

EL ENDOTELIO VASCULAR: UN ENIGMA EN LA PATOGÉNESIS DEL DENGUE GRAVE

The Vascular Endothelium: a mystery in the pathogenesis of Serious Dengue

Josué Reyes^{1,2}, Virginia Martínez² y Nereida Valero^{1,2}

¹Sección de Virología, ²Comunidad Estudiantil de Investigaciones Clínicas (C.E.I.C).

Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette".

Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

josuestf@hotmail.com

RESUMEN

El virus dengue (DENV), produce la infección por arbovirus más frecuente, representa un problema de salud pública en áreas geográficas donde adquiere características de endemia, causando una elevada morbilidad y un consumo importante de recursos económicos y asistenciales; sin embargo, los mecanismos implicados en la producción del cuadro clínico grave no están establecidos. El objetivo de este artículo fue analizar los mecanismos patogénicos involucrados en el daño endotelial producido durante la infección por el virus del dengue, y sus implicaciones como factor desencadenante de dengue grave (DG). Para el estudio se realizó una revisión bibliográfica de la Biblioteca Nacional de Medicina de U.S.A (PUBMED) y Biblioteca Científica Electrónica online (SCIELO). Se analizaron los artículos relacionados con la disfunción endotelial presentada en el dengue y su relación con la fisiopatogénesis del DG, basados en los mecanismos moleculares descritos por Willms (2002), Appanna (2010), Goncalves (2007) y Lien (2009). Se ha establecido como posible causa de DG la disfunción endotelial, estado en el que son liberadas moléculas con actividad vasoactiva y anticoagulante, las cuales posiblemente conlleven a un aumento de la permeabilidad vascular produciendo un desequilibrio hemostático y la aparición consecuente de las manifestaciones hemorrágicas tan temidas en el dengue con signos de alarma y dengue grave.

Palabras Clave: dengue, disfunción endotelial, manifestaciones hemorrágicas, dengue grave.

ABSTRACT

The Dengue virus (DENV) causes the most common arbovirus infection and it represents a public health problem in geographic areas where it has acquired characteristics of being endemic, causing high morbidity and mortality and a significant consumption of economical and medical resources. The mechanisms involved in the production of the serious clinical condition are not established. The main objective of this paper was to analyze the mechanisms involved in endothelial damage occurred during DENV infection as a trigger for severe dengue (DG). For the study, a literature review of the National Library of Medicine, USA (PUBMED) and Scientific Electronic Library Online (SciELO) was carried out. Articles related to endothelial dysfunction and its relationship with the DG fisiopatogenesis were analyzed based on the molecular mechanisms described by (Willms, 2002), (Appanna, 2010), (Goncalves, 2007) and (Lien, 2009). Endothelial dysfunction has been established as a possible cause of DG, a state in which molecules are released with vasoactive and anticoagulant activity, which possibly lead to increased vascular permeability, producing a hemostatic imbalance and consequent emergence of the dreaded hemorrhagic manifestations in dengue with warning signs and DG.

Keywords: dengue, endothelial dysfunction, hemorrhagic manifestations, severe dengue.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad febril aguda producida por virus ARN del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Se han descrito 4 serotipos antigénicamente relacionados, (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4)

cuyo genoma viral codifica una poliproteína, lo que da lugar a 3 proteínas estructurales (prM/M, E y C) y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). (Welsch et al, 2009 y Añez, 2007).

Su transmisión se produce a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes*, principalmente la especie *Aedes aegypti*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado la enfermedad según la presencia o ausencia de signos y síntomas, estableciendo así dengue sin signos de alarma (DSSA), el cual comprende náusea, vómitos, rash, mialgias y artralgias, prueba del torniquete positivo y leucopenia; dengue con signos de alarma (DCSA) caracterizado por la presencia de dolor espontáneo o durante la palpación de abdomen, vómitos persistentes, signos clínicos de acumulación de fluidos, sangrado de mucosas, letargia e irritabilidad, hepatomegalia mayor de 2 centímetros y pruebas de laboratorio que evidencien aumento del hematocrito asociado a rápida caída de las plaquetas. Según Cabello et al. (2009), en el DCSA están presentes múltiples anomalías de la circulación sanguínea, entre estas, marcada trombocitopenia, incremento de la permeabilidad vascular y desequilibrio entre los mecanismos procoagulantes y anticoagulantes encargados de mantener la hemostasia en condiciones fisiológicas. Por último, el dengue grave (DG), implica escape de plasma que conlleva al shock por acumulación de fluidos y distress respiratorio, hemorragias y daño a órganos, blanco evidenciado principalmente por transaminasas hepáticas ≥ 1000 UI/L y alteraciones sensoriales.

El virus dengue (DENV) se encuentra ampliamente distribuido en países tropicales y subtropicales, siendo endémico principalmente donde tiene mayor circulación su vector; estacionalmente genera epidemias, originando un aproximado de entre 50 y 100 millones de casos anuales de los cuales alrededor de 500 mil desarrollan DCSA y DG. En Venezuela el dengue se encuentra presente desde finales de la década de los 60 y es endémico desde los 80. Entre el año 1989-1990, ocurrió en Venezuela la segunda mayor epidemia de dengue hemorrágico a nivel mundial asociada a DENV-2.

Patogénesis y respuesta inmunitaria ante el virus dengue

Posterior a la inoculación del DENV por el mosquito, el virus presente en la epidermis y dermis tiene predilección por las células dendríticas (DC) y los queratinocitos, las primeras, forman parte del sistema inmunológico al comportarse como células presentadoras de antígenos. El DENV por medio de la Pr-E se une a los receptores de manosa de estas células y penetra por endocitosis; las células son capaces de migrar a

la circulación periférica e ir al nódulo linfático más cercano donde son reclutados numerosos monocitos/macrófagos (Mo/M ϕ) para iniciar la eliminación del virus, tal como lo afirman Wang et al (2003) y Wichmann et al (2007).

Según el mecanismo explicado por Wills et al (2002), el virus logra replicarse con rapidez, es diseminado a través del sistema linfático, dando origen a la fase de viremia, por lo que infecta abundantes células del sistema monocítico-macrofágico (MMS), pudiendo afectar gran variedad de órganos. En esta fase se liberan grandes cantidades de factores solubles como las citoquinas de tipo interleucinas (IL): IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, TGF-1 β , TNF- α e IFN- γ ; éstos actúan de forma sinérgica para contener la replicación viral. Habitualmente el MMS, el sistema de complemento y la activación de células T son capaces de eliminar el virus, produciendo así el cuadro clínico que caracteriza al DSSA, posteriormente mediante la activación de células B se da origen a la formación de anticuerpos de tipo IgM e IgG.

Pero si la infección persiste, el DENV puede infectar las células endoteliales y éstas al ser activadas liberan otros factores solubles como; factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), molécula vascular de adhesión celular -1 (VCAM-1), factor de Von Willebrand, trombo-modulina (TM), factor tisular, Selectina E y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). Posiblemente, la excesiva liberación de estos factores solubles y la infección de las células endoteliales, conllevan a un estado de disfunción endotelial y aumento de la permeabilidad vascular produciendo un desequilibrio hemostático y la aparición consecuente de las manifestaciones hemorrágicas tan temidas en DCSA y DG (Apanna et al, 2010; Goncalvez et al, 2007; y Mathew y Rothman, 2008).

Ahora bien, la fisiopatogénesis del DCSA/DG no se encuentra del todo clara, e incluso las manifestaciones hemorrágicas pudiesen estar presentes y no acordes a las cifras plaquetarias, sugiriendo la participación de otras vías involucradas; existen factores de riesgo que tratan de explicar la ocurrencia de DCSA/DS: 1) Una infección secundaria mencionada por Lin et al (2006), en pacientes con historia de primoinfección por un serotipo heterólogo, donde la presencia de anticuerpos subneutralizantes facilitarían la entrada del virus vía receptor Fc a las principales células blanco (Mo/M ϕ). 2) Factores dependientes del hospedador como la edad siendo más frecuente en niños y ancianos, condición nutricional, o tipo de genes HLA del complejo mayor de histocompatibilidad, encargados según Rico (2007), del reconocimiento de antígenos virales y la liberación excesiva de ciertas citoquinas y compuestos proinfla-

matorias como TNF- α , IL-1 y el óxido nítrico (NO); y 3) La presencia de cepas, subtipos o genotipos más virulentos.

Desequilibrio hemostático presente en la infección por DENV

Los mecanismos moleculares inmersos en el desequilibrio hemostático presente en DCSA/DG, vinculan la producción de radicales libres de oxígeno como el NO (Óxido Nítrico), como un factor que pudiese intervenir en la génesis de las manifestaciones hemorrágicas dado el importante papel que éste desempeña en la hemostasia y coagulación como antiagregante plaquetario, antitrombótico, fibrinolítico y vasodilatador. En un estudio realizado por Valero et al (2002), se determinaron concentraciones séricas de nitratos y nitritos, y éstas arrojaron resultados significativos que demostraron una mayor concentración de estos productos de degradación del NO en pacientes con dengue clásico al relacionarlos con los que presentaron dengue hemorrágico.

Asimismo, existe la participación de otras moléculas como la TM catalogada como un anticoagulante natural. La TM es una glicoproteína que se encuentra en la superficie del endotelio vascular, actúa como un receptor para las moléculas de trombina (TR) la cual es la encargada de la conversión enzimática del fibrinógeno en fibrina, además activa las plaquetas y convierte a los factores V y VIII de la coagulación en sus formas activadas (Va y VIIIa). La TR por sí sola activa una proteína que es capaz de inactivar estos factores como lo es la proteína C (PC), la actividad de la TR sobre esta última es muy lenta e ineficiente (Rodríguez, 2000 y Lien et al, 2009).

Sin embargo, la TM unida a TR forma un complejo 1:1 y esta unión evita la formación del coágulo de fibrina, la activación plaquetaria y de los factores de coagulación antes mencionados. En adición a esto, el complejo TM-TR cataliza la conversión del zimógeno de la PC en su forma activa a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} y de esta forma la activación de la PC (PCa) aumenta en rapidez hasta unas 20.000 veces. La PCa por sí sola y en presencia de su cofactor la proteína S, es un agente antitrombótico que tiene la capacidad de hidrolizar enzimáticamente los factores Va y VIIIa, e inhibe sus actividades en el proceso de coagulación. Por tal razón, Butthep et al (2006), explica que el mecanismo de acción de la TM es una de las más importantes vías que mantienen la integridad hemostática en la superficie vascular.

Estudios recientes realizados por Chen et al (2009), en células endoteliales provenientes de microvasculatura de cordón umbilical (HMEC-1) y monocitos infectados con el DENV, demuestran que existe la produc-

ción de citoquinas capaces de estimular una serie de cambios morfológicos en la célula. El efecto del DENV sobre la coagulación y fibrinólisis está relacionado con la expresión de moléculas en la superficie de la célula endotelial; se ha demostrado que éste induce la expresión del ARNm que codifica moléculas como el activador tisular del plasminógeno (t-PA), el cual se encarga de la disolución del coágulo sanguíneo y la TM; este aumento se encuentra ampliamente relacionado con la hiperfibrinólisis o falta de coagulación presente en el DG.

Ahora bien, la PrE del DENV es una glicoproteína codificada por aproximadamente 500 aminoácidos; es la responsable de la adhesión, de la entrada viral mediada por endocitosis, de la fusión endosómica de membranas y de provocar la mayor parte de la respuesta inmunitaria contra el virus. El análisis de esta proteína estructural revela la existencia de tres dominios I, II y III; siendo el dominio III el más relacionado con la adhesión del virus a moléculas en la superficie celular y con la generación de la respuesta inmunitaria (Lin et al, 2003).

Por último, el dominio III de PrE según Huan-Yao et al (2001), también es capaz de inducir un aumento en la expresión de TM en monocitos y células endoteliales, de tal forma que como el virus Ébola la PrE del DENV puede contribuir a la aparición de trastornos hemostáticos durante la infección por dengue.

Autoinmunidad frente al virus dengue

Durante una infección secundaria por DENV producida por un serotipo heterólogo, se genera una respuesta inmunitaria ampliada, debido a la presencia de anticuerpos (Abs) Anti-PrE preexistentes; éstos son los protagonistas del desarrollo de una enfermedad severa dado que favorecen la entrada del virus vía receptor Fc a la célula mononuclear y no su eliminación, permitiendo así una mayor población de células infectadas y por ende mayor carga viral, datos comprobados a través de las investigaciones de Lemes et al (2005) y Kim, Kaistha y Rouse (2006).

Estos estudios demuestran, que los pacientes que han desarrollado DCSA/DG, generan también anticuerpos contra la proteína NS1 del virus, expresada en la superficie de las células infectadas, éstos actúan como auto anticuerpos atacando las proteínas adhesivas e integrinas que componen la matriz extracelular de las plaquetas y células endoteliales. De igual manera, Takada et al (2003), Chen et al (2010) y Guzmán et al (2010), demostraron que los Abs anti-PrE son capaces de actuar sobre el plasminógeno inhibiendo la actividad de la plasmina, la cual actúa como fibrinolisisina, degradando las redes de fibrina que constituyen el tapón hemostático.

CONCLUSIONES

El desarrollo del DG posee una etiología multifactorial, donde se encuentran la edad, sexo, estado nutricional, tipo de HLA e incluso la infección secundaria por un serotipo heterólogo. Sin embargo, es evidente que las células endoteliales juegan un papel clave en el desarrollo de este cuadro dado que, al ser infectadas se activan liberando factores solubles que actúan a nivel local y sistémico tales como: VEGF, MCP-1, MIF, VCAM-1, TM, factor tisular, Selectina E y PAI-1. Posiblemente la excesiva liberación de estos factores conlleva a un estado de disfunción endotelial, es decir, aumento de la permeabilidad vascular, disminución de su capacidad trombogénica, y déficit de la capacidad de agregación plaquetaria; estos cambios producen un desequilibrio hemostático, así como la aparición consecuente de las manifestaciones hemorrágicas temidas en el DG. Teniendo en cuenta estos mecanismos, se evidencia la necesidad de realizar investigaciones que incluyan análisis de las interacciones tempranas sobre el virus-célula, la genómica viral, respuesta inmunitaria, y moléculas involucradas en el equilibrio hemostático durante la infección por serotipos infectantes por el favivirus causante del dengue grave.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Añez, G. (2007). Evolución molecular del virus dengue: un área de investigación prioritaria. *Invest Clin.* 48(3):273-6.
- Appanna, R., Ponnampalavanar, S., Lum Chai See, L. & Sekaran, S. (2010). Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population. *PLoS One.* 28;5 (9).
- Butthep, P., Chunhakan, S., Tangnaratchakit, K., Yoksan, S., Pattanapanyasat, K. & Chuansumrit, A. (2006). Elevated Soluble Thrombomodulin in the Febrile Stage Related to Patients at Risk for Dengue Shock Syndrome. *J Pediatr Infect Dis.* (10):894-897.
- Cabello, C., Manjarrez, M., Huerta, A., Cime, J., Monroy, V., Biruete, B. & Ruiz, B. (2009). Modification of the cytoprotective protein C pathway during Dengue virus infection of human endothelial vascular cells. *Thromb Haemost.* 101(5):916-28.
- Chen, L., Shyu, H., Lin, H., Lei, H., Lin, Y., Liu, H., et al. (2009). Dengue virus induces thrombomodulin expression in human endothelial cells and monocytes in vitro. *J Infect.* 58(5):368-374.
- Chen, L., Yeh, T., Lin, Y., Wang, Y., Su, S., Chen, C. et al. (2010). The envelope glycoprotein domain III of dengue virus type 2 induced the expression of anticoagulant molecules in endothelial cells. *Mol Cell Biochem.* 342 (1-2):215-221.
- Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. (2009). World Health Organization. 15-45.
- Goncalvez, A., Engle, R., Claire, M., Purcell, R., & Lai, Ch. (2007). Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci.* 29; 104(22):9422-7.
- Guzmán, M., Hermida, L., Bernardo, L., Ramirez, R. & Guillén, G. (2010). Domain III of the envelope protein as a dengue vaccine target. *Expert Rev Vaccines.* 9:137-147.
- Huan, L., Trai, Y., Hsiao, L., & Yee, L. (2001). Immunopathogenesis of Dengue virus Infection. *J Biomed Sci.* 8:377-387.
- Kim, B., Kaistha, S., & Rouse, B. (2006). Viruses and autoimmunity. *Autoimmunity.* 39:71-77.
- Lemes, E., Miagostovicsh, M., Alves, M., Costa, S., Fillipis, A., Armoa, G. et al. (2005). Circulating human antibodies against dengue NS1 protein: potential of recombinant D2V-NS1 proteins in diagnostic tests. *J Clin Virol.* 32(4): 305-12.
- Lien, C., Huey, S., Hui, L., Huan, L., Yee, L., Hsiao, L. et al. (2009). Dengue virus induces thrombomodulin expression in human endothelial cells and monocytes in vitro. *Am J Trop Med Hyg.* 58, 368-374.
- Lin, C., Lei, H., Shiao, A., Liu, C., Liu, H., Yeh, T. et al. (2003). Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med. Virol.* 69:82-90.
- Lin, C., Wan, S., Cheng, H., Lei, H., & Lin, Y. (2006). Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol.* 19(2):127-32.
- Mathew, A. & Rothman, A. (2008). Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 225:300-13.
- Rico, R. (2007). Dengue Virus Evolution and Virulence Models. *Clin Infect Dis.* 1; 44 (11):1462-6.
- Rodríguez, Z. (2000). Caracterización de la trombomodulina, un anticoagulante natural. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc.* 1(2):118-24.
- Takada, A., Feldmann, H., Ksiazek, T. & Kawaoka, Y. (2003). Antibody dependent enhancement of Ebola virus infection. *J. Virol.* 77:7539-7544.
- Valero, N., Espina, L., Añez, G., Torres, E., & Mosquera, J. (2002). Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 66(6):762-4.
- Wang, K., Chao, D., Kao, C., Wu, H., Liu, Y., Li, C. et al. (2003). High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology.* 30

- Welsch, S., Miller, S., Romero, I., Merz, A., Bleck, C., Walther, P., Fuller, S., Antony, C., Krijnse, J. & Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe*. 23; 5(4):365-75.
- Wichmann, O., Gascon, J., Schunk, M., Puente, S., Siikamaki, H., Gjorup, I. et al. (2007). Severe dengue virus infection in travelers: risk factors and laboratory indicators. *J. Infect. Dis.* 195:1089–1096.
- Wills, B., Oragui, E., Stephens, A., Daramola, O., Dung, N., Loan, H. et al (2002). Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with dengue shock syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 35:277–285. 5:330–338.