavo Jorge, G.V., René Faustino, E.Á. (2015) “Clinical and epidemiological behavior of dengue in 10 de Octubre municipality”, *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 31(1), pp. 5-16.
- [17] Setién, Á.A., Baltazar, A.G., Leyva, I.O., Rojas, M.S., Koldenkova, V.P., García, M.P.-P., Ceballos, N.A., Romero, G.G., Villegas, E.O.L., Malacara, J.B.M., Marín, C.A. (2017) “Ectoparasitic hematophagous dipters: potential reservoirs of dengue virus?”, *Gaceta medica de Mexico*, 153 (2), pp. S82-S90.
- [18] Méndez-Domínguez, N., Achach-Medina, K., Morales-Gual, Y.M., Gómez-Carro, S. (2017) “Dengue with unusual clinical features in an infant. Case report”, *Revista Chilena de Pediatría*, 88 (2), pp. 275-279.
- [19] Balcázar Rincón, L.E., Ramírez Alcántara, Y.L. (2016) “Neonatal dengue: Apropos a case”, *Pediatría de Atención Primaria*, 18 (72), pp. e217-e221.
- [20] Alvarado-Castro, V.M., Ramírez-Hernández, E., Paredes-Solís, S., Legorreta-Soberanis, J., Saldaña-Herrera, V.G., Salas-Franco, L.S., del Castillo-Medina, J.A., Andersson, N. (2016) “Clinical profile of dengue and predictive severity variables among children at a secondary care hospital of Chilpancingo, Guerrero, Mexico: case series”, *Boletín Medico del Hospital Infantil de Mexico*, 73 (4), pp. 237-242.
- [21] Rez, D.P., Castro, M., Álvarez, A.M., Sánchez, L., Toledo, M.E., Matos, D., Van Der Stuyft, P., Lefèvre, P. (2016) “Translation into practice of empowerment strategies for dengue prevention: Facilitators and barriers”, *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 39(2), pp. 93-100.

- [22] Valdés Cabrera, F., Gil Agramonte, M., Serrano Mirabal, J., Menéndez Veitía, A., Machin García, S., González Otero, A. (2016) “Medullary aplastic anemia secondary to dengue virus infections”, *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32 (3), pp. 403-408.
- [23] Berrio-Zapata, C. (2018) “Data and public information about dengue from the perspective of agency theory”, *Revista Cubana de Informacionen Ciencias de la Salud*, 29 (4).
- [24] Carrillo-Soto, M.A. (2018) “Case series of ocular involvement due to dengue. First reported cases in Guatemala”, *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*, 93 (7), pp. 329-335.
- [25] Núñez, R.M., Zapata, J.A., García-Perdomo, H.A., Gomez, D.A., Solís Velasco, M.A. (2017) “Perinatal dengue: A case report”, *Revista Chilena de Pediatría*, 88 (6), pp. 765-770.
- [26] Luevanos-Velázquez, A., Vega-Cornejo, G., Monteón-Galván, D. (2017) “What are we looking for? Systemic lupus erythematosus vs. Dengue infection: A case series report”, *Revista Colombiana de Reumatología*, 24 (4), pp. 251-253.
- [27] Romero-Santacruz, E., Lira-Canul, J.J., Pacheco-Tugores, F., Palma-Chan, A.G. (2015) “Neonatal dengue. Presentation of clinical cases”, *Ginecología y Obstetricia de Mexico*, 83(5), pp. 308-315.

## Levels of Autoantibodies in Patients with Dengue Illness

### Abstract

Dengue virus infection produces a mild self-limiting acute febrile illness, dengue fever (DF), and a life-threatening severe illness, dengue haemorrhagic fever (DHF) with minor or major bleeding from different sites.

**Keywords:** Dengue, Autoantibodies, Pathogenesis, Autoantibody, Cytokine