
 <p>UNIVERSIDAD CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA</p>	<p style="text-align: center;">Informe de Investigación</p> <hr/> <p style="text-align: center;">Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.</p>	 <p style="text-align: center;">LABCEL</p>
--	--	--

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
FACULTAD: “MIGUEL ENRÍQUEZ”.
LABORATORIO CENTRAL DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO
(LABCEL)**

Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.



AUTOR

-Cristóbal González Losada.
Estudiante de 4to año de Medicina.
Alumno ayudante de Inmunología.

TUTOR

-Alberto Juan Dorta Contreras
Licenciado en Bioquímica.
Doctor en Ciencias de la Salud.
Profesor e Investigador Titular.



**La Habana, Cuba 2017
“Año 59 de la Revolución”**

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	



RESUMEN

Introducción: El virus del dengue es un virus ARN miembro de la familia Flaviviridae. Existen cinco serotipos antigénicamente diferentes. La infección provee inmunidad para un mismo serotipo, pero no para los otros. El dengue no produce de manera general afectaciones en el sistema nervioso central. *Objetivo:* Caracterizar la respuesta neuroinmunológica en pacientes con proceso neuroinflamatorio asociados al virus del dengue. *Materiales y métodos:* Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal. Las muestras se obtuvieron de hospitales de la provincia de La Habana entre los años 2013 y 2014. La muestra estuvo conformada por once pacientes adultos confirmados con el virus del dengue por anticuerpo específico de tipo IgM en suero, que presentaron manifestaciones neurológicas tanto en el curso de la enfermedad como posterior a esta. Las inmunoglobulinas mayores y la albúmina se cuantificaron por el método de inmunodifusión radial simple, la MBL y ficolinas H y M por ELISA. Se emplearon los reibergramas y las regresiones para evaluar la síntesis intratecal de proteínas. *Resultados:* Las alteraciones del líquido cefalorraquídeo fueron contrastantes con el trastorno neurológico desarrollado. Predominó el patrón de tres clases de inmunoglobulinas mayores, altos por cientos de síntesis intratecal de IgG, la integridad de la barrera sangre/ líquido cefalorraquídeo y la síntesis intratecal de MBL de forma general. En todos los pacientes se presentó síntesis intratecal de ficolinas H y M. *Conclusiones:* Se encuentra activa tanto la vía clásica como de las lectinas en pacientes con proceso neuroinflamatorio asociado al virus del dengue.

Palabras claves: dengue, reibergramas, complicaciones neurológicas asociadas al dengue, sistema del complemento, ficolinas, MBL.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

ÍNDICE	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	5
III. RESULTADOS	9
IV. DISCUSIÓN	22
V. CONCLUSIONES	28
VI. RECOMENDACIONES	29
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

I. INTRODUCCIÓN

El virus del dengue (VDEN) es un virus ARN (ácido ribonucleico) 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. Existen cinco serotipos antigénicamente diferentes; VDEN1- VDEN5. La infección provee inmunidad para un mismo serotipo, pero no para los otros serotipos ^[1].



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 ^[2]. Además, el dengue ha dejado de ser una enfermedad exclusiva del trópico y cada año se extiende la latitud de su alcance ^[3].

En el continente americano ya se han reportado brotes desde Argentina hasta Estados Unidos ^[3-4]. Dengue autóctono ha sido reportado recientemente en Europa. Ejemplo de esto fue la epidemia de dengue que ocurrió en Islas Madeira en 2012 ^[5] y en el sur de Francia en 2015 ^[6]. También ha habido dengue importado por viajeros que fueron infectados en lugares afectados por este flavivirus ^[6-7].

Después de la inoculación del virus por el vector *Aedes* (*Ae. aegypti* y *Aedes albopictus*) ^[7], la infección en humanos puede resultar clínicamente asintomática o causar manifestaciones clínicas que van desde el síndrome febril del dengue no complicado, hasta un síndrome de dengue grave, expresado por aumento de la permeabilidad vascular y hemorragia ^[8-10].

Las manifestaciones neurológicas reportadas hasta el momento se encuentran asociadas principalmente con los serotipos VDEN-2 y VDEN-3. Se ha invocado que estas manifestaciones pueden ser más ostensibles cuando el paciente ha experimentado una infección previa con un serotipo diferente ^[11-13].

La infección del dengue tiene la capacidad de causar manifestaciones neurológicas como la mielitis transversa, encefalitis, meningitis, síndrome de Guillain Barré, encefalomielitis diseminada aguda y la miositis ^[8-13].



	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

Las complicaciones neurológicas del dengue es un fenómeno nuevo en Cuba ^[14]. Observaciones recientes indican que el espectro clínico del dengue está cambiando y las manifestaciones clínicas atípicas están siendo más frecuentemente reportadas ^[13].

El empleo de los reibergramas ha demostrado su versatilidad y aplicación en muchas enfermedades neurológicas de naturaleza infecciosa y también de origen autoinmune y degenerativo ^[15-16].

La vía clásica y la de las lectinas son vías de activación del sistema del complemento en la lucha contra las enfermedades. La activación del complemento promueve la diferenciación de células B, mantiene la tolerancia inmune y la subsecuente activación de complejos antígeno-anticuerpo y otras proteínas derivadas del hospedero facilitando la muerte directamente una vez que la respuesta inmune está establecida ^[17-19].

En la activación del complemento por la vía clásica participan la inmunoglobulina IgG e IgM, recientemente se ha demostrado que la subclase 1 de IgA también activa esta vía a través del C3c. En la vía de las lectinas participan 3 proteínas diferentes, cuyas estructuras y funciones son semejantes a los componentes iniciales de la vía clásica. Como unidad de reconocimiento actúan la MBL y las ficolinas H y M, cuya estructura es semejante a la del C1q, que se une con las proteínas asociadas con la lectina: MASP1 y MASP2, de estructuras semejantes al C1r y el C1s, respectivamente, para formar un complejo con actividad esterásica sobre el C4 y el C2, semejante a la macromolécula del componente C1 que participa en la formación de la convertasa del C3. La vía de las lectinas se activa sin la participación de anticuerpos de tipo IgG, IgM e IgA, siendo semejante en esto a la vía alterna ^[17-19].



	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

Los estudios de proteínas de la vía de las lectinas se limitan a enfermedades neurológicas de etiología parasitarias y bacterianas ^[17]. Esto puede deberse fundamentalmente a que la Neuroinmunología y las herramientas como el reibergrama son muy recientes. Es de hecho, nuestro centro, el primero en proponer las herramientas para medir la fracción intratecal de las proteínas de la vía de las lectinas MBL ^[18] y ficolinas ^[19]. Herramientas validadas y utilizadas por el departamento de Neuroquímica de la Universidad de GÖTTINGEN, Alemania y por el Departamento de Biomedicina de la Universidad de Aarhus, Dinamarca. ^[18-19]. Entidades pioneras de la Neuroinmunología.

En nuestro país se implementa un plan estratégico de lucha contra el VDEN; como parte de esto en el Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo, se realizan estudios neuroinmunológicos en pacientes con VDEN como parte de un proyecto nacional. Recientemente, nuestro centro publicó el primer estudio de encefalitis asociado al virus del dengue en Cuba ^[14], dicho estudio no contempla la vía de las lectinas, solo la síntesis intratecal de anticuerpos mayores y el estado de la barrera sangre/ líquido cefalorraquídeo.

Recientemente en México se ha logrado llegar hasta la fase III un candidato vacunar denominado CYD-TDV, producida por Sanofi-Pasteur. Dicha vacuna ha mostrado efectividad contra los serotipos 3 y 4, en contraste con los serotipos 1, 2 y más recientemente el 5. Por tanto, su eficacia es variable y disminuye en relación a si el paciente ha sido infectado o no por el virus del dengue. También se han asociados trastornos neurológicos post-vacunares ^[20].

Es por este motivo que cuando se van a presentar candidatos vacunares contra una entidad determinada, el conocimiento del agente etiológico, la patogenia del mismo y las características de respuesta del hospedero son cruciales para tal diseño. Una de las deficiencias del estudio mexicano es la no inclusión de investigaciones sobre la respuesta inmune intratecal en pacientes infectados con virus del dengue ni del proceso neuroinflamatorio asociado a este agente etiológico.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

Por tanto, consideramos que el conocimiento de la respuesta inmune intratecal así como su asociación con las manifestaciones clínicas en los pacientes con cuadro neurológico asociado al VDEN pudiera contribuir a la selección de posibles candidatos vacunares. Por tales motivos planteamos el siguiente problema científico:

¿Qué características presenta la respuesta neuroinmunológica en pacientes con proceso neuroinflamatorio asociados al virus del dengue?



La hipótesis de trabajo es demostrar que se encuentran activadas tanto la vía clásica como la de las lectinas del sistema del complemento en el sistema nervioso central en pacientes con proceso neuroinflamatorio asociado al virus del dengue.

Objetivo general

- ❖ Caracterizar la respuesta neuroinmunológica en pacientes con proceso neuroinflamatorio asociados al virus del dengue.

Objetivos específicos

- ❖ Establecer las manifestaciones clínicas, imagenológicas y electrofisiológicas de cada complicación neurológica presentada asociada al virus del dengue.
- ❖ Determinar las características citoquímicas del líquido cefalorraquídeo de cada complicación neurológica presentada asociada al virus del dengue.
- ❖ Evaluar la ocurrencia de síntesis intratecal de las clases mayores de inmunoglobulinas.
- ❖ Comprobar el estado de la barrera sangre/líquido cefalorraquídeo.
- ❖ Determinar la ocurrencia de síntesis intratecal de la lectina de unión a la manosa (MBL).
- ❖ Determinar la ocurrencia de síntesis intratecal de las ficolinas H y M.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

II. MATERIALES Y MÉTODOS

❖ *Clasificación de la investigación*

Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal. Las muestras se obtuvieron de hospitales de la provincia de La Habana entre los años 2013 y 2014.



❖ *Pacientes y muestras*

La muestra estuvo conformada por once pacientes adultos confirmados con VDEN por anticuerpo específico de tipo IgM en suero, que presentaron manifestaciones neurológicas tanto en el curso de la enfermedad como posterior a esta. En caso de los que cursaron con manifestaciones neurológicas post-infecciosa se estableció que el daño fue consecuencia directa del VDEN utilizando el índice de anticuerpo ^[21]. Método empleado para vincular daño con agente etiológico.

Tanto las muestras de suero como de líquido cefalorraquídeo (LCR) fueron tomadas en el debut de las manifestaciones neurológicas de forma simultánea en un período menor de treinta minutos entre cada extracción para no afectar el mapa inmunológico de ambos fluidos en cada paciente ^[21]. La extracción de LCR fue por punción lumbar (2ml). Se extrajo sangre mediante venopunción, luego se centrifugó para obtener 2ml de suero.

Una parte de la muestra se procesó en tiempo real para este estudio, el resto se almacenaron a -80°C en alícuotas de 500 µL para futuras investigaciones.

Con la finalidad de realizar esta investigación se revisaron las historias clínicas de los pacientes, de las cuales se recogió parte de la información que se utilizó en este estudio. Se siguieron los protocolos establecidos por cada una de las instituciones en las que estos pacientes fueron atendidos, cumpliendo las normas del comité de ética de las mismas. Cada paciente firmó un consentimiento informado para permitirnos la publicación de los resultados de nuestro estudio.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

❖ *Cuantificación de las proteínas*



Los niveles de albúmina y de inmunoglobulinas fueron determinados por el método de inmunodifusión radial simple en placas (Siemens, Marburg, Alemania). Para la cuantificación en suero se utilizaron placas NOR-Partigen y LC-Partigen para las determinaciones en LCR [18, 21].

Cada placa está cubierta por un gel de agarosa conjugado con anticuerpo específico dirigido a la proteína que se va a cuantificar. En cada uno de los pozos de las placas se añadió 5 µL de muestra para el caso del suero y 20 µL para el caso del LCR. Pasada 72 horas de incubación a 4°C se procedió a la medición del diámetro del halo de precipitación. El diámetro al cuadrado es directamente proporcional a la concentración de cada una de las proteínas de estudio [18, 21].

Las unidades de medida en suero es (g/L) para las clases mayores de inmunoglobulinas, y ng/mL para la MBL y ficolinas H y M. Para las proteínas en el LCR las unidades de medidas son (mg/L) para las clases mayores de inmunoglobulinas; la MBL y las ficolinas H y M se refieren en ng/mL. [14, 18, 21].

La concentración de MBL en suero fue medida utilizando un anticuerpo anti-MBL conjugado con europio en placas de ELISA. 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. Se adicionaron anticuerpos monoclonales anti-MBL en la superficie de las placas. La concentración de MBL en LCR se midió utilizando el mismo procedimiento pero con las muestras sin diluir [17].

Se cuantificaron los niveles de las ficolina M y H en suero y LCR a través de un método de ELISA fluorométrico. Este método utiliza placas recubiertas de anticuerpos monoclonales MAb 7G1 anti ficolina M y anti ficolina H. Después de la incubación con los sueros y patrones diluidos y las muestras de LCR, las ficolinas M y H que han quedado unida a la placa se le añade MAb 7G1 anti ficolina M y H biotinilado. El uso del mismo anticuerpo monoclonal para el recubrimiento de la placa y para el desarrollo del ELISA es posible debido a la estructura oligomérica de las ficolinas M y H. Luego se le añade streptavidina marcada con europium y finalmente los pocillos se leen por fluorometría [17].

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

Como proteína marcadora del paso a través de la barrera sangre-LCR se utilizó la albúmina, que fue cuantificada en ambos fluidos biológicos por inmunodifusión radial simple utilizando placas NOR y LC Partigen de la firma Siemens [14, 18, 21].



❖ *Evaluación de la síntesis intratecal de proteínas*

Los valores de concentración de las proteínas IgG, IgM, IgA y MBL analizadas fueron introducidos en los Reibergramas respectivos, el cual ofrece una representación gráfica de los valores de síntesis de cada una de las proteínas estudiadas. Todos los puntos que caen por encima de la línea más gruesa se consideran con síntesis intratecal [21].

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 $Q \text{ límite} = 0\%$ [21].

Los rangos de referencia para las razones (Q) 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 QAlb desde $1,5$ a 150×10^{-3} [21].

Al presentar las ficolinas H y M menor peso molecular, se introdujeron sus valores de concentración en sus rectas de regresión correspondientes. La regresión ofrece una representación gráfica de los valores de síntesis de cada una de las proteínas estudiadas (ficolinas M y H). Los puntos por encima de la recta gruesa se asumen como síntesis intratecal. El diseño de esta herramienta fue realizado y publicado con anterioridad por nuestro centro en colaboración con el Departamento de Neuroquímica de la Universidad de Göttingen, Alemania y con el departamento de Biomedicina de la Universidad de Aarhus, Dinamarca [19].

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

❖ *Evaluación de la función de la barrera sangre-LCR*

La razón albúmina (QA_{lb}=Albúmina LCR/Albúmina suero) fue usada para evaluar la integridad de la barrera sangre/LCR, utilizando los protocolos descritos [14, 18, 21].

El límite del rango de referencia para la QA_{lb} 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 QA_{lb} 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) [14, 18, 21].

❖ *Análisis Estadístico*



Q ficolina H es la razón de la concentración entre LCR y suero de la ficolina H.

Q ficolina M es la razón de la concentración entre LCR y suero de la ficolina M.

Se realizó la regresión lineal en el programa SigmaPlot 11.0. Para obtener las rectas de mejor ajuste, se le realizaron transformaciones logarítmicas en base 10 para las Q ficolina H y M y transformación lineal para la Q Albúmina.

❖ *Criterio de proceso inflamatorio*

El criterio de proceso inflamatorio se establece por activación de la vía clásica del sistema del complemento. Esta activación se manifiesta por síntesis intratecal de una o todas las clases mayores de inmunoglobulinas. Otro criterio menos específico es la presencia de bandas oligoclonales de tipo IgG [15-16].

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

III. RESULTADOS



Los pacientes de nuestro estudio fueron ingresados por un cuadro clínico de dengue clásico expresado por fiebre, eritema maculopapuloso cefalocaudal, artralgias, mialgias, cefalea frontal y dolor retroocular.

Manifestaciones clínicas, imagenológicas y electrofisiológicas.

Los pacientes del uno al cuatro, al séptimo día, desarrollaron un cuadro neurológico caracterizado por febrícula, alteración de la conciencia, irritabilidad, insomnio y convulsiones tónico-clónicas generalizadas; llegando dos de ellos a estar varios días en coma. También desarrollaron trastornos para la marcha, con disminución de la fuerza muscular en los miembros inferiores y déficit motor en tres de los casos.

En el examen físico se observó meningismo en dos casos, hiperreflexia osteotendinosa, Babinski positivo y alteraciones de la sensibilidad en los cuatro. 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 de los dos pacientes que evolucionaron al coma.

La resonancia magnética nuclear reveló lesiones focales a nivel del hemisferio cerebelar, vermis, lóbulo occipital izquierdo y a nivel del cuerpo caloso. 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 en un paciente 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.



	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

El paciente número cinco, que transitó con una encefalitis en la fase aguda de la enfermedad, presentó alteraciones hematológicas como leucopenia, linfocitosis, trombocitopenia y coagulación intravascular diseminada. Se registró sangramiento de encías y de la mucosa nasal espontáneos. Las manifestaciones neurológicas fueron disartria, paresia facial periférica, estrabismo convergente del ojo izquierdo con diplopía y pupilas isocóricas, con respuesta perezosa al estímulo luminoso intenso. Presentó también mioclonía y empeoramiento progresivo del nivel de la conciencia desde letargo hasta un estado comatoso con Babinski positivo. Posteriormente evolucionó con una hemicooreoatetosis.

En el estudio de la sangre se identificaron por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) proteínas antivirales contra el serotipo 2, lo que sugiere que en otro momento posterior estuvo infectado por el serotipo del VDENV-2. En este momento la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) identificó el serotipo 3.

El sexto paciente a los cuatro días del ingreso manifestó dificultad pronunciada para la marcha. El examen físico arrojó disminución de la fuerza muscular en ambos antebrazos, dolor muscular, articular y de miembros superiores e inferiores, apraxia, reflejos superficiales y profundos disminuidos. La creatina fosfoquinasa se mostró elevada, con valor de 120. La electromiografía fue compatible con un daño axonomielínico del nervio tibial izquierdo y axonal del derecho, concluyendo una forma axonal de una polineurorradiculitis post-infecciosa compatible con síndrome de Guillain Barré.

Los pacientes siete y ocho son dos hermanas con antecedentes de enfermedad atópica que ingresan el mismo día. Al tercer día de ingreso, la paciente siete presenta agitación psicomotriz y posterior evento convulsivo tónico-clónico generalizado, pérdida del estado de alerta y sin recuperación neurológica. Luego de la valoración se decide iniciar fase III de la ventilación por deterioro neurológico. Un día después, clínicamente sin reflejos del tallo, se decide inicio de protocolo para muerte encefálica, con realización de 3 electroencefalogramas en los cuales se reporta sin actividad eléctrica, se realizó tomografía de cráneo en fase simple donde se observa herniación de tipo nucal así como edema cerebral severo.



	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

Se mantiene soporte general durante su estancia y presenta tendencia a la falla orgánica. Al quinto día, en ausencia de tensión arterial, pulsos, reflejos del tallo, frecuencia cardiaca, por telemetría con línea isoeletrica se decide su fallecimiento.



En el caso de la paciente número ocho, la evolución fue más rápida. En horas de la mañana del segundo día presentó evento convulsivo tónico-clónico generalizado de 30 minutos de duración. En el examen físico se encuentra espasticidad e hipotermia generalizada, con midriasis bilateral requiriendo manejo invasivo de la vía aérea. En la TAC simple de cráneo se aprecia edema cerebral severo, con predominio en hemisferio derecho por colapso ventricular, no datos de isquemia o hemorragia. Seis horas después se establece muerte encefálica caracterizada por midriasis bilateral sin respuesta fotomotora. Se le realizan dos EEG donde se muestra trazo isoeletrico. Al tercer día, en ausencia de tensión arterial, pulsos, reflejos del tallo, frecuencia cardiaca, por telemetría con línea isoeletrica se decide su fallecimiento.

El paciente número nueve, al sexto día comenzó con debilidad muscular de carácter progresivo e incontinencia urinaria. En el examen físico se constató una paraplejia con nivel motor dorsal medio. Fuerza muscular de los miembros superiores preservada (4/5 MRC), miembros inferiores (0/5 MRC), con hipotonía de ambos miembros inferiores e hipotrofia de los músculos interóseos de ambas manos. Arreflexia en los miembros inferiores. No presentó clonus, signo de Hoffman ni de Babinski. Con anestesia superficial y profunda con nivel lesional en D5. No signos meníngeos ni cerebelosos. La resonancia magnética nuclear no mostró signos de compresión mecánicas de la medula espinal.

La paciente número diez, además del cuadro clínico clásico del dengue presentó en el momento del ingreso cefalea acentuada, dolor de espalda, fotofobia y letargo. En el examen físico se constata rigidez de nuca con signo de Brudzinski positivo. En el fondo de ojo no se apreció papiledema.

 <p>UNIVERSIDAD CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA</p>	<p style="text-align: center;">Informe de Investigación</p> <hr/> <p style="text-align: center;">Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.</p>	 <p style="text-align: center;">LABCEL</p>
--	--	--

El paciente número once, dos semana después del egreso es ingresado nuevamente por presentar un cuadro neurológico caracterizado por cefalea constante y pertinaz, resistente a la Dipirona y al Paracetamol; con períodos alternos de obnubilación y lucidez, alteraciones cognitivas, trastornos conductuales y un cuadro de convulsiones tónico-clónicas generalizado. En el examen físico se constata hemiparesia izquierda no acentuada, con hiperreflexia osteotendinosa y Babinski positivo. Puesto que la RTPCR fue negativa se decide realizar ELISA para identificar el serotipo al que estuvo expuesto, resultando positivo para anticuerpos antiVDEN-2.



	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

Datos generales y características citoquímicas del LCR.

En la tabla 1 se muestran las características citoquímicas del LCR de cada paciente y el trastorno neurológico desarrollado.



Tabla 1. Asociación entre las características cito-bioquímicas del LCR y el trastorno neurológico desarrollado.

Pacientes	Edad	Sexo	Análisis cito-bioquímico del LCR	Trastorno neurológico
1	44	F	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa normal. • Pandy positivo X. • Proteínas totales 0,6 g/L • Pleocitosis linfocitaria (150 células). • Anticuerpos antiVDEN-2 positivos. • *RTPCR para VDEN-2 positiva. 	Encefalomiелitis diseminada aguda post-infecciosa.
2	56	M	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa normal. • Pandy positivo X. • Proteínas totales 0,75 g/L. • Pleocitosis linfocitaria (200 células). • Anticuerpos antiVDEN-2 positivos. • *RTPCR para VDEN-2 positiva. 	Encefalomiелitis diseminada aguda post-infecciosa.
3	35	M	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa normal. • Pandy positivo XX. • Proteínas totales 1,4 g/L. • Pleocitosis linfocitaria (250 células). • Anticuerpos antiVDEN-2 positivos. • *RTPCR para VDEN-2 positiva. 	Encefalomiелitis diseminada aguda post-infecciosa.
4	39	F	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa normal. • Pandy positivo XX. • Proteínas totales 0,9 g/L. • Pleocitosis linfocitaria (200 células). • Anticuerpos antiVDEN-2 positivos. • *RTPCR para VDEN-2 positiva. 	Encefalomiелitis diseminada aguda post-infecciosa.
5	26	M	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa normal. • Pandy positivo X. • Proteínas totales 0,5 g/L. • Pleocitosis linfocitaria (300 células). • Anticuerpos antiVDEN-2 positivos. • Anticuerpos antiVDEN-3 positivos. • *RTPCR para VDEN-3 positiva. 	Encefalitis aguda para-infecciosa y hemicoreatetosis.

	Informe de Investigación		
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.		

6	45	M	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa normal. • Pandy positivo XXX. • Proteínas totales 11 g/L. • Celularidad cero. • Anticuerpos antiVDEN-2 positivos. • *RTPCR para VDEN negativa. 	Síndrome de Guillain Barre.
7	15	F	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa normal • Pandy positivo XX. • Proteínas totales 0,9 g/L. • Pleocitosis linfocitaria (200 células). • Anticuerpos antiVDEN-1 positivos. • *RTPCR para VDEN-1 positiva. 	Muerte encefálica por edema cerebral citotóxico.
8	17	F	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa normal • Pandy positivo XX. • Proteínas totales 1,0 g/L. • Pleocitosis linfocitaria (600 células). • Anticuerpos antiVDEN-1 positivos. • *RTPCR para VDEN-1 positiva. 	Muerte encefálica por edema cerebral citotóxico.
9	49	M	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa normal. • Pandy positivo XXX. • Proteínas totales 5 g/L. • Pleocitosis linfocitaria (100 células). • Anticuerpos antiVDEN-3 positivos. • *RTPCR para VDEN-3 positiva. • Bandas oligoclonales de IgG negativas. 	Mielitis transversa para-infecciosa.
10	45	F	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa normal. • Pandy positivo XX. • Proteínas totales 0.7 g/L. • Pleocitosis linfocitaria (500 células). • Anticuerpos antiVDEN-3 positivos. • *RTPCR para VDEN-3 positiva. 	Meningoencefalitis aguda para-infecciosa.
11	39	M	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa normal. • Pandy positivo X. • Proteínas totales 0.7 g/L. • Pleocitosis linfocitaria (350 células). • Linfocitos B auto-reactivos y ANA = 80. • Anticuerpos antiVDEN-2 positivos. • *RTPCR para VDEN negativa. 	Encefalitis autoinmune post-infecciosa.

*RTPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; VDEN: virus del dengue; ANA: anticuerpo antinuclear.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

Evaluación la ocurrencia de síntesis intratecal de las clases mayores de inmunoglobulinas y el estado de la barrera sangre/LCR.



En la Tabla 2, se representan las frecuencias de aparición de los patrones de síntesis intratecal de las clases mayores de inmunoglobulinas, así como el comportamiento de su fracción intratecal.

Tabla 2: Patrones de síntesis intratecal de las clases mayores de inmunoglobulinas y comportamiento de su fracción intratecal.

Patrones	Frecuencia	Comportamiento	Frecuencia
Tres clases	7/11	IgG>IgM>IgA	4
		IgA>IgM>IgG	2
		IgM>IgG>IgA	1
Una clase	3/11	IgG	2
		IgM	1
Sin síntesis	1/11		

De manera general se observó un predominio del patrón que involucra a las tres clases de inmunoglobulinas mayores. Se presentaron además patrones de síntesis de una sola inmunoglobulina y un solo paciente no presentó síntesis intratecal.

Como es posible apreciar, de forma general hubo un predominio de un alto por ciento de síntesis intratecal de IgG en relación a la IgM e IgA. El predominio de IgA solo se observó en los trastornos post-infecciosos.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

En la Figura 1 se observan las Q Albúminas de los pacientes en relación con la Q de las inmunoglobulinas mayores de los pacientes estudiados.

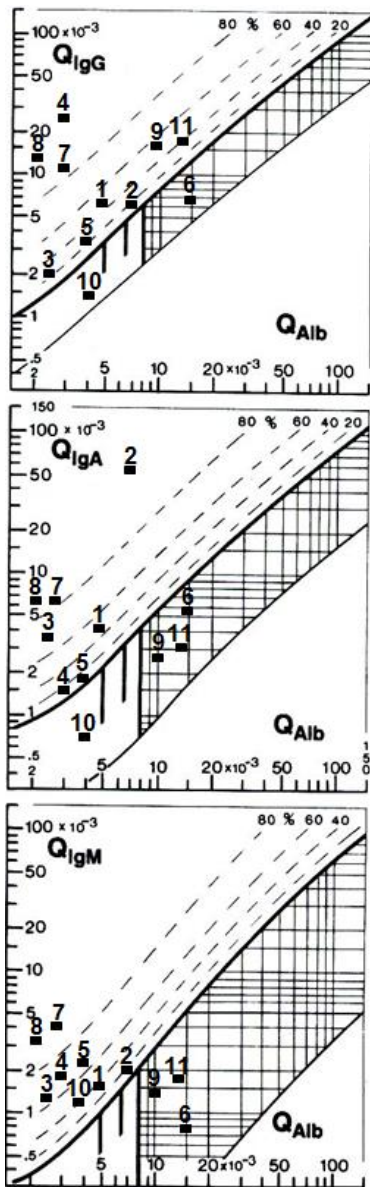




Figura 1. Reibergrama de las clases principales de inmunoglobulinas de los pacientes con manifestaciones neurológicas por virus del dengue. Reibergramas o diagramas de las razones de Reiber para IgG, IgA e IgM. Se basan en la relación hiperbólica entre la razón albúmina (QAlb) y las razones de inmunoglobulinas (QIg). La línea hiperbólica más fuerte señala el límite entre la fracción de inmunoglobulinas derivada de la sangre y la fracción sintetizada en el Sistema Nervioso Central. Si el punto se sitúa por encima de la curva más fuerte, existe síntesis intratecal de IgA, IgM o IgG según el caso. Las líneas de puntos son líneas percentiles que indican las diferentes fracciones intratecales (FI) en un tanto por ciento (%) que indica el porcentaje de inmunoglobulina sintetizada localmente. También el reibergrama brinda información sobre la barrera sangre-LCR; la primera barra vertical (Qalb= 5) indica el límite superior normal hasta los 15 años, la segunda (Qalb= 6,5) hasta los 40 años y la tercera (Qalb= 8) hasta los 60 años. Valores superiores a éstos, de acuerdo con la edad, indican una disfunción de la barrera sangre-LCR [15, 16, 20, 21]. La numeración corresponde al paciente con igual número asignado.

Como se evidencia en la figura 1, de forma general se aprecia integridad de la barrera sangre/LCR en la mayoría de los casos estudiados, tan solo tres casos cursaron con disfunción de la misma.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

Determinación de la ocurrencia de síntesis intratecal de la lectina de unión a la manosa (MBL).

En la Figura 2 se observa el reibergrama para la síntesis intratecal de la MBL de los pacientes estudiados.

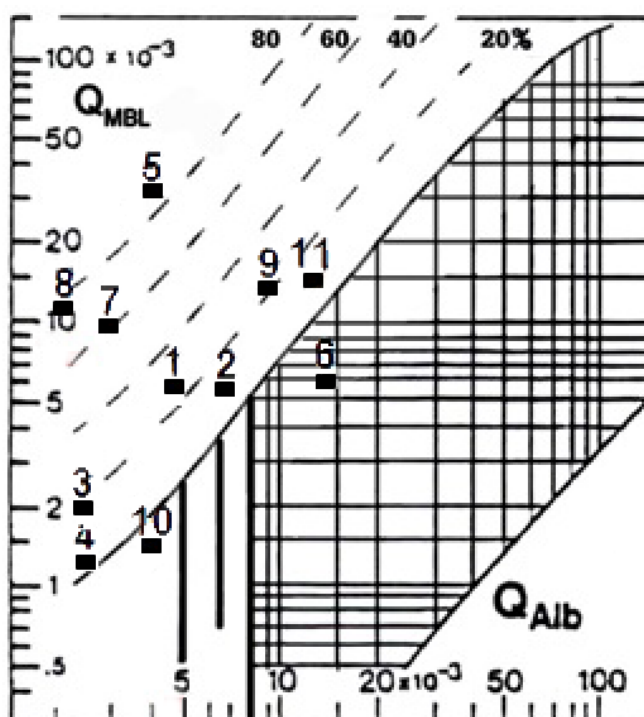




Figura 2. Resultado del reibergrama o diagrama de las razones de Reiber para las MBL de los pacientes con proceso inflamatorio asociada al virus del dengue. Estos fueron representados por cuadrados de color negro.

Como puede observarse en la Figura 2, la mayoría de los pacientes presentaron síntesis intratecal de MBL. El caso cinco presentó una fracción intratecal por encima del 80 percentil. Tan solo dos pacientes no presentaron síntesis intratecal de MBL.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

Determinación de la ocurrencia de síntesis intratecal de las ficolinas H y M.

En la figura 3 se observa la recta de regresión para determinar la ocurrencia de síntesis intratecal de ficolina H en los pacientes estudiados.

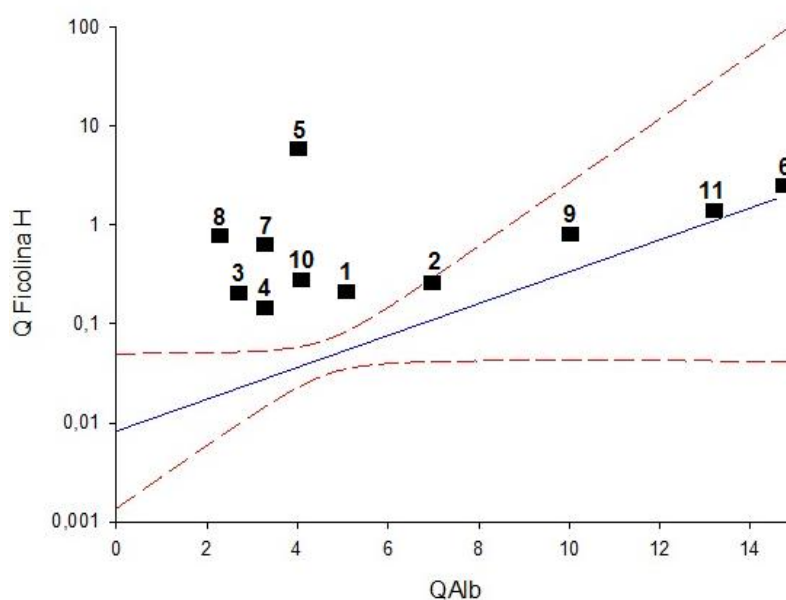


Figura 3. Regresión de las concentraciones de la Q ficolina H de los pacientes estudiados.

Como se muestra, la Q Ficolina H de cada paciente sobrepasa la recta de regresión, por tanto, se asume que hay síntesis intratecal de ficolina H en todos los casos.

Llama la atención la alta concentración de esta proteína en el caso número cinco.

En la figura 4 se muestra la recta de regresión para determinar la ocurrencia de síntesis intratecal de ficolina M en los pacientes estudiados.

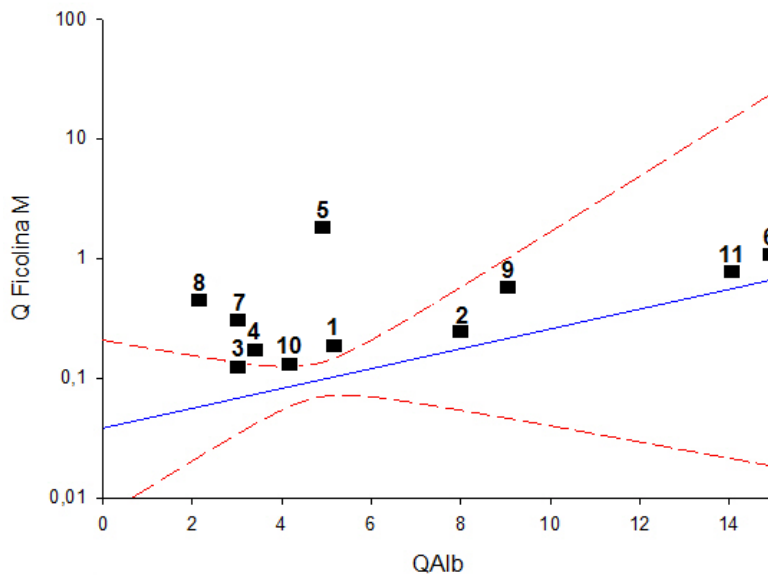




Figura 4. Regresión de las concentraciones de la Q ficolina M de los pacientes estudiados.

Como se muestra, la Q Ficolina M de cada paciente sobrepasa la recta de regresión, por tanto, se asume que hay síntesis intratecal de ficolina M en todos los casos.

Llama la atención la alta concentración de esta proteína en el caso número cinco.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	



Resumen del estudio neuroinmunológico

Los pacientes del uno al cuatro presentaron patrón de tres clases, con altos por cientos de síntesis intratecal de IgG para dos de ellos y de IgA para los dos restantes. Además, no presentaron disfunción de la barrera sangre/LCR. Se constata síntesis intratecal de MBL y de Ficolinas H y M en los cuatro casos, sugiriendo activación de la vía clásica y de las lectinas del sistema del complemento en el sistema nerviosos central. Se establece criterio de proceso inflamatorio del sistema nervioso central.

El quinto paciente presentó patrón de tres clases con altos por cientos de síntesis intratecal de IgM sin disfunción de la barrera sangre/LCR. En este paciente se cuantificaron altos niveles de síntesis de proteínas activadoras de la vía de las lectinas. Se asume entonces activación intratecal de la vía clásica y de las lectinas del sistema del complemento en el sistema nerviosos central. Se establece criterio de proceso inflamatorio del sistema nervioso central.

El paciente número seis no presentó síntesis intratecal de inmunoglobulinas mayores pero si disfunción de la barrera sangre/LCR. Además, se estableció una deficiencia de MBL en contraste con las ficolinas H y M. Es correcto decir que a pesar de no tener activa la vía clásica del sistema del complemento se encuentra activa la vía de las lectinas. No se establece criterio de proceso neuroinflamatorio. Se estableció por técnicas genéticas que esta paciente padecía una deficiencia congénita de MBL.



Los pacientes siete y ocho, presentaron patrón de síntesis de tres clases de inmunoglobulinas, con mayor fracción intratecal de IgG. No se presentó en estos casos disfunción de la barrera sangre/LCR aun a pesar del edema cerebral presentado como complicación en ambos casos. El edema cerebral fue de tipo citotóxico. Estos casos presentaron activación intratecal tanto de la vía clásica como de la vía de las lectinas del sistema del complemento en el sistema nervioso central. Se establece criterio de proceso inflamatorio del sistema nervioso central.

 <p>UNIVERSIDAD CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA</p>	<p style="text-align: center;">Informe de Investigación</p> <hr/> <p style="text-align: center;">Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.</p>	 <p style="text-align: center;">LABCEL</p>
--	--	--

El paciente número nueve presentó patrón de síntesis intratecal de una sola clase, la IgG y disfunción de la barrera sangre/LCR. En este paciente se demostró síntesis intratecal de proteínas activadoras de la vía de las lectinas. Se asume entonces activación intratecal de la vía clásica y de las lectinas del sistema del complemento en el sistema nervioso central. Se establece criterio de proceso inflamatorio del sistema nervioso central.

El paciente diez cursó con patrón de síntesis intratecal de una sola clase, la IgM, sin disfunción de la barrera sangre/LCR. Este paciente mostró deficiencia de la síntesis intratecal de MBL pero si se constató síntesis intratecal de Ficolinas H y M, por tanto es válido plantear que se encuentra activada tanto la vía clásica como la de las lectinas del sistema del complemento en el sistema nervioso central. Se establece criterio de proceso inflamatorio del sistema nervioso central. Por técnicas genéticas se determinó que este caso presentaba deficiencia congénita en la síntesis de MBL.

El paciente once presentó patrón de síntesis de una clase, la IgG con disfunción de la barrera sangre/LCR. Además, se pudo demostrar altos por cientos de síntesis intratecal de proteínas activadoras de la vía de las lectinas en este paciente, por lo que se asume que se encuentra activa tanto de la vía clásica como de la vía de las lectinas del sistema del complemento en el sistema nervioso central. Se establece criterio de proceso inflamatorio del sistema nervioso central.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	



IV. DISCUSIÓN

Las complicaciones neurológicas del dengue es un fenómeno nuevo en Cuba [22] y aun no se reporta en países donde no concomitan diversos serotipos que afecten a la población simultáneamente. Debido a que los distintos serotipos del VDEN fueron entrando en nuestro país de una forma secuencial y sin ocurrencia simultánea de varios serotipos al mismo tiempo hasta fechas recientes, pudiera esta ser una posible explicación a esta observación [23].

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 [23-24].

Observaciones recientes indican que el espectro clínico del dengue está cambiando y las manifestaciones clínicas atípicas están siendo más frecuentemente reportadas. La incidencia de la variedad de estas complicaciones se desconoce. Encefalitis, mielitis, meningitis y síndrome de Guillain Barré son los trastornos neurológicos más importantes asociados al dengue [13]. Estos datos coinciden con nuestro estudio, pues en la variedad de afectaciones neurológicas presentadas por nuestros pacientes se destaca la mielitis transversa, la encefalitis, la encefalomielitis diseminada aguda, la meningoencefalitis y el síndrome de Guillain Barré.

En Brasil existe mucha experiencia en pacientes con manifestaciones neurológicas asociadas a VDEN. En sus trabajos se destaca también la presencia de complicaciones neurológicas más atípicas aun, tales como la muerte encefálica y la encefalitis autoinmune [25]. Estos datos también coinciden con lo presentado en nuestro estudio. Coincidencia relevante si tomamos en cuenta que existe relación epidemiológica pues en ambas naciones circulan los cinco serotipos del VDEN y se fueron estableciendo de forma gradual y secuencial.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	



Las manifestaciones neurológicas se encuentran asociadas principalmente con los serotipos VDEN-2 y VDEN-3. Se plantea que una infección previa con un serotipo diferente, incrementa la posibilidad de desarrollar las manifestaciones hemorrágicas del virus. Esto es debido a un fenómeno denominado “amplificación dependiente de anticuerpo” (del inglés “antibody dependent enhancement”), en el cual los anticuerpos heterópicos no neutralizantes forman complejos con el virus dengue, el cual infecta el sistema fagocítico mononuclear, aumentando su eficacia. Consecuentemente, un elevado número de células en el hospedero están infectadas, incrementando la replicación viral y empeorando los signos clínicos, lo cual pudiera contribuir a desarrollar las complicaciones neurológicas [26]. En nuestro estudio pudo demostrarse y vincular el daño neurológico no solo a los serotipos VDEN-2 y VDEN-3 como ya ha sido ampliamente demostrado, sino que se reporta por primera vez en Cuba y América Latina la muerte encefálica asociada al serotipo VDEN-1.

Se evidenció también la experiencia previa y causal en las manifestaciones neurológicas, pues en el caso número cinco se logró relacionar la sensibilización por dos serotipos secuenciales ocurrida en diferentes momentos.

La respuesta inmune dentro del SNC tiene la característica de que se ausenta el cambio o *switch* que se produce normalmente de clase IgM a clase IgG por lo que evidentemente existe una diferencia en la respuesta inmune sistémica y la respuesta inmune intratecal [15-16].

Con respecto a la síntesis intratecal de inmunoglobulinas, se ha demostrado que tanto en enfermedades autoinmunes como infecciosas del SNC, la presencia de fracción intratecal sintetizada localmente indica inequívocamente la existencia de un proceso inflamatorio en el SNC [15-16, 21, 27]. Por tal motivo el reibergrama es una herramienta indispensable, pues no solo nos permite caracterizar la dinámica intratecal sino también el estado funcional de la barrera sangre/LCR [15].

Como se demostró en nuestro estudio el empleo del reibergrama contribuye al diagnóstico del proceso neuroinflamatorio.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	



En casos como el Guillain Barré, donde no se constata síntesis intratecal de inmunoglobulinas mayores, el reibergrama permite evaluar el estado de la barrera sangre/LCR. Esto constituye una herramienta más para los servicios diagnósticos en Medicina.

Se ha reportado que en pacientes con alteraciones neurológicas asociadas al VDEN el análisis citoquímico del LCR puede resultar normal, lo cual no excluye el diagnóstico de manifestaciones neurológicas asociadas al VDEN. Se plantea que hasta un 50% de los pacientes con encefalitis pueden presentar un estudio citoquímico normal [2, 28]. Es válido señalar que en nuestro estudio el análisis citoquímico de todos los casos se presentó alterado y con rasgos característicos de cada manifestación.

Debido al tamaño de la muestra no es posible establecer una relación que vincule el predominio de síntesis con la manifestación neurológica. Como a medida que se van en aumento los casos de dengue con estas manifestaciones tal vez con mayor número de pacientes se pudiera asociar estadísticamente otros vínculos y de estos establecer alguna relación de importancia clínica y neuroinmunológica.

Puccioni-Sohler plantea que el proceso neuroinflamatorio asociado con las manifestaciones neurológicas en el VDEN como la encefalitis, mielitis y meningitis, el LCR está acompañado de una pleocitosis e hiperproteínorraquia, disfunción de la barrera sangre/LCR ($Qalb \geq 8 \times 10^{-3}$) y síntesis intratecal de IgG total (Índice IgG ≥ 0.7) y que el Guillain Barré se presenta con una disociación albúmina/citológica [2, 29]. En nuestro estudio las características citoquímicas del LCR coinciden con lo antes planteado, difiere en la disfunción de la barrera pues tan solo tres casos cursaron con alteraciones en la integridad de la misma. Otra diferencia es que la síntesis de IgG no fue total, pues aunque de forma general fue la inmunoglobulina predominante, se advirtió predominio en algunos casos de IgA e IgM.

Existen evidencias que sugieren que las manifestaciones clínicas en el Guillain Barré son el resultado de una reacción inmunológica mediada por células. La reacción autoinmune puede ocurrir después de la infección del VDEN [30], como es el caso que nos ocupa, siendo resultado de la deposición de inmunocomplejos en el SNC [30-31]. Con semejante fisiopatología se puede vincular la encefalitis autoinmune [31].

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	



El síndrome de Guillain Barré ha sido descrito en un 30 % de las manifestaciones neurológicas asociadas al VDEN [12, 30]. La presentación clínica del Guillain Barré inducida por el dengue es similar a las que se producen causadas por otras infecciones, con paraparesia ascendente como principal signo [12].

Se ha reportado que el síndrome de Guillain Barré, independiente de la etiología presenta un patrón característico de disfunción de la barrera sangre/LCR sin síntesis intratecal de inmunoglobulinas [15-16, 31-32]. Estos datos permiten diferenciar esta entidad con respecto al proceso neuroinflamatorio aun cuando el agente etiológico es el mismo.

Con respecto a la integridad de la barrera sangre/LCR en enfermedades producidas por virus, se ha podido relacionar su estado con entidades específicas, lo que ha permitido caracterizarlas. Por ejemplo, en la encefalitis asociada al citomegalovirus, se observa una marcada disfunción de la barrera sangre/LCR [15-16], sin embargo en la encefalitis por virus del herpes simple tanto en el tipo 1 como 2 no se presenta alteraciones de la barrera, aun cuando estos virus pertenecen a la misma familia [16]. El neuroSIDA no cursa con disfunción de la barrera sangre/LCR [15]. Sin embargo nuestros casos, aunque no de manera predominante, presentaron alteraciones en la integridad de la barrera. Es por este motivo que no es posible establecer un patrón que caracterice a esta entidad en cuanto al estado de la barrera sangre/LCR en nuestro estudio.

Nuestros resultados difieren de lo presentado por otros autores sobre la integridad de la barrera sangre/LCR en esta entidad [2].

La deficiencia de MBL se ha asociado al padecimiento de enfermedades infecciosas del SNC, sobre todo de meningoencefalitis de múltiples etiologías [33]. En nuestro estudio se pudo comprobar la afirmación anterior puesto que el paciente con deficiencia de MBL curso con meningoencefalitis por dengue.



	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

Tanto la MBL como las ficolinas H y M forman complejos y se consideran moléculas de reconocimiento que pueden ser activadas por la presencia de carbohidratos presentes en la superficie de los microorganismos, incluyendo los virus [34-36]. Por tal motivo asumimos la posibilidad de que estas proteínas presenten receptores que reconozcan los ligandos presentes en la superficie del VDEN.

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 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 [34]. Esto explicaría la el por qué, aun estando activada esta vía, la gravedad de la sintomatología. Como mostró el caso cinco, que fue el que mayor fracción intratecal de estas proteínas sintetizó, sin embargo mostró un cuadro agudo más grave donde no solo se presentaron alteraciones neurológicas sino también hematológicas.

Las ficolinas pueden unirse al MASP2 [35-36] y a la MBL [34] y ser utilizado para neutralizar al VDEN y esto pudiera provocar una disminución de sus concentraciones libres. Sin embargo, todo parece indicar que la síntesis intratecal de las ficolinas H y M libre se observa claramente en los pacientes afectados, dados por la fracción soluble que se sintetiza y se detecta en el LCR de los casos estudiados. Esto pudiera indicar una ineffectividad de la vía de las lectinas en la respuesta ante la infección por VDEN en el SNC.

Es bien conocido que las ficolinas M y H intervienen en la vía de las lectinas [35-36] asociadas a la MBL que es otra pieza clave en la iniciación de este proceso [34]. Lo que se desconocía hasta hace muy poco es que las ficolinas para estabilizar su polimerización de varios monómeros utilizan el fibrinógeno. Esto se sospecha sea la causa, hasta ahora desconocida, de la coagulación intravascular diseminada para-infecciosa [37]. El caso que cursó con mayor síntesis intratecal de ficolinas H y M desarrolló coagulación intravascular diseminada, fenómeno que hacemos dependiente de lo antes planteado.



	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

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 vacunares se encuentran en la Fase I y II de estudios clínicos y otros se encuentran en una fase preclínica avanzada ^[23], aunque confeccionar una vacuna para el dengue es complejo debido a que se necesita desarrollar una vacuna contra los cinco serotipos ^[1].

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 vacunar ^[23].

Este es el segundo reporte de afectaciones neurológicas en pacientes cubanos con dengue. El conocimiento del proceso neuroinflamatorio asociado al VDEN resulta de importancia para el manejo de los pacientes con manifestaciones neurológicas cada vez más frecuentes en nuestro medio. Resulta esencial para el mejor tratamiento y evolución de estos pacientes determinar si existe síntesis intratecal de inmunoglobulinas, elemento clave para el diagnóstico de la neuroinflamación y además conocer el funcionamiento de la barrera sangre/LCR para comprobar el síndrome de Guillain Barré.

En nuestro estudio todos los pacientes con proceso neuroinflamatorio asociado al VDEN presentaron síntesis intratecal de al menos una de las clases mayores de inmunoglobulinas, así como síntesis intratecal de proteínas activadoras de la vía de las lectinas. Lo antes planteado corrobora nuestra hipótesis de que en los pacientes con proceso inflamatorio asociado al VDEN se encuentran activa tanto la vía clásica como de las lectinas del sistema del complemento en el SNC.

	Informe de Investigación	
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	

V. CONCLUSIONES

Este es el segundo estudio neuroinmunológico de manifestaciones neurológicas asociada al VDEN y el primero sobre la vía de las lectinas en esta entidad realizado en Cuba.

En este estudio se pudo demostrar la activación intratecal tanto de la vía clásica como de las lectinas del sistema del complemento en el SNC.



Se determinó el patrón de síntesis intratecal predominante en pacientes con proceso inflamatorio asociado al VDEN.

Se determinó que el estado de la barrera sangre/LCR en los pacientes con proceso inflamatorio asociado al VDEN no constituye un signo distintivo.

Se reporta por primera vez en Cuba y América Latina la ocurrencia de complicaciones neurológicas asociadas al serotipo VDEN-1.



Se demuestra que el patrón de síntesis intratecal constituye un elemento clave para el diagnóstico auxiliar de la neuroinflamación.

Se plantea la ineffectividad de la vía de las lectinas en la respuesta ante la infección por VDEN en el SNC y su asociación con el debut de la coagulación intravascular diseminada.

 <p>UNIVERSIDAD CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA</p>	Informe de Investigación	 <p>LABCEL</p>
	Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.	



VI. RECOMENDACIONES

1. Considerar el patrón de síntesis intratecal como criterio para el diagnóstico auxiliar de la neuroinflamación.
2. Considerar este estudio a la hora de elegir candidatos vacunares contra el virus del dengue como marcador de la respuesta neuroinmunológica en esta entidad.



 <p>UNIVERSIDAD CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA</p>	<p style="text-align: center;">Informe de Investigación</p> <hr/> <p style="text-align: center;">Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.</p>	 <p style="text-align: center;">LABCEL</p>
--	--	--

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Thomas SJ, Endy TP. Critical issues in dengue vaccine development. *Curr Opin Infect Dis.* 2011; 24:442-50.
2. Puccioni-Sohler M, Rosadas C, Cabral-Castro MJ. Neurological complications in dengue infection: a review for clinical practice. *Arq Neuropsiquiatr.* 2013; 71(9-B):667-671.
3. Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol.* 2005; 2(1):1-7.
4. Simmons CP, Farrar J. Changing Patterns of Dengue Epidemiology and Implications for Clinical Management and Vaccines. *PLoS Med.* 2009; 6 (9):e1000129.
5. Liu-Helmersson J, Quam M, Wilder-Smith A, Stenlund H, Ebi K, Massad E, et al. Climate Change and Aedes Vectors: 21st Century Projections for Dengue Transmission in Europe. *EBioMedicine.* 2016; 7: 267-77. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.03.046.
6. Succo T, Leperc-Goffart I, Ferré JB, Roiz D, Broche B, Maquart M, et al. Autochthonous dengue outbreak in Nîmes, South of France, July to September 2015. *Euro Surveill* 2016; 21(21). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.21.30240.
7. Rezza G. Dengue and other Aedes-borne viruses: a threat to Europe? *Euro Surveill* 2016; 21(21). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.21.30238.
8. Deepak M, Basavaprabhu A, Ramapuram JT, Chowta N, Laxman M, Mahalingam S. Dengue encephalitis-a rare manifestation of dengue fever. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014; 4(Suppl 1): S70–S72.
9. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 22:564-81.

 <p>UNIVERSIDAD CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA</p>	<p>Informe de Investigación</p> <hr/> <p>Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.</p>	 <p>LABCEL</p>
--	--	--

10. Sulekha C, Kumar S, Philip J. Guillain-Barre syndrome following dengue fever. *Indian Pediatr.* 2013; 41:948-50.
11. Misra UK, Kalita J, Syam UK, Dhole TN. Neurological manifestations of dengue virus infection. *J Neurol Sci.* 2014; 244:117-22.
12. Carod-Artral FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascon J. Neurological complication of dengue infection. *Lancet Neurol.* 2013; 12(9):906-19.
13. Karoli R, Siddiqi Z, Fatima J, Maini S. Was it a case of acute disseminated encephalomyelitis? A rare association following dengue fever. *J Neurosci Rural Pract.* 2013; 4(3):318-21.
14. Padilla-Docal B, Wainshtok-Tomás D, Martínez-Larrarte J, Rivero-Arias E, Herrera-Wainshtok A, Callo-Barroso J, Dorta-Contreras AJ. Respuesta neuroinmunológica en la encefalitis asociada al virus del dengue. *VacciMonitor.* 2013; 22(3):9-13.
15. Reiber H. Cerebrospinal fluid data compilation and knowledge-based interpretation of bacterial, viral, parasitic, oncological, chronic inflammatory and demyelinating diseases. *Diagnostic patterns not to be missed in neurology and psychiatry Arq Neuropsiquiatr* 2016; 74 (4): 337-350 DOI: 10.1590/0004-282X20160044.
16. Reiber H. Knowledge-base for interpretation of cerebrospinal fluid data patterns. *Essentials in neurology and psychiatry. Arq Neuropsiquiatr* 2016; 74 (6):501-512. DOI: 10.1590/0004-282X20160066.
17. Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013; 2: 346-353.
18. Padilla-Docal B, Ramírez Agüera PJ, Reiber H, Jensenius JC, Dorta-Contreras AJ. Reibergrama para evaluar la síntesis intratecal de Lectina de unión a Manosa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 2014; 33(2): 1-12.

 <p>UNIVERSIDAD CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA</p>	<p>Informe de Investigación</p> <hr/> <p>Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.</p>	 <p>LABCEL</p>
--	--	--

19. González-Losada C, Christian-Jensenius J, Reiber H, Dorta Contreras AJ, Ficolinas M y H: Dinámica y agregación de la sangre al líquido cefalorraquídeo. *Arq Neuropsiquiatr* 2015; 74 (3-A):589-591.
20. Hernández-Ávila M, Lazcano-Ponce E, Hernández-Ávila JE, Alpuche-Aranda CM, Rodríguez-López MH, García-García L, et al. Análisis de la evidencia sobre eficacia y seguridad de la vacuna de dengue CYD-TDV y su potencial registro e implementación en el Programa de Vacunación Universal de México. *Salud pública Méx.* 2016; 58(1): 0036-3634.
21. Dorta-Contreras AJ. Respuesta poliespecífica en el sistema nervioso central: uso del índice de anticuerpo. *Rev Neurol.* 2000; 31:1070-3.
22. Padilla-Docal B, Wainshtok-Tomás D, Martínez-Larrarte J, Rivero-Arias E, Herrera-Wainshtok A, Callol-Barroso J, Dorta-Contreras AJ. Respuesta neuroinmunológica en la encefalitis asociada al virus del dengue. *VacciMonitor.* 2013; 22(3):9-13.
23. Guzman MG, Harris E. Dengue. *The Lancet.* 2015; 385 (9966): 453-65.
24. Hsu YL, Wang MY, Ho LJ, Lai JH. Dengue virus infection induces interferon-lambda1 to facilitate cell migration. *Sci Rep.* 2016; 6: 24530. doi: 10.1038/srep24530.
25. Puccioni-Sohler M, Orsini M, Soares CN. Dengue: a new challenge for neurology. *Neurol Int.* 2012; 4(3):65-70.
26. Soares CN, Cabral-Castro M.J, Peralta JM, Freitas MR G. Puccioni-Sohler M. Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: report of a case. *J Int Infec Dis.* 2010; 14(2):150-2.
27. Dorta-Contreras AJ. Pattern of intrathecal immunoglobulin synthesis in pediatric patients with infectious meningoencephalitis. *Biotechnol Apl.* 2006; 4: 382-6.
28. Puccioni-Sohler M, Soares CN, Papaiz-Alvarenga R, Castro MJC, Faria LC, Peralta JM. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. *Neurology.* 2009; 73(17):1413-7.

 <p>UNIVERSIDAD CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA</p>	<p>Informe de Investigación</p> <hr/> <p>Proceso neuroinflamatorio en pacientes con virus del dengue. Bases para la selección de candidatos vacunares.</p>	 <p>LABCEL</p>
--	--	--

29. Wildemann B, Oschmann P, Reiber H, editores. Laboratory diagnosis in neurology. Stuttgart: Thieme; 2010.
30. Nascimento Soares C, Cabral-Castro M, Oliveira C, Claudio Faria L, Mauro Peralta J, Gomes de Freitas MR, Puccioni-Sohler M. Oligosymptomatic dengue infection. A potential cause of Guillain Barré síndrome. *Arq Neuropsiquiatr.* 2008; 66(2A):234-237.
31. Dorta-Contreras AJ, Silva-Somoza R. Neuroimmunological findings in Guillain Barré syndrome, multiple sclerosis and idiopathic polyneuropathies. *Mol Chem Neuropathol.* 1996; 28(1-3):279-84.
32. Correale J, Villa A. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochem Res.* 20011; 34:2067–77. doi: 10.1007/s11064-009-0081.
33. Padilla-Docal B, Dorta-Contreras AJ, Bu-Coifiu-Fanego R, Martínez-Alderete RH, de Paula-Almeida OS, Reiber H, et al. Mannose-binding lectin deficiency with eosinophilic meningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in children: a case series. *Journal of Medical Case Reports.* 2011; 5: 330.
34. Favoreel HW, Van de Walle GR, Nauwynck HJ, Pensaert MBL. Virus complement evasion strategies. *Journal of General Virology.* 2014; 84(1):1-15.
35. Kjaer TR, Hansen AG, Sørensen UB, Nielsen O, Thiel S, Jensenius JC. Investigations on the pattern recognition molecule M-ficolin: quantitative aspects of bacterial binding and leukocyte association. *J Leukoc Biol.* 2011; 90:425–37.
36. Hein E, Honore C, Skjoedt M-O, Munthe-Fog L, Hummelshøj T, et al. Functional Analysis of Ficolin-3 Mediated Complement Activation. *PLoS ONE.* 2011; 5(11): e15443. doi:10.1371/journal.pone.0015443.
37. Hansen SWK, Ohtanib K, Roy N, Wakamiya N. The collectins CL-L1, CL-K1 and CL-P1, and their roles in complement and innate immunity. *Immunobiology.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2016.05.012>.