

NIVELES SÉRICOS DE IL-8, IL-10, IL-13, IFN γ y TNF α EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON INFECCIÓN AGUDA POR DIFERENTES SEROTIPOS DE VIRUS DENGUE

Joanna Santeliz Casavilca¹, William López¹, Elis Mosquera¹,
Antonio Guerrero², Isabel Álvarez de Mora²

¹Departamento de Ciencias Funcionales, Sección de Fisiología, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), Barquisimeto, Venezuela. ²Departamento de Medicina Preventiva y Social, Sección de Microbiología, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), Barquisimeto, Venezuela. Email: jsanteliz@ucla.edu.ve.

RESUMEN

El dengue es una enfermedad aguda febril causada por cuatro serotipos del virus dengue (DENV) cuya prevalencia en las Américas se ha quintuplicado entre 2003 y 2013. La respuesta inmune contra la infección del virus del dengue involucra la participación de factores celulares y humorales. Se realizó una investigación de corte transversal observacional para evaluar los niveles de interleucinas de la respuesta inmune innata (IL-8, TNF α), de respuesta TH₁ (IFN γ), TH₂ (IL-13) y regulatoria (IL-10) en suero de pacientes durante la fase aguda de infección por los serotipos DENV1, DENV3 y DENV4. Se incluyeron cuarenta pacientes con una edad promedio de 8,74 \pm 1,11 años. No hubo diferencias significativas en los niveles de las interleucinas evaluadas entre pacientes con infección por diferentes serotipos sin embargo se observa una tendencia a una mayor concentración de éstas en pacientes infectados con DENV1. Las concentraciones de IL-8, TNF α , IL-10 e IL-13 fueron descendiendo progresivamente a lo largo de la etapa aguda de la infección, no obstante, desde el inicio, los niveles de IFN γ mostraron niveles comparativamente más bajos. Para evaluar la presencia de polarización TH₁/TH₂ se determinó el cociente IFN γ /IL-13 no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, a pesar de evidenciarse una tendencia a una respuesta tipo TH₁ en pacientes infectados con DENV1. En conclusión, en pacientes infectados con el virus dengue, los niveles séricos de IL-8, IL-10, IL-13, IFN γ y TNF α parecieran ser independientes del serotipo viral.

Palabras clave: Dengue, ELISA, Interleucinas, PCR-TR, TH₁/TH₂

SERUM LEVELS OF IL-8, IL-10, IL-13, IFN γ AND TNF α IN PEDIATRIC PATIENTS WITH ACUTE INFECTION WITH DIFFERENT DENGUE VIRUS SEROTYPES

ABSTRACT

Dengue is an acute febrile disease caused by four dengue virus (DENV) serotypes whose prevalence in the Americas has quintupled between 2003 and 2013. The immune response against the infection with dengue virus involves cellular and humoral factors. We performed an observational and cross-sectional study to evaluate the levels of interleukins of the innate immune response (IL-8, TNF α), TH₁ response (IFN γ), TH₂ (IL-13) and regulatory (IL-10) in serum of patients during the acute phase of infection with the DENV1, DENV3 and DENV4 serotypes. Forty patients with an average age of 8,74 \pm 1,11 were included. There was no significant difference between the levels of interleukins among patients infected with different viral serotypes, however a tendency of higher concentrations of all interleukins in patients infected with the DENV1 serotype was observed. The concentrations of IL-8, TNF α , IL-10 and IL-13 descended during the acute phase of the infection, although from the beginning the levels of IFN γ were comparatively lower. To evaluate the presence of polarization TH₁/TH₂ we determined the IFN γ /IL-13 ratio not finding statistical differences between groups however a tendency towards a TH₁ response was observed in patients infected with DENV1. In conclusion, in patients infected with dengue virus, serum levels of IL-8, IL-10, IL-13, IFN γ and TNF α seem to be independent of viral serotype.

Key words: Dengue, ELISA, Interleukins, RT-PCR, TH₁/TH₂

Recibido: 09 /11/ 2015. Aprobado: 25 /03 /2016.

INTRODUCCIÓN

El dengue es la enfermedad arboviral más frecuente en humanos la cual es producida por la infección con alguno de los cuatro serotipos del virus dengue (DENV) que circulan de forma endémica en áreas tropicales y subtropicales. En las Américas, cerca de 500 millones de personas están en riesgo de contraer dengue y su incidencia ha ido en aumento pasando de 16.4 casos por 100.000 habitantes en la década de los ochenta a 218.3 casos por cada 100 mil habitantes durante la década 2000-2010¹. La infección puede presentarse como un abanico de formas clínicas no severas (asintomática, fiebre leve por dengue) y severas (fiebre de dengue hemorrágico y síndrome de shock por dengue) los cuales pueden llevar a la muerte sin tratamiento de soporte adecuado.

La patogénesis de la infección por el DENV incluye la participación de factores virales, humorales, autoinmunes y factores propios del hospedero. Por ejemplo, diversos estudios asocian el serotipo así como la cantidad de ARN del virus dengue con la severidad de la presentación clínica de la enfermedad^{2,3}. La importancia de los factores humorales es fundamental en la infección secundaria por el DENV. La generación de anticuerpos contra la proteína de envoltura E y la proteína precursora de membrana prM es indispensable para la defensa del huésped, sin embargo dichas respuestas pueden aumentar el riesgo de desarrollar formas clínicas más severas de la enfermedad durante la reinfección⁴. Los factores propios del hospedero incluyen una serie de respuestas inmunes donde intervienen la liberación de interleucinas tales como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18, TGF β , factor inhibitorio de la migración de macrófagos y quimocinas tales como IL-8 y MCP-1 así como la activación de complemento, producción de mediadores inflamatorios y fenómenos de autoinmunidad⁵. En relación a este último aspecto, es sabido que durante la infección por DENV se producen anticuerpos que reaccionan cruzadamente con plaquetas y células endoteliales. La mayor parte de estos autoanticuerpos son resultado de un mimetismo molecular de la glicoproteína viral no estructural NS1⁵.

El presente trabajo de investigación fue realizado con la finalidad de evaluar los niveles de algunas interleucinas de la respuesta inmune innata (IL-8, TNF α), de respuesta TH₁ (IFN γ), TH₂ (IL-13) y regulatoria (IL-10) en pacientes con infección aguda por diferentes serotipos del virus dengue.

MATERIALES Y MÉTODOS

Previo firma de consentimiento informado revisado y aprobado por el Comité de Bioética del Decanato de Ciencias de la Salud de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” y del Hospital Universitario de Pediatría “Dr. Agustín Zubillaga” se recolectaron 52 muestras de sangre de pacientes pediátricos con síntomas sugestivos de dengue provenientes de diversos centros de atención de salud públicos y privados de las ciudades de Barquisimeto y Cabudare, estado Lara (Agosto-Septiembre, 2010).

Extracción de ARN viral y detección de DENV mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR)

Durante la fase febril de la enfermedad, se extrajeron 4 ml de sangre por venopunción los cuales fueron recolectados en tubos con anticoagulante (EDTA) y se procedió a su centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos para la obtención del suero. Se realizaron las extracciones de ARN viral mediante el uso del estuche de extracción de ARN QIAamp QIAGEN® (QIAGEN Inc., CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de la extracción se diluyó en 50 μ L de agua libre de nucleasas. Se analizaron los ARN correspondientes a los cultivos celulares de las cepas control para cada serotipo y de las muestras de pacientes de acuerdo a la metodología descrita por Lanciotti y colaboradores⁶. Los productos de la reacción se analizaron en geles de agarosa al 2% y fueron comparados con el marcador de peso molecular (100 pb DNA *StepLadder*, Axygen, MA, USA). El tamaño final esperado para los productos fue de 482 pb (DENV1), 119 pb (DENV2), 290 pb (DENV3) y 392 pb (DENV4).

Determinación de las interleucinas IL-8, IL-10, IL-13, IFN γ y TNF α en suero por el método de ELISA

Los niveles séricos de interleucinas IL-8, IL-10, IL-13, TNF α e IFN γ fueron determinados a través del método de ELISA según las recomendaciones del fabricante (ThermoScientific, IL, USA). Las muestras fueron evaluadas en duplicados y las concentraciones de las diferentes interleucinas se determinaron a través de una curva estándar. El límite inferior de detección para las interleucinas IL-8 y TNF α fue de 2 pg/ml y para la IL-10, IL-13 e IFN α fue de 3 pg/ml, 7 pg/ml y 12,5 pg/ml, respectivamente.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS versión 20 para Windows.

La comparación entre muestras independientes se realizó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Diferencias entre grupos con una $p < 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Se procesaron 52 muestras de sangre de pacientes con sospecha clínica de dengue de las cuales se incluyeron para el análisis 40 muestras positivas para los serotipos DENV1, DENV3 y DENV4 detectados a través de PCR-TR. No se aisló ninguna muestra positiva para DENV2. La edad de los pacientes incluidos en el estudio fue de $8,74 \pm 1,11$ años. Otras características de los pacientes incluidos en el estudio se observan en el Cuadro 1.

Las concentraciones séricas de IL-8, IL-10, IL-13, IFN γ y TNF α fueron medidas durante la fase febril de la infección aguda (Cuadro 2). No hubo diferencias significativas en los niveles de las interleucinas evaluadas entre pacientes con infección por diferentes serotipos de virus dengue sin embargo se observa una tendencia al incremento en la concentración de todas las interleucinas en pacientes infectados DENV1 con respecto a los pacientes infectados con DENV3 y DENV4. Las concentraciones de IL-8, TNF α , IL-10 e IL-13 fueron altas y progresivamente descendieron a lo largo de los primeros días de la infección (Figura 1). En general, los niveles más elevados se detectaron en el segundo día de fiebre y los niveles más bajos ocurrieron en el quinto día de la infección. Los niveles de IFN γ fueron comparativamente más bajos con respecto a las otras interleucinas evaluadas en este mismo período de tiempo.

Independientemente del serotipo viral, hay una correlación positiva entre los niveles de IL-13 y los niveles de IL-10 e IL-8 (Figura 2) así como entre las concentraciones de TNF α y las de IL-8 e IL-13 ($r^2=0.357$, $p=0.02$ para ambas asociaciones) lo cual sugiere que pacientes que presentaron concentraciones altas de IL-13 tenían más probabilidad de mostrar elevadas concentraciones de IL-8 y IL-10, así como pacientes con niveles altos de TNF α tenían más probabilidad de tener niveles más elevados de IL-8 e IL-13.

El balance entre las interleucinas pro y anti-inflamatorias es importante en el desenvolvimiento de la respuesta inmune en muchas enfermedades. Para evaluar la presencia de polarización TH $_1$ /TH $_2$ en la respuesta humoral contra el virus DENV, se determinó el cociente IFN γ /IL-13 no observándose diferencias significativas ($p=0,36$) en cuanto al valor de este cociente entre pacientes infectados con diferentes serotipos sin embargo se observó una

tendencia hacia una respuesta tipo TH $_1$ en pacientes infectados con DENV1 ($2,03 \pm 0,75$) con respecto a pacientes infectados con los serotipos DENV3 y DENV4 ($0,86 \pm 0,28$ y $0,59 \pm 0,19$, respectivamente).

DISCUSIÓN

La inmunopatogénesis de la infección por el virus dengue comprende la activación del sistema de complemento, producción de mediadores inflamatorios, participación de respuestas inmunes celulares, liberación de interleucinas/quimoquinas y fenómenos de autoinmunidad. Las diferentes manifestaciones de severidad de la respuesta inmune contra el virus dengue se han asociado a propiedades intrínsecas del virus. En este trabajo, pacientes infectados con los serotipos DENV 1, 3 y 4 mostraron niveles similares de las interleucinas IL-8, IL-10, IL-13, IFN γ y TNF α . Estos resultados concuerdan con los de Yohan y colaboradores⁷ quienes observaron niveles similares de otras interleucinas tales como eotaxina, G-CSF, IFN α_2 , IP-10, IL-6, IL-8 e IL-15 en los sobrenadantes de líneas celulares infectadas con los cuatro serotipos de DENV. Jain y colaboradores⁸ evidenciaron niveles más elevados de IL-17 en pacientes infectados con DENV2 en comparación con casos infectados por DENV1 y DENV3, sin embargo esta diferencia no fue significativa. En general, éstos y otros estudios no han podido mostrar una asociación entre serotipo viral y perfil de producción de interleucinas. Nuestros resultados coinciden con estos estudios. Sin embargo, es de acotar que los pacientes infectados con DENV1 mostraron concentraciones más elevadas de todas las interleucinas evaluadas en este estudio en comparación con los pacientes infectados con DENV3 y DENV4. En Venezuela, un país en donde el dengue es una enfermedad endémica y en el cual circulan simultáneamente los cuatro serotipos del virus no es extraño suponer que un grupo de la población pudiera presentar infecciones secuenciales con diferentes serotipos DENV y sean estas respuestas inmunes secundarias las responsables de una mayor producción de ciertas interleucinas como así lo evidencian estudios anteriores⁹.

Los linfocitos T ejercen un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune. Los linfocitos T CD4⁺ ayudadores (TH), cuya principal función es producir interleucinas que permitan la proliferación y activación de las células efectoras, pueden diferenciarse en tres subtipos denominados linfocitos TH $_1$, TH $_2$ y TH $_{17}$, existiendo una regulación cruzada entre los linfocitos TH $_1$ y TH $_2$. En el caso de la infección por dengue, diversos estudios han demostrado una relación entre severidad y tipo de

respuesta en la cual las formas clínicamente más severas están asociadas a respuestas inmunes de tipo TH₂¹⁵⁻¹⁸. Estudios *in vitro* afirman que el virus dengue induce una respuesta de tipo predominantemente TH₁ en los primeros tres días de la infección de cultivos de linfocitos de sangre periférica, respuesta que es reemplazada posteriormente por una de tipo TH₂¹⁹. En este trabajo se observa una tendencia a una respuesta predominantemente de tipo TH₁ en pacientes infectados con el serotipo DENV1. Aun cuando podría inferirse que esta tendencia pudiera ser un efecto intrínseco del serotipo sobre la respuesta inmune, esta asociación no ha sido demostrada en estudios previos. Tal como fue previamente mencionado, es importante recordar el efecto que tienen las infecciones previas sobre la respuesta inmune secundaria. Por ejemplo, en un ensayo clínico para evaluar la inmunogenicidad y efectividad de una vacuna tetravalente contra el dengue, se observó una mayor respuesta CD8⁺ y TH₁ en pacientes previamente vacunados o en pacientes que habían estado expuestos al virus de forma natural demostrando que la existencia de una inmunidad previa contra el virus dengue, lo cual podría suponerse es común en nuestra población, favorece una respuesta inmune de tipo TH₁²⁰⁻²².

Un factor limitante en esta investigación fue el tamaño de la muestra y la imposibilidad de realizar seguimiento a los pacientes para constatar el grado de severidad de la enfermedad durante la evolución de la misma. Es sabido que la relación entre la severidad clínica de la infección por virus dengue y la desregulación en la producción de interleucinas es compleja y dependiente del tipo de interleucina. Por ejemplo, Kuno y colaboradores⁹, utilizando la variable presencia de manifestaciones hemorrágicas y hospitalización como indicadores de severidad, demostraron que los niveles de IL-6 y TNF α fueron significativamente más elevados en infantes y adultos hospitalizados comparados con los tratados de forma ambulatoria; sin embargo no observaron diferencias en los niveles de TNF α , IL-6 e IL-1 β en pacientes con/sin manifestaciones hemorrágicas. Niveles elevados de IL-8, MCP-1, IL-10 e IP-10 han sido reportados en pacientes infectados con DENV, especialmente en los casos más severos¹¹⁻¹⁴. Debido a la compleja interacción entre las diversas interleucinas entre sí y con otras moléculas de la respuesta inmune, es muy difícil atribuir la severidad de la infección por dengue a sólo un factor. La acumulación de data en relación al rol de las interleucinas facilitará en el futuro la comprensión de los complejos mecanismos involucrados en la respuesta inmune contra la infección por el virus dengue.

FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto, estado Lara (Código 001-CS-2012).

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dengue-PAHO/WHO, 2014. (Revisado el 08/03/2016 en <http://www.paho.org/world-health-day2014/wpcontent/uploads/2014/04/Dengue-esp.pdf>).
2. Tuiskunen A, Monteil V, Plumet S, et al. Phenotypic and genotypic characterization of dengue virus isolates differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. *Arch Virol* 2011; 20: 2023–2032.
3. Sudiro T, Zivny J, Ishiko H, et al. Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2001; 20:29–34.
4. Halstead S. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003; 60:421–467.
5. Lin C, Lei H, Liu C, et al. Autoimmunity in Dengue Virus Infection. *Dengue Bull* 2004; 28: 51-57.
6. Lanciotti R, Calisher C, Gubler D, et al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30(3): 545-551.
7. Yohan B, Kendarsari RI, Mutia K, et al. Growth characteristics and cytokine/chemokine induction profiles of dengue viruses in various cell lines. *Acta Virol* 2014; 58(1): 20-7.
8. Jain A, Pandey N, Garg R, et al. IL-17 level in patients with Dengue virus infection & its association with severity of illness. *J Clin Immunol* 2013; 33(3): 613-8.

9. Sierra B, Pérez A, Álvarez M, et al. Variation in Inflammatory/Regulatory Cytokines in Secondary, Tertiary, and Quaternary Challenges with Dengue Virus. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87(3): 538-547.
10. Kuno G, Bailey R. Cytokine responses among to dengue infection among Puerto Rican patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89(2): 179-82.
11. Raghupathy R, Chaturvedi U, Al-Sayer H, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 1998; 56(3): 280-285.
12. Lee Y, Liu M, Lei H, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol* 2006; 87:3623-3630.
13. Fink J, Gu F, Ling L, et al. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2007; 1(2):e86.
14. Malavige G, Gomes L, Alles L, et al. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 341.
15. Chaturvedi U, Agarwal R, Elbishbishi E, et al. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 28:183-188.
16. Mustafa A, Elbishbishi E, Agarwal R, et al. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 30(3): 229-33.
17. Pacsa A, Agarwal R, Elbishbishi E, et al. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 28(2):151-5.
18. Chen R, Yang K, Wang L, et al. Different clinical and laboratory manifestations between dengue hemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101(11):1106-13.
19. Chaturvedi U, Elbishbishi E, Agarwal R, et al. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol* 1999; 59(3):335-40.
20. Guy B, Nougarede N, Begue S, et al. Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. *Vaccine* 2008; 26(45): 5712-21.
21. Guy B. Immunogenicity of sanofi pasteur tetravalent dengue vaccine. *J Clin Virol* 2009; 46(2): S16-9.
22. Qiao M, Shaw D, Forrat R, et al. Priming Effect of Dengue and Yellow Fever Vaccination on the Immunogenicity, Infectivity, and Safety of a Tetravalent Dengue Vaccine in Humans. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85(4): 724-731.

**CUADRO 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PACIENTES
CON INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE**

Variables	Nº de pacientes	%
Sexo		
Masculino	26	65
Femenino	14	35
Serotipo DENV		
DENV1	23	57,5
DENV3	9	22,5
DENV4	8	20,0
Total	40	100

CUADRO 2. NIVELES PLASMÁTICOS DE INTERLEUCINAS EN PACIENTES INFECTADOS CON DIFERENTES SEROTIPOS DE VIRUS DENGUE

	DENV1	DENV3	DENV4	p
IL-8 (pg/ml)	288,8 ± 108,9	187,8 ± 77,8	181,1 ± 52,9	0,89
IL-10 (pg/ml)	203,7 ± 66,3	181,9 ± 43,5	149 ± 31,4	0,91
IL-13 (pg/ml)	292,4 ± 110,2	190,1 ± 78,8	183,4 ± 53,6	0,89
IFNγ (pg/ml)	140,8 ± 46	56,9 ± 12,2	64,9 ± 19,2	0,81
TNFα (pg/ml)	182,1 ± 29,7	177,8 ± 64,5	151,6 ± 36,4	0,79

Los resultados se expresan en promedio \pm ESM

FIGURA 1. NIVELES PLASMÁTICOS DE INTERLEUCINAS EN PACIENTES DURANTE LA FASE AGUDA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE

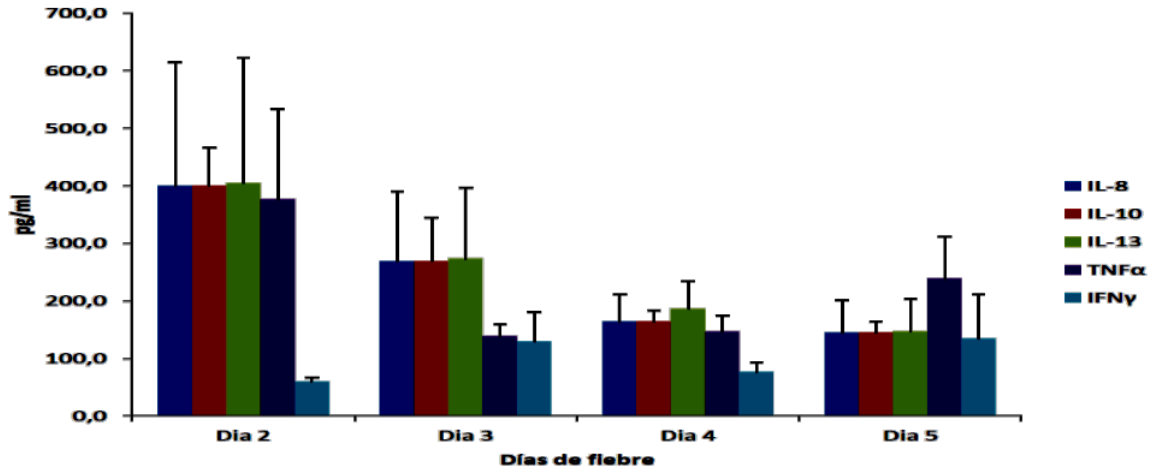


FIGURA 2. CORRELACIONES ENTRE NIVELES PLASMÁTICOS DE INTERLEUCINAS EN PACIENTES DURANTE LA FASE AGUDA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE

