

ARTICULO ORIGINAL

Niveles séricos de factor de necrosis tumoral- α e interferón- γ en pacientes con dengue febril

Serum levels of tumor necrosis factor- α and interferon - γ in patients with dengue

***Picaguá E, Rovira C, Giménez V, Guillén I, Carpinelli MM, Ferreira L**

Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción (UNA). Paraguay

RESUMEN

Los monocitos/macrófagos constituyen las células diana para el virus dengue, activando linfocitos T, liberando citoquinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa e Interferón gamma. El objetivo del estudio fue determinar TNF- α e IFN- γ en suero de pacientes dengue IgM positivo e IgM negativo, que concurren al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, de febrero a abril 2007. Se realizó un estudio analítico en 163 sueros de pacientes con dengue, 143 IgM positivo y 20 IgM negativo, de ambos sexos con edad promedio de 30 y rango entre 18 a 70 años. El anticuerpo IgM para dengue y las citoquinas fueron determinados por ELISA de captura. En los 143 sueros dengue IgM positivo, el IFN- γ se detectó en 73% (104/143) con valores entre 558 y superiores a 2000 pg/ml y en el 27% (39/143) valores por debajo del punto de corte. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa comparado con sueros dengue IgM negativo ($p = < 0.005$). El TNF- α se detectó en 24% (35/143) sueros IgM positivo, de los cuales 33 presentaron valores entre 45 a 176 pg/ml y 2 con valores superiores a 2000 pg/ml. No hubo significancia estadística comparando con sueros dengue IgM negativo ($p = 0.26$). Niveles elevados de IFN- γ y TNF- α podrían ser considerados marcadores de pronóstico para la progresión al dengue hemorrágico. Se debería tener en cuenta la potencial significancia terapéutica de estas citoquinas que podrían ayudar en las estrategias de inhibir o inducir perfiles de citoquinas adecuadas en respuesta al dengue.

Palabras claves: dengue, TNF- α , IFN- γ .

ABSTRACT

Monocytes/macrophages are target cells for dengue virus, taking part in the activation of T lymphocytes, releasing proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ). The objective of this study was to determine TNF- α and IFN- γ in sera of dengue patients with IgM positive and negative who attended the Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud from February to April 2007. An analytical study was performed in 163 sera of dengue patients, 143 IgM positive and 20 IgM negative, men and women with an mean age of 30 years and a range from 18 to 70 years. The IgM antibody for dengue and the serum levels of cytokines were performed by capture ELISA. Serum levels of IFN- γ were detected in 73% (104/143) of the patients with dengue IgM positive, with values between 558 and higher than 2000 pg/ml, and in 27% (39/143) were below the cut-off value. A statistically significant difference was found when they were compared with dengue IgM negative sera ($p < 0.005$). TNF- α serum levels were detected in 24% (35/143) of the dengue IgM positive patients, 33 patients presented values between 45 and 176 pg/ml and 2 had values above 2000 pg/ml. No statistical significance was found when these values were

*Autor Correspondiente: **Dra. Estela Picaguá**. Dpto. de Inmunología

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Río de la Plata y Lagerenza. Asunción-Paraguay

Email: ihumoral@iics.una.py. Fecha de recepción: Setiembre de 2010, Fecha de aceptación: Noviembre de 2010.

compared with those of dengue IgM negative sera ($p=0.26$). $IFN-\gamma$ and $TNF-\alpha$ high levels could be considered prognostic markers for progression to hemorrhagic dengue. The potential therapeutic significance of these cytokines should be considered as they could help in the strategies to inhibit or induce appropriate cytokine profiles in response to dengue virus.

Keywords: dengue, $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad aguda infecciosa producida por arbovirus y transmitida por el mosquito *Aedes aegypti* (1-3). El virus pertenece a la familia Flaviviridae. Se han identificado cuatro serotipos de virus dengue (DEN1, DEN 2, DEN 3, DEN 4). El Dengue es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. No se dispone actualmente de vacuna eficaz contra el dengue y además no hay drogas antivirales para tratar la infección (1-3).

El virus dengue presenta un marcado tropismo por los órganos del sistema reticuloendotelial como son médula ósea, bazo, hígado y nódulos linfáticos, en los que puede realizarse la detección intracelular de antígeno viral por varios métodos inmunológicos (1,2). El dengue es una enfermedad aguda infecciosa que por lo general adopta dos formas, el dengue febril (DF) o clásico con manifestaciones clínicas benignas y el dengue hemorrágico (DHF) que produce un cuadro más severo y se encuentra asociado a un riesgo muy alto de mortalidad (1,2).

El DF está caracterizado por una variedad de manifestaciones clínicas, tales como fiebre elevada, dolor de cabeza, dolor retroocular, malestar general, mialgias, artralgias y a menudo exantema (1,5).

Los monocitos/macrófagos pueden actuar como células presentadoras de antígenos y secretar monoquinas, que participan en la activación de las células T produciendo en plasma, elevados niveles de factores proinflamatorios durante la infección aguda del dengue (6-9). La infección por el virus del dengue induce a monocitos infectados, linfocitos B y mastocitos a la producción de varias citoquinas (10). Un aspecto de la patogénesis del dengue es la marcada activación de las células T y la inducción de reactividad cruzada a células TCD4+ y células TCD8+, que reconocen a los antígenos virales del virus del dengue en monocitos infectados (11). El resultado de este proceso puede traer consecuencias patofisiológicas en los pacientes, debido a la liberación de citoquinas con propiedades vasoactivas y procoagulantes como Interleuquinas, factor de necrosis tumoral ($TNF-\alpha$), factor activante de plaquetas y uroquinas; la activación del complemento y la liberación de Interferón - gamma ($IFN-\gamma$), produciendo alteración de la permeabilidad vascular (8,9,12-14).

Se ha demostrado que después de una infección por dengue se producen linfocitos T de memoria serotipo-específico y serotipo-cruzado y se presume que durante una infección secundaria se produce una activación de células T en su interacción con los monocitos infectados (5, 15, 16). Observaciones recientes indican una activación masiva de las células T en el curso del dengue hemorrágico, fenómeno que pudiera explicar total o parcialmente el mecanismo de permeabilidad vascular y extravasación del plasma, debido a la liberación de citoquinas y mediadores químicos por lisis de las células infectadas (17,18).

Varios autores han planteado que la transición de una respuesta Th1 a Th2 caracteriza la forma severa de la enfermedad. A su vez, los niveles elevados de $TNF-\alpha$ (inducido por los monocitos infectados y la activación de las células T o ambos) pudieran ser responsables en parte del daño vascular transitorio (19, 20). El papel de $TNF-\alpha$ en la patogénesis de la enfermedad es crítico y probablemente inicia una serie de procesos que llevan al incremento de la permeabilidad vascular y la hemorragia (20-27). La producción de $IFN-\gamma$ por los linfocitos T después de la estimulación por el virus dengue puede

contribuir a la patogénesis de DHF porque aumenta los receptores Fc γ en los monocitos y esto aumenta el número de monocitos infectados por el virus en presencia de anticuerpos anti-dengue durante la infección secundaria activando los macrófagos para liberar los componentes vasoactivos (8).

El 2 al 4% de los individuos con infección secundaria con un serotipo diferente de dengue, pueden progresar de una enfermedad aguda febril a una forma más severa de la enfermedad como el DHF, que se caracteriza por aumento de la permeabilidad vascular, manifestaciones hemorrágicas (1-3). Muchos autores discuten la significancia del componente inmunopatológico que lleva a la severidad de la enfermedad y la forma en que las células T, citoquinas y la reacción cruzada de anticuerpos, se combinan para contribuir a la progresión a dengue hemorrágico (5,6).

En Paraguay se registraron dos grandes epidemias de fiebre de dengue, atribuida al serotipo DEN-1, en los años 1988-1989 (40.000 casos) y 1999-2000 (25.000 casos). A partir del año 2001 hasta el 2005, se registraron anualmente pequeños brotes epidémicos, que no sobrepasaron 150 casos por año. No obstante, durante el mismo período, circularon varios serotipos (Den-1, 2, 3), en algunos años en forma concomitante, lo cual ubicaba al país con alto riesgo para la ocurrencia de dengue hemorrágico. En marzo de 2006 se inició un brote importante con más de 1994 casos en forma sostenida hasta el 2007, siendo el serotipo circulando DEN-3, originándose una nueva epidemia. En el 2007 se registraron más de 28.000 casos de dengue clásico y 54 de dengue hemorrágico; fallecieron 17 personas (6 por dengue hemorrágico, 7 por dengue clásico con compromiso visceral severo y 4 sin determinación) (28,29).

El objetivo de este estudio preliminar fue determinar el nivel de las citoquinas proinflamatorias, TNF- α e IFN- γ , en suero de pacientes con anticuerpo IgM positivo para dengue y compararlo con sueros de pacientes IgM negativo, que concurren al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, desde febrero a abril durante la epidemia de dengue del 2007, considerando que niveles séricos elevados de estas citoquinas están relacionados con las formas severas de la enfermedad, como la hemorrágica.

MATERIALES Y METODOS

Población estudiada: Se realizó un estudio analítico para comparar los niveles séricos de TNF- α e IFN- γ en sueros de pacientes con anticuerpos IgM positivo para dengue e IgM negativo, debidamente codificados pertenecientes a una seroteca del Departamento de Inmunología-IICS, conservados a -80°C. El total de individuos estudiados fue de 163, de los cuales 143 fueron pacientes con dengue IgM positivo y 20 controles dengue IgM negativo, de ambos sexos, con una edad promedio de 30 años comprendida entre 18 a 70 años, que habían concurrido al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, dependiente de la Universidad Nacional de Asunción, durante la epidemia de dengue entre febrero y abril de 2007 en Paraguay. Los pacientes con IgM positivo fueron 143 y 20 con IgM negativo.

Determinación del anticuerpo IgM para el virus dengue: Se realizó por el método ELISA de captura (Focus, USA) en sueros de pacientes con pedido médico (que presentaban dos o más síntomas característicos de la enfermedad como: fiebre, cefalea, dolor retroocular, dolor articular u otros).

Detección de citoquinas: Los niveles séricos de TNF- α e IFN- γ fueron detectados por ELISA de captura (PeproTech, México) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron diluciones del estándar a diferentes concentraciones (0-2000 pg/ml). Se graficó la curva con la densidad óptica (DO) correspondiente a la concentración de cada dilución del estándar. El valor de cada una de las muestras fue definido como la media de dos determinaciones. Las DO fueron leídas en un lector de ELISA (Awareness technology, USA) a 405 nm.

Punto de corte: La media de los valores del nivel sérico de las citoquinas de los individuos IgM negativo para dengue, más 1 desviación estándar fue utilizada como punto de corte.

Análisis de datos: Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado, tomando como significativo valor de $p < 0.05$.

Consideraciones éticas: El presente estudio fue aprobado para su realización por los Comités Científico y de Ética en Investigación del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, dependiente de la Universidad Nacional de Asunción. Se guardó la confidencialidad de los datos personales y resultados en todo momento.

RESULTADOS

Los síntomas y signos más comunes observados en nuestros pacientes infectados fueron fiebre (100%), dolor de cabeza (90%), mialgias/artralgias (79.5%), 58% náuseas/vómitos y dolor retroocular.

La media de los valores séricos de las citoquinas de los individuos IgM negativo para dengue más una desviación estándar fue utilizada como punto de corte.

Para establecer el punto de corte para IFN- γ , la media fue de 399, y 157 la desviación estándar. El valor del punto de corte fue de 556 pg/ml. Se detectaron niveles séricos de IFN- γ superiores al punto de corte en 73% (104/143) pacientes IgM positivo para dengue, con un rango de valores entre 558 a más de 2000 pg/ml y en el 27% (39/143) restante, los valores encontrados estuvieron por debajo del valor del punto de corte (tabla 1).

Comparando los niveles de IFN- γ de los pacientes IgM positivos e IgM negativos para dengue, se encontró una diferencia estadísticamente significativa utilizando la prueba de Chi cuadrado ($p = < 0.005$).

Para establecer el punto de corte para TNF- α , la media fue de 33 y 11 la desviación estándar. El valor del punto de corte fue de 44 pg/ml. Se detectaron niveles séricos de TNF- α , superiores al punto de corte en 24% (35/143) pacientes IgM positivo para dengue, de los cuales 33 pacientes presentaron valores entre 45 a 176 pg/ml y 2 con valores superiores a 2000 pg/ml. En el 76% (108/143) de los pacientes restantes, los valores encontrados estuvieron por debajo del valor del punto de corte (tabla 2).

Comparando los niveles de TNF- α de los pacientes IgM positivos e IgM-negativos para dengue, no hubo significancia estadística, utilizando la prueba de Chi cuadrado ($p = 0.26$).

La media y la desviación estándar de los niveles séricos de las citoquinas en pacientes con dengue IgM (+) se presentan en la tabla 3.

Tabla 1. Niveles séricos de IFN- γ en pacientes IgM positivos con relación al punto corte (n: 143)

Valores de IFN- γ	Punto de corte: IFN- γ : 556 pg/ml	
	n	%
Superior al punto de corte	104	73
Inferior al punto de corte	39	27

Tabla 2. Niveles séricos de TNF- α en pacientes IgM positivos con relación al punto corte (n: 143)

Valores de TNF- α	Punto de corte: TNF- α : 44 pg/ml	
	n	%
Superior al punto de corte	35	24
Inferior al punto de corte	108	76

Tabla 3. Nivel sérico de IFN- γ y TNF- α en pacientes con dengue IgM (+)

Citoquinas (pg/ml)	$\bar{X} \pm DE$
IFN- γ	915 \pm 301
TNF- α	53 \pm 10.6

\bar{X} : Media, DE: desviación estándar

DISCUSIÓN

En nuestros pacientes IgM positivos para dengue, los síntomas y signos clínicos más comunes observados fueron fiebre, dolor de cabeza, mialgias/artralgias, náusea /vómito y dolor retroocular como lo observado en otros estudios (30).

Al evaluar los valores de IFN- γ , se detectaron niveles séricos superiores al punto de corte en 73% de los pacientes IgM positivo para dengue. Estos valores fueron semejantes a estudios realizados en la India en el 2003 durante un brote epidémico (26) y en Recife-Brasil en donde el 33% de 54 pacientes dengue IgM positivos, presentaron valores superiores al de su punto de corte (25).

Con respecto a los niveles séricos de TNF- α , el 24% de los pacientes IgM positivos para dengue de nuestro estudio presentaron niveles superiores al punto de corte, valores similares a lo reportado por Braga et al 2001(25), donde se encontró valores de TNF- α superiores al punto de corte en 25% de los pacientes dengue IgM positivos estudiados.

Lyngkaran N, Yadav M, 1995 (31), reportan que durante el seguimiento de un niño con dengue, demostraron que un aumento de la severidad de la infección fue seguida por una elevación de valores séricos de TNF- α . En Río de Janeiro-Brasil fue observado un caso fatal con niveles séricos de TNF- α de 900 pg/ml (32). En nuestro estudio se observaron valores de TNF- α superiores a 2000 pg/ml en dos pacientes mayores de edad, pero al momento de la realización del presente estudio no fueron localizados para verificar si tenían o habían desarrollado un cuadro de DHF.

Nuestro estudio ha proveído un panorama de las respuestas de citoquinas en casos de dengue en la población estudiada. Niveles elevados de IFN- γ y TNF- α podrían ser considerados marcadores de pronóstico para la progresión al dengue hemorrágico, pues según varios investigadores (25,30) estas citoquinas aparentan jugar un rol en la patogénesis de la enfermedad.

Se debería tener en cuenta la potencial significancia terapéutica de estas citoquinas que podrían ayudar en las estrategias de inhibir o inducir perfiles de citoquinas adecuadas en respuesta al virus dengue.

Agradecimientos: A Dra. Graciela Velázquez, Dra. Soledad Campos, Dra. María Eugenia Acosta, Dra. Alejandra Rojas por el apoyo brindado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramirez-Ronda CH, Garcia C. Dengue in the western hemisphere. *Infect Dis Clin North Am* 1994; 8:107-28.
2. Halstead S. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239: 476-81.
3. Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2395-400.
4. Organización Panamericana de la Salud. Dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington: OPS, 1995.
5. Guzman MG, Kouri G. Dengue and Dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 2003; 27: 1-13.
6. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol* 1998; 161: 6338-46.
7. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune of plasma leakage and disease severity. *J Infect dis* 1998; 179: 755-62.
8. Kurane I, Innis BL, Nisalak A, Hoke C, Meager A, Ennis FA. Human T cell response to dengue virus antigens. Proliferation responses and interferon gamma producción. *Clin invest* 1989; 83(2): 506-13.
9. Kurane I, Meager A, Ennis FA. Induction of interferon alpha and gamma from lymphocytes by dengue virus-infected cells. *Journal of General Virology* 1986, 67:1653-1661.
10. Hober D, Shen L, Benyoucel S, De Groote D, Deubel V, Waltré P. Enhanced TNF α production by monocytic-like cells exposed to dengue virus antigens. *Immunol Letters* 1996; 53: 115-20.
11. Kurane I, Brinton MA, Samson AL, Ennis FA. Dengue virus specific human CD4+ CD8cytotoxic Tcell clones: Multiple patterns of virus cross reactivity recognized by NS3-specific T-cells clones. *J Virol* 1991;65:1823-8.
12. Zivny J, Kurane I, Leporati AM, Ibe M, Takiouchi M, Zeno LL, et al. A single nine-amino acid peptide induces virus-specific, CD8+ human cytotoxic T lymphocyte clones of heterogenous serotype specificities. *J Exp Med* 1995; 182 (3):853-63.
13. Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones. *J Virol* 1999;73: 3623-9.
14. Rothman A. Patogénesis of dengue virus infection. In "Up to date in infectious diseases"BD. Wellesley, MA: Rose Ed. UpToday. 1999.
15. Kurane I, Ennis FA. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Seminars in Immunology* 1992;4:121-7.
16. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Rothman AL, Livingston PG et al. Human immune responses to dengue viruses. *The Southeast Asian. J trop Med Public health.* 1990;21(4):658-2.
17. Navarro-Sánchez E, Després P, Cedillo-Barrón L. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res* 2005 36:425-35.
18. Cardier JE, Mariño E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. Proinflammatory factor present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: Posible role of TNF- α in endothelial cells damage in dengue. *Cytokine* 2005, 30: 359-65.
19. Hober D, Nguyen TL, Shen L, Ha DQ, Huong VTQ, Benyoucef S, et al. Tumor Necrosis factor alpha levels in plasma and whole-blood culture in dengue-infected patients. Relation between virus detection and pre-existing specific antibodies. *Journal of Medical Virology* 1998;54:210-8.
20. Lei HY, Veh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* 2001;8: 377-88.
21. Chaturvedi UC. Tumor necrosis factor & dengue. *Indian J Med Res* 2006; 1: 11-4.
22. Fink J, GU F, Vasudevan SG. Role of T cells, cytokine and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol* 2006; 4: 263-75.
23. Lei HY, Huang KJ, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Infect Dis* 2008; 4(1):1-9.
24. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos de Chacon I, Ramos C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with patogénesis. *J Virol* 1999; 73(6): 4738-47.
25. Braga ELA, Moura P, Pinto LMO, Ignácio SRN, Oliveira MJC, Cordeiro MT, et al. Detecção od circulant tumor necrosis factor- α , soluble tumor necrosis factor p75 anf interferon- γ in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Ins Oswaldo Cruz*, 2001; 96(2): 229-32.

26. Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumor necrosis factor- α & interferon γ in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res* 2006; 123: 25-30.
27. González M, González D, Cepero J. Dengue Hemorrágico. Estudio Clínica de 200 pacientes. *Rev Cubana Med* 1999; 38(1): 13-8.
28. Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Dengue. *Boletín Epidemiológico semanal*. 2007; 5(6): 1-2.
29. Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Dengue. *Boletín Epidemiológico semanal*. 2007; 5(20): 2.
30. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, et al. Clinical findings and Pro-Inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *Plos ONE* 2010; 5(1):e8709.
31. Lyngkaran N, Yadav M, Sinniah M. Augmented inflammatory cytokines in primary dengue infection progressing to shock. *Singapore Med J* 1995; 36:218-21.
32. Kubelka CF, Borges PA, vonSydow FOF, Lampe E. Analysis of tumor necrosis factor- α serum level in Brazilian patients with dengue-2. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995;90:741-2.