

Expresión de genes de IFN γ y TNF α en tejidos de fallecidos por dengue

Expression of IFN γ and TNF α genes in tissues from dengue fatal cases

Dra. Ana B. Pérez Díaz,^I MSc. Olga L. Pérez Guevara,^{II} Dra. Beatriz de la C. Sierra Vázquez,^I Téc. Eglis Aguirre Pérez,^I Dra. Gissel García Menéndez,^I Dra. Mayling Álvarez Vera,^I Dr. Daniel Gonzalez Rubio,^I Dr. Daniel Limonta Velázquez,^I Dra. Delfina Rosario Domínguez,^I MSc. Alienys Izquierdo Oliva,^I Dra. María G. Guzmán Tirado,^I

^I Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba.

^{II} Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el dengue es considerada la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en el humano a nivel global, con un estimado de 100 millones de infecciones anuales y más de 20 000 muertes. La patogénesis de la enfermedad grave por dengue no está totalmente esclarecida. Sin embargo, existen estudios que la asocian con infecciones secuenciales por diferentes serotipos virales, activación de células T de memoria e hiperproducción de citocinas.

Objetivos: determinar la expresión cualitativa de genes de las citoquinas IFN γ y TNF α en tejidos de bazo e hígado de casos fatales por dengue 3 o dengue 4 mediante la detección de ARNm y comprobar su papel en la patogénesis de la enfermedad.

Métodos: El estudio se realizó a través de un método de retro-transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con el uso de cebadores específicos.

Resultados: la expresión de IFN γ predominó a la de TNF α , y fue más evidente en los tejidos de bazo que del hígado.

Conclusiones: los resultados obtenidos apoyan el papel patogénico del patrón de respuesta Th1 en el dengue grave y constituye el primer estudio realizado de este tipo en la infección por dengue.

Palabras clave: dengue, tejidos, citoquinas.

ABSTRACT

Introduction: dengue is considered to be the most important arthropod-borne human disease worldwide, with an estimated 100 million new cases per year and more than 20 000 deaths. The pathogenesis of severe dengue is not fully understood. However, certain studies have associated it with sequential infections by different viral serotypes, memory T cell activation and cytokine hyperproduction.

Objectives: determine the qualitative expression of genes of cytokines IFN γ and TNF α in spleen and liver tissues from dengue 3 and 4 fatal cases, detecting RNAm and verifying their role in the pathogenesis of the disease.

Methods: the study was conducted by retrotranscription and polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primers.

Results: expression of IFN γ predominated over that of TNF α , and was more evident in spleen than in liver tissues.

Conclusions: results support the pathogenic role of the Th1 response pattern in severe dengue. This is the first study of its type about dengue infection.

Key words: dengue, tissues, cytokines.

INTRODUCCIÓN

La Fiebre Dengue (FD) es una enfermedad humana común que afecta millones de personas cada año en áreas tropicales y subtropicales principalmente en Asia, Centro y Sur América. La Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) es la forma grave de la enfermedad caracterizada por un desequilibrio en la hemostasia y un aumento en la permeabilidad vascular que puede resultar en el Síndrome de Choque por Dengue (SCD).¹ La FHD/SCD se caracteriza clínicamente por la extravasación de plasma que se traduce en efusión pleural, ascitis u otras, hemoconcentración, tendencia al sangramiento e hipoproteïnemia.¹ Como hallazgos histopatológicos predominan el edema perivascular sin destrucción del endotelio y la necrosis del parénquima hepático y esplénico.² El hígado puede estar aumentado de tamaño y puede observarse un incremento de las enzimas hepáticas.³

Los mecanismos por los cuales el virus dengue puede conllevar a la severidad y a la muerte del paciente no están totalmente esclarecidos, sin embargo, la producción sistémica de citoquinas pro-inflamatorias se han implicado en el cuadro grave de la enfermedad. Niveles significativamente elevados de TNF α e IFN γ se han constatado en suero o plasma de pacientes graves, o se expresan en células infectadas con el virus in vitro, asociándose a la patogénesis de la enfermedad.⁴

El estudio de los marcadores de la respuesta inmune de los casos graves y fallecidos para esclarecer los mecanismos involucrados en el agravamiento de la infección por dengue reviste gran importancia, es por eso que el presente trabajo se propone determinar la expresión de los genes de las citoquinas IFN γ y TNF α en tejidos de hígado y bazo de fallecidos por dengue 3 o dengue 4.

MÉTODOS

Muestras

Se emplearon para el estudio 6 muestras frescas de tejidos de bazo y 4 de hígado procedentes de 6 fallecidos con el diagnóstico presuntivo de FHD/SCD durante la epidemia cubana de dengue de 2006,⁵ en los que se confirmó la infección por los virus dengue 3 y dengue 4 como la causa de muerte al detectarse el virus o su genoma a través del aislamiento viral en células C6/36HT⁶ y la Reacción en Cadena de la polimerasa respectivamente.⁷ En todos los casos se identificó el serotipo viral infectante, determinándose en 3 de los fallecidos la infección por el virus dengue 3, mientras que el serotipo 4 se identificó en los 3 casos restantes. En la Tabla 1 se muestran los datos generales de los 6 casos incluidos en el estudio.

Tabla 1. Datos generales de los fallecidos incluidos en el estudio

No.	Edad	Den	Días	Muestra	APP	CC
1	69	D3	5	Bazo	Bronquitis	Fiebre, Plaquetopenia, Ascitis, Hepatomegalia, Shock
				Hígado	Aneurisma de la aorta	
2	30	D3	6	Bazo	HTA, Epilepsia	Fiebre, Trombocitopenia, HipoTA, Ascitis Mialgia, Vómitos, Cefalea, Tos
				Hígado	Encefalopatía congénita	
3	48	D3	6	Bazo	HTA, RM	Miocarditis, Shock
4	37	D4	5	Bazo	no	Fiebre, Dolor abdominal, Diarreas, Hipotensión, Hematemesis, Shock
				Hígado		
5	31	D4	¿?	Bazo	LES, Asma bronquial	Sangramiento gingival, Ascitis, Derrame pleural, Plaquetopenia severa, Shock,
				Hígado		
6	36	D4	6	Bazo	no	Cefalea, Vómitos, Diarreas, Shock

Leyenda

Den: Serotipo viral, Días: Días desde el comienzo de los síntomas, APP: Antecedentes patológicos personales, CC: Cuadro clínico, HTA: Hipertensión arterial, RM: Retraso mental, LES: Lupus eritematoso sistémico, AB: Asma bronquial, ND: No datos disponibles.

Procesamiento de tejidos y extracción de Ácido Ribonucleico (ARN)

Se obtuvieron fragmentos de bazo e hígado de aproximadamente 30 mg (5x5 mm³) que se almacenaron en viales estériles a -80 °C hasta su uso. Se procedió al macerado de las piezas en nitrógeno líquido y el tejido pulverizado se colocó en viales fríos estériles libres de enzimas degradantes del ARN (ARNasa). Tras la evaporación del nitrógeno, se añadieron 600 mL del Tampón de lisis (RLT) (Qiagen

GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt; Alemania) que, en condiciones altamente desnaturalizantes, inactiva ARNasas y libera el ARN intacto.

Para la extracción de ARN se siguió el protocolo del estuche comercial QIAamp RNA Blood Mini kit (Qiagen). Tras el tratamiento con la enzima degradante del ADN (ADNasa), el ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir del ARN mensajero (ARNm) utilizando cebadores poli(dT) y la enzima reverso-transcriptasa Superscript II (Invitrogen Corp., CA; EE.UU.). El ADNc resultante fue conservado a -20 °C hasta su uso.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de la expresión de los genes de citoquinas

Se utilizó un ensayo de PCR cualitativo para determinar la expresión de los genes de IFN γ y TNF α y del gen de la unidad ribosomal 18S, de expresión constitutiva en los tejidos, como control positivo. Se emplearon pares de cebadores específicos para la amplificación de los genes de cada citoquina y del gen 18S provenientes de un estuche comercial para este fin (Maxim Biotech, Inc). Todas las muestras se estudiaron por duplicado en un volumen total de reacción de 50 μ l conteniendo 43 μ l de la mezcla de reacción de la PCR (Qiagen, Valencia, CA); 0,5 μ M de cada cebador y 5 μ l de ADNc. La PCR se realizó de acuerdo a los siguientes parámetros: 1) Desnaturalización: 96 °C 1 minuto; 2) Amplificación: 40 ciclos de a) 95 °C 60 segundos, b) 60 °C 90 segundos, y 3) 72 °C 60 segundos. Los productos de amplificación se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2 % en TBE (Tris base 89 mM- ácido bórico 89 mM-EDTA 2 mM, pH 8,3) y teñidos posteriormente con bromuro de etidio para su visualización en un transiluminador con luz UV. En la figura 1 se muestra una foto de una corrida electroforética con las bandas resultantes de la amplificación de los genes de las citoquinas y el control 18S.

RESULTADOS

El presente estudio permitió detectar la expresión cualitativa de los genes de citoquinas en tejidos de casos fatales de dengue. En la [tabla 2](#) se muestran los resultados de acuerdo al porcentaje de fallecidos en que fue detectada la positividad de esa expresión por órgano evaluado. Se detectó la mayor expresión de IFN γ en los tejidos (entre un 33 y el 100 % de los casos, según el órgano de procedencia), a diferencia de la proporción mucho menor de casos (entre el 25 y el 30 %) que expresaron TNF α , sólo en 3 de los casos estudiados.

Tabla 2. Expresión de IFN γ y TNF α en tejidos de bazo e hígado de fallecidos por FHD

	Dengue 3				Dengue 4				Total	
	Bazo		Hígado		Bazo		Hígado		Bazo	Hígado
	n	%	n	%	n	%	n	%	%	%
IFN γ	3	100	1	50	3	100	0	0	100	25
TNF α	1	33	1	50	1	33	0	0	33	25

Al analizar la expresión de los genes en los tejidos estudiados dependiendo del órgano de procedencia, observamos que la expresión de IFN γ se detectó en el bazo en el 100 % de los casos, sin embargo, en el hígado, se demostró sólo en uno de los casos (33 %). Por su parte, el TNF α sólo se detectó en dos de los fallecidos: en uno de ellos tanto en bazo como en hígado, y en el otro solamente en el bazo.

La comparación de la expresión de las citoquinas en los casos infectados con ambos serotipos virales, dengue 3 o dengue 4, mostró que en el bazo se comportó similar para el IFN γ , que se expresó en la totalidad de los casos para ambos serotipos, mientras en el hígado sólo se expresó en uno de los casos con dengue 3 (33 %). Por otra parte, el TNF α (se detectó sólo en un caso de dengue 4 en el bazo y en el caso de dengue 3, fue en el hígado). En el hígado, las citoquinas pro-inflamatorias sólo se expresaron en una proporción de los fallecidos que padecieron la infección por dengue 3.

DISCUSIÓN

El entendimiento de la patogénesis del dengue grave y la participación de la respuesta inmune en la misma es una prioridad para el desarrollo de candidatos vacunales contra el dengue. Sin embargo, está lejos de obtenerse un verdadero modelo animal que reproduzca la FHD y se han empleado numerosos modelos *in vitro* de interacciones virus-célula con el objetivo de simular la enfermedad, no obstante, la correlación de estos con lo que ocurre *in vivo* es muy especulativa y lleva en ocasiones a interpretaciones erradas.⁸ Los estudios de pacientes comparando formas clínicas leves y graves, aunque han aportado la mayor información, presentan un grupo de debilidades que limitan su relevancia en el entendimiento de la enfermedad en el humano. Se reconoce que revisten especial significación los estudios realizados en tejidos de fallecidos obtenidos por necropsias al ser los más informativos, pero dada la baja tasa de mortalidad de la enfermedad y las limitaciones socio-culturales en relación a las prácticas necróticas en múltiples países endémicos, éstos son escasos. Particularmente, los estudios publicados que exploran la presencia de mediadores de la respuesta inmune como las citoquinas son excepcionales.⁹

Por tanto el objetivo de la investigación fue determinar la expresión de las citoquinas relacionadas con la inmunopatogénesis del dengue en los tejidos de un grupo de casos fatales. Fueron seleccionados tejidos de bazo e hígado por ser órganos afectados durante la infección humana por este virus.¹ Las afectaciones en

estos órganos se han vinculado a la presencia de proteínas o ARN virales en sus tejidos.^{10,11}

En los tejidos estudiados se encontró una expresión predominante de la citoquina IFN γ . El IFN γ es una citoquina producida por las células NK y las células T, la cual predomina en la circulación y en los órganos.¹² Su efecto principal se ejerce sobre la activación de las funciones del macrófago tales como la fagocitosis, la presentación de antígenos y la secreción de citoquinas, actuando además sobre la síntesis de anticuerpos por las células B y la maduración de las células T citotóxicas.¹² Si tenemos en cuenta que en el momento de la muerte de los pacientes de FHD la respuesta inmune adquirida tiene su papel protagónico, pudiéramos inferir que la fuente de estas citoquinas sean principalmente las células T, sugiriendo el predominio de un patrón de respuesta Th1.

La expresión de IFN γ en el 100 % de los casos coincide con los niveles elevados de esta citoquina en sangre reportado por varios autores.^{13,14} Trabajos que miden la concentración de la citoquina en suero de forma cinética en pacientes de FHD describen un máximo de su concentración hacia los días 4-5to del cuadro clínico, con un descenso lento posterior. Los casos estudiados en la presente investigación fallecen entre el 5to y 6to días del inicio del cuadro clínico, constatándose la expresión de esta citoquina en los tejidos, lo cual parece estar en correspondencia con los niveles elevados en estos pacientes durante esa fase de la enfermedad.

Por otra parte, sin embargo, no se detectó la expresión de TNF α en la mayoría de los tejidos estudiados. Debemos considerar la cinética de los niveles de TNF α en suero o plasma durante la fase aguda de la enfermedad. Existen investigaciones que asocian niveles elevados de TNF α a trombocitopenia o a infección secundaria, pero no a severidad.^{15,16} Wang y cols., (2007), por su parte, encontraron niveles significativamente mayores en pacientes de FHD que en FD y controles, pero restringido a los primeros 3 días del cuadro clínico.¹⁷ Luego esta citoquina iba declinando en sangre y no se detectaban diferencias en sus concentraciones entre las distintas formas clínicas.¹⁷

O sea, los mayores niveles de TNF α descritos en los pacientes graves pudieran no coincidir cronológicamente con el momento de la muerte, entre el quinto y sexto días del cuadro clínico para la mayoría de los fallecidos. Si además tenemos en cuenta que bastan 6 a 24 horas del incremento de las concentraciones de TNF α para que se logren causar los cambios histopatológicos y agravamiento clínico en el humano,¹⁸ pudiera ser explicable entonces la infrecuente expresión de ese gen en los tejidos encontrada en este estudio.

Al comparar la expresión de los genes de citoquinas entre los tejidos de bazo e hígado, vemos cómo el ARNm de IFN γ en el bazo se detectó en el 100 % de los casos de dengue, sin embargo, en el hígado, se demostró solo en uno de los fallecidos. Significativamente, en el único caso en que fue detectada la expresión de IFN γ y TNF α en el tejido hepático, se encontró hepatomegalia en la autopsia, pudiendo estar asociada a una infiltración celular y a la respuesta inmune aumentada en el órgano.

El comportamiento tan disímil en la expresión de genes de las citoquinas entre el bazo y el hígado de los mismos pacientes pudiera deberse a diferencias sustanciales en la histología y función de estos órganos,^{19,20} además de posibles diferencias en el tropismo viral.

De Macedo y cols. (2006) estudiaron la presencia de TNF α y la IL-2 por inmunohistoquímica en muestras de tejidos de fallecidos por dengue. Los autores

reportan muy pocas células positivas a estas citoquinas en una observación que abarcó hasta 20 lóbulos del órgano. Las células positivas tenían la apariencia de células de Kupffer.⁹

Teniendo en cuenta que la mayoría de los hepatocitos y células de Kupffer son infectadas por el virus dengue durante la enfermedad, llegando a ser hasta un 70 %, ⁹ debiera esperarse una mayor expresión de citoquinas en este tejido. Sin embargo, la baja expresión de TNF α pudiera deberse a un ambiente predominantemente anti-inflamatorio o a la toxicidad directa sobre las células de Kupffer, que constituyen la principal fuente de citoquinas pro-inflamatorias en este órgano.²¹

En un estudio de la expresión de citoquinas en hígados de fallecidos por fiebre amarilla se encontró la infección de hepatocitos y apoptosis e infiltración de células mononucleares a expensas de células T CD4+ principalmente, detectándose algunas células que expresaban IFN γ , pero la expresión de TNF α fue muy escasa,²² lo cual es un resultado comparable al nuestro.

Considerando que la síntesis de citoquinas responde a una red compleja de interconexiones y que dicha red frecuentemente involucra varias citoquinas, algunas con efectos sinérgicos que se potencian y otras con efectos antagónicos, se hace notar la importancia de los estudios en órganos de fallecidos para dilucidar el papel de estos mediadores. La inclusión de tejidos controles provenientes de casos fallecidos por causas no infecciosas sería de gran utilidad para esclarecer el protagonismo de dichos mediadores aparentemente asociados al desenlace fatal del dengue grave.

Los resultados del presente estudio nos permiten inferir el papel del IFN γ en la patogénesis del dengue. No obstante, la ausencia de la expresión de TNF α en los tejidos no excluye su papel como inductor primario de la patogénesis del cuadro grave. Además, se demuestra la expresión diferencial de estos mediadores en los diferentes órganos de la respuesta inmune.

Este constituye el primer estudio de la expresión molecular de estas citoquinas en los órganos de fallecidos por dengue lo cual aporta al conocimiento de la enfermedad.

Futuros trabajos deberán abordar la cuantificación de estos mediadores empleando métodos específicos y sensibles como el PCR en tiempo real, así como determinar su ubicación celular por métodos inmunohistoquímicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:7-16.
2. Bhamarapravati N, Tuchinda P, Boonyapaknavik V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. *Ann Trop Med Parasitol.* 1967;61:500-10.
3. Nascimento Dd, Castro AR, Froes ÍB, Bigaton G, Oliveira ÉC, Dal Fabbro MF, et al. Clinical and laboratory findings in patients with dengue associated with hepatopathy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44:674-7.

4. Soundravally R, Hoti SL, Patil SA, Cleetus CC, Zachariah B, Kadiravan T, et al. Association between proinflammatory cytokines and lipid peroxidation in patients with severe dengue disease around defervescence. *Int J Infect Dis.* 2014;18:68-72.
5. Libel M. Brote de dengue en Cuba, 2006. *Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas.* Habana: OPS, 2006.
6. Rodríguez-Roche R, Alvarez M, Guzmán MG, Moriel L, Kouri G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3508-10.
7. Rosario D, Alvarez M, Vazquez S, Amin N, Rodriguez-Roche R, Guzman MG. Application of Molecular Methods to the diagnosis and Characterization of a dengue outbreak in Cuba. *Biotecnología Aplicada.* 2001;18:203-6.
8. Bente DA, Rico-Hesse R. Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models.* 2006;3:97-103.
9. de Macedo F, Nicol A, Cooper L, Yearsley M, Pires A, Nuovo G. Histologic, viral, and molecular correlates of dengue fever infection of the liver using highly sensitive immunohistochemistry. *Diagn Mol Pathol.* 2006;15:223-8.
10. Miagostovich MP, dos Santos FB, Fumian TM, Guimaraes FR, da Costa EV, Tavares FN, et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:307-13.
11. Limonta D, Capo V, Torres G, Perez AB, Guzman MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol.* 2007;40:50-4.
12. Young H, Bream J. IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;316:97-117.
13. Libraty DH, Endy TP, Houg HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis.* 2002;185:1213-21.
14. Chen JP, Lu HL, Lai SL, Campanella GS, Sung JM, Lu MY, et al. Dengue virus induces expression of CXC chemokine ligand 10/IFN-gamma-inducible protein 10, which competitively inhibits viral binding to cell surface heparan sulfate. *J Immunol.* 2006;177:3185-92.
15. Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res.* 2006;123:25-30.
16. Bozza FA, Cruz OG, Zagne FM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008;8:86.
17. Wang L, Chen RF, Liu JW, Yu HR, Kuo HC, Yang KD. Implications of dynamic changes among tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), membrane TNF receptor, and soluble TNF receptor levels in regard to the severity of dengue infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:297-302.

18. Talwar S, Munson P, Barb J, Fiuza C, Cintron A, Logun C, et al. Gene expression profiles of peripheral blood leukocytes after endotoxin challenge in humans. *Physiol Genomics*. 2006;25:203-15.
19. Mebius R, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:606-16.
20. Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol*. 2008;1:107-17.
21. Velazquez P, Cameron T, Finjo Y, Nagarajan N, Kronenberg M, Dustin M. The Activation by Innate Cytokines or Microbial Antigens Can Cause Arrest of Natural Killer T Cell Patrolling of Liver Sinusoids. *J Immunol*. 2008;180:2024-8.
22. Juarez AS, Quaresma AB, Vera LRS, Barros C, Pagliari C, Fernandes ER, et al. Revisiting the liver in human yellow fever: Virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-h, TNF-a and NK cells activity. *Virology*. 2006;345:22-30.

Recibido: 10 de julio de 2013.

Aprobado: 5 de febrero de 2014.

Dra. Ana Beatriz Pérez Díaz. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½ La Lisa, C.P: 17100, La Habana, Cuba.
Teléfono: 537-2553559. Correo electrónico: anab@ipk.sld.cu