

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Niveles de óxido nítrico en monos *Macacus irus* inoculados con virus dengue

Lic. Gissel García,<sup>1</sup> Dra. Ana B. Pérez,<sup>2</sup> Dra. Beatriz Sierra,<sup>3</sup> Dra. Rosmari Rodríguez,<sup>4</sup> Dra. Delfina Rosario,<sup>5</sup> Dr. Rafael Martínez,<sup>6</sup> Dr. Gerardo Guillén<sup>7</sup> y Dra. María G. Guzmán<sup>8</sup>

### RESUMEN

**OBJETIVO:** partiendo de que los anticuerpos preexistentes en la infección secundaria por dengue suprimen la acción de moléculas con acciones antivirales como el óxido nítrico, se determinó el comportamiento de esa molécula en suero de monos *Macacus irus* inoculados con virus dengue 2 como infección primaria y en monos con una infección secuencial dengue 4-dengue2. **MÉTODOS:** los niveles de óxido nítrico referidos como niveles de nitritos fueron detectados mediante la reacción de Griess. **RESULTADOS:** los niveles máximos de óxido nítrico se detectaron en los animales que sufrieron una infección primaria a partir del séptimo día posinoculación, a diferencia de los monos con infección secundaria en que no se obtuvieron niveles mayores de 100 µM. **CONCLUSIONES:** al parecer existe una asociación entre la infección secundaria y la inhibición de la producción del óxido nítrico.

**Palabras clave:** Monos, dengue, óxido nítrico.

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad causada por los virus del dengue ha emergido como el mayor problema de salud para las áreas tropicales del mundo donde el mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector y el hombre el principal reservorio.<sup>1</sup> Puede evolucionar desde una infección subclínica o producir una amplia gama de formas clínicas que van desde la fiebre indiferenciada, pasando la fiebre del dengue (FD) o dengue clásico, hasta las formas graves como la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) o el síndrome de choque por dengue (SCD).<sup>1</sup>

Los factores específicos del virus y del hospedero que causan la forma severa de la enfermedad no están definidos hasta el momento. Se conoce que el óxido nítrico (ON) es un importante mediador intracelular y extracelular implicado en numerosas funciones biológicas y su papel ha sido demostrado en la patogénesis de varias enfermedades infecciosas, en particular en la severidad de las fiebres hemorrágicas virales.<sup>2</sup> No queda exento de esto la infección por dengue<sup>3,4</sup> donde, paradójicamente, los niveles de ON detectados en el suero de pacientes infectados, han sido correlacionados con la forma menos severa de la enfermedad.

<sup>1</sup> Máster en Ciencias. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada. Instructora. Departamento de Virología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

<sup>2</sup> Especialista de I Grado en Inmunología. Investigadora Auxiliar. Instructora. Departamento de Virología, IPK.

<sup>3</sup> Máster en Ciencias. Especialista de I Grado en Inmunología. Profesora Auxiliar. Investigadora Auxiliar. Departamento de Virología, IPK.

<sup>4</sup> Doctora en Ciencias. Profesora Auxiliar. Investigadora Auxiliar. Departamento de Virología, IPK.

<sup>5</sup> Doctora en Ciencias Médicas. Instructora. Investigadora Auxiliar. Departamento de Virología, IPK.

<sup>6</sup> Doctor en Medicina Veterinaria. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

<sup>7</sup> Doctor en Ciencias Médicas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

<sup>8</sup> Doctora en Ciencias. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular. Profesor Titular. Departamento de Virología, IPK.

En este estudio se determinaron los niveles de ON en suero de monos con infección primaria o secuencial con virus dengue 2.

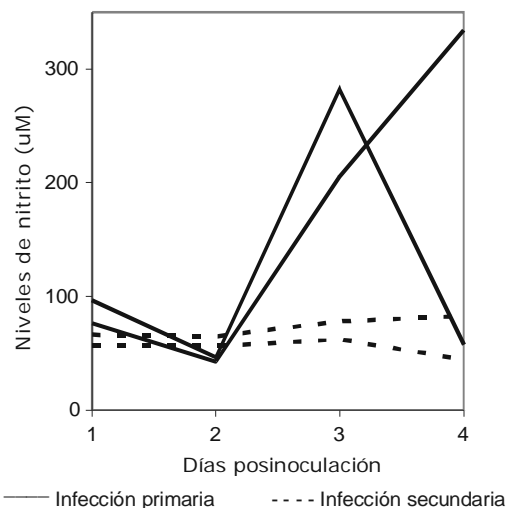
## MÉTODOS

Del sexo masculino, 2 monos (*Macacus irus*, 4-6 kg) se inocularon por vía subcutánea con  $10^5$  ufp de virus dengue 4 cepa H 241 (24 pases en ratón, cepa estándar de referencia). Un año después les fue inoculado a ambos animales el virus dengue 2 cepas A 15 (4 pases en ratón, 2 pases en Vero, aislada en Cuba en 1981) y, siguiendo igual esquema, se inocularon adicionalmente con el virus dengue 2 cepa A15, 2 monos no inmunes a *Flavivirus*. La infección se confirmó por aislamiento viral e inmunofluorescencia indirecta (IFI) en la línea celular C6/36 HT2 PV (aislada en 1977, gentilmente donada por el ya fallecido doctor Robert Shoppe) y por PCR (del inglés *polimerase chain reaction*). Los sueros tomados en días alternos (el día 0 hasta el día 9 posinoculación) se almacenaron a  $-70$  °C hasta su uso. Todos los experimentos fueron diseñados siguiendo las guías cubanas de salud para el uso de animales de laboratorio.<sup>5</sup>

Los niveles de óxido nítrico, reportados como la acumulación de nitritos en las muestras de suero de los monos, se determinaron mediante la reacción colorimétrica de Griess.<sup>6</sup>

## RESULTADOS

Como se aprecia en la figura los niveles de ON fueron similares en los primeros días posinoculación (días 0, 4), tanto en los monos con infección primaria como en uno de los que se estableció la infección secundaria. Un incremento de los niveles de ON se hace notable en aquellos monos con una infección primaria después del cuarto día, con valores máximos en los días 7 y 9. Sin embargo, en aquellos monos con infección secundaria los niveles de ON se mantuvieron en niveles basales similares a los del día 0 de la inoculación viral (muestra obtenida preinoculación).



**Fig.** Cinética de los niveles de ON referidos como niveles de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) en infección primaria y secundaria por virus dengue 2 desarrollada en monos *Macacus irus*.

## DISCUSIÓN

Existen reportes sobre la detección de ON en sueros de pacientes de dengue colectados durante el transcurso de la infección. Sin embargo, la detección de los niveles de ON inmediatamente después de la inoculación viral del dengue podría ofrecer información de interés, que brindaría más elementos sobre su posible papel en esta enfermedad en estadios tempranos. Como los pacientes infectados por el virus dengue arriban al hospital después que tiene lugar el inicio de los síntomas fue propósito en este trabajo estudiar ese marcador en monos inoculados, los cuales no mostraron ninguna señal de la enfermedad pero desarrollaron viremia que puede tomarse como un modelo animal con cierta similitud a aplicarse en dengue y así buscar aproximaciones al humano.

El ON tiene complejas y diversas funciones bajo condiciones patológicas y fisiológicas. Recientemente se ha demostrado que este mediador es capaz de suprimir el ARN del virus dengue así como la acumulación de proteínas en células infectadas al inhibir la actividad ARN polimerasa-ARN dependiente.<sup>7</sup> Sin embargo, estudios *in vitro* sugieren que esta molécula podría estar involucrada en el desarrollo de la patogénesis de la FHD.<sup>8</sup>

El aumento hacia el séptimo día posinoculación viral en la infección primaria, no así en la secundaria, sugiere una posible asociación entre

la infección secuencial y la inhibición de la producción de ON.

Evidencias *in vitro* avalan esta hipótesis que relaciona la supresión del radical nítrico y otras citoquinas proinflamatorias con el fenómeno que, hipotéticamente, explica el desarrollo de la FHD, la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA).<sup>9</sup> Se plantea que la alta producción de partículas virales en la infección mediada por la ADA, comparada con la infección por el virus *per se* podría deberse a la supresión, durante esta infección mediada por anticuerpos, de determinadas moléculas antivirales como los radicales de ON. Se ha señalado además que ocurre un bloqueo del factor de transcripción genético de la enzima inducible óxido nítrico sintasa (iONS), el IRF-1.<sup>9</sup>

Dado que no existe un modelo animal idóneo para dengue, hoy día se plantea que deberían integrarse datos obtenidos a partir de cultivos primarios de células humanas, mosquitos, monos, ratones y estudios clínicos que integrados permitan el entendimiento de la enfermedad.<sup>10</sup> Es interesante para el caso del ON los resultados aquí obtenidos coinciden con los reportados para humanos infectados con dengue que desarrollaron sus 2 formas clínicas.<sup>3</sup> Valero y otros detectaron elevados niveles de ON en pacientes que desarrollaron la forma clásica del dengue FD y niveles bajos, en aquellos que mostraron un cuadro de fiebre hemorrágica. La molécula de ON, por las coincidencias experimentales encontradas en primates y humanos, debería ser uno de los marcadores a tener en cuenta en el desarrollo de los modelos computadorizados que integren el análisis de los modelos de la enfermedad.

Por causa de las coincidencias encontradas entre primates y humanos así como la posible implicación en el desarrollo de FHD que tendría la inhibición de la expresión de la molécula de ON, sería muy interesante ampliar los estudios relacionados con este marcador asociado al desarrollo de los modelos animales, que permitan esclarecer la inmunopatogenia de la enfermedad y facilitar el camino para el desarrollo de vacunas.

### Serum nitric oxide in *Macacus irus* monkeys inoculated with dengue virus

#### ABSTRACT

OBJECTIVE: To determine the action of nitric Oxide (NO) in serum samples of dengue 2 inoculated *Macacus irus* monkeys as primary

infection and in dengue 4 -dengue 2 inoculated monkeys as secondary infection, taking into account that preexisting antibodies in secondary dengue infection elicit the action of antiviral molecules such as nitric oxide. METHODS: NO levels referred as nitrite levels were detected by Griess colorimetric reaction. RESULTS: The highest nitric oxide levels were detected in those animals with primary infection seven days after inoculation monkeys whereas those monkeys with secondary infection did not show NO levels over 100 µM. CONCLUSIONS: Our results suggest that there seems to be a relationship between secondary infection and NO production inhibition.

**Key words:** Monkeys, dengue, nitric oxide.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kourí GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. Bull World Health Organ. 1989;67:375-80.
2. Sánchez A, Lukwiya M, Bausch D, Mahanty S, Sánchez AJ, Wagoner KD, et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. J Virol. 2004;78:10370-7.
3. Valero N, Espina, L, Añez G, Torres E, Mosquera J. Increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(6):762-4.
4. Trairatvorakul P, Chongsrisawat V, Ngamvasinont D, Asawarachun D, Nantasook J, Poovorawan Y. Serum nitric oxide in children with dengue infection. Asian Pac J Allergy Immunol. 2005;23:115-9.
5. Balaguer Cabrera JR, Ministro de Salud Pública. Gaceta Oficial de la República de Cuba Edición Ordinaria, La Habana, 14 de diciembre de 2004, Año CII. Número 69. p. 1152. La Habana:Ministerio de Salud Pública. Resolución Ministerial No. 132/2004; 2004.
6. Yee LJ, Knapp S, Burgner D, Hennig BJ, Frodsham AJ, Wright M, et al. Inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) haplotypes and the outcome of hepatitis C virus infection. Genes Immun. 2004;5:183-7.
7. Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. J Gen Virol. 2006;87:3003-11.
8. Lin YS, Lin CF, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, et al. Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. Curr Pharm Des. 2004;10(2):213-21.
9. Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. J Gen Virol. 2007; 88:365-75.
10. Rico-Hesse R. Dengue virus evolution and virulence models. Clin Infect Dis. 2007;144(11):1462-6.

Recibido: 13 de septiembre de 2007. Aprobado: 15 de noviembre de 2007.

Dra. *Gissel García*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Departamento de Virología, Centro Colaborador OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su Vector. Autopista Novia del Mediodía, Km. 6 ½, Marianao 13, Ciudad Habana, Cuba. Teléfono: 53-7-2020450. Correo electrónico: gmd@ipk.sld.cu