

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
UNIVERSIDAD MÉDICA DE NEW JERSEY

Nuevas evidencias de la relación antigénica entre los virus de la neuropatía epidémica y el sistema nervioso humano. Estudio de la respuesta inmune celular en pacientes con neuropatía epidémica y controles. Revisión del tema

Dra. Beatriz Sierra Vázquez,¹ Dr. Pedro Más Lago,¹ Dra. Ana Beatriz Pérez,¹ Lic. Luis Sarmiento Pérez,¹ Lic. Marité Bello Corredor,¹ Dra. Ivonne Ávalos Redón,¹ Dra. Sonia Resik Aguirre,¹ Dr. Thomas Denny,² Lic. Gissel García¹ y Dra. María Guadalupe Guzmán Tirado¹

RESUMEN

En el Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" se desarrolló una serie de experimentos con el fin de obtener nuevas evidencias sobre las posibles relaciones antigénicas de los virus aislados de pacientes con neuropatía epidémica, con estructuras del sistema nervioso humano. De los resultados se puede inferir finalmente, que la persistencia y/o la autoinmunidad pueden ser considerados como mecanismos por los cuales los virus estudiados participan en la etiopatogenia de la neuropatía epidémica en Cuba, siendo de gran importancia en futuros experimentos identificar los posibles epitopes virales involucrados en el mimetismo molecular y responsables de los posibles mecanismos autoinmunes o de persistencia viral.

Descriptores DeCS: NEURITIS/etiología; NEURITIS/líquido cefalorraquídeo; SISTEMA NERVIOSO/inmunología; CUBA.

El mimetismo molecular entre antígenos del sistema nervioso humano y una variedad de proteínas de diferentes virus ha sido estudiado ampliamente, y se ha sugerido su posible implicación en la inmunopatogenia de enfermedades desmielinizantes. Con el reciente desarrollo de la biología molecular se han definido segmentos genómicos en algunos virus que son responsables de desmielinización, ya sea por mecanismos dependientes de la infección viral, o por una mediación del sistema inmune.¹

La homología entre proteínas propias y proteínas virales pudiera llevar, a través del fenómeno de reactividad cruzada, a 2 eventos en los que participa el sistema inmune: la ruptura de la tolerancia a antígenos propios y el desencadenamiento de autoinmunidad, hecho que se ha sugerido como mecanismo patogénico de varias enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso

humano como la esclerosis múltiple,² el síndrome de Guillain-Barré,³ y la tolerancia al antígeno extraño, que en caso de involucrar epitopes importantes en la protección frente a la infección, pudiera conllevar a una persistencia del agente como resultado de una respuesta inmune ineficiente que explicaría la aparición de una enfermedad crónica o cíclica de episodios recurrentes en la cual el virus sería un agente crucial de la desmielinización.⁴

En el curso de la neuropatía epidémica ocurrida en Cuba en 1992 y 1993 se aislaron del líquido cefalorraquídeo de pacientes agentes virales que mostraron 2 tipos de efecto citopatogénico (ECP): uno típico de *Enterovirus* (cepa 47-93 IPK CoxA9) y otro mucho más ligero (cepa 44-93 IPK, cepa M28-IG, ambas de ECP-L).^{5,6} Teniendo en cuenta que el cuadro clínico de los pacientes está dado por síntomas que expresan daños del sistema nervioso central y/o periférico, y todas las

¹ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

² Universidad Médica de New Jersey. New Jersey, EE.UU.

consideraciones anteriores acerca de la homología estructural entre antígenos del virus y del sistema nervioso humano (SNH), en el Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) se desarrolló una serie de experimentos con el fin de obtener nuevas evidencias sobre las posibles relaciones antigénicas de los virus aislados con estructuras del SNH, lo cual llevaría a considerar la reactividad cruzada de células B (sistema inmune humoral) y/o T (sistema inmune celular) entre antígenos de ambos orígenes como un mecanismo involucrado en la patogenia de la entidad que nos ocupa, así como también experimentos que permitieran obtener datos acerca de la participación activa del sistema inmune en la inmunopatogénesis de dicha enfermedad.

EXPERIMENTOS REALIZADOS

SISTEMA INMUNE HUMORAL

Prueba inmunohistoquímica en biopsias de nervio sural. Se seleccionaron cortes de biopsias de nervio sural de pacientes con neuropatía epidémica y se aplicó la técnica AuBio (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología) usando oro coloidal con suero hiperinmune de conejo contra la cepa 44-93 IPK ECP-L y contra el ECHO virus tipo 1. Se obtuvo una reacción positiva con el suero hiperinmune de conejo contra la cepa 44-93 IPK ECP-L. El suero hiperinmune de conejo contra el ECHO virus tipo 1 no reaccionó con las muestras de tejido.⁷

Dot ELISA. Se utilizaron antígenos del sistema nervioso central humano (corteza, globos pálidos, cerebelo y bulbo) y antígenos de las cepas 47-93 IPK CoxA9 y 44-93 IPK ECP-L los cuales fueron igualados en concentración de proteínas. En un primer experimento se utilizó un suero de conejo hiperinmune anticerebro y se obtuvo el esperado reconocimiento de los antígenos de cerebro contra los cuales iba dirigido pero además reconocimiento cruzado de los antígenos virales. En una segunda experiencia se utilizaron los mismos antígenos y el reconocimiento se realizó con sueros hiperinmunes de conejo contra antígenos de las cepas 47-93 IPK CoxA9 y 44-93 IPK ECP-L. Los resultados mostraron reconocimiento cruzado de los antígenos de cerebro por los 2 sueros antivirales (Más Lago P. Comunicación personal).

Doble inmunodifusión en agarosa. En esta prueba se emplearon como antígenos en una primera experiencia, muestras de 8 nervios olfatorios de personas fallecidas

por accidentes y sin antecedentes de neuropatía, según lo referido en el interrogatorio realizado a los familiares, en las cuales se practicó biopsia médico-legal. Dichos antígenos se enfrentaron a un suero hiperinmune de conejo contra la cepa M28-IG ECP-L, y se produjeron bandas de precipitación en todos los casos. El empleo de este mismo suero con antígenos de 3 cerebros humanos obtenidos de personas fallecidas en las condiciones ya referidas y antígeno de cerebros de ratón, conejo y curiel produjo banda de precipitación sólo en el caso de los cerebros humanos. En una tercera experiencia usando como antígeno uno de los cerebros humanos referidos y sueros hiperinmunes contra células vero, cepa M28-IG ECP-L, *Poliovirus*, Coxsackie B3 y Echovirus 6, se obtuvo banda de inmunoprecipitación sólo en el caso de la cepa M28-IG ECP-L.⁷

Western Blot. Se utilizaron antígenos de cerebro humano y de las cepas 47-93 IPK CoxA9 y 44-93 IPK ECP-L igualados en cuanto a concentración de proteínas, y un suero hiperinmune anticerebro humano. El suero empleado muestra señales con los antígenos preparados con cerebro humano como era de esperar, pero muestra también señal de reconocimiento con los antígenos virales. Se observa en estos casos de forma específica una banda a los 18 kD también presente en el antígeno de cerebro (Más Lago P. Comunicación personal).

Neutralización. Los resultados por prueba de neutralización del suero hiperinmune a cerebro humano y los sueros obtenidos a cepas del virus aislados durante la epidemia (cepa 47-93 IPK CoxA9, cepa 44-93 IPK, cepa M28-IG, ambas de ECP-L) frente a distintos *Enterovirus* (3 *Poliovirus*, 6 Coxsackie B, Coxsackie A9, 12 Echovirus, cepa 47-93 IPK CoxA9, cepa 44-93 IPK, cepa M28-IG y cepa M2-IG ECP-L). Se observó una correlación que va desde 0,81; 0,79 y 0,67 al comparar los anticuerpos neutralizantes a los virus probados en el suero anticerebro y los de las cepas 44-93 IPK, M28-IG ECP-L y 47-93 CA9 respectivamente hasta 0,86 con los sueros de las cepas 44-93 IPK y M28-IG, ambas de ECP-L. Todas estas correlaciones poseen una significación superior a $p < 0,01$.⁷ En un segundo experimento de neutralización se compararon los porcentajes de sueros con anticuerpos y los títulos promedios geométricos (TPG) de anticuerpos neutralizantes presentes en pacientes y controles a las cepas M28-IG y 47-93 CA9. Con respecto a esta última cepa los porcentajes y los TPG fueron superiores para los pacientes (92,8 % y 35,0 TPG) con respecto a los controles (77,3 % y 14,1 TPG), no siendo así para la cepa de ECP-L, en cuyo caso ambos son inferiores en los

pacientes (50,0 % y 8,9 TPG) con respecto a los controles (75,0 % y 24,3 TPG).⁸

SISTEMA INMUNE CELULAR

Estudio de la respuesta linfoproliferativa en conejos. Para estudiar esta respuesta se inmunizó un conejo blanco de Nueva Zelanda con macerado de antígeno de sistema nervioso central (SNC) humano. Un mes después de la última dosis se sangró el animal, se aislaron las células mononucleares periféricas y se estimularon con antígenos del SNC y con antígenos de las cepas 47-93 IPK CoxA9 y 44-93 IPK ECP-L. Se constató respuesta proliferativa de las células T a los antígenos del SNC humano de forma específica, comparado con los resultados obtenidos con los linfocitos de un conejo control inmunizado con antígeno de células Vero, así como reconocimiento y respuesta linfoproliferativa cruzada a los antígenos de las cepas virales (Pérez AB. Comunicación personal).

Estudio de la respuesta inmune celular en pacientes de neuropatía epidémica. Este estudio fue realizado en colaboración con la División de Alergia, Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad Médica de New Jersey, EE.UU. En este estudio se emplearon pacientes con diagnóstico de neuropatía epidémica (neuropatía óptica o polineuropatía) mayores de 15 años y menores de 70 de ambos sexos (tabla).

TABLA. Características de los individuos incluidos en el estudio de la respuesta inmune celular en pacientes con neuropatía epidémica

Tamaño	Edad	Sexo	
Pacientes: 19	27 a 70 años	F: 9	M: 10
Controles: 30	31 a 68 años	F: 13	M: 17
Cuadro clínico de los pacientes			
Diagnóstico inicial	Síntomas vigentes	Aislamiento viral	
Neuropatía óptica: 12	Neuropatía óptica:-	ECP-L: 15	
Polineuropatía: 7	Polineuropatía: 10	CoxA9: 3	

Para desarrollar el ensayo de linfoproliferación se aislaron las células mononucleares a partir de sangre venosa periférica de pacientes y controles y se estimularon con varias concentraciones de mitógenos (PHA y PWM) y antígenos (*Candida albicans*, toxoide tetánico, toxoide diftérico, estreptoquinasa y antígenos de las cepas 44-93 IPK ECP-L y 47-93 CA9). En el sobrenadante de cultivo de las células estimuladas con PHA se cuantificaron varias citoquinas (IL-2, IL-10, TNF alfa e

IFN gamma) y marcadores solubles (CD4, CD8, CD23 y beta 2 mi-croglobulina). Para las células estimuladas con el resto de los mitógenos y antígenos se determinó la capacidad linfoproliferativa en respuesta a éstos.

Al estudiar la respuesta inmune de los pacientes frente a los agentes virales aislados, se constató un menor nivel de respuesta celular en pacientes con neuropatía periférica con respecto a controles sanos (Denny T. Comunicación personal). Este menor grado de reconocimiento inmune del virus en los pacientes fue selectivo para esos antígenos, al haberse comprobado una respuesta proliferativa de células T normal frente a mitógenos y antígenos convencionales. De los marcadores solubles estudiados se observó diferencia en los niveles de IL-2, los cuales fueron 4 veces más altos en sobrenadantes de cultivo de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA en pacientes con respecto a controles sanos.

DISCUSIÓN

Existen numerosos reportes acerca de la homología entre proteínas de los *Enterovirus* y estructuras del sistema nervioso humano.^{9,10} De forma aún más específica se ha reportado homología entre diferentes proteínas estructurales y no estructurales de los virus Coxsackie y antígenos del sistema nervioso humano.

Ha sido reportado similitud antigénica entre la proteína básica de la mielina y la proteína estructural VpG de algunos virus Coxsackie y la región codificante para la proteína no estructural P3A del genoma de los virus Coxsackie B3 y B4,¹¹ así como entre la proteína no estructural P2-C de los virus Coxsackie B4 y la glutamato descarboxilasa humana.¹²

Los resultados obtenidos en nuestro Instituto por diferentes métodos sugieren una vez más que existe mimetismo epitópico entre los agentes virales aislados de pacientes con neuropatía epidémica, fundamentalmente los de ECP-L, y estructuras del SNC y periférico humano.

Algunos de estos resultados no sólo nos muestran que existe homología sino que ofrecen datos que nos permiten una preidentificación de dichos antígenos, como ocurre con los resultados del ensayo de Western Blot, el cual nos muestra que anticuerpos presentes en este suero anticerebro son capaces de reconocer de forma cruzada una proteína de bajo peso molecular presente en los antígenos virales, la cual pudiera corresponder a una proteína no estructural, y corroboraría lo reportado en la literatura.

Los resultados obtenidos de los ensayos de respuesta linfoproliferativa en conejos sugieren

cruzamiento entre antígenos virales y del SN humano también a nivel de epitopes T, lo cual coincide con lo reportado por la literatura para proteínas no estructurales.¹³

La función de la reactividad cruzada de células B y T entre antígenos del virus y del sistema nervioso humano en la patogenia de esta enfermedad no se conoce. Sin embargo, los niveles de IL-2, 4 veces más altos en sobrenadantes de cultivo de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA de pacientes con respecto a controles sanos sugiere una activación y proliferación de las células T en estos pacientes, y por tanto un papel activo de estas células en la enfermedad. Sería de gran interés comprobar en experimentos futuros la existencia de autoanticuerpos o de células T autorreactivas en los sitios de desmielinización, así como también en la sangre periférica de los pacientes, estudio que sería de gran importancia para corroborar la autoinmunidad como mecanismo etiopatogénico.

Al estudiar la respuesta inmune de los pacientes frente a los antígenos virales se constató un menor nivel de respuesta tanto humoral, por títulos de anticuerpos neutralizantes, como celular, por respuesta linfoproliferativa al virus de la cepa 44-93 IPK ECP. Estos resultados pudieran estar en relación con los resultados de Beck y otros (Comunicación personal), y de Más y otros (Comunicación personal), de los cuales se puede inferir que pueden existir modificaciones en las proteínas estructurales de la cepa 44-93 IPK que repercutan en la estructura del virión dando lugar a una aparente falta de proteínas estructurales, por lo menos en su forma nativa. Estas modificaciones pueden conllevar a un cambio de los principales sitios antígenos y de esta forma burlar el sistema inmune y establecer persistencia. También el mimetismo epitópico puede explicar que los virus escapen del sistema inmune y causen infección persistente. En este caso la activación inmune de las células T en periferia pudiera ser el resultado de la liberación de antígenos producto de la destrucción de las vainas de mielina, y presentación a células T por células fagocíticas presentadoras de antígenos, con la subsiguiente estimulación de éstas. Todo lo anterior, unido a los resultados descritos por diferentes autores que evidencian que la patogenia de muchas enfermedades crónicas puede estar dada por la capacidad de los *Enterovirus* de causar persistencia,¹⁴ la cual ha sido demostrada recientemente en estudios prospectivos de los ARN encontrados en los sueros de pacientes con el síndrome de fatiga crónica,¹⁵ lleva a considerar la persistencia viral como otro posible mecanismo etiopatogénico de la enfermedad.

De los resultados se puede inferir finalmente que la persistencia y/o la autoinmunidad pueden ser consideradas como mecanismos por los cuales los virus

estudiados participan en la etiopatogenia de la neuropatía epidémica en Cuba, sería de gran importancia identificar en futuros experimentos los posibles epitopes virales involucrados en el mimetismo molecular y responsables de los posibles mecanismos autoinmunes o de persistencia viral.

SUMMARY

A series of experiments was made at the Virology Department of the "Pedro Kouri" Institute of Tropical Medicine aimed at obtaining new evidences on the possible antigenic relations existing between the viruses isolated from patients with epidemic neuropathy and the structures of the human nervous system. According to the results it may be finally inferred that the persistence and/or autoimmunity may be considered as mechanisms through which the studied viruses participate in the etiopathogeny of the epidemic neuropathy in Cuba. For future experiments it is very important to identify the possible viral epitopes involved in the molecular mimicry that are responsible for the probable autoimmune mechanisms or for the viral persistence.

Subject headings: NEURITIS/etiology; NEURITIS/cerebrospinal fluid; NERVOUS SYSTEM/immunology; CUBA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ohara Y. The pathomechanism of virus-induced demyelination. *Nippon Rinsho* 1994;552:2906-11.
- Rostami AM. Pathogenesis of immune-mediated neuropathies. *Pediatr Res* 1993;33(1 suppl):590-4.
- Willson HJ, Kennedy PGE. Gangliosides and bacterial toxin in Guillain Barré syndrome. *J Neuroimmunol* 1993;46:105-12.
- Nash T. Immunity to viruses. En: Roitt I, Brostoff J, Male D, eds. *Immunology*. 4 ed. Mosby, Times Mirror International Publishers Limited. 1996;1-6,16.
- Más Lago P, Rodríguez MP, Guzmán MG, Álvarez M, Muzio A, Ancheta O, et al. Resultados preliminares de laboratorio virológico en estudios de casos de neuropatía epidémica cubana. *Bol Epidemiol IPK* 1993;1(Esp):7-8.
- Más Lago P, Guzmán MG, Muné M, Resik S, Álvarez M. Neuropatía epidémica cubana: Parte I: aislamiento viral. *Rev Cubana Med Trop* 1995;47(1):11-15.
- Más Lago P, Guzmán MG, Capó V, Álvarez M, Resik S, Goyenechea A, et al. Neuropatía epidémica cubana. Parte IV: Relación antigénica de los aislamientos virales con estructuras del sistema nervioso central. ¿Posible mecanismo etiopatogénico? *Rev Cubana Med Trop* 1995;47(1):26-31.
- Más Lago P, Balmaseda A, Ávalos I, Castillo A, Guzmán MG, Llop A, et al. Neuropatía epidémica cubana. Parte III: Anticuerpos neutralizantes a cepas aisladas y otros Enterovirus en pacientes y personas sanas. *Rev Cubana Med Trop* 1995;47(1):21-5.
- Jahnke U, Fisher EH, Alvarod EC. Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science* 1985;229:282-4.
- Gianani R, Sarvetnick N. Viruses, cytokines, antigens and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2257-9.
- Souberbielle BE, Kemp G, Russell WC. Viral homologies with myelin basic protein. *Immunol Today* 1991;12:264-5.

12. Kufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxilase in insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992;89:283-9.
13. Rewers M, Atkinson M. The possible role of enteroviruses in diabetes mellitus. En: Rotbart HA, ed. *Human Enterovirus Infections*. Washington: ASM Press, 1995;353-385.
14. Miller DC. Post-Polio syndrome spinal cord pathology case report with immunopathology. En: Dalakas MC, Bartfeld H, Kurland LT, eds. *The post-polio syndrome: Advances in the pathogenesis and treatment*. New York: Acad Sci NY 1995:186-93.
15. Galbraith DN, Narin C, Clements GB. Evidence for an enteroviral persistence in humans. *J Gen Virol* 1997;78:307-12.

Recibido: 5 de mayo de 1998. Aprobado: 17 de julio de 1998.
Dra. *Beatriz Sierra Vázquez*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.