

Respuesta neuroinmunológica en la encefalitis asociada al virus del dengue

Bárbara Padilla-Docal,^{1*} Daisy Wainshtok-Tomás,² José Pedro Martínez-Larrarte,¹ Edmundo Rivero-Arias,³ Ana Herrera-Wainshtok,⁴ Jesús Callol-Barroso,² Alberto Juan Dorta-Contreras¹

¹ Laboratorio Central de Líquido cefalorraquídeo (LABCEL). Facultad de Ciencias Médicas "Dr Miguel Enríquez", Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Ramón Pinto No 202, Luyanó. La Habana, Cuba.

² Hospital Universitario Clínico Quirúrgico "Dr. Miguel Enríquez". Ramón Pinto No 202, Luyanó. La Habana, Cuba

³ Hospital Universitario Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras". San Lázaro No 701, Centro Habana. La Habana, Cuba.

⁴ Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Manuel Fajardo", Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Nva. de Hospitales y Zapata, Vedado. La Habana, Cuba.

⁵ Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Manuel Fajardo", Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, Nva. de Hospitales y Zapata. Vedado. La Habana, Cuba.

email: barbara.padilla@infomed.sld.cu

El virus del dengue es un virus ARN miembro de la familia *Flaviviridae*, la cual incluye, además, el de la fiebre amarilla, el del Nilo del Oeste y la encefalitis japonesa. Se realizó un estudio retrospectivo con tres pacientes diagnosticados de encefalitis asociada al dengue, en cuyas muestras de suero y líquido cefalorraquídeo se cuantificaron los niveles de las clases mayores de inmunoglobulinas por inmunodifusión radial y la manosa de unión a lectina, proteína de la vía de las lectinas del sistema del complemento por fluorimetría. En el reibergrama se muestra la presencia de síntesis intratecal de las tres clases de inmunoglobulinas y ausencia de síntesis intratecal de lectina de unión a manosa. Existieron diferencias en cuanto al por ciento de síntesis intratecal de inmunoglobulinas, las cuales estuvieron relacionadas con el momento de la infección por el virus y la aparición de las manifestaciones neurológicas compatibles con una encefalitis. Este es el primer reporte de afectaciones neurológicas en pacientes cubanos con dengue. La respuesta inmune intratecal puede ser utilizada para el mejor conocimiento de la enfermedad y contribuir al desarrollo de posibles candidatos vacunales.

Palabras clave: encefalitis, dengue, reibergrama.

Introducción

El virus del dengue (VDEN) es un virus ARN y miembro de la familia *Flaviviridae*, la cual incluye, además, el virus del Nilo del Oeste, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la fiebre amarilla.

La infección del VDEN continua dispersándose globalmente con un estimado de 70 a 100 millones de infecciones humanas; 2,1 millones de casos clínicamente severos y 21 000 muertes por año (1). Además, el dengue ha dejado de ser una enfermedad exclusiva del trópico y cada año se extiende la latitud de su alcance (2). En el continente americano ya se han reportado brotes desde Argentina hasta Estados Unidos (2, 3), y en Madeira, isla portuguesa, se había detectado un brote epidémico a finales del 2012 (4).

Después de la inoculación del virus por *Aedes Aegypti*, mosquito que lo transmite, la infección en humanos puede resultar clínicamente asintomática o causar manifestaciones clínicas que van desde el síndrome febril del dengue clásico, hasta un síndrome de shock por dengue, expresado por aumento de la permeabilidad vascular y hemorragia (5).

La patogenia de la infección del VDEN se mantiene controversial; el efecto de cepas virulentas, la presencia de citoquinas proinflamatorias secundarias a la activación excesiva de células T, con especificidad cruzada a otros serotipos de pobre poder lítico y la activación del complemento, son sugeridos como posibles mecanismos (5).

La infección del dengue tiene la capacidad de causar una enfermedad multisistémica. Se reportan numerosas manifestaciones neurológicas, incluyendo la mielitis transversa, el síndrome de Guillain Barré, la encefalomielitis diseminada aguda y la miositis (6, 7). Sin embargo, la más ampliamente reportada es la encefalopatía.

La encefalitis es una inflamación del parénquima cerebral, comúnmente debido a infección viral. La encefalitis típicamente se presenta con fiebre, disminución del nivel de conciencia, cefalea, convulsiones y signos neurológicos focales.

Existen diagramas (reibergramas) que analizan de manera integrada la función de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR) y la síntesis intratecal de proteínas, para contribuir en el diagnóstico de enfermedades del sistema

* Licenciada en Biología, Máster en Enfermedades Infecciosas y Profesor Auxiliar.

nervioso central (SNC) asociados a patrones específicos de inmunoglobulinas (8).

Consideramos que el conocimiento de la respuesta neuroinmunológica en los pacientes con cuadro clínico compatible con encefalitis asociada al dengue, pudiera contribuir de alguna manera a desarrollar posibles candidatos vacunales contra esta entidad.

El objetivo del presente trabajo fue mostrar la respuesta neuroinmunológica, a través del reibergrama, en tres pacientes cubanos con encefalitis asociada al VDEN.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio retrospectivo en tres pacientes con encefalitis, confirmados con el VDEN, para evaluar la posible síntesis intratecal de las clases mayores de inmunoglobulinas y la lectina unida a manosa (MBL), proteína de la tercera vía de activación del sistema del complemento (vía de las lectinas), así como la disfunción de la barrera sangre-LCR.

Con la finalidad de realizar esta investigación se revisaron las historias clínicas de los pacientes, de las cuales se recogió toda la información que se utilizó en este estudio y se siguieron los protocolos establecidos por cada una de las instituciones en que estos pacientes fueron atendidos.

Los niveles en suero y LCR de IgA, IgG e IgM fueron cuantificados por la técnica de inmunodifusión radial simple, utilizando placas NOR y LC Partigen, respectivamente (Siemens, Marburg, Alemania), en los tres pacientes confirmados, que fueron internados en diferentes hospitales de La Habana. La razón albúmina (QAIB=Albúmina LCR/Albúmina suero) fue usada para evaluar la integridad de la barrera sangre-LCR, utilizando los protocolos descritos (9). Se utilizó en cada caso el reibergrama correspondiente.

La concentración de MBL en suero fue medida utilizando un anticuerpo anti-MBL conjugado con europio y placas de ELISA. Se adicionaron anticuerpos monoclonales anti-MBL en la superficie de las placas.

Las muestras de suero se diluyeron 1:100 en un buffer de elevada concentración de iones calcio con IgG humana normal, agregada por calor (10 mg/mL) y suero bovino al 1%, pH 7,4. Los sueros se adicionaron a los pocillos.

La concentración de MBL en LCR se midió utilizando el mismo procedimiento pero con las muestras sin diluir (10).

La presencia de síntesis intratecal de IgM, IgG, IgA y MBL se demostró usando los reibergramas correspondientes (11-12). Los métodos seguidos en este estudio cumplieron las normas éticas del comité de investigación de las instituciones en que se atendieron a estos pacientes.

Resultados

Las concentraciones individuales en sangre y LCR de las clases mayores de inmunoglobulinas y MBL de los pacientes se observan en la Tabla 1.

En la Figura 1 se observa el reibergrama para la síntesis intratecal de las clases mayores de inmunoglobulinas de los tres pacientes estudiados y en la Figura 2 se muestra el reibergrama para la MBL.

La curva hiperbólica superior (línea gruesa) representa la línea de discriminación entre las proteínas derivadas del cerebro y las proteínas derivadas de la sangre. Los valores por encima de esta línea indican síntesis intratecal. Las líneas discontinuas indican la magnitud de la fracción sintetizada intratecalmente, con 20, 40, 60 y 80% de la concentración total de la proteína medida en el LCR y se calcula a partir de $Q \text{ límite} = 0\%$. Los rangos de referencia para las razones LCR/suero del reibergrama se apoyan en la línea discriminatoria superior (Q límite) dibujada más fuerte en la figura y el borde inferior (Q bajo). El reibergrama usa escala logarítmica que cubren los rangos más frecuentes para las proteínas, siendo para la QAIB desde 1,5 a 150×10^{-3} .

El límite del rango de referencia para la QAIB entre las concentraciones de proteínas normales e incrementadas debido a la disfunción de la barrera sangre/LCR es indicada por líneas verticales y es dependiente de la edad, la QAIB de $5,5 \times 10^{-3}$ (hasta 15 años), Q Alb de $6,5 \times 10^{-3}$ (hasta 40 años), y Q Alb de 8×10^{-3} (hasta 60 años).

Los tres pacientes de nuestro estudio estuvieron ingresados por un cuadro clínico de dengue clásico expresado por fiebre, artralgias, mialgias y cefalea retroocular. Evolutivamente desarrollaron trastornos para la marcha, con disminución de la fuerza muscular en los miembros inferiores.

Tabla 1. Niveles en suero y LCR de albúmina, IgG, IgA, IgM y MBL.

Paciente	Edad	IgA g/L suero	IgG g/L suero	IgM g/L suero	MBL ng/mL suero	Alb g/L suero	IgA mg/L LCR	IgM mg/L LCR	IgG mg/L LCR	MBL ng/mL LCR	Alb mg/L LCR
1	44	1,17	3,8	0,887	1559,03	44	4,42	71,7	15,3	3,08284	211,58
2	55	0,94	5,8	0,79	1385,59	66,9	4,62	30,9	16,94	0,13042	156,03
3	51	0,42	18,79	0,43	236,105	66,9	21,42	0,76	101,82	0,20292	471,69

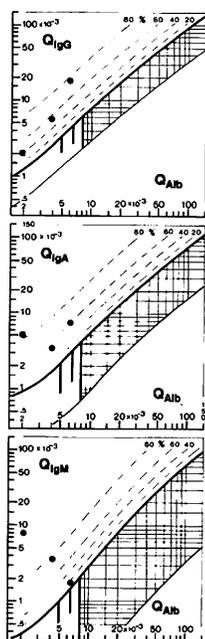


Fig. 1. Resultados de los pacientes con encefalitis por dengue. Reibergrama para la IgG, IgA e IgM.

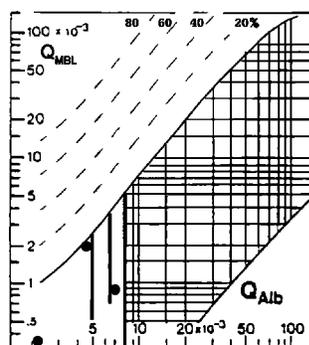


Fig. 2. Resultados de los pacientes con encefalitis por dengue. Reibergrama MBL.

Uno de los pacientes, al realizarle el examen físico no presentó rigidez de nuca ni defecto motor. La resonancia magnética del cerebro reveló lesiones en el hemisferio cerebelar, vermix, lóbulo occipital izquierdo y a nivel del cuerpo caloso.

Otro de los pacientes, en el cual la toma neurológica fue mayor, llegando incluso a estar varios días en coma, la electromiografía de los miembros inferiores y superiores presentó abundante actividad de denervación, compatible con severo compromiso de la neuroconducción por daño axonomielínico con patrón neurógeno en las cuatro extremidades.

En los potenciales evocados somatosensoriales se constató una ausencia de respuesta cortical que se atribuyó al severo compromiso de nervios periféricos. Los potenciales evocados auditivos de tallo cerebral mostraron una onda V con latencia prolongada en el oído derecho, mientras que en el izquierdo se advirtió marcada prolongación de la latencia interpico entre las ondas III y V. Estos hallazgos resultaron compatibles con un severo compromiso de la conducción a nivel mesencéfalo protuberancial. Uno de estos pacientes presentó disartria, paresia facial periférica, estrabismo convergente del ojo izquierdo con diplopía y pupilas isocóricas, con respuesta perezosa al estímulo luminoso intenso.

En el último paciente, que también presentó un cuadro con afectación neurológica marcada sin llegar al coma, la electromiografía y estimulación magnética transcraneal reveló: prolongación de latencias en las respuestas con estimulación distal en medianos y prolongación de latencias distales en ambos peroneos profundos, donde se identificó bloqueo de conducción parcial bilateral (fibras motoras). Las fibras sensitivas mostraron ausencia de respuesta al

estimular nervios medianos, cubitales y sural izquierda y enteltecimiento de la conducción en sural derecho.

En todos los pacientes, la IgM e IgG en suero resultó positivo para dengue y en la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se identificó el serotipo DEN2 en uno de ellos. Desde el punto de vista neuroinmunológico, los pacientes mostraron un patrón de síntesis de las tres clases mayores de inmunoglobulinas y ausencia de síntesis de MBL en el momento en que se le realizó la punción lumbar.

En el reibergrama para las clases mayores de inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM se observa que el punto correspondiente se encuentra por encima de la línea hiperbólica más intensa, que indica el límite entre la fracción derivada de la sangre y la fracción derivada del cerebro, lo cual significa síntesis intratecal de inmunoglobulinas (Fig. 1). Sin embargo, esto resultó diferente para la MBL, donde el punto se encuentra por debajo de esta línea de discriminación e indicó ausencia de síntesis intratecal de MBL (Fig. 2).

El por ciento de síntesis intratecal de estas inmunoglobulinas en dos de los pacientes se comportó en el siguiente orden: IgM>IgG >IgA; en el otro paciente el comportamiento del por ciento de síntesis de las inmunoglobulinas fue IgG>IgA>IgM. Estos resultados pueden ser apreciados en los respectivos reibergramas.

Discusión

La síntesis intratecal de inmunoglobulinas durante una variedad de enfermedades del SNC, principalmente enfermedades inflamatorias, es originada por infiltraciones perivasculares de los linfocitos B localmente maduros, los cuales pueden estar asociados a enfermedades del SNC.

La relación de la fracción intratecal de una o más clases de inmunoglobulinas o el predominio de alguna de ellas, ha creado un patrón típico de síntesis intratecal en algunas enfermedades neurológicas producidas por bacterias, virus, parásitos u otros (13).

El reibergrama está basado en la demostración de relaciones no lineales entre la QAIB y el cociente de la concentración LCR-suero de la IgG, IgA, IgM y MBL (QIgG, IgA, IgM, MBL), para determinar si existe disfunción de la barrera sangre-LCR y síntesis intratecal de estas proteínas (9). Los valores normales para las inmunoglobulinas (14) y MBL han sido considerados en reportes previos (15).

Los tres pacientes sujetos a nuestro estudio fueron hospitalizados. Los pacientes uno y dos lo hicieron con una sintomatología similar de encefalitis en el curso del dengue. El paciente tres tuvo una afectación más leve, pues resultó una encefalitis posdengue. Los principales síntomas iniciales fueron: cefalea generalizada, vértigo, trastornos del equilibrio y vómitos. Sin embargo, como muestran nuestros resultados, los tres pacientes tuvieron manifestaciones neurológicas compatibles con una encefalitis que se corrobora con el patrón IgA+IgG+IgM típico en estos casos (16). Los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas se mantienen por largo tiempo y esto hace que los reibergramas sean utilizados para establecer algunas aproximaciones diagnósticas como sucede con muchas enfermedades neurológicas infecciosas y autoinmunes (17).

Desde el punto de vista neuroinmunológico, nuestros resultados son interesantes, ya que la fracción intratecal estuvo presente de manera similar en los casos 1 y 2, es decir, hubo un por ciento mayor de síntesis intratecal de IgM, no así en el caso tres, donde la fracción intratecal fue a predominio de IgG, correspondiendo esto con el hecho que en los dos primeros casos la encefalitis fue parainfecciosa y en el tercer caso, posterior a la misma. Aunque para establecer un patrón definitivo en cuanto a la frecuencia e intensidad de la síntesis de inmunoglobulinas se requiere de una muestra mayor.

La presencia de síntesis intratecal de las tres clases de inmunoglobulinas en los tres pacientes estudiados es una clara evidencia de un proceso inflamatorio en el SNC, que lo hace similar a severos cuadros virales, como las encefalopatías producidas por virus de la familia herpesviridae y en NeuroSIDA, en los momentos iniciales (18). Sin embargo, ninguno de ellos sintetizó intratecalmente la MBL.

Esta proteína es considerada una molécula de reconocimiento que puede ser activada por la presencia de carbohidratos presentes en la superficie de los microorganismos, incluyendo los virus. Es posible que la misma no presente receptores que reconozcan los ligandos presentes en la superficie del VDEN, o que el sistema del complemento haya sido activado por otras de sus vías (la vía clásica o la alternativa) y no precisamente por la vía de las lectinas, ya que en los tres casos hay síntesis de las clases mayores de inmunoglobulinas que pudieran haber activado el complemento por la vía clásica. Se plantea que se depositan inmunocomplejos a nivel del SNC en afecciones neurológicas

por dengue, que se inician tardíamente dentro de la evolución de esta enfermedad (19).

La interacción de la MBL con algunos virus puede tener un efecto adverso en la infección viral debido a la subversión del sistema del complemento por los virus. De hecho, la activación anticuerpo-independiente de la vía clásica o de las lectinas del complemento resulta en la deposición de fragmentos de C3 en la superficie viral, pero no lleva a la destrucción eficiente de muchos virus que han desarrollado mecanismos de resistencia para escapar a la lisis mediada por el complemento (19).

Como la activación del complemento es un componente crucial de la inmunidad innata (vía alterna y de las lectinas), así como de la inmunidad adaptativa (activación de la vía clásica, dependiente de anticuerpos), la evasión de este sistema es de particular importancia para los virus (19).

Este es el primer reporte de afectaciones neurológicas en pacientes cubanos con dengue. De ahí la importancia de dar a conocer esta respuesta neuroinmune que puede ser utilizada para el diagnóstico precoz de esta entidad. Este conocimiento le permitiría al médico de asistencia tomar conductas más acertadas, a una mejor comprensión de la enfermedad en cuanto a formas evolutivas, así como al desarrollo de posibles candidatos vacunales.

De todos es conocido que el desarrollo de una vacuna efectiva para el dengue es una de las prioridades de la salud pública, definidas por la Organización Mundial de la Salud. Actualmente algunos candidatos vacunales se encuentran en la Fase I y II de estudios clínicos y otros se encuentran en una fase preclínica avanzada, aunque confeccionar una vacuna para el dengue es complejo debido a que se necesita desarrollar una vacuna contra los cuatro serotipos (20).

Por otro lado, la inmunidad protectora contra los virus y el rol de la respuesta inmune celular en la protección y recuperación, no se encuentran bien definidos, por lo que continúa siendo una prioridad. Es urgente definir estas interrogantes para permitir el establecimiento de la eficacia de un candidato vacunal (20).

Referencias

1. Thomas SJ, Endy TP. Critical issues in dengue vaccine development. *Curr Opin Infect Dis* 2011;24:442-50.
2. Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol* 2005;2(1):1-7.
3. Simmons CP, Farrar J. Changing patterns of dengue epidemiology and implications for clinical management and vaccines. *PLoS Med* 2009;6(9):e1000139. Disponible en: doi:10.1371/journal.pmed.1000139.
4. Dengue, viajero, caso confirmado-Ru Ex: Madeira. *BOLIPK* 2012;22(43):338.

5. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:564-81.
6. Sulekha C, Kumar S, Philip J. Guillain-Barre syndrome following dengue fever. *Indian Pediatr* 2004; 41:948-50.
7. Misra UK, Kalita J, Syam UK, Dhole TN. Neurological manifestations of dengue virus infection. *J Neurol Sci* 2006; 244:117-22.
8. Dorta-Contreras AJ, Silva-Somoza R. Neuroimmunological findings in Guillain-Barré syndrome, multiple sclerosis and idiopathic polyneuropathies. *Mol Chem Neuropathol* 1996; 28:279-84.
9. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001; 184:101-22.
10. Thiel S, Møller-Kristensen M, Jensen L, Jensenius JC. Assays for the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *Immunobiology* 2002;205:446-54.
11. Dorta-Contreras AJ, Reiber H. Intrathecal synthesis of immunoglobulins in eosinophilic meningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:452-5.
12. Reiber H, Padilla-Docal B, Jensenius JC, Dorta-Contreras AJ. Mannan-binding lectin in cerebrospinal fluid: a leptomeningeal protein. *Fluids Barriers CNS* 2012; 9(17):7. Disponible en: [http://www.dinamica de la sw.fluidsbarrierscns.com/content/9/1/17](http://www.dinamica.de.la.sw.fluidsbarrierscns.com/content/9/1/17).
13. Dorta-Contreras AJ. Respuesta poliespecífica en el sistema nervioso central: uso del índice de anticuerpo. *Rev Neurol* 2000;31:1070-3.
14. Dorta-Contreras AJ. Dinámica de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. *Rev Neurol* 2000;31:991-3.
15. Padilla-Docal B, Dorta-Contreras AJ, Bu-Coifiu-Fanego R, René H Martínez-Alderete, Olga Susana de Paula-Almeida, Hansotto Reiber, et al. Mannose-binding lectin deficiency with eosinophilic meningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in children: a case series. *Journal of Medical Case Reports* 2011; 330(5):19. Disponible en: <http://www.jmedicalcasereports.com/content/5/1/330>
16. Storch-Hagenlocher B, Oschmann P, Wildemann B. Inflammatory and autoimmune diseases. En: Wildemann B, Oschmann P, Reiber H, editores. *Laboratory Diagnosis in Neurology*. New York: Thieme; 2010. p. 117-65.
17. Dorta-Contreras AJ, Reiber H, Magraner-Tarrau ME, Weissbrich B, Interián-Morales MT, Noris-García E, et al. Patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas en epidemia de meningoencefalitis por echovirus 9. *Rev Neurol* 2002;35:904-7.
18. Schultze D, Weder B, Casinotti P, Vitk L, Kraube K, Fierz W. Diagnostic significance of intrathecally produced herpes simplex and varicella-zoster virus-specific antibodies in central nervous infections. *Swiss Med Wkly* 2004; 134:700-4.
19. Favoreel HW, Van de Walle GR, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Virus complement evasion strategies. *Journal of General Virology* 2003; 84(1):1-15.
20. Guzmán MG, Vázquez S, Kourí G.. Dengue: where are we today? *Malays J Med Sci* 2009;16(3):4-11.

Neuroimmunological response in dengue virus encephalitis

Abstract

Dengue virus is a RNA virus of the Flaviviridae family including also West Nile virus, Japanese encephalitis virus and yellow fever virus. A retrospective study with three patients diagnosed with encephalitis associated with dengue virus was carried out. Using their sera and cerebrospinal fluid samples the levels of high class of immunoglobulins by radial immunodiffusion and mannan binding lectin were quantified by fluorometry three classes of immunoglobulins levels were quantified by using an immunodiffusion technique. Mannose-binding lectin was quantified by fluorometry. A retrospective study with three patients diagnosed with encephalitis. The Reibergram has shown three classes of immunoglobulins intrathecal synthesis and absence of mannan binding lectin synthesis. Differences in the immunoglobulin intrathecal synthesis percent were observed, which were related with the moment of virus infection and the onset of neurological manifestations compatible with encephalitis. This is the first report of neurological affectations in Cuban patients with dengue fever. The intrathecal immune response may be used for the best knowledge of the disease and for the contribution to the development of possible candidate vaccine.

Key words: encephalitis, dengue, reibergram.