

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”**

**DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA**

**Polimorfismo del Receptor FcγRIIIa. Influencias  
en la patogénesis y en la evolución de la infección  
por virus dengue.**

*Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en  
Ciencias de la Salud*

**Autor: Lic. Gissel García Menéndez, MSc**

**Asesores: Dra. María G. Guzmán, DrCs**

**Dr. Luis Fonte Galindo, DrC**

**Lic. Lizet Sánchez, DrC**

**Ciudad de la Habana**

**2010**

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”  
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA**

**Polimorfismo del Receptor FcγRIIa. Influencias  
en la patogénesis y en la evolución de la infección  
por virus dengue.**

*Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en  
Ciencias de la Salud*

**Autor: Lic. Gissel García Menéndez, MSc**

**Asesores: Dra. María G. Guzmán, DrCs**

**Dr. Luis Fonte Galindo, DrC**

**Lic. Lizet Sánchez, DrC**

**Ciudad de la Habana**

**2010**

*"Donde yo encuentro poesía mayor es en los libros de ciencia,  
en la vida del mundo, en el orden del mundo, en el fondo del  
mar, en la verdad y música del árbol, y su fuerza y amores, en  
lo alto del cielo, con sus familias de estrellas— y en la unidad  
del universo, que encierra tantas cosas diferentes, y es todo  
uno...".*

*José Martí*

*A K.F,*  
*que los árboles nunca te impidan ver el horizonte*  
*Mamá.*

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**Ac:** Anticuerpos

**ADA:** Amplificación dependiente de anticuerpos

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**C (proteína):** Proteína estructural de la Cápside del virus dengue

**CD:** Grupo de diferenciación, del inglés (*Cluster of differentiation*)

**CMSP:** Células mononucleares de sangre periférica

**CTL:** Linfocito T citotóxico, (del inglés *cytotoxic T lymphocyte*)

**DC-SIGN:** ICAM 3 no integrina específica de células dendríticas, (del inglés *Dendritic Cell-specific ICAM-3 grabbing non integrin*)

**DO:** densidad óptica

**E (proteína):** Proteína estructural de la Envoltura del virus dengue

**EDTA:** Ácido etilendiamino tetraacético, del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*

**ELISA:** Ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida, (del inglés, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

**FAS:** Fragmento estimulador de apoptosis, del inglés *Apoptosis Stimulating Fragment*

**Fc:** Fracción cristalizante, del inglés (*Fraction Crystallized*)

**FD:** Fiebre por dengue

**FHD:** Fiebre hemorrágica por dengue

**HLA/MHC:** Sistema principal de Histocompatibilidad, (siglas del inglés *Human Leucocyte Antigens/Major Histocompatibility Complex*)

**HPRT-1:** del inglés *hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1*

**HTLV:** Virus linfotrópico humano, del inglés *Human T cell lymphotropic virus*

**IC:** Inmunocomplejos

**ICAM:** Molécula de adhesión intercelular, del inglés *Intercellular adhesion molecule*

**IFN $\alpha$ :** Interferón alfa

**IFN $\beta$** : Interferón beta

**IFN $\gamma$** : Interferón gamma

**Ig**: Inmunoglobulina

**IL-**: Interleuquina

**IPK**: Instituto Pedro Kourí

**ITAM**: Secuencia transmembrana de activación, del inglés *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

**MEI**: Método de ELISA de Inhibición, del inglés Method ELISA Inhibition

**M (Proteína)**: Proteína estructural de membrana del virus dengue

**NK (células)**: Células asesinas naturales, del inglés Natural Killer Cells

**NS (proteínas)**: Proteínas no estructurales del virus dengue

**OMS**: Organización Mundial de la Salud

**OR**: Razón de productos cruzados, (del inglés *odds ratio*)

**PBS**: Tampón Fosfato salino, (del inglés *Phosphate Buffer Saline*)

**PBS-T20**: Tampón de fosfato salina-Tween20

**PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa, (del inglés *Polimerase chain reaction* )

**PHA (Mitógeno)**: Fitohemaglutinina, (del inglés *Phytohemaglutinina*)

**prM (proteína)**: Proteína estructural pre-membrana del virus dengue

**RAE**: Riesgo atribuible de expuestos porcentual

**RAP**: Riesgo atribuible poblacional porcentual

**RANTES (quimoquina)**: Quimoquina expresada y secretada por células T normales reguladas tras la activación, (del inglés *Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*)

**SCD**: Síndrome de choque por dengue

**STF**: Suero de ternera fetal

**TGF $\beta$** : Factor transformador de crecimiento, del inglés ( *Transforming grow factor* )

**Th (célula)**: Células T auxiliaadoras, (del inglés *T helper cells* )

**TNE**: Tris HCL, NaCL , EDTA

**TNF $\alpha$** : Factor de necrosis tumoral alfa, (del inglés *Tumor Necrosis Factor* )

**Treg (célula)**: Células T reguladoras, (del inglés *T regulator cells* )

**VD**: virus dengue

## SÍNTESIS

Los resultados de la investigación realizada mostraron que la variante homocigótica que codifica para la arginina (RR) está asociada a la protección frente al desarrollo de la fiebre hemorrágica en la población con antecedentes de infección asintomática (OR=0.09, p=0.01). Sin embargo, la variante HH mostró una asociación altamente significativa tanto con susceptibilidad a padecer la enfermedad por dengue como con la presencia de síntomas persistentes en un período de dos años, en más de la mitad de los individuos con antecedentes de FD y FHD (FHD: OR= 10.56, p=0.00018- con tendencia similar observada para la FD: OR= 4.33, p=0.018,).

Los resultados descritos nos indican que individuos con genotipo RR para el receptor Fc $\gamma$ RIIa, unirían con mayor afinidad los IC los que son eliminados por los mecanismos fagocíticos de las células. Esto repercutiría en la protección al desarrollo del cuadro severo y favorecería, en muchos casos, aún en presencia de infecciones secundarias, el desarrollo de la forma asintomática y la recuperación total en etapas posteriores de la infección. Sin embargo, individuos con la variante HH no clarificarían eficazmente los IC, lo que traería implicaciones en el desarrollo de la FHD en la etapa aguda de la enfermedad, posiblemente favoreciendo el mecanismo de ADA. La ineficiente activación de los mecanismos fagocíticos dependientes de este receptor pudiera repercutir, incluso, en etapas posteriores a la infección en las que IC formados por anticuerpos contra estructuras propias podrían no ser eliminados y se depositarían en estructuras filtrantes, provocando la persistencia de manifestaciones clínicas de tipo osteomioarticulares y neurológicas.

<b><i>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</i></b> .....	<b>2</b>
<b>I-2 Hipótesis del trabajo</b> .....	<b>4</b>
Las variantes polimórficas del gen del receptor FcγRIIa se relacionan tanto con el curso clínico de la infección aguda por dengue como con la persistencia de síntomas clínicos dos años después. ....	4
<b>I-3 Objetivos</b> .....	<b>4</b>
<b>I-4 Novedad Científica</b> .....	<b>5</b>
<b>I-5 Valor Teórico-Práctico</b> .....	<b>5</b>
<b><i>CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i></b> .....	<b>8</b>
<b>II-1 Re-emergencia del dengue como problema de salud mundial</b> .....	<b>8</b>
<b>II-2 Características del virión</b> .....	<b>11</b>
<b>II-3 Células dianas de la infección por dengue</b> .....	<b>13</b>
<b>II-4 Ciclo Viral</b> .....	<b>14</b>
<b>II-5 Manifestaciones clínicas del dengue</b> .....	<b>16</b>
<b>II-6 Inmunobiología de la infección por virus dengue</b> .....	<b>20</b>
<b>II-7 Situación epidemiológica del dengue en Cuba</b> .....	<b>27</b>
<b>II-8 Polimorfismo genético asociado a la infección por dengue</b> .....	<b>28</b>
<b>II-8.1 Receptor Fcγ IIa de baja afinidad</b> .....	<b>30</b>
<b>II-9 Enfermedades autoinmunes</b> .....	<b>33</b>
<b>II-9.1 Fc y enfermedades autoinmunes</b> .....	<b>36</b>
<b>II-10 Funcionabilidad de los receptores Fcγ: Subclases de IgG</b> .....	<b>37</b>
<b>II-10.1 Actividades biológicas de los anticuerpos</b> .....	<b>37</b>
<b>II-10.2 Funciones efectoras</b> .....	<b>38</b>
<b><i>CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS</i></b> .....	<b>41</b>
<b>III-1a Determinación de las variantes genotípicas del receptor de baja afinidad FcγIIa en una muestra, tomada al azar para caracterizar la población de Ciudad de la Habana</b> .....	<b>41</b>
<b>III-1.1a Criterio de selección de los individuos que tomaron parte de este estudio</b> .....	<b>41</b>
<b>III-1.2a Muestra</b> .....	<b>42</b>
<b>III-1.3a Metodología</b> .....	<b>42</b>
<b>III-1.3.1a Determinación del polimorfismo genético del receptor FcγRIIa</b> .....	<b>42</b>
<b>III-1b Demostrar la asociación entre las variantes polimórficas del gen del receptor FcγIIa y la susceptibilidad a desarrollar enfermedad por dengue</b> .....	<b>43</b>
<b>III-1.1b Criterio de selección de los individuos que forman parte de este estudio</b> .....	<b>43</b>
<b>III-1.2b Muestra</b> .....	<b>44</b>
<b>III-1.3b Metodología</b> .....	<b>45</b>
<b>III-1.3.1b Determinación del polimorfismo genético del receptor FcγRIIa</b> .....	<b>45</b>
<b>III-2 Relación entre el polimorfismo del gen del receptor FcγRIIa y las manifestaciones clínicas referidas dos años después</b> .....	<b>45</b>
<b>III-2.1 Criterio de selección de los individuos que conforman el estudio</b> .....	<b>45</b>

III-2.2 Muestra .....	46
III-2.3 Metodología.....	46
III-2.3.1 Determinación del polimorfismo genético del receptor FcγRIIa.....	46
III-2.3.2 Determinación del título de anticuerpos totales IgG anti-dengue .....	46
III-2.3.3 Determinación del antecedente de infección por dengue .....	47
III-2.4 Análisis estadísticos .....	53
III-3 Determinación cualitativa de las subclases de IgG .....	53
III-3.1 Muestras.....	54
III-3.2 Metodología.....	54
III-3.2.1 Dot-Blot .....	54
III-4 Flujo de trabajo general.....	56
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
IV-1.1 Determinación de las variantes genóticas del receptor de baja afinidad FcγIIa en una muestra representativa de la población cubana .....	58
IV-1.3 Asociación a nivel genotípico entre el polimorfismo del FcγRIIa y el cuadro clínico sufrido en la etapa aguda de la infección (Epidemia de Ciudad de la Habana de VD 4 año 2006).....	63
IV-1.4 Análisis de las variantes genóticas homocigóticas del FcγRIIa y el cuadro clínico sufrido en la etapa aguda de la infección (Epidemia en Ciudad de la Habana de VD 4 año 2006).....	64
IV-1.5 Asociación a nivel alélico entre el polimorfismo del Fcγ RIIa y el cuadro clínico sufrido en la etapa aguda de la infección (Epidemia de Ciudad de la Habana de VD 4 año 2006).....	65
IV-1.6 Asociación a nivel genotípico entre el polimorfismo del FcγRIIa y eventos clínicos padecidos en la etapa aguda de la infección (Epidemia de Ciudad de la Habana de VD 4 año 2006).....	69
VI-2.1 Análisis de la posible relación entre la frecuencia genotípica con manifestaciones clínicas.....	76
IV-2.2 Asociación entre la presencia de manifestaciones clínicas persistentes y los factores demográficos .....	77
IV-2.3 Determinar la relación entre la presencia de manifestaciones clínicas y los títulos de IgG anti-dengue totales tras dos años de haber padecido la enfermedad.....	79
IV-2.4 Relación entre la presencia de manifestaciones clínicas con la secuencia de la infección .....	80
IV-2.5 Títulos de IgG totales en relación con el número de infecciones .....	80
IV-2.6 Títulos de IgG totales frente a las variantes genóticas homocigóticas .....	81
IV-2.7 Títulos de IgG totales en relación con el número de infecciones por cada variante homocigótica.....	82
IV-2.8 Estudio de la posible relación entre las manifestaciones clínicas, dos años después de haber padecido la enfermedad, con marcadores de autoinmunidad. ....	84
IV-3 Subclases de IgG en muestras de suero agudo: FS e IC .....	89
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>95</b>

<b><i>CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES.....</i></b>	<b><i>97</i></b>
<b><i>CAPÍTULO VII. AUTOBIOGRAFÍA DE LA ASPIRANTE.....</i></b>	<b><i>99</i></b>
<b><i>VII-1 Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis .....</i></b>	<b><i>99</i></b>
<b><i>VII-2 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis.....</i></b>	<b><i>99</i></b>
<b><i>VII-3 Tesis .....</i></b>	<b><i>100</i></b>
<b><i>CAPITULO VIII. REFERENCIAS.....</i></b>	<b><i>102</i></b>
<b><i>CAPÍTULO IX. ANEXOS .....</i></b>	<b><i>118</i></b>

# I. INTRODUCCIÓN

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La fiebre dengue (FD), caracterizada por un cuadro febril acompañado, entre otras manifestaciones, de cefalea y rash, es causada por cualquiera de cuatro serotipos del virus dengue (VD), perteneciente al grupo de los flavivirus. Estos son transmitidos de humano a humano por el mosquito *Aedes aegypti*. El espectro clínico de la infección puede variar desde individuos asintomáticos hasta otros, en los que la infección tiene un curso más severo, conocido como Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) (1).

Durante la infección primaria, el VD entra a la célula a través de la interacción de la proteína E de su envoltura con un receptor celular aún no caracterizado. (2). Durante la infección secundaria, el virus, además de utilizar su receptor primario para entrar a la célula, es capaz de hacerlo formando inmunocomplejos (IC) con anticuerpos heterólogos preexistentes no neutralizantes. La interacción con receptores alternativos, como los receptores Fcγ I y II, puede resultar en el fenómeno de inmunoamplificación dependiente de anticuerpos (ADA). Hipotéticamente, este fenómeno contribuiría a explicar la inmunopatogenia del daño severo causado por VD (3). Sin embargo, a pesar de la alta frecuencia de infecciones secundarias, solo un pequeño porcentaje progresa a FHD; por ello, se piensa que factores adicionales relacionados con el ambiente, el hospedero y factores virales, contribuyen al desarrollo de la forma grave de la enfermedad (4-7) .

Es conocida la influencia de la genética del hospedero tanto en la resistencia a las infecciones como en la susceptibilidad a las mismas (8). Entre los genes que codifican para los receptores del dominio Fc (FcγR) de las Inmunoglobulinas G (IgG) (9), la isoforma II (FcγRIIa), única en la especie humana, ha sido asociada con el desarrollo de diferentes patologías (10). Esta molécula presenta dos formas alélicas en la que sólo el polimorfismo asociado al aminoácido 131 afecta significativamente la unión al ligando (11, 12). Esto se ha asociado a la susceptibilidad de padecer varias enfermedades infecciosas; tales como malaria, infecciones respiratorias agudas y

*Polimorfismo del Receptor FcγRIIa . Influencias en la patogénesis y en la evolución de la infección por dengue.*

dengue (13, 14) En esta última también se sugiere que desempeñan un importante papel en otros aspectos de la respuesta inmune (15, 16).

La producción de anticuerpos contra ciertos antígenos puede resultar en un incremento selectivo de inmunoglobulinas IgG de ciertas subclases (15, 17, 18). En general, los anticuerpos IgG antivirales están altamente restringidos a IgG1 e IgG3 (19). Se ha descrito que la variante para la histidina une eficientemente la IgG2 (FcγRIIa-H/H131), mientras que la isoforma de la arginina presenta muy baja afinidad por este ligando uniendo preferencialmente las IgG 1/3 (FcγRIIa-R/R131) (12). De esta forma las variantes alélicas del FcγRIIa están vinculadas a las diferencias en el proceso de fagocitosis y, en consecuencia, a una susceptibilidad hereditaria a enfermedades asociadas a inmunocomplejos (20), infecciosas y de tipo autoinmunes (21).

Las enfermedades autoinmunes, desde el punto de vista etiológico, conjugan factores medioambientales, genéticos, inmunológicos y hormonales. Desde el punto de vista inmunogenético, son complejas y, de manera general, su fisiopatología es el resultado de la pérdida de tolerancia con exagerada activación de linfocitos autorreactivos, producción de autoanticuerpos y, muchas veces, inflamación crónica en los sitios de depósito de ICs (22).

Un estudio realizado en Cuba, tras la epidemia por VD3 (Ciudad de la Habana 2001-2002), corroboró la existencia de astenia, dolores articulares y musculares en los individuos estudiados seis meses después de haber padecido en etapa aguda la FHD (23) .

Los virus han sido descritos como agentes etiológicos desencadenantes de fenómenos autoinmunes (24-27) a través del mimetismo molecular entre las proteínas virales y del hospedero (28). Entre éstos se destacan el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Citomegalovirus, Herpes Simple, Epstein- Barr, alfavirus y el parvovirus humano B19 (29-33) y, entre los flavivirus, el de la hepatitis C (25, 26).

Si bien las manifestaciones clínicas durante la etapa aguda del dengue son bien conocidas, pocos estudios abordan las consecuencias de la infección a largo plazo (34). Existen evidencias que apuntan al posible desarrollo de fenómenos autoinmunes asociados a la infección por dengue (24, 27). Estudios recientes mostraron que anticuerpos dirigidos contra la proteína NS1 del VD 2 reconocen elementos celulares y moleculares (30, 35). Por otra parte, anticuerpos contra la proteína E del VD 4, reconocen una región de 20 aminoácidos en el plasminógeno (36). Ha sido

documentado el desarrollo de síndrome de Guillain Barre debido a la infección por VD. En relación con ello, se plantea que la amplificación inmune permite la generación de anticuerpos de reactividad cruzada y la desmielinización (24, 27).

Las peculiaridades epidemiológicas de los eventos de dengue que han tenido lugar en nuestro país y las características organizativas de nuestro sistema de salud conforman un escenario especial para llegar a definir, con mayor certeza, factores genéticos involucrados en el desarrollo de la FHD, así como estudiar la evolución de los individuos en etapas posteriores a la enfermedad aguda.

Partiendo de lo referido anteriormente, realizamos un estudio para explorar las implicaciones que, tanto en la patogenia como en la evolución de la infección por VD, podrían tener las variantes genéticas (RR/HH) del receptor FcγRIIa.

## **I-2 Hipótesis del trabajo**

Las variantes polimórficas del gen del receptor FcγRIIa se relacionan tanto con el curso clínico de la infección aguda por dengue como con la persistencia de síntomas clínicos dos años después.

## **I-3 Objetivos**

### **Objetivo general:**

Determinar los efectos del polimorfismo del gen del receptor FcγRIIa en la patogenia y evolución de la infección por virus dengue.

### **Objetivos específicos**

1. Demostrar si existe asociación entre las variantes polimórficas del gen del receptor FcγRIIa y la susceptibilidad a desarrollar enfermedad por dengue.
2. Determinar si el polimorfismo del gen del receptor FcγRIIa está asociado con la presencia de manifestaciones clínicas dos años después de haber padecido la enfermedad.
3. Evaluar si las variantes polimórficas del FcγRIIa al determinar las subclases de IgG con que interactúan, influyen sobre la evolución clínica de la infección por dengue.

#### **I-4 Novedad Científica**

Aunque las manifestaciones clínicas del dengue son bien conocidas, los estudios que relacionan la genética del individuo a la susceptibilidad o protección al virus, son recientes. El presente trabajo explora, por primera vez, la población con infección asintomática, evidenciando que en ésta la variante genética del receptor FcγRIIa RR está asociada a la protección.

Pocos son los estudios que abordan las complicaciones que, a largo plazo, pudieran derivar de la infección por dengue. En este sentido el presente trabajo constituye el primer estudio que, de manera preliminar, explora la posible relación entre trastornos autoinmunes y manifestaciones clínicas tardías atribuibles a dengue. Los resultados obtenidos brindan evidencias, cuya verificación futura pudiera tener importantes implicaciones en el desarrollo de estrategias preventivas efectivas contra el VD.

Todos estos resultados parten de la caracterización genética que, con relación al FcγRIIa, se realiza por primera vez en la población cubana de Ciudad de la Habana, resultado novedoso que puede ser empleado en investigaciones futuras asociadas a otras enfermedades infecciosas o de tipo autoinmune.

Por lo tanto, los hallazgos encontrados constituyen un novedoso aporte al conocimiento mundial de la fisiopatología de la infección por dengue.

#### **I-5 Valor Teórico-Práctico**

La investigación desarrollada se enfocó a la infección por virus dengue, hoy la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante en términos de morbilidad y mortalidad humanas. Esta entidad, constituye un problema grave de salud, en tanto no se dispone de medidas preventivas eficientes, incluida una vacuna.

En Cuba se han producido epidemias, pero la acción concertada de organizaciones estatales y de masas ha permitido que la infección por dengue sea controlada por lo que a diferencia de lo que ocurre en cualquier otro lugar, para la realización de nuestro trabajo, pudimos contar con una población de características únicas. Ello permitió estudiar el polimorfismo genético asociado al receptor FcγIIa en relación con individuos infectados asintomáticos. La investigación realizada sugiere que existe una variante genética asociada a la protección. Por otra parte es uno de los pocos estudios que evalúan las consecuencias de la infección a largo plazo y en este sentido hace

*Polimorfismo del Receptor FcγRIIa . Influencias en la patogénesis y en la evolución de la infección por dengue.*

un aporte a nivel mundial, pues se evidencia que tras dos años de haber padecido la enfermedad por dengue e independientemente del cuadro clínico padecido en la etapa aguda, los individuos presentan manifestaciones que sugieren el posible desarrollo de trastornos autoinmunes, lo cual es de gran relevancia para el desarrollo de vacunas por las consecuencias que una respuesta inmune de anticuerpos pudiera generar. Además constituye una alerta al sistema de salud para el seguimiento de personas que, tras haber padecido la enfermedad, podrían continuar con manifestaciones clínicas.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **II-1 Re-emergencia del dengue como problema de salud mundial**

El origen de los VD ha sido objeto de muchas discusiones. En un inicio (1883) se especulaba que habían surgido en África y distribuido alrededor del mundo con la trata de esclavos (37). Sin embargo, hacia 1956 se propone que los mismos se originan en un ciclo forestal entre primates bajos y mosquitos en la península de Malasia (38). Su origen geográfico, ha llevado a pensar que éstos se desarrollaron inicialmente como virus de mosquitos de tres subgéneros *Stegomyia*, *Finlaya* y *Diceromya*, pertenecientes al género *Aedes*, hospedero donde son mantenidos por transmisión vertical, adaptándose posteriormente a los primates y al hombre. Se piensa que estos virus tienen un origen asiático, pues sus cuatro serotipos han sido encontrados en el ciclo forestal del mencionado continente. En cambio, en África sólo se ha encontrado el serotipo 2 (39). *Aedes aegypti*, especie del nuevo mundo, es considerado el principal vector de los virus del dengue. De origen africano, se piensa convivía en un ambiente peridoméstico en las aguas almacenadas de las aldeas africanas. La especie se adaptó a los humanos y, la trata de esclavos que tuvo lugar durante los siglos XVII, XVIII y XIX, contribuyó a la diseminación del agente en todo el mundo, fundamentalmente en las Américas, donde se adaptó al ambiente urbano (38). El VD, así transportado, tanto en los esclavos como en su vector, se asentó del otro lado del atlántico.

Las migraciones de personas y el comercio contribuyeron a diseminar el virus en pueblos y ciudades del Asia tropical, donde encontró otros vectores esporádicos para su transmisión, como *Aedes albopictus* y otra especies *Stegomyia*.

El *Aedes aegypti* se desarrolló muy asociado al humano, prefiriendo alimentarse de él y compartiendo sus viviendas y sus alrededores. De esta forma, se convirtió en un vector muy eficiente para el VD.

Como consecuencia del incremento del comercio y el cada vez más intenso trasiego humano entre diferentes regiones, los agentes portadores del virus se introdujeron en las regiones urbanas y de esta forma comenzaron las grandes epidemias de la enfermedad. La primera descripción clínica y epidemiológica de una enfermedad parecida al Dengue, fue encontrada en una enciclopedia china publicada en el año 610 (40). Muchos años más tarde, en 1779, se describe la primera epidemia de Dengue, a la que entonces los chinos denominaron “veneno de agua” y a la que asociaron con insectos del preciado líquido. La enfermedad se caracterizó por rash, fiebre, dolor ocular, artralgias, mialgias y manifestaciones hemorrágicas que incluían sangramientos vaginales, intestinales y gingivales, todo esto acompañado de una alta mortalidad. Ésta descripción soporta las bases del origen y evolución de los virus del Dengue en Asia. Se tienen reportes anteriores a 1779 de una enfermedad que afectó a la población de Las Indias Francesas del Este y Panamá, en 1635 y 1699, respectivamente, que fue descrita como un dengue clásico (40). Esto demostró que el dengue, o una enfermedad similar, estaba ampliamente distribuida antes del siglo XVIII, de cuando se tiene el reporte de la primera pandemia de Dengue. Todas estas descripciones epidémicas, así como otras que ocurrieron hasta 1945, no tuvieron una confirmación de laboratorio, lo que dificultó su diferenciación de otras enfermedades hemorrágicas, como chikungunya, muy parecidas al dengue.

El origen del nombre de la enfermedad, Dengue, se remonta a la primera epidemia ocurrida en Cuba hacia 1828, y se plantea que el mismo es de origen africano (40).

Sin embargo, a pesar de las descripciones sobre el origen de la enfermedad no se tiene claro aún por qué existen cuatro serotipos diferentes. Se plantea que, probablemente se haya separado en cuatro linajes debido a divisiones ecológicas o geográficas en diferentes poblaciones de primates y, por tanto, los cuatro serotipos evolucionaron de forma independiente (41).

Otro enfoque del fenómeno evolutivo plantea que los VD pudieron evolucionar dentro de una única población, donde la presencia de cuatro serotipos antigénicamente diferentes pudo facilitar la transmisión a través del fenómeno de ADA (41). Sin embargo, los estudios de selección natural realizados hasta la fecha no muestran que los serotipos virales puedan ser seleccionados inmunológicamente por dicho fenómeno. Luego, se ha considerado el fenómeno de amplificación como el resultado del contacto reciente entre los cuatro virus que evolucionaron

por separado durante un período extenso y por casualidad tienen un nivel de divergencia antigénica, más que una estrategia evolutiva a largo plazo (41). Aunque existen numerosas evidencias que relacionan la ADA con la patogénesis del dengue, su influencia en la diversificación genética de los VD requiere una mayor investigación.

En la actualidad, el dengue es la enfermedad viral de mayor importancia médica transmitida por artrópodos y una prioridad de salud pública en los países tropicales. La incidencia y las epidemias por VD han aumentado exponencialmente en los últimos 35 años a escala mundial. En el período de 1970 a 1995 el número de casos de dengue se ha cuadruplicado, particularmente en 1998, año en que la incidencia alcanzó la cifra máxima de 1,3 millones de casos y se informaron más de 3 600 muertes. Actualmente el dengue es endémico en más de 100 países del sudeste Asiático, el Pacífico occidental, las Américas, África y el Medio Oriente (42).

Aunque no se ha determinado con exactitud la carga real de la enfermedad, se estima que de los 2 500 millones de personas que viven en áreas de riesgo de transmisión, 50 millones se infectan anualmente y más de 500 000 desarrollan su forma más grave: la FHD. Durante las epidemias, las tasas de infección pueden llegar a afectar a 80-90% de las personas susceptibles (43) y la mortalidad puede ser mayor de 5%.

Si bien sólo nueve países habían informado casos de FHD antes de 1970, en la actualidad se ha documentado su presencia en más de 30 países. Por ello se considera una enfermedad emergente sin medios de control y constituye un problema creciente de salud que amenaza con expandirse a todo el mundo (44).

Los factores determinantes de la emergencia del DH y la re-emergencia del dengue son complejos y no se han estudiado completamente, aunque posiblemente están relacionados con los profundos cambios demográficos y sociales ocurridos durante la Segunda Guerra Mundial, que favorecieron la expansión del virus y de su vector por varios países del sudeste asiático (40). Posteriormente, el crecimiento sin precedentes de la población, la urbanización masiva no planificada, el insuficiente abastecimiento de agua potable, la disposición inadecuada de los residuos sólidos, los depósitos no biodegradables desechados en el medio, el aumento de viajeros y migraciones poblacionales, el deterioro de los sistemas de salud y de los programas de control y la pobreza han contribuido a agravar la situación epidemiológica. Recientemente se

demonstró que los cambios climáticos ocurridos en los últimos años contribuyen a la transmisión viral, lo que hace prever que aumente el número de enfermos (45).

## II-2 Características del virión

Los virus del dengue pertenecen a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. Existen cuatro serotipos del virus dengue (VD1, VD2, VD3 y VD4), para los cuales se ha descrito una homología de secuencia de un 70% aproximadamente. Esta homología es mayor entre VD1, VD3 y VD4. El serotipo 2 parece diferir en su origen evolutivo (1).

Similar a los otros flavivirus, los viriones maduros del dengue son partículas esféricas de 40-50 nm de diámetro. Poseen una envoltura lipídica de 10 nm de espesor rodeando una nucleocápsida icosaédrica de 30 nm de diámetro, la cual contiene una molécula de ARN de simple cadena, con orientación positiva, de aproximadamente 11 Kb de longitud y peso molecular de 4.2 kD (46, 47). La densidad del virión es de 1.23 g/cm<sup>3</sup> y tiene un coeficiente de sedimentación de 210 S (48). La traducción del genoma de los flavivirus trae como resultado la formación de un precursor de poliproteína, en el cual, el orden de las moléculas ha sido determinado como: NH<sub>2</sub> - ANCHC - C - prM - E - NS1 - NS2A - NS2B - NS3 - NS4A - NS4B - NS5 - COOH (49), donde ANCH y prM son precursores de C y M, respectivamente (50), y NS designa las siete proteínas no estructurales identificadas y mapeadas del ARN viral (51).

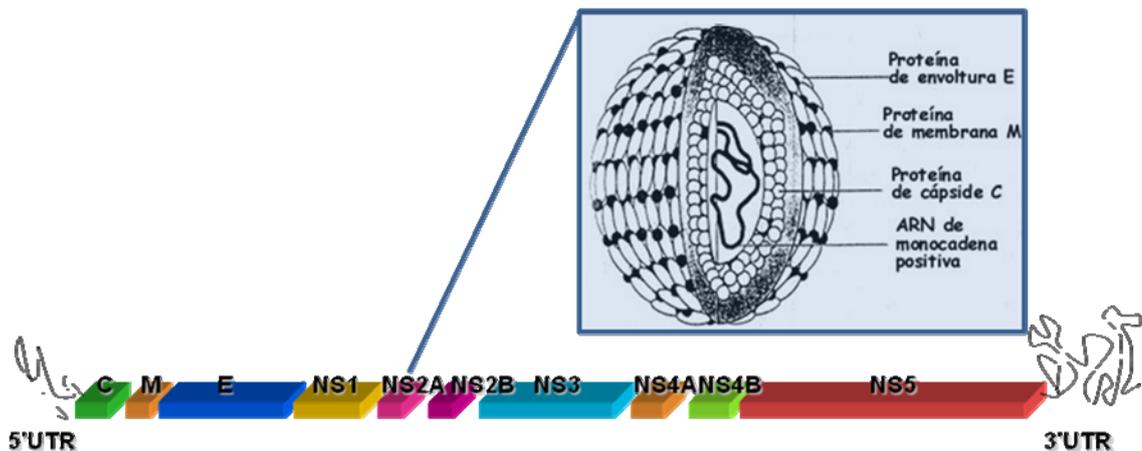


Fig. 1. Virus dengue: Estructura y genoma.

Hacia el extremo 5' del ARN viral, cubierto por una caperuza, se localizan las proteínas estructurales, y el extremo 3', carente de cola de poli A, contiene el fragmento de las proteínas no estructurales (47, 50). En ambos extremos están presentes secuencias no codificadoras, las cuales son necesarias para los procesos de replicación, transcripción y traducción. La proteína C de 13,5 kD, es el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción, posee carácter básico por lo que interactúa con el ARN formando la nucleocápsida. Posee un dominio hidrofóbico hacia el extremo carboxi terminal, que se plantea actúa como transductor de señales transmembrana (52) que median la inserción de prM dentro del retículo endoplasmático rugoso (53). Este precursor glicosilado de 22kD es escindido proteolíticamente, liberándose su extremo N terminal para dar lugar a la proteína M de 8kD, la cual aumenta la infectividad viral (54). Durante la ruptura se genera, a su vez, un fragmento **pr** cuyo papel no ha sido bien identificado aún (53, 55).

La proteína E de 51 - 60 kD constituye la proteína más grande del virión y es la principal proteína estructural de los flavivirus. Contra ella se generan anticuerpos neutralizantes. Esta proteína, además, participa en la unión del virus a su receptor celular, está implicada en el aumento de la infectividad viral (56) y contiene epítopes para células T (57, 58).

Las proteínas no estructurales son, sin embargo, de gran importancia en el desarrollo de la respuesta inmune antiviral. En ese caso tenemos la NS1, glicoproteína no estructural de 48 kD, que presenta un mosaico de determinantes antigénicos específicos de serotipo, así como algunos de reactividad cruzada. La glicosilación de la NS1 en la asparagina-130 y -207 es necesaria para la replicación viral en las células de mosquitos y para la neurovirulencia en ratones (59). Esta proteína, al parecer, reviste gran importancia inmunológica, ya que las células infectadas que la expresan se convierten en dianas de la citólisis inmune (60), tanto la realizada por células T citotóxicas, como la mediada por anticuerpos específicos contra ella, que la hacen blanco de la acción del complemento o de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (61).

Otras, en cambio, se destacan en el procesamiento de las proteínas virales así como en el ensamblaje de la partícula viral. En este caso se encuentran la NS3, proteína hidrofóbica de 70 kD, la cual se sugiere actúa como una proteasa viral activa (49). Además, esta proteína es la principal fuente de epítopes para las células T del sistema inmune (62). Las derivadas de la ruptura de NS2 (2A y B) son requeridas para el procesamiento proteolítico (49). La NS2A tiene

un peso molecular de aproximadamente 22 kDa y su función puede estar relacionada con el reclutamiento de los moldes de ARN necesarios para la replicación. La proteína NS2B, de 14 kDa, es un cofactor requerido para la función serina-proteasa de la proteína NS3 (55, 63).

Las proteínas originadas a partir de NS4 (4A y B) actúan como posibles cofactores de la NS5, la que al parecer, es la polimerasa viral (63) e induce la transcripción y la traducción de la IL-8, citoquina involucrada en la patogénesis de la enfermedad (64). La función de NS4 no está totalmente esclarecida; sin embargo se conoce que inhibe la función antiviral de los interferones (INFs)- $\alpha$  y  $-\beta$  (65).

La composición lipídica del virus es poco conocida y refleja la de las membranas intracelulares del retículo endoplasmático de la célula hospedero. Los lípidos constituyen el 7% del peso seco del virión, de ellos el 90% son fosfolípidos, el 7% esfingomielina y el resto colesterol y lípidos neutros (66).

### **II-3 Células dianas de la infección por dengue**

Estudios iniciales in vitro mostraron al monocito como la célula donde mejor ocurría la replicación viral (67). Sin embargo, estudios recientes postulan que tras la picadura del mosquito el virus es presumiblemente inyectado al torrente circulatorio esparciéndose sobre la dermis y la epidermis, lo que resulta en la infección de células dendríticas inmaduras (CD), denominadas células de Langerhans (epidermis) y queratinocitos (68). Las células infectadas migran entonces desde el sitio de la infección al linfonodo donde son reclutados monocitos y macrófagos que se convierten en blancos para la infección. Consecuentemente, la infección es amplificada y el virus se disemina a través del sistema linfático. Como resultado de esta viremia primaria muchas células del linaje mononuclear como los monocitos derivados de la sangre (69), CD mieloides (70), (71) y macrófagos del bazo e hígado son infectados (72-74) Varios estudios sugieren que el linfocito B podría ser también un blanco importante de la infección (75, 76). En este sentido, se ha demostrado por inmunofluorescencia indirecta (IFI) la presencia de antígenos virales en la superficie de estas células. Además, se ha demostrado in vitro, que el virus puede infectar y replicarse en células de origen endotelial y epitelial (77).

Estudios recientes en células cebadas humanas demuestran que éstas pueden ser infectadas por el VD estimulándose la producción de quimoquinas y citoquinas capaces de activar células endoteliales y reclutar células efectoras al sitio de la infección (78).

Ha sido difícil identificar, si es que existe, el tropismo del virus por algún tejido. Anecdóticamente, tras estudios histopatológicos, se ha inferido la presencia del virus en diferentes tejidos y órganos humanos como: piel, hígado, bazo, nódulos linfáticos, riñón, pulmón, médula ósea, pulmón, timo y cerebro (74, 79-85). La presencia de partículas virales infectivas, sin embargo, sólo se ha confirmado en aislamientos de hígado y células mononucleares periféricas.

A la luz de los conocimientos actuales, continúa siendo un reto conocer qué células son las que se infectan después que el mosquito inocula el virus, cómo se disemina el mismo, qué órganos y células contribuyen a la viremia y si el endotelio vascular se infecta in vivo (86).

#### **II-4 Ciclo Viral**

Unión y entrada a la célula hospedera: Los estudios realizados sugieren que en la entrada del VD a su célula diana se produce mediante el empleo de múltiples receptores de los cuales sólo algunos son específicos para dengue.

A pesar de esto se reconocen dos mecanismos de interacción con la célula que son comunes para todos los flavivirus:

- Interacción del virus con el receptor celular.
- Unión del virus a la célula por formación de IC (87).

La unión primaria del virus a la célula blanco ocurre a través de un receptor específico para la proteína E (55). Se planteaba que esta interacción inicial tiene lugar a través de glucosaminoglicanos (GAG), los cuales transfieren el virión a un receptor de alta afinidad (HAR, del inglés high affinity receptor), ocurriendo la endocitosis (88, 89).

La presencia de las CD en las superficies mucosales, en la piel y en la sangre así como su capacidad de capturar antígenos las ubica para ser los blancos iniciales de la infección viral. Ellas presentan en su superficie receptores virales, las lectinas tipo C, como el DC-SIGN (del inglés Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin), que reconocen residuos de manosa presentes en la proteína E, y median el proceso endocítico (90). Una vez formada la vacuola endocítica, ocurre la fusión entre las membranas de dicho compartimiento y la envoltura viral, lo que facilita la salida del ARN viral al citosol (88). Estudios recientes revelan el reconocimiento del ARN viral en el endosoma por el TLR-7 (del inglés toll like receptor) induciendo señales que activan la producción de citoquinas como el Interferón tipo I (IFN-1) (91).

El segundo mecanismo tiene lugar durante una infección secundaria. El flavivirión forma complejos con las IgG, y estos se unen a las células susceptibles por sus receptores FcγR expresados sobre la superficie, potenciando la infección del virus a la célula diana (92). Luego, ocurre la internalización de los IC formándose el endosoma y es en ese compartimiento ácido donde, y probablemente mediado por la proteína E (93), se desencadena la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular liberándose la nucleocápsida en el citoplasma (94, 95).

Aunque son pocos aún los estudios, algunos autores apoyan la idea de que la unión del IC al FcγR no es suficiente para que ocurra la internalización de la partícula viral, sino que requiere el receptor específico del virus de modo que la unión IgG-FcγR propicia el acercamiento del virión infeccioso a la proximidad de su receptor (96), para la entrada. Sin embargo, este mecanismo no puede explicar las infecciones primarias en personas que no tienen anticuerpos contra el virus, ni la capacidad de este para infectar células que no expresan los FcγR(97).

Replicación: La replicación del ARN viral puede ser detectada tres horas después de la infección y parece ocurrir en la región perinuclear de la célula infectada asociada con membranas lisas (98). El ARN del virus dengue sirve como ARN mensajero, tiene sentido positivo y contiene un fragmento de lectura abierto para una polimerasa que está insertada dentro de la membrana del retículo endoplasmático (99).

Ensamblaje: El ensamblaje de la nucleocápsida a partir de la proteína C y el ARN, así como la adquisición de la envoltura ocurren intracelularmente. Las partículas del virión son llevadas en

vesículas de transporte que salen de la membrana del RE y por un mecanismo específico son translocadas al pre-Golgi, pasando posteriormente al aparato de Golgi. En las vacuolas de pre y post Golgi opera un transporte exocítico de glicoproteínas de membrana a la superficie celular (95, 100). La liberación del virus puede ocurrir por fusión de las membranas de la vesícula exocítica, que contienen al mismo, con la membrana plasmática, o por efecto citopático, a través de rupturas puntuales en la membrana que lo separan del espacio exterior (101).

## **II-5 Manifestaciones clínicas del dengue**

Dos cuadros clínicos principales se reconocen, la fiebre del dengue (FD), y su forma severa, la fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque del dengue (FHD/SCD). Ambas formas clínicas se presentan en niños y adultos aunque la enfermedad severa se ha asociado principalmente a la niñez, sobre todo en el Sudeste Asiático y Pacífico Occidental (102).

La FD es una enfermedad febril autolimitada ( $\approx 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), con un período de incubación de 2 a 7 días. La fiebre tiene un comienzo abrupto, puede estar acompañada de escalofríos, cefalea supraorbitaria intensa, dolor retroocular, quebrantamiento general, náuseas, vómitos, linfadenopatías, anorexia y sensación de frío corporal. Estos síntomas aparecen acompañados de leucopenia y diferentes grados de trombocitopenia y, en algunos casos, sangramientos menores como petequias, epistaxis y gingivorragia. De uno a dos días después de la defervescencia, aparece un rash maculopapular generalizado y puede haber manifestaciones hemorrágicas como petequias. Su pronóstico es en general benigno, y su convalecencia puede acompañarse de fatiga prolongada durante varios días sobre todo en los adultos (103). De comienzo similar a la FD, al tercer o cuarto día de evolución, coincidiendo con la caída de la fiebre, se produce un agravamiento de la enfermedad; pudiendo observarse sangramiento y tendencia al desarrollo de choque. Según la OMS, la fiebre, algún sangramiento (al menos una prueba de torniquete positiva), la trombocitopenia de menos de  $100\ 000$  plaquetas/ $\text{mm}^3$  y un aumento del hematocrito en 20 % o más y algún signo clínico de extravasación de líquidos, como derrame pleural y ascitis, caracterizan al dengue hemorrágico. También pueden observarse petequias, epistaxis, sangramiento gingival y por venipuntura, hematemesis y sangramiento vaginal. Algunos pacientes evolucionan al choque presentando sudoración profusa, pulso rápido y débil, estrechamiento de la presión arterial o hipotensión, y piel fría y sudorosa (102, 104). La

evolución hacia la fiebre hemorrágica en general es precedida por los llamados signos de alarma; entre ellos se identifican los vómitos frecuentes, el dolor abdominal persistente, cambios en el nivel de conciencia, caída brusca de las plaquetas e incremento rápido del hematocrito.

La FHD/SCD puede presentarse en cuatro grados de severidad, el choque caracteriza los grados III y IV (104). La infección con cualquiera de los cuatro serotipos del virus puede conllevar a desarrollar cualquiera de los cuatro niveles: una infección asintomática, la FD, u ocasionar las formas más severas conocidas como la FHD y el SCD, potencialmente fatal para quien las padece. Cada vez con mayor frecuencia se reportan las llamadas manifestaciones inusuales, en el desarrollo del dengue. El fallo hepático fulminante, la miocardiopatía, y los trastornos neurológicos (encefalitis y encefalopatía) son las observadas con mayor frecuencia. La hipotensión, el edema cerebral, las hemorragias focales y el fallo hepático fulminante pueden ser la causa de la encefalopatía.

El incremento en las enzimas hepáticas (aspartatoaminotransferasa y alanina aminotransferasa) ha sido reportado en el DH con bastante frecuencia (105). Aunque el virus dengue se ha detectado en cerebro, hígado y miocardio, no está bien definido si estas manifestaciones son producto de la acción directa del agente en el tejido o de una respuesta de hipersensibilidad o de tipo autoinmune, o ambas. Recién se ha reportado en pacientes de FD trastornos visuales en el desarrollo de la enfermedad y en particular la presencia de hemorragias en la retina (106). Aunque el dengue en cualquiera de sus formas clínicas es una enfermedad de evolución rápida, existen pocos estudios que presentan un seguimiento clínico de los pacientes una vez concluida la fase aguda. González y otros reportaron la presencia de cefalea, astenia y artralgia en 76 pacientes adultos que desarrollaron FHD/SCD por VD 3, aun después de 6 meses de la enfermedad (107).

La definición de caso FHD propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha sido de gran utilidad para la clasificación clínica de los pacientes, sin embargo cada vez con mayor frecuencia se encuentran enfermos que no cumplen totalmente con estos criterios (108, 109). Por otra parte, como ya mencionábamos, cada vez se detectan con mayor frecuencia las llamadas manifestaciones inusuales en enfermos de dengue, como el fallo hepático, la miocardiopatía y los trastornos neurológicos (encefalitis y encefalopatía) (66). Harris y cols, en 2000 (110), en el

transcurso de una epidemia de dengue en Nicaragua reportaron casos de SCD en ausencia de sangramiento y trombocitopenia. Existen numerosos reportes de enfermos graves que no cumplen con todos los criterios establecidos.

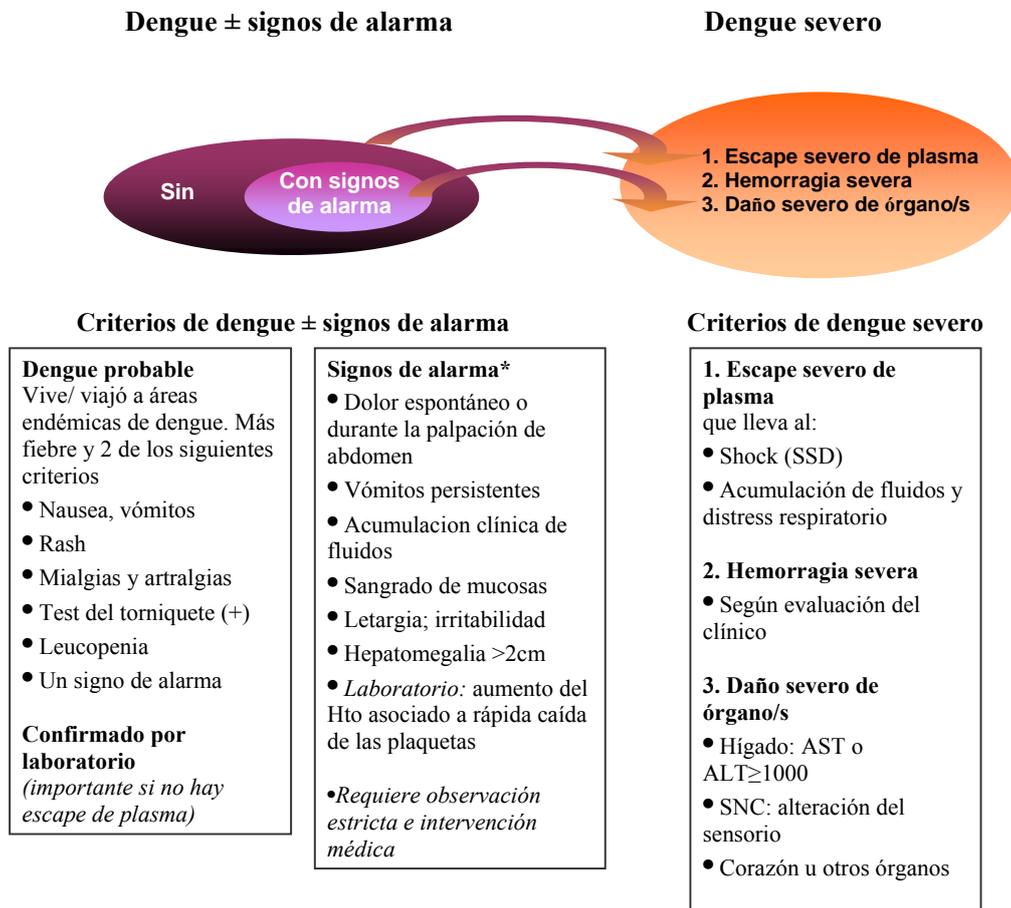
La aplicación de procedimientos clínicos estandarizados para la clasificación y el tratamiento de los enfermos de dengue debe ayudar a reducir la morbilidad y la mortalidad por esta enfermedad. Por esta razón, la evaluación de la clasificación actual en diferentes condiciones epidemiológicas mediante protocolos clínicos estandarizados constituyen una prioridad en la investigación (111). También se debe estudiar la utilidad de los signos de alarma clínicos y de laboratorio como marcadores de pronóstico del DH, la utilidad y el significado del estudio ultrasonográfico y la comparación del cuadro clínico del DH, tanto en niños y adultos como en pacientes de diferentes regiones (75).

Estos estudios se deben complementar con la capacitación del personal de salud en los países endémicos de esta enfermedad.

Teniendo en cuenta lo anterior y posterior a una reunión de expertos desarrollada en la Habana , se comenzó un estudio multicéntrico en 7 países de ambas regiones para evaluar la clasificación de dengue hemorrágico de la OMS, evaluar la utilidad de los signos de alarma (propuestos por Cuba), describir el cuadro clínico de dengue en ambas regiones y proponer, de ser necesaria, una nueva clasificación (112).

La nueva clasificación clínica propuesta fue validada en varios estudios prospectivos de 6-8 meses en países endémicos de dengue, editándose en 2009 la nueva edición de las guías para la Prevención y control del dengue de la OMS (113, 114).

## Clasificación revisada de dengue



**Fig. 2** Nueva Clasificación de dengue WHO/TDR 2009 (114)

## **II-6 Inmunobiología de la infección por virus dengue**

El conocimiento de las interacciones hospedero-parásito que se desarrollan en una infección facilita el entendimiento de los mecanismos inmunopatogénicos que tienen lugar en algunas de éstas, por ejemplo, el dengue. Ello, además, aclara el camino al hallazgo de inmunógenos que estimulen respuestas protectoras que, a la vez que controlarían la infección, no desatarían la producción de mecanismos deletéreos de naturaleza inmune.

Existen muchas hipótesis que tratan de explicar el incremento de la incidencia de la forma severa de la enfermedad después de la infección heterotípica por virus dengue. El primer indicio de una base inmunológica para el desarrollo de la FHD fue la observación, en 1960, de que más del 85% de los niños que en Bangkok desarrollaron este cuadro habían tenido altos títulos de anticuerpos de reactividad cruzada, lo cual sugería una infección previa con dicho virus (115). Esto sentó las bases para plantear que la FHD es más común en las infecciones secundarias que en las primarias. La hipótesis fue confirmada tiempo después en estudios prospectivos hechos en Tailandia y Myanmar (116). Estas observaciones se sustentaron, además, en las características de las epidemias que tuvieron lugar en Cuba (117), donde la infección por VD 2, en 1981, causó muchos casos de FHD en pacientes que habían padecido la infección por VD 1 en 1977.

Se plantea así la primera hipótesis que trata de explicar el desarrollo del fenómeno hemorrágico, el llamado efecto ADA (118): La respuesta inmune humoral a una infección primaria por un determinado serotipo origina anticuerpos neutralizantes, capaces de proteger al individuo contra el virus homólogo y, en menor medida, contra serotipos heterólogos. Durante una infección secundaria se formarían IC cuyos anticuerpos serían menos eficientes en la neutralización de la partícula viral. Estos IC, serían internalizados, por las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos), al interactuar con los receptores Fc-γ tipo I (CD64) y II (CD32) en ellas presentes. Se favorecería, de esta manera, la diseminación viral, ya que estos IC entran a las células hospederas más rápido que los viriones no acomplexados (118, 119). Otras células contribuirían a la extensión de la infección, entre ellas otros fagocitos, ampliamente distribuidos en los tejidos (119, 120). Finalmente, como consecuencia de la lisis por efecto citopático del virus, o por interacción de las células infectadas con mecanismos efectores del sistema inmune, se liberan factores solubles al medio extracelular como IL-8, IL-18 e IFN-γ (119, 121-123), los

cuales están implicados en la coagulopatía intravascular, la efusión pleural y el aumento de la permeabilidad vascular con pérdida de plasma y, como consecuencia, en el desencadenamiento de la forma grave de la enfermedad (7).

La clarificación viral, la recuperación del hospedero y la protección., en cambio, han sido relacionados con otros factores. Tal es el caso de la IL-12, que se ha encontrado elevada en pacientes que sufren la forma clásica y ausente en aquellos con FHD(123, 124). Recientemente se planteó que la elevada producción de partículas virales durante la infección facilitada por la ADA, se debe a la capacidad de esta vía de infección de suprimir moléculas antivirales claves como la IL-12 y el INF $\gamma$  (125).

La FHD/SCD detectada en algunos niños menores de 1 año, de madres inmunizadas y sin antecedentes de exposición al virus, es otra importante evidencia epidemiológica en favor de la ADA. En éstos, probablemente, el cuadro grave era causado por los anticuerpos maternos (126).

Los anticuerpos contra las proteínas E y prM han sido capaces de amplificar la infección por el VD in vitro de manera dependiente de la concentración y no del serotipo. Además, los anticuerpos contra la proteína prM pueden amplificar la infección por una vía independiente de los Fc. El mecanismo que media este proceso es la unión específica dual de los anticuerpos anti-prM a antígenos propios como la Hps60 y a la superficie del virión (127).

Los daños inmunológicos por reactividad cruzada son, con frecuencia, rasgos de la enfermedad por flavivirus (128). El estudio de la respuesta de células T al VD ha mostrado evidencias de la participación, no menos importante, de éstas en la inducción del cuadro severo de la enfermedad (120, 129). Se ha corroborado la existencia de clones de células T virus específicos, capaces de responder solo al serotipo homólogo.

Otros, en cambio, presentan reactividad cruzada con uno, dos o los tres serotipos heterólogos restantes, así como contra otros flavivirus (130). El reconocimiento de estas células de reactividad cruzada está dirigido, con más frecuencia, a los epítopes sobre las proteínas no estructurales más conservadas. Entre ellas, la NS3 parece ser el blanco principal de linfocitos T CD4+ y CD8+ (129, 131).

Varios estudios avalan la hipótesis sobre la activación de linfocitos T y la producción de citoquinas como factores importantes en la patogénesis de la FHD. Diferentes autores han encontrado altos niveles de TNF $\alpha$  , IFN $\gamma$  e IL-2 asociadas a cuadros de FHD (132), así como altos niveles de receptores CD8 y CD4 solubles y receptores de IL-2 en niños con FHD(133).

¿Cómo pueden relacionarse la reactividad cruzada, la acción citotóxica y la producción de citoquinas de las células T CD4+ para producir el fenómeno inmunopatológico? Después de la infección primaria existen clones de memoria de linfocitos T CD4+ y T CD8+ cuyos niveles de activación se han visto aumentados en individuos con FHD durante el transcurso de la infección secundaria. Las células T CD4+ pueden inducir el fenómeno inmunopatológico a través de dos mecanismos: la citotoxicidad y/o la liberación de citoquinas. La activación del primero de ellos puede, a su vez, cursar dos caminos: la liberación de perforinas y granzimas de las células citotóxicas sobre la célula infectada o la interacción del FasL (Fas Ligando) sobre la célula T con la molécula Fas expresada sobre la célula blanco. Estudios in vitro muestran que, cuando se activa la vía Fas/FasL, la lisis tiene lugar no solo sobre las células infectadas, sino también sobre las células vecinas que no han estado aún expuestas al virus y que, en sus membranas expresan la molécula de Fas, contribuyendo con la amplificación de la enfermedad. De ocurrir este mecanismo de destrucción celular in vivo, pudiese conducir al desarrollo de diferentes patologías que tiene lugar durante la FHD (134). Como consecuencia de la activación con serotipos heterólogos, los linfocitos de memoria T CD4+ con reactividad cruzada secretan citoquinas como las ya mencionadas (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y TNF $\beta$ ), las cuales han sido detectadas en altas concentraciones en el plasma de individuos con FHD(134).

El IFN $\gamma$  incrementa la expresión de receptores Fc- $\gamma$  en los monocitos, lo cual pudiera explicar el aumento de la infección de éstas células por los complejos virus-anticuerpos (135). El TNF $\alpha$  junto a otras citoquinas como la IL-6, incrementan la permeabilidad de las células endoteliales e inducen la pérdida de plasma (136, 137). La IL-6, producida principalmente por células endoteliales y mastocitos, tiene un papel dual ya que actúa como molécula pro-inflamatoria y anti-inflamatoria e incrementa la permeabilidad de las células endoteliales. Niveles elevados de la misma son encontrados en los sueros de pacientes con FHD/SCD (137).

Similar asociación con la severidad de la enfermedad se muestra en la expresión de marcadores de activación en las células T CD8+ y la expansión de poblaciones de estas células específicas a epítopes del VD. Durante la fase aguda de la infección secundaria con VD heterólogo, células T CD8+ de alta reactividad cruzada con alta avidez por el virus infeccioso son preferencialmente activadas. En su mayoría estas células producen altas concentraciones de citoquinas pro y anti inflamatorias como IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-13 y en ocasiones, bajos niveles de IL-10. Se plantea que estas células de gran avidez y reactividad cruzada mueren por apoptosis, pero no está claro aún si esta es activada selectivamente por epítopes de reactividad cruzada o como resultado de la activación propia del proceso de muerte programada. Alternativamente, células TCD8+ de reactividad cruzada de baja avidez pudieran preferencialmente, ser expandidas (138-140). Estas células T de reactividad cruzada reconocen preferencialmente epítopes heterólogos produciendo altos niveles de citoquinas proinflamatorias pero pierden su actividad citolítica. El retardo en la clarificación viral pudiera prolongar la activación de las mismas, resultando en la producción de muy altos niveles de citoquinas como IL-6, TNF- $\alpha$  y otros factores solubles que afectan la permeabilidad vascular. Este fenómeno donde se activan más eficientemente las células T de memoria con reactividad cruzada al serotipo primoinfectante ha sido llamado “Seno Antigénico Original”(138). Se plantea que sólo un pequeño subconjunto de células T de memoria podrían ser estimuladas a expandirse debido al estrecho repertorio de los receptores de células T (TCR) (*del inglés T cell receptor*) y esto, unido a una especificidad única del TCR (141), pudiera resultar en una respuesta dominante única para cada individuo, explicando así la variedad vista en el espectro de la enfermedad ante la infección secundaria con un serotipo de dengue heterólogo (129).

Otro factor importante parece ser la activación del sistema de complemento. Numerosos estudios sugieren que este sistema proteico está asociado a la pérdida de plasma, al detectarse niveles elevados de C3 y C1q en pacientes que sufren la forma severa de la enfermedad (142-144). Se plantea que la cascada del complemento podría ser activada por los IC circulantes (ICC). Los niveles de anticuerpos se elevan con mayor rapidez en infecciones secundarias por VD, y de esta forma los altos títulos de anticuerpos son alcanzables antes de la desaparición de la viremia, aumentando el potencial para la formación del IC (7, 142, 143).

Las evidencias experimentales ya citadas contribuyeron a la elaboración de un modelo para explicar las bases inmunológicas del síndrome de pérdida capilar en la FHD (7, 145). El mismo plantea que, la pérdida de plasma en infecciones secundarias por VD es debida a un efecto sinérgico entre el IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y proteínas activadoras del complemento en las células endoteliales unidas a un mecanismo de regulación positivo, donde el fenómeno de ADA incrementa el número de células presentadoras de antígeno que estimulan a los linfocitos de memoria de reactividad cruzada CD4+ y CD8+. La activación de macrófagos y linfocitos induce la producción de citoquinas y mediadores químicos los cuales conllevan al choque por pérdida de la capilaridad (7, 145).

Otra hipótesis relaciona el fenómeno de reactividad cruzada entre proteínas del virus y aquellas pertenecientes a la cascada de la coagulación. La misma plantea la existencia de una homología estructural entre una secuencia conservada de la proteína E de los flavivirus y ciertas secuencias de factores de la cascada de la coagulación, específicamente el plasminógeno y su activador, que pudieran estar vinculadas con la aparición del cuadro hemorrágico (36).

Se ha podido constatar por análisis computarizado que existe una región de 20 residuos de aminoácidos de la proteína E del serotipo 4 del VD que tienen similitud con una familia de factores que incluyen al plasminógeno, primer mediador de la fibrinólisis, y otros como el factor X, protrombina y el activador del plasminógeno (146).

La actividad de la plasmina, forma activa del plasminógeno, está modulada fisiológicamente por un antagonista,  $\alpha$  2 antiplasmina, que se une a la serina del sitio activo en el complejo plasminógeno/plasmina.

Se ha reportado que los anticuerpos producidos ante la infección por VD 4, específicos a la proteína E, reconocen una secuencia similar en el plasminógeno, provocando un impedimento estérico que bloquea la unión del antagonista, lo cual constituye una hipótesis posible de la alteración hemostática en pacientes con anticuerpos de reactividad cruzada (147).

Otros autores, en cambio, han analizado las formas virulentas de ciertas variantes virales y plantean que las formas graves de la enfermedad por flavivirus pudieran estar ligadas además, a un determinismo genético de la virulencia. Se plantea que la virulencia de las distintas cepas de

los cuatro serotipos del virus puede aumentar cuando estas pasan repetidamente por el hospedero humano. Una mutación en una región precisa del gen que codifica para la proteína E, asegura la atenuación o el incremento de la virulencia de una cepa dada (148), por lo que la aparición de cuadros clínicos graves se asocia con determinadas cepas virales o mutantes de estas. Se especula que, tras una infección primaria ( por ejemplo al serotipo 1), el repertorio de anticuerpos neutralizantes generados es capaz de eliminar la infección causada por un serotipo viral diferente (por ejemplo, el serotipo 2) antes que, en los individuos por segunda vez infectados, tenga lugar el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa específica contra el agente viral. Esto se explica porque, como consecuencia del proceso de maduración de la afinidad, los anticuerpos generados en la primoinfección son capaces de reconocer determinantes antigénicos mayoritarios comunes en la superficie de la partícula viral del serotipo 2. De esta forma son eliminadas, en su mayoría, las partículas virales durante la segunda infección y, en consecuencia, los individuos desarrollan un cuadro clínico benigno o, en muchos casos, asintomático. Sin embargo, en otros casos partículas virales escapan a la neutralización, pues en el proceso de síntesis de sus proteínas estructurales no son expresados aquellos determinantes comunes al serotipo causal de la primoinfección. Cuando son transmitidas, y de forma mayoritaria se multiplican en otros individuos con igual historia primaria de infección y por tanto con igual repertorio de anticuerpos neutralizantes, son capaces de desarrollar en éstos el cuadro más severo de la enfermedad.

Los anticuerpos predominantes en dichos individuos son por tanto, anticuerpos que al no poder neutralizar la infección por medio de su porción Fc se unen a diferentes tipos celulares donde encuentran los receptores correspondientes y, de esta forma, se desarrolla el proceso de ADA (149).

Leitmeyer y cols. (1999) reportaron la existencia de diferencias estructurales entre las cepas de origen asiático y americano del VD 2, que están correlacionadas con la virulencia y la patogenicidad. Los determinantes principales de la severidad han sido encontrados en el aminoácido 390 de la proteína E, que podría afectar la unión del virus a la célula hospedera; los nucleótidos del 68 al 80 del lazo de la NCR 5', que podrían estar involucrados en la iniciación de la traducción del ARN viral y en los primeros 300 nucleótidos de la NCR 3', que podrían regular

la replicación viral mediante la formación de intermediarios (150, 151). Además, las cepas del VD 2 de genotipo americano muestran una capacidad replicativa menor en monocitos y en CD humanas comparadas con las cepas de genotipo asiático (151).

Estudios en Perú y Sri Lanka han proporcionado datos convincentes, demostrando la asociación de la FHD con genotipos virales específicos (152, 153). Durante las infecciones secundarias, las cepas de VD 2 pertenecientes al genotipo asiático han sido asociadas al desarrollo de las formas severas mientras que las cepas de genotipo americano han sido asociadas al desarrollo de las formas leves de la enfermedad (150). Las epidemias de VD 2 ocurridas en Cuba en el año 1981 y en Perú en el año 1995 fueron precedidas por una epidemia de VD 1. Sin embargo, la introducción en Cuba en 1981 de una cepa de VD 2 de genotipo asiático provocó una epidemia de FHD, mientras que en Perú en 1995 ocurrió una epidemia de FD causada por una cepa de VD 2 perteneciente al genotipo americano (154). En este sentido se ha demostrado que los sueros humanos inmunes a VD 1 neutralizan más eficientemente al VD 2 de genotipo americano que al de genotipo asiático (155).

Por otra parte, determinadas secuencias de infección han sido correlacionadas con el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. La infección secuencial VD 1-VD 2 o VD 1-VD 3 ha sido asociada con epidemias de FHD (156, 157). En la epidemia de 1980 en Tailandia, la secuencia de infección VD 1-VD 2 mostró un riesgo de desarrollo de FHD 500 veces mayor que la infección primaria por el virus VD 2. Para la secuencia VD 3-VD 2 el riesgo de desarrollo de la FHD fue 150 veces mayor, y en el caso de la secuencia VD 4-VD 2 de 50 veces (110). En la segunda epidemia cubana de FHD ocurrida en el año 1997 y causada por una cepa del VD 2 de genotipo asiático se comprobó la secuencia de infección VD 1-VD 2 en el 98% de los casos graves y en el 92% de los fallecidos (158).

Otros elementos importantes son los factores del hospedero como la edad, la raza, el estado nutricional, genético e inmunológico, así como infecciones recurrentes los cuales contribuyen al desarrollo de las formas graves de la enfermedad(159, 160).

Por lo tanto podríamos concluir que, para la comprensión de los fenómenos inmunopatológicos desencadenados como consecuencia de la infección por VD, deben ser integrados múltiples

factores: factores de riesgos individuales (presencia de anticuerpos anti-VD, edad, sexo, raza, portador de enfermedades crónicas, genética del individuo), epidemiológicos (vector e intervalo entre infecciones) y factores relacionados con el virus (serotipo, virulencia de la cepa y secuencia de infección), los que, como consecuencia de su interacción, conllevan al desarrollo de la forma grave de esta enfermedad (4).

## **II-7 Situación epidemiológica del dengue en Cuba**

Aunque la circulación del VD ha sido ampliamente documentada en la región de las Américas, en Cuba los reportes de síndromes clínicos por infección han sido esporádicos.

La primera epidemia de dengue reportada en Cuba fue en 1977-79, con 500 000 casos diagnosticados, todos clínicamente clasificados como FD. En esa ocasión el 44,6% de la población cubana fue infectada con VD 1 (161).

Una segunda epidemia tuvo lugar en 1981, donde circuló el serotipo 2 del virus. Un total de 344 203 personas resultaron infectadas, de las cuales 10 312 desarrollaron FHD/SCD. Se produjeron 158 muertes, de ellas 101 niños y 57 adultos (162). Dieciséis años más tarde, en 1997, vuelven a reportarse casos de dengue en nuestro país, fundamentalmente en la provincia de Santiago de Cuba. Durante esta epidemia fueron infectadas 2 946 personas; de estas 205 fueron diagnosticadas con FHD/SCD y 12 fallecieron (163). Las cepas aisladas mostraron gran homología con VD 2 Jamaica y se relacionaron por análisis de la secuencia nucleotídica, con cepas del genotipo asiático.

Tres años más tarde, en el año 2000 se detectó un brote en Ciudad de la Habana, durante el cual fueron aislados virus de los serotipos 3 y 4. Nuevamente durante el período 2001-2002 Ciudad de la Habana estuvo afectada por un nuevo evento epidemiológico. En esta oportunidad el serotipo 3 fue responsable de la infección, y se confirmaron serológicamente 1 635 casos, de los cuales 152 desarrollaron FHD/SCD (157, 164).

En el año 2006 se vieron afectadas varias provincias del país donde circularon los serotipos virales 3 y 4 (165).

Aunque las manifestaciones durante la etapa aguda del dengue son bien conocidas, pocos estudios abarcan las consecuencias de la enfermedad a largo plazo en los individuos (34).

La información obtenida de esta situación epidemiológica dada en nuestro país, que ha sido extensivamente estudiada, completamente diferente a la encontrada en el sudeste asiático, constituye una herramienta esencial para llegar a definir con mayor autenticidad, factores genéticos involucrados en el desarrollo de la Fiebre Hemorrágica del Dengue así como estudiar la evolución de los individuos en etapas posteriores a la enfermedad aguda.

## **II-8 Polimorfismo genético asociado a la infección por dengue**

La gran evolución en el campo de la genética del hospedero, de patógenos y vectores y el extensivo crecimiento de estos estudios, ha incrementado grandemente el entendimiento de la transmisión y la patogenicidad de las enfermedades infecciosas. Es conocido la gran influencia de la genética del hospedero en la resistencia a las infecciones así como que la susceptibilidad a las mismas tiene también bases genéticas. Por lo tanto el estudio de los factores genéticos del hospedero asegura el camino a seguir en la elaboración de drogas y otras alternativas de tratamiento.

El papel de los alelos correspondientes a antígenos leucocitarios humanos (HLA) en determinar la resistencia, susceptibilidad o la severidad de infecciones virales agudas constituye un tema de gran interés, sobre el que la comunidad científica ha centrado su atención. La FD y la FHD constituyen modelos útiles para estudios inmunogenéticos, existiendo hasta la fecha varios estudios sobre la temática.

Los primeros estudios realizados sobre la asociación de genes de respuesta inmune y dengue se realizaron en población tailandesa y reportaron una frecuencia incrementada de HLA A2 en pacientes DHF (166). Posteriormente se identifican dos alelos HLA-A, HLA A\*0203 asociados a cuadros benignos de la infección secundaria por dengue, y el HLA A\*0207 asociado con la susceptibilidad a padecer FHD en población tailandesa (167). Estas asociaciones difieren de las encontradas en Cuba donde un primer estudio realizado en niños durante la epidemia de dengue 2 ocurrida en 1981, mostró una asociación positiva de HLA-A1, HLA B y HLA CW1 con susceptibilidad a desarrollar FHD (168). Estudios posteriores de individuos con antecedentes de

infección por virus dengue mostró un aumento en la frecuencia de los alelos A\*31 y B\*15 del HLA I. Sin embargo, a pesar de las características epidemiológicas excepcionales de Cuba, que permitieron clasificar dichos casos en FD y FHD (169), no se encontraron diferencias asociadas a los cuadros clínicos de la enfermedad, por lo que al parecer, la infección por dengue parece comportarse como una sola enfermedad.

Estos trabajos de asociaciones de genes HLA y enfermedad por dengue se retomaron nuevamente en el 2001, dónde un análisis molecular de los alelos HLA clase I por métodos moleculares en población vietnamita, mostró que el locus HLA-A, estaba significativamente asociado con la susceptibilidad a sufrir la FHD así como la presencia del alelo T en la posición 352 del gen del receptor de la vitamina D, y la homocigosis AA en la posición 131 del gene del receptor Fc  $\gamma$  IIA, con una resistencia al desarrollo de FHD (13).

Como hemos explicado en acápites anteriores, los niveles de los diferentes tipos de citoquinas influyen en el desarrollo de la patogenicidad por VD. Estos niveles son determinados por las variaciones en los genes que las codifican, de ahí que trabajos recientes abarcan el estudio del polimorfismo genético de citoquinas. En este sentido, se ha constatado un incremento significativo del alelo 308A que codifica para el TNF  $\alpha$  (del inglés *Tumor Necrosis Factor*) en los pacientes FD con manifestaciones hemorrágicas comparado con aquellos que desarrollaron solo un cuadro benigno, lo cual pudiera asociarse a la permeabilidad vascular y al fenómeno hemorrágico presente en la FHD (13, 170).

En los últimos tiempos se postula que la lectina tipo C, DC-SIGN, codificada por el CD209 es el receptor natural para la proteína E del virus del dengue (13). También para esta molécula se reporta una fuerte asociación entre la variante que expresa el alelo G del promotor de CD 209, denominada DCSIGN1-336, con la protección para el desarrollo del cuadro grave de la enfermedad. Se ha podido demostrar que esta variante polimórfica afecta *in Vitro*, el sitio de unión y la actividad transcripcional, lo que indica a su vez que juega un papel central en la patogénesis de la enfermedad por dengue al discriminar entre el cuadro leve y la fiebre hemorrágica (171).

El polimorfismo asociado a la lectina de unión a manosa 2 MBL-2 (*del inglés manosa binding Lectine*) fue asociado con la trombocitopenia y con un incremento del riesgo a padecer FHD. La

MBL es miembro de la familia de las colectinas y juega un importante papel en el patrón de reconocimiento y en la respuesta inmune innata (172).

El polimorfismo en los transportadores asociados con la presentación antigénica y los antígenos plaquetarios humanos han sido asociados también con el incremento de la FHD (173).

Podemos decir que el riesgo a padecer FHD y SCD tras la infección por VD está determinado por la combinación de múltiples factores genéticos comunes cada uno con efectos desde benignos a moderados predisponen a una forma más severa de la enfermedad. Permanece aun en incógnito si un simple defecto genético que confiera profunda susceptibilidad a FHD pudiera existir, tal y como se ha propuesto para otros patógenos como pneumococos y micobacterias (174).

### **II-8.1 Receptor Fcγ IIa de baja afinidad**

Los FcγR de las IgG comúnmente expresados sobre las membranas de las células del linaje hematopoyético median un importante número de procesos biológicos como son: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, endocitosis, fagocitosis, liberación de mediadores inflamatorios y aumento de la presentación antigénica. De esta manera forman un puente de unión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (22).

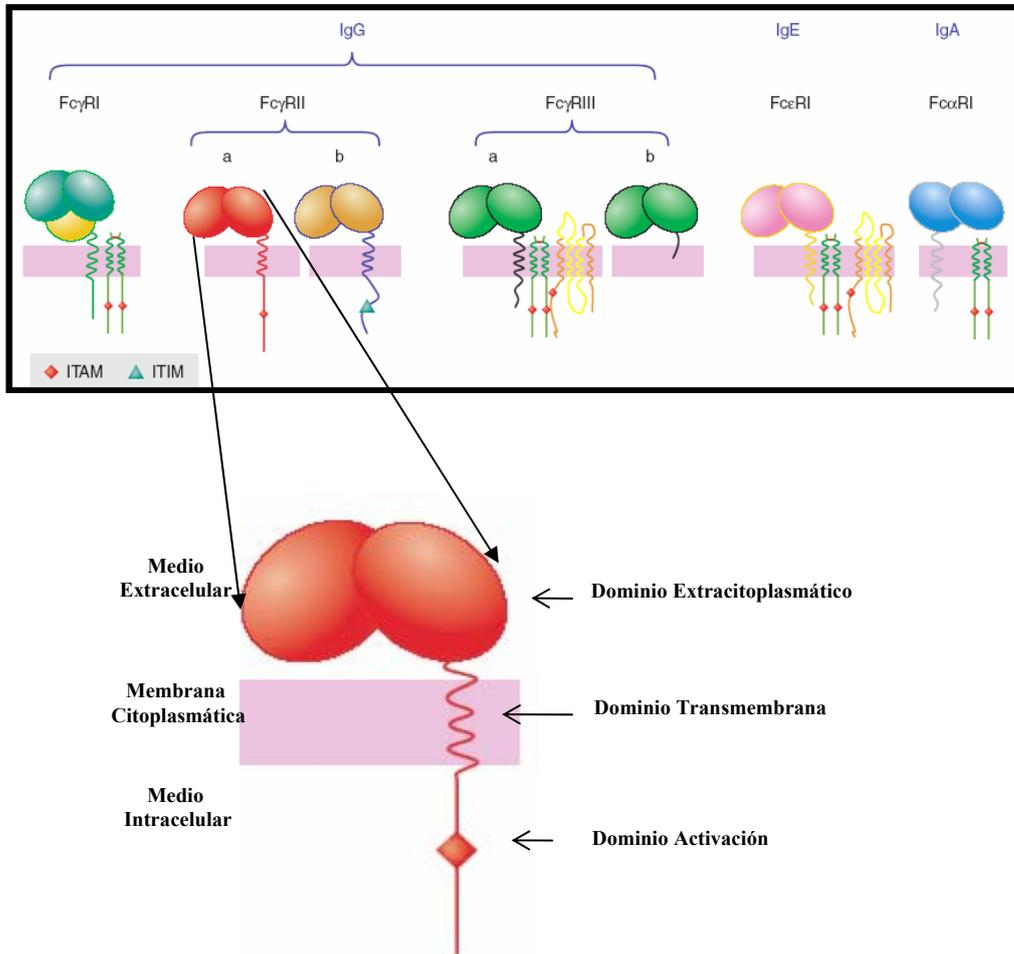
Estos receptores, codificados por ocho genes localizados en el brazo largo del cromosoma 1, están divididos en tres clases: FcγRI (CD 64), FcγRII (CD 32), FcγRIII (CD 16) (9) y en cada clase se han identificado isoformas que varían en peso molecular, afinidad de unión de a las subclases de IgG así como su distribución en la superficie de las células hematopoyéticas. El FcγRI es el receptor de alta afinidad para las formas monoméricas de las IgG1, IgG3 y IgG4. Los receptores FcγRII y FcγRIII son, en cambio, los receptores de baja afinidad para dichas inmunoglobulinas y son capaces de unirlos formando complejos (175). La isoforma II del receptor Fcγ de baja afinidad, es aún más compleja pues presenta variantes alélicas biológicamente diferentes: (IIa, IIb, IIIa y IIIb), las cuales han sido asociadas con el desarrollo de diferentes desordenes clínicos (10).

Los receptores Fc contienen tres dominios clasificados de acuerdo con su ubicación, llamados dominio extracitoplásmico, dominio transmembrana y dominio de activación/inhibición. El

receptor de activación posee una región basada en tirosinas (ITAM: del inglés *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) en su región citoplasmática que actúa como unidad central para la transmisión de señales, que redundan en las ya mencionadas funciones de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA), citotoxicidad dependiente de complemento (CDCC), endocitosis, regulación de anticuerpos, producción de citoquinas inflamatorias y potenciación de la presentación antigénica.

Para el caso del receptor Fc inhibidor (FcγRIIb), la región de inhibición basado en tirosinas (ITIM) presente en su porción citoplasmática, regula las funciones de los dominios activadores como es el caso de la regulación de anticuerpos y la activación de la apoptosis de las células B (176).

El receptor Fcγ RIIa (fig. 3) tiene varias características que lo hacen único: primero, no se encuentra en ratones o cualquier otro mamífero, únicamente en humanos. Segundo, es el único receptor de Fc y uno de los únicos inmunoreceptores, donde la secuencia ITAM (secuencia intracelular de activación) se encuentra en la cadena de unión a su ligando IgG y no en moléculas de bajo peso molecular asociadas por enlaces no covalentes a la cadena de unión al ligando. Tercero, FcγRIIa forma un homodímero unido no covalentemente, característica única entre los FcR. Cuarto, las señalizaciones de otros receptores Fc dependen de la isoforma IIa para ser funcionales, tal es el caso del FcγRI expresados en los macrófagos maduros. Por tanto, las señales de los receptores Fc al menos en algunos casos se focalizan a través del FcγRIIa (11). Esta molécula se encuentra expresada en la superficie de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, células dendríticas y de Langerhans .



**Fig. 3:** Representación de la molécula del receptor Fcγ RIIa de baja afinidad.

Este receptor presenta dos formas alélicas que difieren en el aminoácido (aa) 27 (E/Y) y el aminoácido 131 (R/H). Solo el polimorfismo asociado al aminoácido 131 afecta significativamente la unión al ligando. Se ha descrito que la variante para la histidina (H131) une eficientemente la IgG2 (FcγRIIa-His/His131), mientras que la isoforma de la arginina (R131) presenta muy baja afinidad por este ligando uniendo preferencialmente las IgG 1/3 (FcγRIIa-Arg/Arg131) (12). Este polimorfismo ha sido vinculado a la susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas(177-180) y autoinmunes como explicaremos más adelante.

## **II-9 Enfermedades autoinmunes**

Las enfermedades autoinmunes en su conjunto conforman un síndrome caracterizado por la activación de células T o B, o ambas, en ausencia de infección u otra causa discernible, que resulta en daño a estructuras propias (181).

Durante muchos años el dogma de la inmunología se centró en la selección clonal de las células T autoreactivas lo que se especulaba, llevaba a la formación final de un repertorio de células T y B específicos a antígenos foráneos. Sin embargo, actualmente se conoce que existe autoreactividad a niveles fisiológicos que es crucial para el funcionamiento del sistema inmune (182). Los autoantígenos ayudan en la formación del repertorio de los linfocitos T maduros y la supervivencia de los linfocitos T y B vírgenes que en la periferia requieren una continua exposición a los antígenos propios (181). Debido a que no existen diferencias fundamentales entre autoantígenos y antígenos extraños se plantea que los linfocitos no distinguen entre ellos, sino que responden a ellos en determinados microambientes, generalmente en presencia de las citoquinas inflamatorias (183)

Se plantea que el potencial inherente para la reactividad cruzada dado al unísono por una respuesta inmune eficiente para un vasto grupo de patógenos y el reconocimiento de lo propio, conlleva a la autoinmunidad, proceso que se ha denominado *Mimetismo Molecular* (184).

Este fenómeno que conlleva al desarrollo de enfermedades autoinmunes ha sido descrito para niveles de células T y B así como de anticuerpos tanto en modelos experimentales como en humanos expuestos a infecciones. En su mayoría, las enfermedades autoinmunes crónicas en humanos son precedidas por un largo período de latencia, lo cual hace difícil poder definir el evento inicial que le dio origen, así como se hace imposible aislar el microorganismo del tejido dañado (185). La artritis reumatoide, por ejemplo, se caracteriza por la inflamación en las articulaciones que es causada por una respuesta de auto-anticuerpos que reconocen antígenos sinoviales. En el caso de la diabetes tipo 1, los pacientes desarrollan insulinitis como resultado de la infiltración de las células T y destrucción de los islotes del páncreas. La esclerosis múltiple, desorden neurológico que representa una importante fuente de discapacidad, puede ser producida

por células B autoreactivas que proliferan en el Sistema Nervioso Central (SNC) (186). Las respuestas autoinmunes, por lo tanto, se basan en la pérdida de la tolerancia central o periférica, donde las células presentadoras de antígenos en presencia de factores genéticos y ambientales, estimulan clones de linfocitos autoreactivos (187).

Los auto-anticuerpos presentes en el suero frecuentemente son utilizados como marcadores diagnósticos. Se han descrito cientos de auto-anticuerpos diferentes, sin embargo no todos están involucrados en las enfermedades autoinmunes. Estos anticuerpos que reconocen las estructuras propias se clasifican en dos grandes categorías (188):

*Anticuerpos órgano- específicos:* Aquellos que localizan su antígeno diana en un órgano o tipo celular.

a) *Anticuerpos órgano-no específico:* Aquellos en que los antígenos blancos están ampliamente distribuidos, usualmente como componentes presentes en todos los tipos celulares.

Pueden clasificarse además como:

a) *Anticuerpos patogénicos primarios:* Aquellos que causan directamente los desórdenes al bloquear las funciones normales de las células o mediando el daño de los tejidos.

b) *Anticuerpos patogénicos secundarios:* No son patogénicos por si mismos, sino que son producidos como resultado de la enfermedad autoinmune y son utilizados como marcadores.

Por tanto según el tipo de auto-anticuerpo, las enfermedades autoinmunes, pueden clasificarse como órgano-específica y órgano-no específica (o sistémica). Entre las enfermedades autoinmunes órgano-específicas, se encuentra la anemia hemolítica autoinmune donde los auto-anticuerpos producidos son dirigidos contra los eritrocitos.

Las enfermedades autoinmunes sistémicas se caracterizan por el daño y la inflamación en los tejidos, iniciados generalmente por la permeabilidad vascular y la deposición en múltiples sitios de ICC formados contra antígenos celulares solubles y ubicuos, usualmente de origen nuclear. El ejemplo clásico de enfermedad autoinmune sistémica lo constituye el LES, caracterizado por la producción de múltiples autoanticuerpos anti-nucleares y anti-ADN. El diagnóstico de estas enfermedades es difícil pues individuos que muestran síntomas muy diferentes sin embargo,

cursan la misma enfermedad. Luego puede tomar años analizar los síntomas y resultados de laboratorio para concluir con un diagnóstico acertado. Por ello, la inmunología clínica es un campo que se encuentra en constante cambio donde se desarrollan protocolos más específicos en el diagnóstico de estas enfermedades autoinmunes. Entre las técnicas que permiten el acumulo de información para el diagnóstico de estas patologías tenemos:

- **Inmunofluorescencia Indirecta:** Considerada como la técnica estándar para la detección de un amplio rango de anticuerpos en suero, pues se pueden simultanear varios tejidos (por ejemplo: tejidos de hígado y riñón de rata), o puede emplearse un tejido único como el de riñón de ratón que contiene células del músculo y sangre. Dentro de estas pruebas tenemos la de anticuerpos anti-nucleares (ANA), donde se detectan anticuerpos contra componentes del núcleo de todas las células y se realiza para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune fundamentalmente cuando hay sospechas de Lupus eritematoso sistémico.
- **Ensayos de ELISA:** Este procedimiento es similar a la inmunofluorescencia pero en vez de células se utiliza antígenos unidos covalentemente a una superficie sólida, a la cual se le adiciona la muestra de suero. Es una técnica menos costosa pero aporta menos información que la inmunofluorescencia sobre múltiples tejidos, y se realiza para confirmar el diagnóstico basado en lo resultados de la misma.
- **Prueba de detección de anticuerpos anti-mitocondriales:** Es una prueba primaria cuando hay síntomas de daño hepático o en otros órganos, y se emplea para el diagnóstico o como ayuda en la identificación de las posibles causas del daño tisular. La detección de anticuerpos anti-mitocondriales es útil para distinguir una cirrosis biliar primaria de otras obstrucciones extra hepáticas, hepatitis y cirrosis alcohólicas.
- **Prueba de detección de anticuerpos anti-fosfolípidos:** Estos anticuerpos son detectados cuando existen desórdenes circulatorios (síndrome de Sneddon) en enfermedades como el LES, el síndrome Sjögren y en mujeres que sufren de abortos espontáneos recurrentes.
- **Prueba de detección de crioglobulinas:** Las crioglobulinas son inmunoglobulinas anormales que forman inmunocomplejos que precipitan en un rango de temperaturas inferiores a los 37°C y que se resolubilizan cuando la temperatura aumenta, lo que puede bloquear los capilares

sanguíneos. Este ensayo se aplica cuando existen síntomas inducidos por el frío como el fenómeno de Raynaud y cuando se sospecha de alguna enfermedad mediada por inmunocomplejos.

- **Factor reumatoideo:** Se encuentra asociado a múltiples factores como infecciones virales, bacterianas crónicas, linfomas y mielomas, y enfermedades del tejido conectivo. Constituye un ensayo no específico que detecta toda clase de inmunoglobulinas que reacciona con la región Fc de otras inmunoglobulinas. Se ha encontrado niveles de este factor elevado en enfermedades reumatológicas como el LES (188).
- Existen otros ensayos que indirectamente alertan sobre posibles desórdenes de origen inmunológico según el estado clínico del individuo, como es el caso de la detección de ICC, los niveles de la proteína C reactiva (PCr) y de las proteínas del complemento C3 y C4.

### **II-9.1 Fc y enfermedades autoinmunes**

Como describimos, las enfermedades autoinmunes, desde el punto de vista etiológico, conjugan factores medioambientales, genéticos, inmunológicos y hormonales. Éstas se caracterizan por la presencia de una respuesta linfocitaria T y/o B autorreactiva en ausencia de alguna causa discernible (infección o cáncer), acompañados de inflamación, producción de autoanticuerpos, presencia de autoantígenos (modificados o no), pérdida de la tolerancia y daño tisular. Desde el punto de vista inmunogenético, las enfermedades autoinmunes son complejas, debido a que no siguen un patrón de herencia mendeliano y son poligénicas, sumado a interacciones génicas como epístasis y desequilibrio de ligamiento. Las fisiopatologías de las enfermedades autoinmunes son el resultado de la pérdida de tolerancia con una exagerada activación de linfocitos autorreactivos, producción de autoanticuerpos y una inflamación constante en los sitios de depósito de complejos inmunes. Dado que en las enfermedades autoinmunes se observa una inhibición de la respuesta tanto humoral como celular, es fundamental determinar si los receptores Fc desempeñan un papel importante en estas patologías (22).

El estudio de los receptores Fc en el contexto de la autoinmunidad ha despertado un gran interés por su implicación biológica en la depuración de complejos inmunes. Modelos animales para el estudio de enfermedades autoinmunes así como estudios genéticos en ratones y humanos ilustran que los receptores Fcγ son un factor de riesgo para el desarrollo de estas patologías (189,

190). Estudios de autoinmunidad in vivo muestran que la inactivación del receptor de inhibición FcγRIIb exacerba la autoinmunidad existente y predispone al desarrollo espontáneo de otras enfermedades autoinmunes (191-193)

Una de las mayores deficiencias que mostraron estos análisis y en general el estudio de los receptores Fc en las enfermedades humanas es carencia de modelos animales para la variante FcγRIIa pues, como ya decíamos, es único de la especie humana.

Al obtener ratones transgénicos que expresan el receptor FcγRIIa estos desarrollaron espontáneamente un síndrome autoinmune similar a la artritis reumatoidea, LES, pneumonitis y artritis no erosiva, hechos que evidencian en su conjunto que aun en presencia de los receptores Fc endógenos, el FcγRIIa es el activador mayoritario de la inflamación (11). Se ha descrito que la homocigosis para la variante R 131 está asociada con una alta susceptibilidad a padecer infecciones causadas por organismos encapsulados cuya respuesta es mediada fundamentalmente por las IgG2 (21) y en consecuencia se ha asociado con un incremento en la prevalencia de neuropatías (194), infecciones bacterianas (195) y, presumiblemente, en el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (196, 197). Es por ello que determinar el polimorfismo asociado al FcγRIIa reviste gran importancia para determinar susceptibilidades a padecer o no enfermedades autoinmunes o enfermedades infecciosas, entre ellas el dengue, que se manifiesta en un espectro de cuadros clínicos que describen una misma enfermedad.

## **II-10 Funcionabilidad de los receptores Fcγ: Subclases de IgG**

### **II-10.1 Actividades biológicas de los anticuerpos**

Las actividades biológicas de los anticuerpos dependen de la interacción de su porción Fc con los sistemas efectoros, esencialmente el sistema de complemento y las células que expresan los receptores de tipo Fc. Los anticuerpos han sido agrupados en clases con funciones específicas asignadas. Dentro de las clases, existe una subclasificación para las IgG que amplía la diversidad de las inmunoglobulinas.

La distribución de las subclases IgG, en respuestas de anticuerpos específicos está influenciada por múltiples factores, entre ellos el ambiente de citoquinas predominantes. Experimentos en ratones muestran que, en un contexto donde predominan las citoquinas Th2 como la IL-4 se

induce un cambio a la subclase IgG1 y a la clase IgE. El factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) induce un cambio a IgG 2b,e IgA . Alternativamente un patrón Th1 donde predomina IFN-γ resulta en IgG2a, IgG2b e IgG3. Los cambios de subclases son además influenciados por la estructura del antígeno (naturaleza del *carrier*, número y naturaleza de los epítopes, propiedades físico-químicas), su dosis y ruta de entrada, así como con la constitución genética del hospedero. En contraste con los antígenos independientes de células T (timo independiente), los dependientes de células T (timo dependiente) requieren de la interacción con linfocitos T cooperadores con el fin de estimular a los linfocitos B para la producción de anticuerpos. En este sentido, la estimulación de la respuesta de anticuerpos hacia ciertos antígenos puede resultar en un incremento selectivo de anticuerpos IgG de ciertas subclases (17, 18). En general los anticuerpos IgG anti-virales están altamente restringidos a IgG1 e IgG3, apareciendo primero los IgG3 en el curso de la infección y prevaleciendo IgG1, algunas veces en combinación con IgG3 (19). Mientras que en una respuesta antibacteriana, la distribución de la subclase será más heterogénea ya que la bacteria contiene muchos epítopes antigénicos diferentes, con variaciones considerables en su estructura de carbohidrato y proteína (198).

## **II-10.2 Funciones efectoras**

En su mayoría, las actividades biológicas de los anticuerpos, están relacionadas con sus funciones efectoras, destinadas a la inactivación o remoción del agente infeccioso y sus productos. Ellas están mediadas por el fragmento Fc (constante) y son inducidas como resultado de la interacción del anticuerpo con su antígeno, mediante su fragmento Fab (variable)(198).

Las 4 subclases de IgG difieren una de otra en cuanto a sus funciones efectoras. Esta diferencia está relacionada con diferencias estructurales notables, con respecto a la interacción entre los fragmentos Fab y Fc. En particular, las longitudes y flexibilidades de las regiones bisagras son diferentes. La flexibilidad disminuye en este orden IgG3>IgG1>IgG4>IgG2, lo cual se relaciona, probablemente, con la mayor actividad de IgG3 en activar las funciones efectoras, comparado con el resto de las subclases (199, 200). Una de estas funciones es la capacidad para activar el complemento. El evento inicial de la cascada de complemento por la vía clásica, lo constituye la unión de C1q a sitios presentes en el dominio CH2 de la IgG. Esta unión ocurre cuando el anticuerpo está agregado, usualmente formando IC. Otros componentes requeridos para la

activación del complemento incluyen un puente S-S en el extremo N- terminal de CH2 (normalmente la región bisagra), la presencia de carbohidratos y dominios C(H)3 pareados. La capacidad de las 4 subclases IgG humanas (en forma monomérica) para unir C1q disminuye en el orden: IgG3> IgG1>IgG2 y por último IgG4 que no activa complemento (201, 202). Las flexibilidades Fab-Fab y Fab-Fc dependientes de la región bisagra determinan la accesibilidad del sitio de unión del complemento a C1q. IgG3, con la bisagra más extensa, es el activador del complemento más efectivo. La incapacidad de IgG4 para activar el complemento es causada por la estructura del fragmento Fc, así como por el impedimento estérico de los fragmentos Fab al sitio de unión del complemento (198). La mayoría de los microorganismos son incapaces de activar el complemento o unir fagocitos, por sí mismos. Los anticuerpos actúan como adaptadores flexibles mediando la adherencia de agentes infecciosos a los fagocitos, formando así un puente entre las membranas celulares y del microorganismo.

La interacción entre el receptor Fcγ y el complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) estimula las respuestas de fagocitosis, endocitosis, ADCC, generación de radicales superóxidos y liberación de mediadores inflamatorios, así como la clarificación de inmunocomplejos (203-206). Estas respuestas son dependientes las interacciones entre los Fcγ y las proteínas así como de la transducción de señales a través de de la región transmembrana y citoplasmática del FcR (203, 207). Se ha descrito que la endocitosis de partículas opsonizadas a través del receptor FcγIIa involucra el movimiento lipídico permitiendo el acercamiento de los receptores y con ello la señalización a través de la secuencia ITAM (208). Se especula a partir de evidencias experimentales que esta maquinaria de internalización a través de los receptores FcγRIIa pudiera mediar junto a la fagocitosis del inmunocomplejo, el fenómeno de ADA en la infección por dengue (16, 209).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS**

Este estudio formó parte de un proyecto de investigación aprobado y financiado por el programa especial de la OMS para las investigaciones en Medicina Tropical (TDR, del inglés *Tropical Disease Research*). El mismo contó con la aprobación de los comités de éticas y científico del IPK, así como el comité de ética de la OMS (Anexos 1 y 2).

*Objetivo 1: Demostrar la asociación entre las variantes polimórficas del gen del receptor FcγIIa y la susceptibilidad a desarrollar enfermedad por dengue.*

#### **III-1a Determinación de las variantes genóticas del receptor de baja afinidad FcγIIa en una muestra, tomada al azar para caracterizar la población de Ciudad de la Habana.**

Para dar cumplimiento al primer objetivo se hizo necesario conocer previamente el fondo genético que, para la molécula FcγRIIa, presenta la población cubana del lugar de estudio.

##### **III-1.1a Criterio de selección de los individuos que tomaron parte de este estudio**

Se escogieron personas sin enfermedad reconocida en curso, donantes de sangre, en número de 100, que es útil para estudios de poblaciones según lo referido en la literatura (10). Los individuos se seleccionaron tras una entrevista previa en la que se les preguntó su lugar de nacimiento, así como el de padres y abuelos. Se escogieron aquellos nacidos en Ciudad de la Habana, con padres y abuelos nacidos en las provincias de Ciudad de la Habana o en las provincias aledañas de La Habana o Pinar del Río, de manera que pudiera ser la muestra representativa de la región occidental del país. De cada participante, después de expuestos los objetivos del estudio, se obtuvo el consentimiento informado correspondiente (Anexo 3).

### III-1.2a Muestra

De cada individuo seleccionado se tomaron 10 ml de sangre venosa periférica tras completar la donación de una bolsa del donante. La misma fue colectada en tubos Corning de 15 ml, que contenían EDTA como anticoagulante, y fue conservada a -20°C hasta su uso.

### III-1.3a Metodología

#### III-1.3.1a Determinación del polimorfismo genético del receptor FcγRIIa.

1. **Extracción de ADN:** Brevemente, el ADN genómico se aisló a partir de la sangre total colectada con EDTA empleando un estuche comercial de extracción QIAGEN (QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit.información disponible en la página [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)). Este sistema se basa en el empleo de centrifugación al vacío de columnas, las cuales poseen una membrana a la cual se adsorbe el ADN. Inicialmente, la sangre total fue mezclada con proteinasa-K para extraer el material genético. Luego se añadió a las muestras el tampón lisis incubándose 10 minutos a 56<sup>0</sup>C para aumentar la eficiencia del proceso. Tras mezclarlas con etanol absoluto, las muestras fueron aplicadas a las columnas (QIAamp Spin Column) donde, tras la centrifugación, se adhirió ADN a la membrana de dicha columna. Se realizaron lavados seriados empleando un sistema de tampones con concentraciones de sales y pH específicos, que evitan la contaminación con proteínas, enzimas y otros, así como se logra un mayor rendimiento del proceso. Una vez obtenido el ADN genómico, el mismo se conservó a -20<sup>0</sup> C hasta su uso.
2. **Determinación del polimorfismo genético:** Para la determinación del polimorfismo asociado al R-FcγIIa se estandarizó, en nuestras condiciones, el protocolo propuesto por Basilio y colaboradores en el 2004 (210), empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) para ampliar la región genética de interés. La reacción por PCR amplificó la porción de 1kb correspondiente al gen FcγIIa, en la cual están contenidos el exón 4 y parte del exón 5, separados por un intrón. La reacción utilizó como cebador sentido el P63 (5'-CAAGCCTCTGGTCAAGGTC) y antisentido FcRII-3' (5'-CAATGACCACAGCCACAA TC). A esta fase se le denominó PCR1. El producto obtenido se empleó en una reacción de amplificación anidada utilizando los cebadores sentido específicos: 494A (5'-ATTCTCCCATTGGATC) y

494G (5'-ATTCTCCCGTTTGGATC) y el cebador antisentido P52 (5'-GAAGAGCTGCCCATGCTG). La reacción de amplificación fue denominada como PCR2 y PCR3, respectivamente. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidium. El genotipage fue validado luego de tres pruebas diferentes para cada muestra estudiada.

3. **Análisis estadístico:** El estudio estadístico para la población se realizó empleando la prueba de hipótesis de diferencia de proporciones mediante el programa estadístico Microstat.1984, utilizando un nivel de significación estadística de  $p < 0.05$ .

### **III-1b Demostrar la asociación entre las variantes polimórficas del gen del receptor FcγIIa y la susceptibilidad a desarrollar enfermedad por dengue**

Una vez conocido el fondo genético de la población cubana en esta región del país procedimos con el estudio que responde al objetivo 1.

#### **III-1.1b Criterio de selección de los individuos que forman parte de este estudio**

El estudio, de tipo analítico retrospectivo, se realizó con individuos que fueron infectados por VD4 en Ciudad de la Habana durante la epidemia del año 2006. Estos se seleccionaron en dos momentos:

*1-: Grupo de infección subclínica o asintomáticos.* Durante el mes noviembre del 2006 se llevó a cabo una encuesta epidemiológica (Anexo 4) en áreas que presentaban alta transmisión de la infección, pertenecientes al Municipio 10 de Octubre. En este Municipio fue reportado el primer caso de dengue el 17 de Junio y reconocida la transmisión el 5 de Julio de 2006.

Los individuos que formaron parte del estudio habitaban varias manzanas correspondientes al Policlínico "Raúl Gómez". Tras la obtención del consentimiento informado se concientizó a cada participante con la necesidad de avisar a un miembro del grupo de investigadores en caso de presentar síntomas como fiebre, malestar general y dolores articulares en los 7 días posteriores a la encuesta.

*2-: Grupo con antecedentes de infección clínica por dengue con cuadros bien caracterizados de FHD o FD.* Los individuos con antecedentes de infección por dengue en el año 2006, se contactaron a los dos años de haber padecido la enfermedad por dengue, en el año 2008. Estos individuos habían sido ingresos del IPK, siendo confirmados durante la epidemia como infección por dengue acorde a los criterios de la OMS (211), y confirmado el diagnóstico serológica y

virológicamente por la detección de IgM en suero al 6to día del inicio de la fiebre (212). Para análisis posteriores se hizo una base de datos con los síntomas y signos evaluados por el personal médico del IPK durante la fase aguda de la enfermedad: derrame, sangramiento, signos de alarma, citolisis, hemoconcentración y trombocitopenia.

Durante la visita a los lugares de residencia, después de obtener el consentimiento informado correspondiente, se confeccionó una pequeña historia clínica que recogió datos demográficos como edad, sexo, color de la piel, enfermedades crónicas y antecedentes de infección por dengue (Anexo3). Para el análisis genético, en ambos grupos se incluyeron solo aquellos individuos nacidos en la Ciudad de la Habana.

### **III-1.2b Muestra**

*Selección de la muestra del grupo con infección asintomática:* Se colectaron muestras de suero de 500 individuos sanos, convivientes o vecinos de pacientes confirmados de infección por dengue para determinar si los mismos cursaban por una infección asintomática. Además, se colectó una muestra de sangre venosa en EDTA como anticoagulante para los estudios genéticos. Se consideró que estos individuos, a pesar de no manifestar síntomas, estaban infectados por VD, si en el suero de los mismos se demostró la presencia de Ac IgM anti-dengue (212). Se realizó un seguimiento de su evolución durante el transcurso del evento epidemiológico y no se incluyeron aquellos que refirieron síntomas clínicos posteriores a la encuesta.

Del total de individuos evaluados serológicamente, fueron seleccionados para estudios genéticos aquellos nacidos en Ciudad de La Habana que cursaban con una infección secundaria, tomando como criterio un título de IgG anti dengue  $\geq 1280$  (213). Un total de 42 individuos cumplieron ambos parámetros; es decir, cursaban por una infección secundaria a virus dengue y la misma se manifestaba sin signos ni síntomas (infección subclínica).

*Selección de la muestra del grupo con infección clínica:* Se reclutaron un total de 97 individuos nacidos en Ciudad de la Habana de los cuales 68 habían padecido FD y 29 FHD. Se les extrajo una muestra de 10 ml de sangre total en anticoagulante (EDTA) y 5ml en tubo seco para la obtención del suero (aproximadamente 2 ml de suero).

En resumen, el número total de individuos participantes en el estudio fue de 139, de los cuales 97 habían desarrollado las formas clínicas de la infección por dengue (68 FD y 29FHD) y 42 reclutados en el momento de la epidemia (año 2006) evidenciaron la ocurrencia de infección secundaria asintomática.

En todos los casos, las muestras de sangre total con EDTA y el suero fueron almacenados a -20 °C y -80°C respectivamente hasta su uso.

### **III-1.3b Metodología**

#### **III-1.3.1b Determinación del polimorfismo genético del receptor FcγRIIa**

Para determinar el polimorfismo genético se empleó la metodología descrita en el acápite III-1.3a.

*Objetivo 2: Determinar si el polimorfismo del gen del receptor FcγRIIa está asociado con la presencia de manifestaciones clínicas dos años después de haber padecido la enfermedad.*

### **III-2 Relación entre el polimorfismo del gen del receptor FcγRIIa y las manifestaciones clínicas referidas dos años después**

#### **III-2.1 Criterio de selección de los individuos que conforman el estudio**

A los 97 individuos con antecedentes de FHD y FD se les realizó una caracterización clínica tras dos años de haber padecido infección por VD. La encuesta recopiló información sobre los síntomas clínicos que, según la bibliografía revisada, con más frecuencia se presentan seis meses después de haber padecido la infección por dengue (23). Los mismos se agrupan en osteomioarticulares (artralgias, mialgias, malestar general, astenia, empeoramiento de artropatías crónicas y debilidad en las manos) y neurológicos (cefalea, dolor retro ocular, irritabilidad, insomnio y pérdida de memoria) (Anexo 5).

A todos los participantes se les realizó, además, un estudio descriptivo y exploratorio con enfoque cualitativo cuya intención fue observar, describir y explorar aspectos psicológicos por personal especializado. En la visita a las áreas o terreno, se entrevistaron todos los individuos, tanto los que padecieron la enfermedad de manera sintomática como los individuos asintomáticos. Se aplicó a ambos subgrupos, en paralelo con la entrevista médica, una guía estructurada de observación desarrollada por el psicólogo en el terreno, la cual exploró los aspectos esenciales que dieran en general criterio del estado de salud mental *in situ* del paciente y que contempló los siguientes aspectos:

#### Variables o aspectos evaluados en los entrevistados:

- APP(Antecedentes Patológicos Personales, psicológicos o psiquiátricos)

- APF (Antecedentes patológicos Familiares, psicológicos o psiquiátricos)
- Actividad motora
- Actividad verbal
- Estado de alerta
- Estado de ánimo y afectos
- Procesos cognoscitivos

Los criterios seguidos para evaluar el estado de salud mental incluyeron 4 ó más indicadores no alterados como estado de salud mental favorable y 4 o más indicadores alterados como estado de salud mental desfavorable. (Anexo 6).

Nuestra muestra clínica de estudio quedó entonces dividida en Individuos con manifestaciones clínicas mantenidas e Individuos recuperados o sin manifestaciones clínicas.

Teniendo en cuenta que el grupo de individuos con infección asintomática había sido determinado en el momento de la epidemia, sus integrantes también fueron visitados dos años después (2008) y evaluados con las entrevistas recogidas en los Anexos 5 y 6.

### **III-2.2 Muestra**

La muestra utilizada en este caso es la descrita para el objetivo 1, suero y sangre total en EDTA con anticoagulante de los 97 individuos con antecedentes de infección clínica por VD. Como se verá más adelante, los individuos asintomáticos no manifestaron síntomas dos años después de haber sido infectados con el VD por lo que solo se analizaron en ellos los datos recopilados durante la entrevista.

### **III-2.3 Metodología**

#### **III-2.3.1 Determinación del polimorfismo genético del receptor FcγRIIa**

Para determinar el polimorfismo genético se empleó la metodología descrita en el acápite III-1.3a.

#### **III-2.3.2 Determinación del título de anticuerpos totales IgG anti-dengue**

Los títulos de anticuerpos IgG anti-dengue presentes en los individuos dos años después de haber padecido la enfermedad, se determinaron mediante un ELISA de inhibición, según el protocolo descrito por Vázquez y cols (213).

Se adsorbieron en placa de poliestireno inmunoglobulinas humanas anti-dengue en tampón carbonato / bicarbonato pH 9,5 a una concentración de 10 ug/ml y se dejaron incubar toda la noche (18 horas aproximadamente) a 4°C. Posteriormente, la superficie no cubierta por anticuerpos fue bloqueada con 150 ul de albúmina de suero (ABS) al 1% en PBS. Se incubó a 37°C por 1 hora. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-T, pH 7,4, añadiendo posteriormente 100 ul de la dilución de trabajo de la suspensión del antígeno en cada pozo (diluido 1:40 en PBS-T). Se incubó la placa 1 hora a 37°C y se lavó en iguales condiciones. Las muestras de suero y los controles (positivo y negativo) fueron añadidas a razón de 100uL por pozo a la dilución 1/20 en PBS-T. Tras similares condiciones de lavado e incubación, se añadieron 100 µL del conjugado anti-dengue-peroxidasa diluido 1/8000 en PBS-T con 2% de suero de ternera, dejándolo incubar nuevamente 1 hora a 37oC. Seguido de tres lavados, 100uL por pozo de sustrato fueron adicionados y al cabo de 30 minutos la reacción se detuvo con 100 µL de ácido sulfúrico al 12,5% en cada pozo. Los valores de densidad óptica se determinaron a 492 nm en un lector Micro-ELISA (Dynex Technologies Denkendorf Germany). Se consideraron positivos aquellos sueros que presentaron un % de inhibición mayor o igual al 50% con relación al control negativo.

### **III-2.3.3 Determinación del antecedente de infección por dengue**

Para saber la historia de infección por dengue se empleó el ensayo de Neutralización por Reducción del Número de Placas (NRNP), siguiendo lo descrito por Morens y colaboradores en 1985 (214) con las modificaciones realizadas por Álvarez y colaboradores en el año 2005 (215).

*Células empleadas:* Para el desarrollo de este objetivo, se emplearon las células BHK21. La línea celular BHK-21 clono 15 (de riñón de Hámster), obtenida a partir de la BHK-21 clono 13 (ATCC 1992) y donada al laboratorio de Arbovirus por el Prof. S.B. Halstead (Director Científico de la Iniciativa para la Vacuna Pediátrica de Dengue), se empleó en la NRNP y en la titulación de los lotes virales. Las células se cultivaron a 37°C en frascos plásticos estériles de 75 cm<sup>2</sup>, utilizando medio MEM suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (100X) y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), y pasadas semanalmente a una razón de pase de 1:8. Para la realización de ambas técnicas se prepararon suspensiones celulares a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/mL.

*Cepas empleadas:* La tabla 1 muestra las cepas virales de los 4 serotipos empleadas en los diferentes estudios.

**Tabla 1.** Historial de pases, lugar y año de aislamiento de las cepas utilizadas en la NRNP

<b>Cepas virales</b>	<b>Historial de pases</b>	<b>Lugar de aislamiento</b>	<b>Año de aislamiento</b>
DEN-1 Angola *	7P C6/36	Angola	1988
DEN-2 A15/1981	2PR 2P C6/36 HT	Cuba	1981
DEN-3 116/00	3P C6/36 HT	Cuba	2000
DEN-4 187/06	5P C6/36 HT	Cuba	2006
DEN-4 TVP 360 **	1P Vero 3P C6/36 H1	Colombia	1982

P: Pase, R: Ratón

\* Cepa gentilmente donada por el Dr. Robert Shope (ya fallecido) de la Universidad de Texas, EUA.

\*\*Donada gentilmente por el Comité de Expertos de Estandarización Biológica de la Organización Mundial de la Salud.

#### *Preparación de los lotes virales para la NRNP*

1. Frascos de poliestireno estériles de 25 cm<sup>2</sup> con monocapa confluyente de células C6/36 HT (C6/36 HT (*Aedes albopictus*), obtenida por Kuno y Oliver en 1989 a partir de la línea celular C6/36 de Igarashi y donada a nuestro laboratorio por el Dr J. Díaz del Laboratorio Departamental de Medellín, Colombia) se inocularon con 500 µl de la dilución de las cepas virales utilizadas en el estudio (ver cepas virales empleadas). Todas las cepas fueron inoculadas a una multiplicidad de infección de 0.001, empleando como medio de mantenimiento medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (100X), 2mM de glutamina, antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomina 100 mg/mL) y 10% SFB inactivado para la dilución viral.
2. Las células inoculadas se incubaron durante una hora a 33°C para facilitar la entrada del virus.
3. Posteriormente, se añadieron 5 ml de medio de mantenimiento (MEM) a cada uno de los frascos.
4. Los cultivos infectados con las diferentes cepas fueron incubados a 33°C y observados diariamente hasta que el efecto citopático (ECP) se extendió por toda la monocapa celular.

5. Cuando la multiplicación viral fue confirmada, los frascos fueron congelados a  $-86^{\circ}\text{C}$ , previa adición de SFB al 2%. Finalmente, los cultivos fueron descongelados de forma rápida a  $37^{\circ}\text{C}$  y distribuidos en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$ . El título viral se determinó mediante la técnica de titulación viral por placas empleando células BHK-21 clono 15, escrita a continuación:

*Titulación por Placas*

1. Se prepararon diluciones seriadas en base 10 de los virus desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ .
2. Se añadieron 0.5 ml de la suspensión de células BHK21 a cada pozo de la placa de 24 pocillos y se dejaron en reposo por 1 hora a temperatura ambiente.
3. Se inocularon 50  $\mu\text{l}$  de cada dilución viral a las células incubándose por 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en incubadora de  $\text{CO}_2$ , al 5%.
4. Se añadieron 0.5 ml de medio de recubrimiento “overlay”, incubándose a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 días para el virus DEN-2, 6 días para el virus DEN-4 y 7 días para los virus DEN-1 y DEN-3, en incubadora de  $\text{CO}_2$  al 5%.
5. Luego de la incubación se descartó el medio y se lavaron las monocapas celulares con agua de la pila. A cada pozo de la placa le fue añadido 0,5 ml de una solución del colorante Naphthol Blue Black (Acido Acético 60 ml, Naphthol Blue Black 1g y 13,6 g Acetato de Sodio).
6. Para conocer el título infectivo de los virus titulados se aplicó la siguiente fórmula:

$$P \times 20 \times 10X = \text{ufp/ml}$$

Donde:

P: Promedio del número de placas obtenido en la dilución en que se contaron las placas.

20: Factor de corrección para expresar el título en ufp/ml (1000 $\mu\text{l}$ /Volumen Inóculo).

10X: Representa la dilución en que se contaron las placas (Factor de Dilución).

*Neutralización por Reducción del Número de Placas (NRNP)*

1. Los sueros a estudiar fueron inicialmente tratados con 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo y posteriormente se realizaron diluciones en base 10 (1/10-1/1000) utilizando medio de mantenimiento (MEM). Los sueros controles negativos y positivos se emplearon a la dilución 1/10.
2. De acuerdo al título viral previamente calculado, se preparó la dilución de trabajo para cada una de las cepas virales empleadas, la que consistió en 80 (ufp) por cada 0,1 mL de dilución.
3. Las diluciones de los sueros se mezclaron con igual volumen de la dilución viral de trabajo (0,1mL de cada una). Para cada virus se preparó un control viral que consistió en mezclas de

0,1mL de medio de mantenimiento (MEM) con 0,1mL de la dilución de trabajo de la cepa viral correspondiente.

4. Las mezclas de virus más suero, o virus más medio, se incubaron durante una hora a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

5. Posteriormente, 0,05 mL de cada una de las mezclas virus-suero y de los controles virales (virus-medio) fueron inoculados en 0,5mL de la suspensión de células BHK-21 clono 15 previamente sembradas en las placas plásticas de 24 pozos a la concentración previamente mencionada en este acápite.

6. Las células inoculadas se incubaron durante 4 horas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

7. El medio de recubrimiento (MEM 2X (100 ml), Glutamina (1 ml), SFB (10 ml), Carboximetilcelulosa viscosidad media (50 ml), y antibióticos (0.2 ml)) se añadió a razón de 0,5mL por pozo. Las células se incubaron durante cinco días para el virus DEN-2, seis días para el DEN-4, y 7 días para los virus DEN-1 y DEN-3.

8. Luego de la incubación se descartó el medio y se lavaron las monocapas celulares con agua corriente. A cada pozo le fue añadido 0,5 mL de una solución del colorante (Acido Acético 60 mL, Naphthol Blue Black 1g y de Acetato de Sodio 13,6 g).

9. El valor porcentual de reducción del número de placas con respecto al control viral se calculó según la relación:

$$\% \text{ de reducción} = [1 - (X_s/X_m)] \times 100\%$$

En la cual:

X<sub>s</sub> -- promedio del número de placas obtenido para cada dilución de suero.

X<sub>m</sub> -- promedio del número de placas obtenido para el control viral.

El suero se evaluó en las diluciones previamente citadas, frente a una dilución constante de virus. A cada dilución de suero se le determinó el valor porcentual de reducción del número de placas virales por la fórmula anterior. El título de anticuerpos neutralizantes de cada suero se calculó utilizando un papel semilogarítmico (probit) donde el título se correspondió con la dilución de suero que redujo en un 50 % el número de placas virales en relación al número de placas del virus control (214).

A los títulos de anticuerpos neutralizantes inferiores al inverso de 10 y superiores al inverso de 1000 se les asignaron los valores de 5 y 2000, respectivamente.

### **III-2.3.4 Determinación de marcadores de autoinmunidad.**

**Muestras:** Debido a limitaciones en la disponibilidad de recursos, se seleccionaron al azar 26 muestras de sueros del grupo de individuos que refirieron la presencia de manifestaciones clínicas dos años después de haber padecido la enfermedad.

#### **Metodología:**

##### *Detección de anticuerpos anti-nucleares (ANA):*

Se partió de una lámina sobre la que se colocó un corte de tejido de hígado de rata, incubándola durante 10 minutos en un vaso Koplín con acetona, para fijar la muestra de tejido. Transcurrido este tiempo, la lámina se dejó secar a temperatura ambiente (TA). Seguidamente se preparó una dilución 1:10 de los sueros a testar en PBS 1X.

Como control positivo se utilizó un suero de paciente con enfermedad autoinmune y como control negativo PBS 1X.

Se aplicaron 50 µL de la dilución de los sueros sobre el corte histológico fijado en la lámina, y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente (25°C) en cámara húmeda. Posteriormente se retiró el suero lavando la lámina con PBS 1X gentilmente. Luego se le adicionó, 50 µL del conjugado (inmunoglobulina anti-IgG humana producida en oveja marcado con fluoresceína) protegido de la luz (Wellcome, # lote: k648120) diluido 1:20 en Azul de Evans preparado a la dilución 1:1000 en PBS 1X. Se incubaron las láminas 30 minutos bajo las mismas condiciones previamente descritas. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS 1X en vaso Koplín. Una vez concluido los lavados, la lámina fue escurrida, se le adicionó una gota de glicerol justo donde se encuentra la preparación y se le colocó un cubre objeto para observar en microscopio fluorescente (Leite Diaplan). Se consideraron como negativas las muestras donde el tejido se observó teñido de rojo; y como positivas, aquellas en las que el tejido presentó una fluorescencia de color verde (216).

##### *Determinación del Factor Reumatoideo:*

La determinación del FR se realizó mediante una prueba inmuno-turbidimétrica automática cuyo principio consiste en la aglutinación con intensificación de la reacción por látex, empleando un estuche comercial (217) (-Tina-quant de FR II, cobas®- Roche Hitachi, EUA) para el analizador

Roche Hitachi (Hitachi 912 automatic analyzer). Se definió el criterio de positividad teniendo en cuenta el rango de valores normales definido en el estuche comercial (0-14 UI/ml).

*Determinación de los niveles de C3 y C4:*

La concentración sérica de los marcadores C3 y C4 del complemento se determinó mediante una prueba inmuno-turbidimétrica automática mediante un estuche comercial (Tina-quant C4 y Tina-quant C3c, cobas® Roche Hitachi, EUA) para el analizador Roche Hitachi (Hitachi 912 automatic analyzer) (217). Se definió el criterio de positividad teniendo en cuenta el rango de valores normales definido en el estuche comercial (C3: 90-180 mg/dl, C4: 10-40 mg/dl)

*Determinación de la Proteína C reactiva:*

La prueba de PCr de ROCHE se basa en el principio de la prueba inmunológica de aglutinación intensificada por partículas, utilizando un procedimiento inmuno-turbidimétrico automático cuyo principio consiste en la aglutinación con intensificación de la reacción por látex, empleando un estuche comercial (Tina-quant de proteína C reactiva (intensificada con látex), cobas® Roche Hitachi, EUA) para el analizador Roche Hitachi (Hitachi 912 automatic analyzer) (217) . Se definió el criterio de positividad teniendo en cuenta el rango de valores normales definido en el estuche comercial ( $\leq 0,50$  mg/dl)

*Detección de inmunocomplejos circulantes por polietilenglicol:*

LA detección de inmunocomplejos circulantes (ICC) se realizó según la metodología descrita por Haskova y col., 1978 (218). Los sueros fueron diluidos  $\frac{1}{2}$  en solución de tampón borato 0,1M, pH 4 (550mL de una solución A: 12,4 g de ácido bórico 0,2M (Riedel-Haen, # lote. 52340) disuelto en 1L de agua destilada; con 450mL de la solución B: 19,05g de tetraborato de Na 10H<sub>2</sub>O (MERCK, # lote. 6315) disuelto en 1L de agua destilada para un volumen final de 600 ul.

Cada muestra fue tratada como sigue:

Tubo 1: 220  $\mu$ L suero diluido + 2 mL del tampón borato

Tubo 2: 220  $\mu$ L suero diluido + a 2 mL de polietilenglicol (PEG: disolver 4,16g de PEG 6000 (MERCK- Schuchardt, # lote. 807491 en 100 ml de tampón borato).

Tubo 3: blanco: 2 mL del tampón borato.

Los tubos de las muestras y el blanco se incubaron 1 hora a temperatura ambiente leyéndose posteriormente la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000) a la longitud de onda de 450 nm, primeramente los tubos 1 y, posteriormente, los tubos 2. El valor de DO se calculó: DO muestra = DO tubo2 – DO Tubo1 considerando valores normales de IC aquellas muestras cuya DO  $\leq 0.050$ .

### **III-2.4 Análisis estadísticos**

Para el análisis de los resultados de los puntos III-1 y III-2 se emplearon los métodos estadísticos descritos a continuación:

En los análisis de asociación entre variables cualitativas para las 139 muestras, se emplearon las tablas de contingencia, utilizando el estadígrafo  $\chi^2$ , tomándose como valor significativo una  $p < 0,05$ .

En las asociaciones establecidas con el título de IgG anti-dengue y, teniendo en cuenta que esta variable no sigue una distribución normal, se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas observadas en el estudio molecular, se aplicó la Prueba de Hipótesis de diferencia de proporciones.

En todos estos análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS para Windows versión 11.5.1. Las frecuencias génicas de los alelos H y R relacionados con el receptor FcγRIIa de la población de Ciudad de La Habana se estimaron a partir de las frecuencias genotípicas observadas utilizando el programa estadístico Epiinfo 2002 que permitió calcular los intervalos de confianza con un 95% de confiabilidad.

*Objetivo 3: Evaluar si las variantes polimórficas del FcγRIIa al determinar las subclases de IgG con que interactúan, influyen sobre la evolución clínica de la infección por dengue.*

### **III-3 Determinación cualitativa de las subclases de IgG**

Para la determinación de las subclases de IgG se diseñó un estudio analítico descriptivo, en el cual se evaluaron las subclases de manera cualitativa.

### III-3.1 Muestras

**Sueros:** La determinación de las subclases de IgG se realizó en 34 sueros colectados en la etapa aguda, durante la epidemia que tuvo lugar en Santiago de Cuba en 1997. De ellos, 20 desarrollaron la forma grave de la enfermedad (FHD) y 14 debutaron con FD. Previo a la determinación de las subclases, los sueros se caracterizaron como secundarios a infección por VD2 mediante la prueba de Neutralización por Reducción del Número de placas, con modificaciones (215), que fue previamente descrita en el objetivo 2.

**Plasmas:** Se analizaron muestras de plasma correspondientes a 10 de los 34 individuos estudiados en la etapa aguda. Las mismas se colectaron 5 años después de haber padecido la infección por dengue 2. Teniendo en cuenta la historia anterior durante la infección por dengue 2, 6 habían sido caracterizados como FD, y 4 con el cuadro de FHD.

**Antígenos virales:** Se emplearon cepas estándar como antígenos virales (tabla 2)

**Tabla 2.** Historial de pases y título viral de las cepas utilizadas en la determinación de las subclases

	<b>Cepas virales</b>	<b>Historial de pases</b>	<b>Título viral</b>
DEN-1	Hawaii	18P.R C6/36	$2.6 \times 10^6$ UFI
DEN-2	Nueva Guinea C	2PR 3P C6/36 HT	$1,52 \times 10^4$ UFI
DEN-3	H87	18PR 2P C6/36 HT	$1 \times 10^4$ UFP
DEN-4	H241	19 PR 3P C6/36 HT	$9 \times 10^5$ UFP

P: Pase, R: Ratón

### III-3.2 Metodología

#### III-3.2.1 Dot-Blot

Las 34 muestras de suero referidas anteriormente se diluyeron con solución tampón de borato 0.1M, pH 8.4. Luego se mezclaron 220µL de la dilución con 2mL de PEG 6000 al 4.166% (preparado con la solución amortiguadora de borato), se incubaron 1h a 25°C y se centrifugaron a 1000 rpm (ALC PM 140R), 1h a 4°C. Finalmente, se obtuvo un precipitado correspondiente a la fase de inmunocomplejos (IC) y en el sobrenadante la fracción soluble (FS)

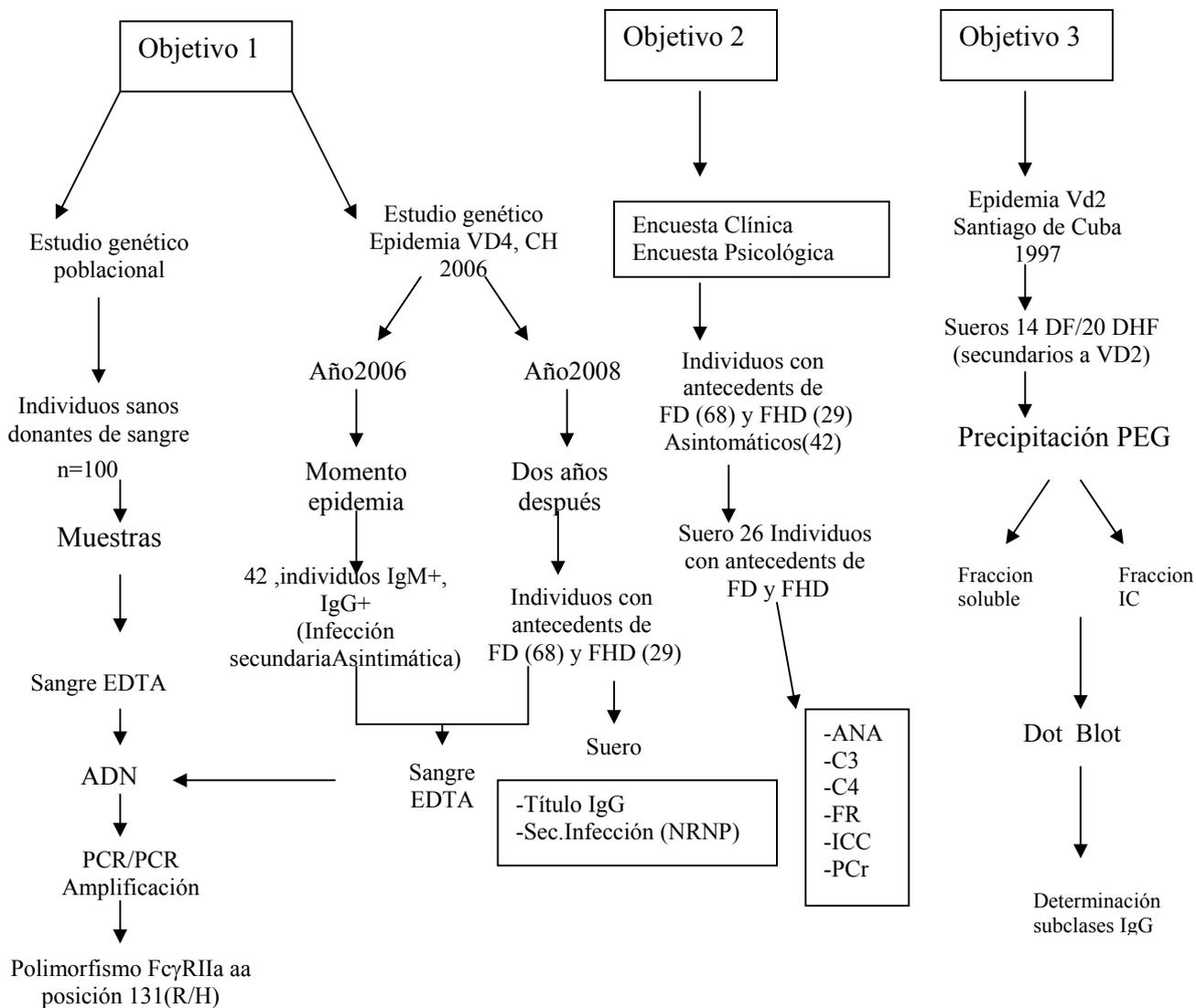
(Inmunoglobulinas libres), ambas fueron sometidas a un ensayo de dot-blot para determinar la composición de subclases de IgG.

El ensayo se realizó en una cámara del tipo Miniblotter 25 (Cambridge, USA). En el caso de la FS, 400 µL de los antígenos (VD1, VD2, VD3 y VD4) diluïdos 1:4 en PBS, se aplicaron sobre una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm (Schleicher&Schuell, USA) y se incubaron 1h a TA en agitación. Como tampón se utilizó PBS 100 mM de fosfato (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.14%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.09%, pH 7.4). La membrana se bloqueó durante toda la noche a 4°C en PBS con Tween-20 al 0.05% (PBS-T), conteniendo leche descremada al 5%. Luego de los lavados con PBS-T la membrana sensibilizada con los diferentes antígenos se enfrentó a 100uL de las diferentes preparaciones de Acs (FS), para lo cual se empleó nuevamente la cámara referida. Posteriormente, se repitieron los lavados de la misma forma, la membrana sensibilizada con los antígenos y las muestras, fue cortada en tiras que se incubaron con 100 uL del anticuerpo anti-IgG1, -2, -3 y -4 humano (SIGMA) correspondiente, durante 1h a T.A. Estos fueron diluïdos previamente 1/1000 para IgG1 y 1/100 para el resto, en PBS-T, leche descremada al 5% y suero humano normal (SHN), durante 1h a temperatura ambiente con agitación. Luego se añadió la enzima streptavidina-fosfatasa alcalina (SIGMA, USA) 1/1000 en dietanolamina y se incubó por 30 min a temperatura ambiente con agitación (Balancin, USA). Después de los últimos lavados con PBS-T, la detección se realizó con 5 bromo, 4 cloro 3 indolil fosfato/ nitro azul tetrazolium (SIGMA, USA) hasta la aparición de la reactividad. La reacción se detuvo mediante suave agitación con agua corriente.

Para la determinación de la subclase en el IC se aplicaron las muestras directamente, eliminando el paso previo de sensibilización de la membrana con los antígenos y se procedió según lo explicado anteriormente (219).

En las muestras de plasma se determinaron las subclases de Igs libres teniendo en cuenta el tiempo en que se colectaron dichas muestras.

### III-4 Flujo de trabajo general



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo 1: *Demostrar si existe asociación entre las variantes polimórficas del gen del receptor FcγIIa y la susceptibilidad a desarrollar enfermedad por dengue*

### IV-1.1 Determinación de las variantes genóticas del receptor de baja afinidad FcγIIa en una muestra representativa de la población cubana

El PCR para determinar el polimorfismo asociado al gen del receptor FcγRIIa se estandarizó según lo descrito previamente por Basilio y colaboradores (210). Como se observa en la Figura 4, tanto el PCR1 como los productos resultantes del PCR de amplificación (NESTED-PCR) y los controles amplificaron en su talla, al comparar con el ADN control.



**Pozos:**

- 1- Caso A PCR1 (sense P63 y antisense FcR2-30)
- 2- Caso B PCR1 (sense P63 y antisense FcR2-30)
- 3- Control Negativo
- 4 y 5 – Caso A R/H (NESTED PCR 494A/494G y antisense P52)
- 6 y 7 – Caso B R/H (NESTED PCR 494A/494G y antisense P52)
- 8- Marcador de peso molecular (Promega cat # G 69441 1kb DNA step leader 10000b-1kb )

**Fig. 4:** Estandarización del PCR-NESTED PCR para la determinación del polimorfismo asociado al receptor de baja afinidad FcγRIIa.

La tabla 3 muestra la distribución de las variantes genóticas del receptor de baja afinidad FcγRIIa determinadas en la población de Ciudad de La Habana. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias relativas de los tres genotipos observados, con un predominio del genotipo RR (55%).

**Tabla 3:** Distribución de las frecuencias genóticas del receptor FcγRIIa en la población de Ciudad de la Habana, 2007.

Genotipo FcγRII	Número de individuos (n=100)	Frecuencia genotípica observada		Frecuencia genotípica esperada	
		Frecuencia	IC (95%)	Frecuencia	IC (95%)
RR	55	0,55*	0,45-0,6	0,50	0,40-0,6
RH	32	0,32*	0,23-0,4	0,41	0,31-0,5
HH	13	0,13*	0,74-0,2	0,08	0,03-0,1

(\*)Diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias relativas observadas  $p < 0,05$  (RR vs RH,  $p = 0,003$ ; RR vs HH,  $p = 1,625E-09$ , RH vs HH,  $p = 0,001$ )  
(Frecuencias observadas vs Frecuencias esperadas,  $X^2 = 5,60$ ,  $p < 0,05$ )

Estudios que analizan poblaciones de diversos países, muestran el predominio del genotipo RH en poblaciones caucásicas de Reino Unido, Francia, Alemania, Estados Unidos, Suiza, Canadá, Finlandia, Irlanda, Rusia, Grecia y Australia (10). Las poblaciones de Japón, China y Viet Nam mostraron mayores frecuencias para el genotipo HH (10, 13). Corea y la India, en cambio, coincidieron con lo encontrado en los grupos caucásicos. En el Caribe, Brasil (210) y el Este de África (220), se reporta un predominio del genotipo RH (Tabla 4). Nuestra población, sin embargo, coincide con lo reportado para la población noruega, que muestra un predominio del genotipo homocigótico, de baja afinidad, RR.

La distribución de las frecuencias genóticas observadas del receptor FcγRIIa, no se corresponden con las esperadas según la Ley de Hardy Weinberg (H-W) ( $X^2 = 5,60$ ;  $p < 0,05$ ).

**Tabla 4** (10). Frecuencias de los genotipos del receptor de baja afinidad FcγRIIa en diferentes países.

Países	No. casos	Genotipo FcγRIIa			Referencias
		HH	RH	RR	
<b>Reino Unido</b>	259	57 (22%)	<b>120 (46%)</b>	82 (32%)	
<b>Alemania</b>	256	71 (28%)	<b>134 (52%)</b>	51 (20%)	
<b>Francia</b>	218	75 (34%)	<b>99(45%)</b>	44(21%)	
<b>Estados Unidos</b>	149	38(26%)	<b>79(53%)</b>	32(21%)	
<b>Suiza</b>	123	36(29%)	<b>59(48%)</b>	28(23%)	<b>(10)</b>
<b>Rusia</b>	107	30(28%)	<b>58(54%)</b>	19(18%)	
<b>Canadá</b>	100	26(26%)	<b>52(52%)</b>	22(22%)	
<b>Finlandia</b>	93	25(27%)	<b>55(59%)</b>	13(14%)	
<b>Irlanda</b>	61	15(25%)	<b>35(57%)</b>	11(18%)	
<b>Grecia</b>	52	20(39%)	<b>24(46%)</b>	8(15%)	
<b>Australia</b>	22	2(9%)	<b>13(60%)</b>	7(31%)	
<b>Noruega</b>	49	9(18%)	18(37%)	<b>22(45%)</b>	
<b>Caribe</b>	77	17(22%)	<b>35(45%)</b>	25(33%)	
<b>Japón</b>	105	<b>63(60%)</b>	38(36%)	4(4%)	
<b>China</b>	49	<b>24(49%)</b>	20(41%)	5(10%)	
<b>Corea</b>	64	22(34%)	<b>37(58%)</b>	5(8%)	
<b>India</b>	16	2(13%)	<b>9(56%)</b>	5(31%)	
<b>Viet Nam</b>	238	<b>119(50%)</b>	94(39.5%)	25(10.5%)	<b>(13)</b>
<b>Brasil</b>	48	13(27%)	<b>25(52%)</b>	10(21%)	<b>(210)</b>
<b>Este de África</b>	100	23(16%)	<b>47(33%)</b>	30(21%)	<b>(220)</b>

Distribución de las frecuencias genotípicas en diferentes países donde se muestra un predominio de la variante heterocigótica en la mayoría de las regiones estudiadas.

Para calcular las frecuencias genotípicas esperadas, se calcularon las frecuencias alélicas H 131 y R131, las que aparecen reflejadas en la tabla 5. Como se puede apreciar la frecuencia del alelo R131 es mayor que la del alelo H131.

**Tabla 5.** Distribución de la frecuencia alélica del receptor FcγRIIa en la muestra estudiada de Ciudad de La Habana.

Alelo	Frecuencia alélica	IC (95%)
R131	0,71	0,63-0,80
H131	0,29	0,21-0,37

Cálculo de la frecuencia alélica del receptor FcγRIIa. La frecuencia del alelo R es mayor que el alelo H en la población de Ciudad de la Habana.

Nuestros resultados sugieren que en la población cubana hay un predominio de las variantes genotípicas donde los individuos presentan copias del alelo de baja afinidad R (RR y RH). Al comparar las frecuencias de las variantes genotípicas obtenidas en este estudio con las referidas en otros países, puede apreciarse que en su mayoría predominan las frecuencias asociadas al genotipo heterocigótico con excepción de la población asiática, donde se hace notar el predominio de la variante homocigótica de alta afinidad. La variante homocigótica de baja afinidad está presente en un menor número de las poblaciones que han sido sujeto de estudio.

A pesar de ser nuestra población el resultado de la mezcla mayoritaria de caucásicos y africanos, la distribución genotípica del receptor de baja afinidad FcγRIIa en los individuos cubanos estudiados (55%RR, 32% RH y 13% HH) difiere de la reportada para la mayoría de estos grupos poblacionales, donde se observa un predominio de la forma RH en europeos, africanos y brasileños. Un hecho no debemos perder de vista: las peculiaridades de la población española que, diferente al resto del mundo caucásico, tuvo una fuerte influencia árabe. Ese componente pudo haber introducido características genéticas particulares en sus descendientes en las Américas. Lamentablemente, no disponemos de datos en relación al polimorfismo del receptor FcγRIIa en España y países de la América Hispano parlante (221, 222).

Nuestros resultados difieren de lo esperado según la Ley de Hardy Weinberg (H-W) ( $X^2=5,60$ ;  $p<0,05$ ). Ello, posiblemente sea consecuencia de la heterogeneidad de la población estudiada, que es consecuencia de la intensa migración de personas que se observa en la Cuba de hoy (221, 222). El polimorfismo asociado al receptor FcγRIIa en la población cubana, confiere datos de interés en el campo de la genética poblacional, que podrían ser tenidos en cuenta al estudiar otras enfermedades; por ejemplo, aquellas asociadas a inmunocomplejos.

#### **IV-1.2 Características demográficas de los casos que desarrollaron infección clínica por dengue**

Con el objetivo de conocer cómo evolucionaron los individuos que padecieron la infección por VD4 durante la epidemia del 2006 en Ciudad de la Habana, se realizó una encuesta de seguimiento clínico (Anexo 2) donde se recogieron, datos demográficos como edad, sexo, color de la piel y los síntomas que presentaban durante su evolución clínica, desde el alta hospitalaria hasta dos años después.

En las tablas 6a y 6b se muestran algunas de las características demográficas correspondientes a los 97 individuos incluidos en este estudio que desarrollaron la enfermedad por dengue (FD o FHD) y los que desarrollaron infección asintomática respectivamente durante la epidemia de VD 4 del 2006.

**Tabla 6a:** Características demográficas de los individuos con antecedentes de infección clínica por dengue

<b>Características Demográficas</b>	<b>Total</b>
*Edad (media ± DS)	46,44 ± 13,906
Sexo (%)	
Femenino	67 (69,1%)
Masculino	30 (30,97%)
Color de la piel (%)	
Negro	10 (10,3%)
Blanco	69 (71,3%)
Mestizo	18 (18,6%)

\*Valores mínimo de 21 y máximo de 81 años para la edad.  
Cálculo de frecuencias absolutas para el sexo y la raza

**Tabla 6b:** Características demográficas de los individuos que desarrollaron infección subclínica.

<b>Características Demográficas</b>	<b>Total</b>
*Edad (media ± DS)	49,67 ± 20,119
Sexo (%)	
Femenino	26 (55,3%)
Masculino	16 (34,0%)
Color de la piel (%)	
Negro	13 (31%)
Blanco	22 (52,4%)
Mestizo	7 (16,7%)

\*Valores mínimo de 17 y máximo de 83 años para la edad.  
Cálculo de frecuencias absolutas para el sexo y la raza

Como se observa, hay un predominio del sexo femenino así como de individuos de color de la piel blanco en ambos grupos estudiados.

#### **IV-1.3 Asociación a nivel genotípico entre el polimorfismo del FcγRIIa y el cuadro clínico sufrido en la etapa aguda de la infección (Epidemia de Ciudad de la Habana de VD 4 año 2006)**

Siguiendo los propósitos del estudio procedimos a analizar la distribución de las frecuencias genotípicas en los individuos seleccionados con antecedentes de infección clínica por dengue (FD y FHD) e infección subclínica (infección asintomática). Como muestra la tabla 7, el fenotipo HH 131 se encontró con frecuencia significativamente elevada ( $p=0.008$ ) en aquellos individuos

que habían padecido la infección clínica FHD (44.8%), FD (25.0%) con respecto al grupo con antecedentes de infección subclínica (7.1%).

Para determinar el riesgo asociado a cada variante genética, individuos homocigóticos para un alelo se compararon con el resto de los individuos (heterocigóticos + homocigóticos del otro alelo). El análisis demostró que con respecto al grupo de infección asintomática, el genotipo HH 131 fue asociada al desarrollo de la FHD (OR= 10.56, 95% Intervalo de Confianza –IC- 2.33-54.64; p=0.00018) con tendencia similar observada para la FD (OR= 4.33, 95% CI 1.08-20.10; p=0.018, Tabla 7). Por el contrario, la variante RR fue asociada a protección contra el desarrollo de la forma grave (OR=0.09, p=0.01).

**Tabla 7:** Frecuencias genotípicas asociadas la polimorfismo de FcγRIIa casos de FHD, FD y asintomáticos

GENOTIPO	CUADRO CLÍNICO		
	FD	FHD	Inf. asintomática
R/R (%)	18 (26.4%)	6 (20.7%)	16 (38.1%)
H/H(%)	17 (25.0%)	13 (44.8%)	3 (7.1%)
H/R(%)	33 (48.5%)	10 (34.5%)	23 (54.8%)
Total	68 (100%)	29 (100%)	42 (100%)

Análisis total genotivo vs cuadro clínico. Tabla de contingencia de 3x3  $\chi^2= 13.91$ , p= 0.008  
Comparación de H/H vs. R/R + H/R entre FHD y casos de infección asintomática:  $\chi^2=13.96$ , p=0.00018 [OR=10.56 (2.33-54.64)]  
Comparación de H/H vs. R/R + H/R entre FD y casos de infección asintomática:  $\chi^2=5.56$ , p=0.018 [OR=4.33 (1.08-20.10)]

#### **IV-1.4 Análisis de las variantes genotípicas homocigóticas del FcγRIIa y el cuadro clínico sufrido en la etapa aguda de la infección (Epidemia en Ciudad de la Habana de VD 4 año 2006)**

Teniendo en cuenta que no existen reportes con respecto a la variante heterocigótica, donde los individuos que la presentan expresan moléculas de ambos tipos, quisimos comprobar si la misma pudiera expresarse de manera codominante, analizando para ello sólo las variantes homocigóticas. El análisis no mostró alteración con respecto al análisis de las tres variantes

genotípicas, evidenciando una vez más que el genotipo HH está asociado al riesgo de padecer la enfermedad (FHD (p=0.001, OR=11.56) y FD (p=0.017 OR=5.04)) y el genotipo RR con la protección (FHD (p=0.01, OR=0.09) y FD (p=0.017 OR= 0.2)). Esto indica que las variantes homocigóticas son las determinantes y la heterocigosis pudiera expresarse de manera codominante. La cuantificación de las homocigosis en los individuos heterocigóticos permitiría caracterizar aún más este patrón genético y saber exactamente la mayor tendencia homocigótica de estos individuos en los que, al parecer, parece predominar la variante RR (tabla 8).

**Tabla 8:** Frecuencias genotípicas homocigóticas del FcγRIIa en individuos con antecedentes de FD, FHD e infección subclínica o asintomática.

Genotipo	CUADRO CLÍNICO		
	FD	FHD	Inf. asintomática
R/R (%)	18 (26.4%)	6 (20.7%)	16 (38.1%)
H/H(%)	17 (25.0%)	13 (44.8%)	3 (7.1%)
Total	35 (100%)	19 (100%)	19 (100%)

HH: Genotipo homocigótico asociado a riesgo de padecer FHD (p=0.001, OR=11.56) y FD (p=0.017 OR=5.04) RR: Genotipo homocigótico asociado a protección a FHD (p=0.01, OR=0.09) y FD (p=0.017 OR= 0.2)

#### **IV-1.5 Asociación a nivel alélico entre el polimorfismo del Fcγ RIIa y el cuadro clínico sufrido en la etapa aguda de la infección (Epidemia de Ciudad de la Habana de VD 4 año 2006)**

El análisis de la frecuencia alélica no mostró diferencias significativas entre los individuos con antecedentes de manifestaciones clínicas ( $\chi^2 = 0.59$  p=0.44). Sin embargo, al incluir al grupo con antecedentes de infección asintomática encontramos diferencias estadísticamente significativas con respecto a aquellos que desarrollaron clínica ( $\chi^2 = 10.92$  p=0.004, Tabla 9). Como muestra la tabla 9 la presencia del alelo H fue predominante en los individuos con antecedentes de FHD y

FD con respecto al grupo asintomático (FHD: OR = 3.10 95% IC 1.46-6.62; p=0.001; FD: OR= 1.9 95% IC 1.04-3.47; p=0.025).

**Tabla 9:** Distribución de la frecuencia alélica del receptor FcγRIIa en individuos con antecedentes de FD, FHD e infección subclínica o asintomática.

<b>Alelos</b>	<b>FD</b>	<b>FHD</b>	<b>Infección asintomática</b>
<b>H</b>	67(50%)	36(62.1%)	29(34.5%)
<b>R</b>	67(50%)	22(37.1%)	55 (65.5%)
<b>Total</b>	134(100%)	58(100%)	84(100%)

Análisis total de,  $\chi^2= 10.92$ , p=0.0042

Comparación entre los grupos de FD y Asintomáticos:  $\chi^2=5.02$ , p=0.025 [OR=1.90 (1.04-3.47)]

Comparación entre los grupos de FHD y Asintomáticos:  $\chi^2=10.49$ , p=0.0012 [OR=3.10 (1.46-6.62)]

Como ya mencionáramos en la revisión bibliográfica, existen evidencias en la literatura del efecto protector a padecer enfermedades infecciosas frente a gérmenes intracelulares ligado a la variante homocigótica que codifica para la arginina (R/R) en la posición 131 del gen del receptor Fcγ RIIa que une IgG1/3(13, 220). Por otra parte, se ha reportado la susceptibilidad a desarrollar infecciones extracelulares con bacterias encapsuladas ligado a esta misma variante homocigótica (arginina), al no unir eficientemente la IgG2 que juega un papel protector frente a este tipo de infecciones (177-180). De modo que la asociación de la homocigosis para la histidina (H/H) al desarrollo de la enfermedad por dengue y la asociación de las variantes polimórficas que presentan arginina al cuadro menos severo de la enfermedad y a la infección subclínica encontrados por nosotros, están en concordancia con lo ya publicado si tenemos en cuenta que durante la infección por el complejo de los virus del dengue predominan las subclases IgG1/3 (15, 219).

Estamos en condiciones, por tanto, de afirmar que existe una asociación entre la variante homocigótica RR y la resistencia a padecer FHD.

En el año 2002, Loke y cols sugirieron la probable asociación de la variante homocigótica para la arginina (FcγRIIa-RR) con la protección a no desarrollar el cuadro severo de la enfermedad (13). Sin embargo, este estudio se realizó en población infantil, empleando como grupo control pacientes hospitalizados por causas no infecciosas, lo cual no permite concluir certeramente si, en efecto, esta variante está vinculada o no a la protección. Nuestro estudio, por el contrario, se realizó en adultos clínica y epidemiológicamente bien caracterizados, empleando como controles individuos que desarrollaron infección subclínica. La inclusión de este grupo le otorga valor a los resultados obtenidos al constituir una muestra única solo posible en las condiciones epidemiológicas para el dengue en Cuba. Todo lo anterior le otorga confiabilidad a nuestros resultados, los cuales asocian la variante homocigótica FcγRIIa-RR (predominante en el grupo con infección asintomática) a la protección. Este resultado se confirma, además, al encontrar una mayor representatividad del alelo R en el grupo control.

Teniendo en cuenta los resultados hipotetizamos que: durante una infección secundaria por virus dengue, donde las IgG1/3 son las inmunoglobulinas predominantes (15), aquellos individuos que presentan la forma polimórfica para la arginina (R) asociada al receptor FcγIIa unen eficientemente los inmunocomplejos VD-IgG1/3, activando de forma eficiente los mecanismos de formación del fagolisosoma (203), la eliminación de los inmunocomplejos y el control de la diseminación viral (223). Lo contrario ocurriría en aquellos individuos homocigóticos para la histidina (FcγIIa-HH) que no poseen una unión eficiente del inmunocomplejo VD-IgG1/3 lo que favorecería la diseminación de la infección viral a través del mecanismo de ADA.

Hallazgos recientes de Bruhns y cols., (224) contradicen estas observaciones (225, 226). Estos autores investigaron la unión de anticuerpos monoclonales y policlonales (IgG1-IgG4) a las variantes polimórficas de los receptores Fcγ, encontrando una diferencia en la afinidad de unión de los receptores FcγR humanos por las cuatro subclases de IgG (224). Contrario a lo reportado previamente (225, 226), ellos encontraron que la subclase IgG1 se une con mayor eficiencia a la variante FcγR- HH que a la FcγR-RR. Ello podría estar relacionado, entre otros factores al uso de anticuerpos monoclonales en el citado estudio, diferente a los anteriores en los que, el empleo de sueros policlonales se traducía en la presencia de un mayor rango de especificidades. Para dar sustento a nuestra hipótesis es necesario desarrollar futuros estudios que determinen, entre otros aspectos de interés, la afinidad del inmunocomplejo VD/IgG1/3 a las variantes polimórficas del

receptor FcγRIIa y las señales de transducción intracelulares que pudieran favorecer la inmunoamplificación o la eliminación eficiente de las partículas virales.

Como ya describíamos, la frecuencia de la variante polimórfica RR en las poblaciones de diferentes países varía de manera significativa. Nuestros estudios poblacionales mostraron que la distribución genotípica que predomina en la población cubana de Ciudad de la Habana es la variante RR siendo menos común la HH. (RR55%, RH 32% y HH13%). En Asia, por el contrario, la variante que predomina es la de la histidina siendo menos común la variante RR (6–10%).

Las diferencias asociadas al polimorfismo del FcγRIIa entre estas poblaciones podría explicar, al menos en parte, la mayor severidad de la enfermedad por dengue observada en Asia, así como las diferencias en el desenlace de la enfermedad por dengue observada entre los individuos con infección heterotípica bajo similares condiciones epidemiológicas.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que estudia el polimorfismo genético del receptor FcγRIIa en una población con infección asintomática en la que la variante genotípica FcγRIIa-R/R131 está asociada a protección.

#### IV-1.6 Asociación a nivel genotípico entre el polimorfismo del FcγRIIa y eventos clínicos padecidos en la etapa aguda de la infección (Epidemia de Ciudad de la Habana de VD 4 año 2006)

Teniendo en cuenta los síntomas y signos clínicos durante la etapa aguda analizamos la relación de los mismos con el polimorfismo del receptor FcγRIIa.

**Tabla 10:** Relación entre los síntomas clínicos recogidos en la etapa aguda con las variantes polimórficas del receptor FcγRIIa

Variante Genotipo	Derrame seroso		Sangramiento		Signos Alarma		Citolisis Hepática		Hemoconcentración.		Trombocitopenia	
	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no
RR	12	18	13	17	19	11	21	9	6	24	18	11
HH	10	12	<b>18</b>	<b>4</b>	16	6	17	5	9	13	16	6
HR	6	26	15	17	14	18	19	13	6	26	17	15
Total	28	56	46	38	49	35	57	27	21	63	51	32
Sig. Estadística	p=0.077		<b>p=0.012</b>		p = 0.001		p=0.366		p=0.133		p=0.346	

Análisis total de,  $\chi^2$ , p=0.012. Sólo para el sangramiento se evidencian diferencias significativas

El análisis mostró que sólo para el sangramiento las diferencias fueron significativas y las mismas se asociaron a la forma polimórfica HH.

La hemostasis es mantenida por el balance entre la coagulación y la fibrinólisis, limitando la pérdida de sangre al regular de forma precisa una variedad de interacciones entre los componentes de la pared vascular, las plaquetas sanguíneas y las proteínas plasmáticas. El diagnóstico exacto y el tratamiento de los pacientes con hemorragia o trombosis requiere el conocimiento de la fisiopatología de la hemostasia, la cual para su estudio se divide en hemostasia primaria (formación del tapón plaquetario primario) y hemostasia secundaria (formación de fibrina que refuerza el tapón hemostático primario) (227).

En la formación del tapón plaquetario primario intervienen tres fenómenos: la adherencia, en la que las plaquetas interactúan con el plano subendotelial de los vasos; la activación y secreción,

en la que las plaquetas al activarse producen factores como ADP, trombospondina, fibronectina, entre otros; y la agregación donde se forma la monocapa adherente de plaquetas. El proceso de adherencia tiene lugar con la participación de dos receptores de colágena: la glucoproteína (Gp) Ia/IIa, miembro de la familia de las integrinas, y GpVI. La unión de este último a la colágena transduce señales que activan a las plaquetas a través del receptor FcγRIIa (227).

El ADP liberado se une a un receptor purinérgico que, cuando se activa, modifica la configuración del complejo glucoproteína IIb/IIIa de manera que puede unirse al fibrinógeno. Así se unen entre sí las plaquetas adyacentes para formar un tapón hemostático. A medida que se forma el tapón hemostático primario, las proteínas plasmáticas de la coagulación se activan para iniciar la hemostasia secundaria, la cual culmina en la producción de trombina en cantidad suficiente para transformar en fibrina una fracción pequeña de fibrinógeno plasmático.

En lo fundamental, la salida de plasma y el sangramiento, son los dos cambios fisiopatológicos que determinan la severidad de la FHD. Entre las características más prominentes de la FHD está la hemorragia, causada, entre otros factores, por la disfunción plaquetaria. La pérdida de la función de agregación plaquetaria fue evidenciada inicialmente (228) en pacientes FHD convalecientes al no liberarse ADP. Se constató que esta función se repone de 2 a 3 semanas (229), detectándose en plasma niveles aumentados del factor plaquetario 4 y tromboglobulina.

En el año 1982, Halstead planteó que los monocitos, células dianas de la infección, poseían actividad fibrinolítica y coagulante, postulando que la coagulopatía sistémica que caracteriza al choque pudiera ser inducida por factores derivados de los monocitos como el factor PCA (del inglés *Pro-coagulant activity*), identificado entonces como activador tisular (230). Posteriormente, en el año 1984 Vassalli y colaboradores enriquecieron este planteamiento al demostrar que los monocitos producían un inhibidor de la enzima activadora del plasminógeno Urokinasa (UK), denominado PAI-2 (del inglés *plasminogen activator inhibitor-2*) que inhibía la fibrinólisis (231). Años más tarde, en 1989 Krishnamurti y col reportaron que esta actividad fibrinolítica en los monocitos aumentaba, al ser infectados en condiciones subneutralizantes de anticuerpos, ya que activaba la producción del PAI-2 (232).

Teniendo en cuenta lo referido en la literatura pudieramos inferir que tras una infección secundaria por VD, los anticuerpos anti-dengue preexistentes incrementan el proceso infeccioso de monolitos y macrófagos, los cuales pudieran activar linfocitos T y, en su conjunto, dar lugar a la producción de niveles aumentados de TNF $\alpha$ , IL-1  $\beta$  e IL-6, citoquinas asociadas

significativamente con la activación y regulación de marcadores de la coagulación y la fibrinólisis en el cuadro severo de dengue. Se plantea que los niveles de TNF $\alpha$ , e IL-1  $\beta$  son detectados elevados con respecto a los niveles de IL-6 al momento de la admisión y los mismos van disminuyendo en los siguientes días. Los niveles de IL-6 en cambio permanecen normales lo cual habla a favor de su carácter pro y antiinflamatorio.

Consecuentemente, se constató una activación de la fibrinólisis caracterizada por el incremento en los niveles de las moléculas activadoras de dicho proceso como el dímero D, u- PA y t-PA, seguido de PAI-1(inhibidor de los activadores del plasminógeno) y la misma se vio asociada con el TNF $\alpha$  y la IL-1  $\beta$ , así como con la IL-6, la cual además se constató asociada a la coagulación . Generalmente, al activarse la coagulación ocurre una activación secundaria de la fibrinólisis que rápidamente es inhibida por la liberación de grandes cantidades de PAI-1. Se plantea que en condiciones normales el endotelio produce TM y tPA, moléculas inhibidoras de la coagulación y moduladoras de la fibrinólisis. Tras la infección por dengue se han detectado niveles elevados de TM, TF y PAI-1, lo cual ha sugerido que en esta infección tiene lugar primeramente el proceso de fribinólisis, el que posteriormente activa la coagulación. La producción exacerbada de éstos, entre otros factores, rompe la hemostasis permitiendo el sangramiento (233).

Interesantemente, el polimorfismo del receptor FcγRIIa se ha vinculado con deficiencias en la coagulación (234). Se ha podido constatar que la variante genética FcγRIIa-RR se asocia con desórdenes tromboembólicos debido a una ineficiente clarificación del complejo IgG-Plaqueta-plaqueta-factor plaquetario 4, lo que induce una activación sostenida de plaquetas y células endoteliales incrementando la ocurrencia de cambios tromboembólicos (225).

Teniendo en cuenta lo referido en la literatura, podemos inferir que tras la infección de los monocitos por virus dengue se produce la activación de los mismos, generando un ambiente de citoquinas entre las que se destacan la IL-6, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estas citoquinas activan el proceso de fibrinólisis y, en consecuencia, puede tener lugar, unido a otros factores, el cuadro de sangramiento. Resulta interesante especular entonces que las deficiencias en la coagulación (225) y evolución del cuadro hemorrágico de dengue pudieran estar influenciadas también por el polimorfismo del FcγRIIa, en el que los individuos homocigóticos para la arginina RR podrían activar las plaquetas con mayor eficiencia, logrando controlar el sangramiento. Por el contrario, los individuos con la variante HH no podrían activar eficientemente la formación de coágulos, prevaleciendo en ellos la hemorragia. Esto explicaría la asociación encontrada entre la variante

*Polimorfismo del Receptor FcγRIIa . Influencias en la patogénesis y en la evolución de la infección por dengue.*

genética HH y el síntoma característico de la FHD. Sin embargo, al analizar los valores para la variante homocigótica RR encontramos que en 13 de los individuos se pudo detectar el sangramiento y en 17 de ellos no, lo cual aparentemente no es una diferencia significativa. Para tratar de explicarlo analizamos la razón entre el total de individuos con sangramiento en cada variante homocigótica, de manera que de los 20 individuos HH, 18 presentaron sangramiento representando el 81.8%. En los individuos RR, en cambio, 13 presentaron sangramiento lo que representa el 43.3%. De esta manera, se evidencia que el sangramiento podría estar ligado a la variante HH.

***Caracterización del estado general actual de individuos tras dos años de haber padecido infección por dengue.***

El cuestionario aplicado permitió comprobar que del total de los 97 individuos encuestados, 55 presentaban manifestaciones osteomioarticulares y/o neurológicas representando el 56,7% y 42 se habían recuperado totalmente representando el 43,3% (tabla 11).

**Tabla 11:** Manifestaciones clínicas referidas en el año 2008 por los individuos encuestados que desarrollaron infección clínica por dengue en la epidemia de VD4 en Ciudad de la Habana 2006

<b>Manifestaciones clín</b>	<b>No de pacientes</b>
- Mialgias	42 (30.4%)
- Artralgias	41 (29.7%)
- Astenia	32 (23.2%)
- Debilidad en las ma	31 (22.5%)
- Malestar General	28 (20.3%)
- Irritabilidad	27 (19.6%)
- Pérdida de memoria	27 (19.6%)
- Palpitaciones	27 (19.6%)
- Mareos	25 (18.1%)
- Artropatías cónicas	24 (17.4%)
- Dolor de cabeza	21 (15.2%)
-Dolor retroocular	20 (14.5%)
-Anorexia	15 (10.9%)
-Alopecia	13(9.4%)
-Rash	12(8.7%)
-Nauseas	10(7.2%)
- sangramiento vagina	10(7.2%)
-Diarreas	8 (5.8%)
-Gingivorragia	6(4.34%)
-Vómitos	3(2.2%)

Representación de manifestaciones clínicas persistentes en los individuos con antecedentes de infección clínica por dengue. Se aprecia un predominio de las manifestaciones osteomioarticulares.

La evaluación psicológica reflejó que el 100% de los individuos que integraron el estudio poseían una adecuada capacidad para hacer uso de sus habilidades emocionales y cognitivas, así como de las funciones sociales y de respuesta a las demandas ordinarias de la vida cotidiana en general, concluyéndose que exhibían un estado favorable de salud mental.

Partiendo de estos datos, nos preguntamos entonces si haber padecido la FHD pudiera estar relacionado con las manifestaciones referidas dos años después (tabla 12).

**Tabla 12:** Asociación entre el cuadro clínico (FD o FHD) y la presencia o no de manifestaciones clínicas a los dos años de haber padecido la infección por dengue.

<b>Cuadro Clínico (2006)</b>	<b>Manifestaciones clínicas (2008)</b>		<b>Total</b>
	<i>si</i>	<i>no</i>	
<b>FD</b>	34	34	68
<b>FHD</b>	21	8	29
<b>Total</b>	55	42	97

Análisis total de,  $\chi^2=2,947$ ;  $p=0,086$  no mostró diferencias significativas en relación al cuadro clínico padecido durante la fase aguda.

Al comparar el cuadro clínico padecido con la presencia o no de manifestaciones clínicas dos años después de la infección por dengue, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $\chi^2=2,947$ ;  $p=0,086$ ), lo que permite concluir que la situación clínica detectada tras dos años de haber padecido la infección por dengue, no guardaba relación con la historia anterior de la enfermedad.

Nos preguntamos entonces si sería el hecho de haber padecido la infección clínica lo que determinaba dichas manifestaciones (tabla 13).

**Tabla 13:** Asociación entre haber padecido infección clínica o asintomática con la presencia o no de manifestaciones clínicas a los dos años de haber padecido la infección por dengue.

Infección (2006)	Manifestaciones clínicas (2008)		Total
	<i>si</i>	<i>no</i>	
<b>Infección Clínica</b>	55	42	97
<b>Infección asintomática</b>	0	42	42
<b>Total</b>	55	84	139

Análisis total de,  $\chi^2=38,24$ ;  $p<0,0001$  mostró diferencias altamente significativas en relación a haber padecido infección clínica con relación a haber tenido infección asintomática.

El análisis mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre haber padecido la infección clínica y la presencia de manifestaciones ( $\chi^2=38,24$ ;  $p<0,0001$ ). Aparentemente, haber padecido la forma sintomática de la infección se asocia con la presencia de manifestaciones clínicas dos años después de ésta.

En el año 2002, cinco años después de la epidemia por VD 2 ocurrida en el año 1997 en Santiago de Cuba, nuestro grupo constató que los individuos que sufrieron infección clínica referían haber padecido síntomas y signos como dolores articulares y musculares, cefaleas y astenias entre otros, lo cual resultaba de gran interés al no existir hasta el momento ningún reporte de manifestaciones tras la infección por VD (datos no publicados).

González y colaboradores en el año 2005 (23) reportaron la presencia de síntomas que prevalecen seis meses después de la fase aguda de la enfermedad por VD 3 en pacientes que cursaron con el cuadro de FHD (epidemia 2001-2002), sugiriendo que la convalecencia en éstos puede durar meses. Sin embargo, en su estudio no existen pacientes con antecedentes de FD, por lo que no se puede afirmar si los síntomas, seis meses después de la enfermedad clínica, están relacionados sólo al cuadro severo. Más tarde, en el año 2007, Raymond y colaboradores (34) reportan un síndrome de fatiga dos meses después de haber sufrido la infección por dengue en casos diagnosticados como FHD y FD.

Entre los síntomas más frecuentes se encontraron en ambos estudios: mialgia, cefalea, artralgia, astenia, dolor retro-ocular, anorexia, náuseas, prurito y fatiga. Ambos estudios describen una sintomatología asociada a una convalecencia temprana de la enfermedad. Sin embargo, hasta donde conocemos, nuestro estudio representa la primera evidencia de la persistencia de manifestaciones clínicas, tras dos años de haber padecido la enfermedad clínica por dengue.

Teniendo en cuenta los resultados encontrados hasta el momento y que el polimorfismo del FcγRIIa se ha asociado a la susceptibilidad de padecer varias enfermedades infecciosas, nos preguntamos si el polimorfismo del gen del receptor FcγRIIa podría estar relacionado con la presencia de manifestaciones clínicas dos años después de haber padecido la enfermedad.

*Objetivo 2: Determinar si el polimorfismo del gen del receptor FcγRIIa está asociado con la presencia de manifestaciones clínicas dos años después de haber padecido la enfermedad*

#### **VI-2.1 Análisis de la posible relación entre la frecuencia genotípica con manifestaciones clínicas**

El análisis de las frecuencias genotípicas del FcγRIIa no mostró diferencias significativas entre individuos con manifestaciones clínicas persistentes o sin estas ( $p=0.08$ , Tabla 14). Considerando entonces la influencia del polimorfismo de esta molécula en el desarrollo de fenómenos autoinmunes y el hecho de encontrarse asociado como un factor de riesgo en la patogénesis de la FHD, comparamos individuos homocigóticos para un alelo con el resto de los individuos (heterocigóticos + homocigóticos del otro alelo), determinando así si existía riesgo asociado a alguna de las variantes genéticas. El análisis mostró que el genotipo HH está asociado con la presencia de los síntomas clínicos ( $p=0.027$ , OR= 2.83, 95% CI 1.01-8.11; Tabla 14).

**Tabla 14:** Análisis de la frecuencia genotípica del FcγRIIa con la presencia de síntomas clínicos a los dos años de haber padecido la infección por dengue

Genotipo	Manifestaciones clínicas		Total
	no	si	
HH	8 (26.7%)	22 (73.3%)	30
HR	23 (52.3%)	21 (47.7%)	44
RR	11 (47.8%)	12 (52.2%)	23
Total	42	55	97

Distribución de la frecuencia genotípica en individuos con y sin manifestaciones clínicas con y sin síntomas clínicos  $p= 0.08$ .

Comparación entre HH vs. HR+RR,  $p=0.027$  (Prueba de  $\chi^2$ ).

Al analizar si algunas de las variantes polimórficas estaba relacionada con algún síntoma en particular, encontramos que el genotipo HH se asoció significativamente con la presencia de síntomas osteomioarticulares (análisis de  $\chi^2$  de Pearson = 4,410, tabla de contingencia 2x2,  $gl= 1$ ,  $*p=0.036$ ) y neurológicos (estadístico exacto de Fisher, tabla de contingencia 2x2,  $*p=0,008$ ) indistintamente.

#### **IV-2.2 Asociación entre la presencia de manifestaciones clínicas persistentes y los factores demográficos**

Al analizar las posibles asociaciones entre la presencia de síntomas y los factores demográficos descritos, solo el género mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,008$ , Tabla 15). Como puede apreciarse, el mayor porcentaje de las mujeres presentó síntomas, mientras que los hombres en su mayoría se recuperaron después de la infección por el virus dengue.

**Tabla 15:** Asociación entre la presencia de síntomas dos años después y el género.

<b>Género</b>	<b>Síntomas</b>		<b>Total</b>
	<b>Sí</b>	<b>No</b>	
<b>Femenino</b>	<b>44</b>	<b>23</b>	<b>67</b>
<b>Masculino</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>30</b>

Distribución del género de los individuos asociado a la recuperación: tabla de contingencia 2x2, análisis de  $\chi^2$  de Pearson, gl=1, \*p= 0,008.

Los resultados obtenidos coinciden con lo encontrado por Rymond y cols., en el 2007 (34) sugiriendo que el sexo femenino es un factor de riesgo importante en la persistencia de manifestaciones posterior a la infección por dengue. Ciertas características asociadas al sexo como factores hormonales y endocrinos (235), constitución genética (236), así como características psicosomáticas frente al estrés, pudieran marcar la predisposición a mantener síntomas clínicos en las mujeres tras la infección por dengue (237-241) .

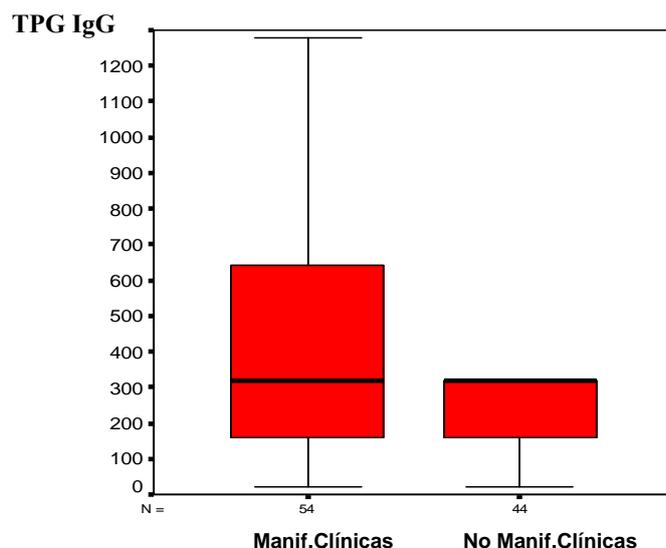
Interesantemente, al analizar la distribución de las variantes genotípicas en el género femenino, encontramos un predominio de la forma HH (n=18). La variante RR en cambio, estaba presente solo en 9 féminas, el resto presentó el genotipo heterocigótico (datos no mostrados).

La genética, sin dudas juega un importante papel en definir la susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes y determina la expresión de hormonas sexuales y factores neuroendocrinos. En un individuo con un genotipo susceptible, la exposición a factores ambientales (ejemplo la luz solar, la dieta, alérgenos, agentes infecciosos o toxinas ambientales) pueden actuar en el desencadenamiento de un proceso autoinmune. Entre los factores moduladores que pueden marcar la diferencia entre la expresión o no de la enfermedad, se incluyen las hormonas sexuales, las cuales pueden actuar recíprocamente con hormonas del eje hipotalámico o el sistema nervioso simpático. Todos estos factores en su conjunto afectan la respuesta inmune a lo propio y a antígenos extraños modulando la producción de citoquinas así como las funciones de la célula efectora (238).

#### **IV-2.3 Determinar la relación entre la presencia de manifestaciones clínicas y los títulos de IgG anti-dengue totales tras dos años de haber padecido la enfermedad**

En este punto nos preguntamos qué podría quedar como huella de la infección por dengue que pudiera relacionarse con las manifestaciones clínicas referidas. Conociendo que la IgG anti-dengue prevalece de por vida (242) determinamos los títulos presentes en el suero de los individuos a los dos años. En este sentido, observamos que existía una asociación significativa entre la presencia de las manifestaciones clínicas estudiadas y los títulos de anticuerpos antes mencionados ( $p=0.041$ , fig. 5)

**Fig.5** Relación entre los títulos de IgG anti VD y la presencia de manifestaciones clínicas dos años después de haber padecido la enfermedad por dengue.



Cada caja representa el título promedio geométrico de IgG (TPG IgG) en individuos con manifestaciones clínicas persistentes o no. La línea horizontal dentro de la caja representa los valores medio y las líneas superiores e inferiores muestran los valores máximos y mínimos, respectivamente. Análisis de  $\chi^2$   $p=0.041$

Sin embargo, no encontramos asociación particular entre los títulos de IgG y las manifestaciones clínicas más representativas (Tabla 1).

#### **IV-2.4 Relación entre la presencia de manifestaciones clínicas con la secuencia de la infección**

Con el objetivo entonces de saber a qué serotipos podrían haberse expuesto anteriormente los individuos y si esto guardaba alguna relación con la clínica manifestada a los dos años, se les determinó la secuencia de infección (tabla 16).

Como se puede apreciar, la mayoría de los individuos presentaron al menos dos infecciones previas por dengue. Sin embargo, no existe asociación entre la presencia de manifestaciones clínicas tras dos años de haber padecido el cuadro agudo y la secuencia de infección ( $p>0.005$ ).

**Tabla 16:** Relación entre la secuencia de infección y la presencia o no de manifestaciones clínicas

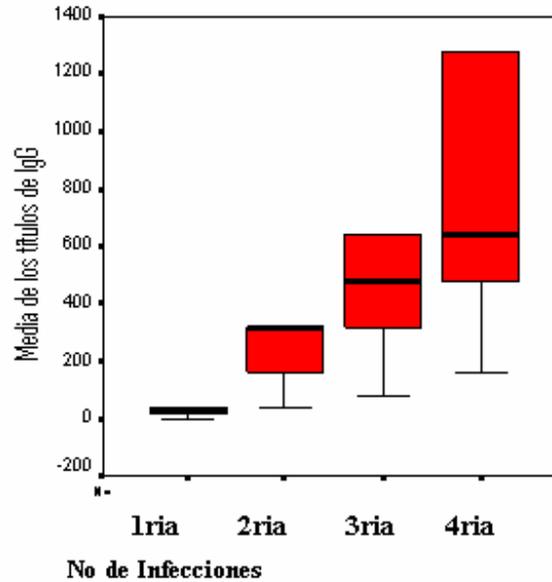
Secuencias	Manifestaciones	
	Si (%)	No (%)
VD4	6 (10.91)	4 (13.33)
VD1/VD4	2(3.64)	0
VD2/VD4	18(32.73)	22(48.89)
VD3/VD4	1(1.82)	0
VD1/VD3/VD4	7(12.73)	1(2.22)
VD2/VD3/VD4	16(29.09)	11(24.44)
VD1/VD2/VD4	0	1(2.22)
VD1/VD2/VD3/VD4	5(9.09)	4(8.89)
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>42</b>

No se encuentra asociación entre la presencia de manifestaciones clínicas y el antecedente de infección por dengue ( $p>0.005$ ).

#### **IV-2.5 Títulos de IgG totales en relación con el número de infecciones**

Relacionando ambas variables determinamos entonces si los niveles de IgG anti dengue se relacionaban con el número de infecciones aplicando para ello la prueba estadística de Kruskal Wallis para la comparación de medias (fig.6).

**Fig.6** Relación entre la media de los títulos de anticuerpos IgG anti VD y el número de infecciones en los individuos que padecieron la enfermedad por dengue.



Cada caja representa el título promedio geométrico de IgG (TPG IgG) en individuos con persistentes manifestaciones clínicas o no. La línea horizontal dentro de la caja representa los valores medio y las líneas superiores e inferiores muestran los valores máximos y mínimos respectivamente. Se observa un aumento proporcional de los títulos de IgG con el número de infecciones (Prueba estadística de Kruskal Wallis para la comparación de medias  $\chi^2 = 23.7$ ,  $p < 0.0001$ )

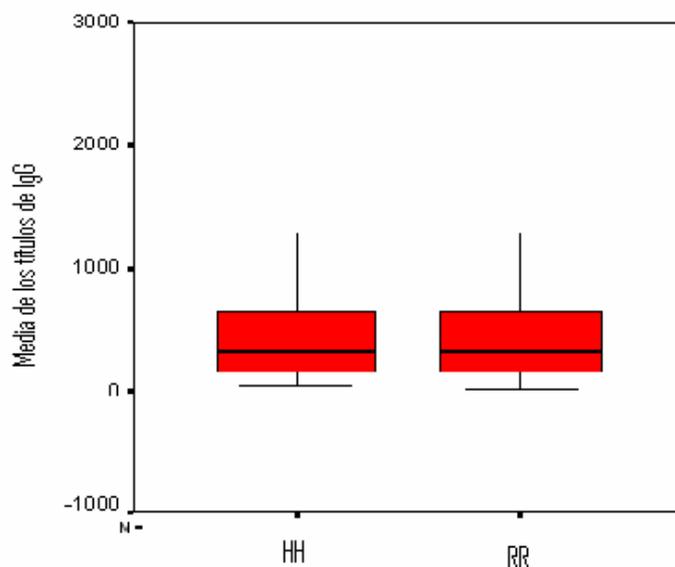
El análisis mostró diferencias altamente significativas ( $\chi^2 = 23.7$ ,  $P < 0.0001$ ), lo que evidencia que existe una relación directamente proporcional entre los altos títulos de IgG anti VD con el número de infecciones padecidas.

Conociendo que el polimorfismo del receptor FcγRIIa-HH se había asociado a la presencia de manifestaciones clínicas, nos preguntamos entonces qué relación pudieran tener los títulos de IgG con las variantes genotípicas homocigóticas del receptor.

#### **IV-2.6 Títulos de IgG totales frente a las variantes genotípicas homocigóticas**

El análisis mostró una distribución similar de ambos genotipos con relación a la media de los títulos de IgG, no encontrándose un asociación significativa ( $p=0.33$ ).

**Fig.7** Relación entre la media de los títulos de IgG anti VD y las variantes genotípicas homocigóticas del FcRγIIa



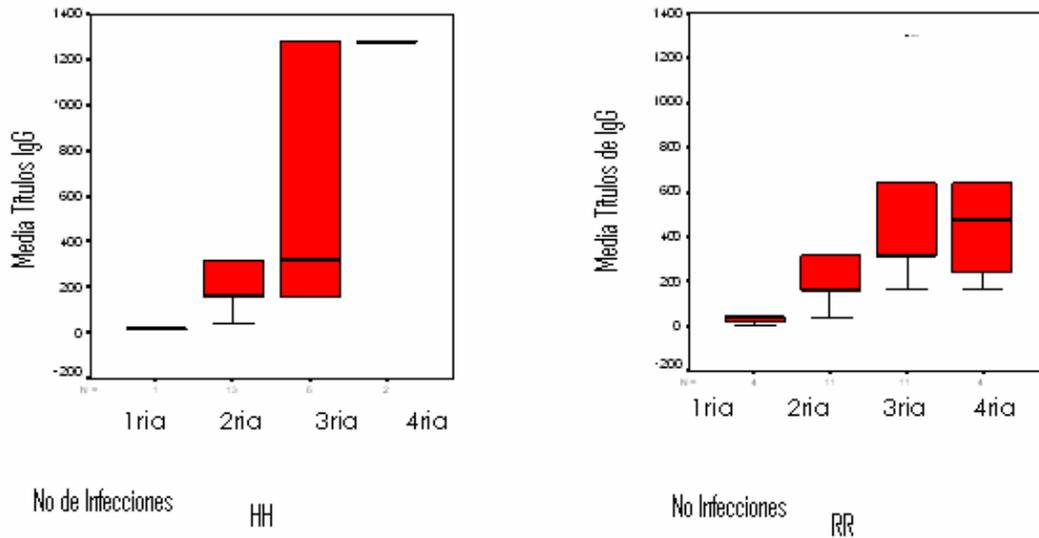
Cada caja representa el título promedio geométrico de IgG (TPG IgG) en individuos con persistentes manifestaciones clínicas o no. La línea horizontal dentro de la caja representa los valores medio y las líneas superiores e inferiores muestran los valores máximos y mínimos respectivamente. No existe relación significativa entre la media de los títulos de IgG anti VD y las variantes homocigóticas del receptor FcγRIIa Prueba  $\chi^2$ ,  $p=0.33$ ).

Resultaba interesante en este punto relacionar los tres aspectos, es decir, el número de infecciones sufridas con las variantes genéticas y los títulos totales de IgG anti dengue.

#### **IV-2.7 Títulos de IgG totales en relación con el número de infecciones por cada variante homocigótica**

Solo para la variante genética HH los títulos de IgG aumentan proporcionalmente con el número de infecciones padecidas (Fig.8) aunque al dividirse el número de muestra esta relación no llega a ser estadísticamente significativa ( $\chi^2=7,8$   $p=0,05$ ).

**Fig. 8** Relación entre la media de los títulos de IgG anti VD y el número de infecciones para cada variante genotípica homocigóticas del FcRγIIa



Cada caja representa el título promedio geométrico de IgG (TPG IgG) en individuos con persistentes manifestaciones clínicas o no. La línea horizontal dentro de la caja representa los valores medio y las líneas superiores e inferiores muestran los valores máximos y mínimos respectivamente. Se observa un aumento proporcional cercano a la significación estadística de los títulos de IgG para la variante homocigótica HH relacionado al número de infecciones padecidas ( $\chi^2=7,8$   $p=0,05$ )

El comportamiento que muestran los títulos de IgG y el número de infecciones en aquellos individuos cuyo receptor FcγRIIa presenta la variante polimórficas HH sugiere: un aumento de los títulos de anticuerpos, tras el desarrollo de infecciones sucesivas por el virus y una disminución en la eliminación de éstos por causas a las que nos referiremos más adelante.

Para analizar la posible relación entre las manifestaciones clínicas presentes dos años después de la infección y el desarrollo de eventos autoinmunes, basándonos en lo ya descrito en la literatura revisada (27, 34, 187, 239, 243) estudiamos posibles asociaciones con marcadores de autoinmunidad.

#### **IV-2.8 Estudio de la posible relación entre las manifestaciones clínicas, dos años después de haber padecido la enfermedad, con marcadores de autoinmunidad.**

Para este estudio preliminar se realizó una selección aleatoria de 26 individuos, del total de 55 con secuelas post-dengue, para determinar marcadores de autoinmunidad en suero. Los resultados obtenidos mostraron que 20 de estos individuos presentaron alteraciones en al menos uno de los marcadores. El hecho de no haber podido incluir en este análisis individuos sin secuelas como grupo control, constituye una limitante del trabajo.

En la tabla 17 se expone el número de individuos que mostraron alteraciones para cada uno de los marcadores de autoinmunidad seleccionados en el estudio.

**Tabla 17:** Número de personas con alteraciones en los niveles de ANA, C3, C4, ICC, FR y PCr.

<b>Marcadores</b>	<b># de individ</b>	<b>%</b>	<b>Rango</b>
<b>Autoinmunes</b>			
ANA	6	23.1	-
C3	2	7.7	90-180 mg/dl
C4	3	11.5	10-40 mg/dl
ICC	10	42.3	≤ 0,050 Abs
FR	1	4.8	0-14 UI/ml
PCr	11	52.4	≤ 0,50 mg/dl

ANA: anticuerpos antinucleares, C3 y C4: factores 3 y 4 del complemento, ICC: Inmunocomplejos circulantes, FR: Factor Reumatoideo y PCr: Proteína C reactiva

Como se muestra, seis individuos que resultaron positivos a anticuerpos anti-nucleares, lo cual sugiere que ellos podrían estar atravesando por un desorden inmunológico.

No existe asociación estadísticamente significativa entre los diferentes marcadores, posiblemente debido al pequeño número de individuos estudiados.

Al analizar la distribución de género en la muestra estudiada encontramos un predominio del género femenino (n=21), donde la distribución genotípica del receptor Fc muestra un predominio de la variante HH (11 mujeres) con respecto a la homocigocis RR (3 mujeres) y la forma heterocigótica RH (7 mujeres).

Se ha planteado que la sobreproducción hepática de proteínas plasmáticas de fase aguda como la PCr puede ocurrir, entre otros factores, en respuesta a inflamación sistémica y daño tisular. En el hepatocito la síntesis de la PCr puede ser activada a nivel transcripcional por la IL-6, IL1β e indirectamente por el TNFα, y a su vez puede ser inhibida por el TGFβ (del inglés tissue growth factor) (244).

Por otra parte, niveles aumentados de ICC, a los que se ha hecho referencia antes, podrían provocar reacciones inflamatorias mediante varios mecanismos. Entre ellos se ha descrito la estimulación de los macrófagos mediante su receptor Fcγ por inmunocomplejos insolubles que, usualmente, no pueden ser digeridos lo que constituye un estímulo de activación persistente, que induce a su vez la liberación de citoquinas pro inflamatorias como IL-1 y TNFα (185).

Estas moléculas son, además, activadoras de la transcripción hepática de PCr, por lo que el hecho de encontrarse elevada la PCr en aquellos individuos con manifestaciones post-dengue pudiera sugerir que existe un proceso agudo de tipo autoinmune, donde la activación de diferentes ramas del sistema inmune provoca la liberación de los mediadores que inducen la síntesis de esta proteína. Aunque la PCr es un marcador en procesos inflamatorios como la osteoartritis emergente (245), algunos reportes refieren que no siempre está aumentada en estos desórdenes (246), lo cual podría explicar el hecho de no haberla encontrado en todos los individuos con las manifestaciones clínicas descritas.

Dos mecanismos inmunopatogénicos podrían explicar el desarrollo de manifestaciones clínicas tardías tras la infección por dengue:

- 1- Un mecanismo autoinmune, en el que la presencia de efectores del sistema inmune contra lo propio podría ser consecuencia de:- una activación policlonal de células , que daría lugar a anticuerpos contra estructuras propias-el mimetismo molecular entre antígenos propios y antígenos microbianos (29).
- 2- Un mecanismo mediado por inmunocomplejos que se depositarían en determinadas estructuras filtrantes, fenómeno inmunopatogénico conocido como hipersensibilidad tipo III. Entre los factores que determinan la deposición en los tejidos de los IC se destacan el tamaño, siendo los pequeños y medianos los de mayor capacidad patogénica, y el estado funcional del sistema retículo endotelial. Una vez depositados en los tejidos, se produce una reacción inflamatoria aguda activándose mecanismos efectores de la respuesta

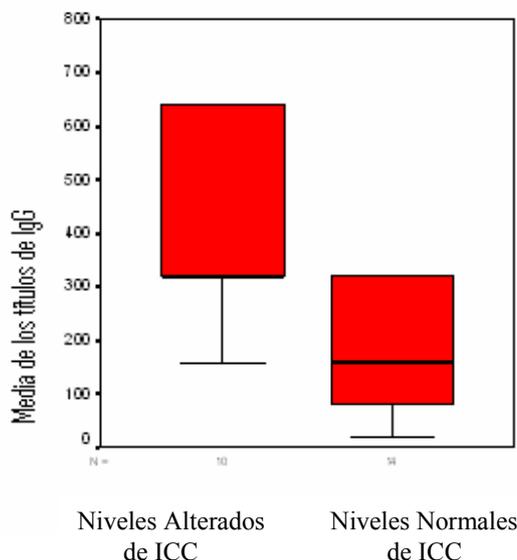
inmune como la cascada del complemento y la activación de neutrófilos a través de los receptores Fc. Esto se traduce desde el punto de vista clínico en dolor e inflamación en sitios de depósito como articulaciones y músculos (185).

Los estudios realizados por nosotros demostraron la elevación de la concentración de los inmunocomplejos en una parte de los individuos participantes. Sin embargo, los procedimientos empleados no permitieron caracterizar la composición de éstos y, en consecuencia, no podemos afirmar si la citada elevación obedece a un aumento en la producción.

Fue interesante el hecho que la casi totalidad de los individuos estudiados expresaban la variante homocigótica HH. Dos observaciones, y una de ellas mencionada con anterioridad, podrían relacionarse con lo antes dicho: la menor afinidad de los receptores FcγRIIa-HH con las regiones Fc de los anticuerpos de la subclase IgG1 e IgG3, y el hallazgo nuestro, a que nos referiremos más adelante, de que cinco años después de una infección son precisamente los anticuerpos IgG de estas subclases los que predominan.

Un elemento que pudiera vincular los niveles elevados de ICC con un fenómeno autoinmune, fue la asociación encontrada entre los niveles de IgG anti-dengue (detectados 2 años después de la infección) con estos inmunocomplejos en los individuos seleccionados para realizarle la determinación de los diferentes marcadores de autoinmunidad. Se encontró una asociación estadísticamente significativas entre el título de anticuerpos circulantes y los niveles de ICC, en el que el promedio de los títulos de IgG fue mayor en los individuos con ICC (Fig. 9  $p=0,042$ ). Luego, los altos títulos de IgG anti-dengue encontrados en aquellos individuos con manifestaciones y niveles altos de ICC podrían estar indicando que los ICC detectados están formados por anticuerpos anti-dengue, debido posiblemente a la estimulación persistente de clones de células plasmáticas por antígenos propios que comparten epítopes con algunas de las proteínas virales, lo cual será discutido más adelante.

**Fig. 9** Relación entre el título de IgG y los niveles de ICC



Cada caja representa el título promedio geométrico de IgG (TPG IgG) en los 26 individuos con persistentes manifestaciones clínicas. La línea horizontal dentro de la caja representa los valores medio las líneas superiores e inferiores muestran los valores máximos y mínimos. Se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre el título de anticuerpos circulantes y los niveles de ICC (Prueba de  $\chi^2$ ,  $p=0,042$ ).

Al analizar los síntomas más frecuentes dentro del grupo de individuos que mostraron alguna alteración en los marcadores estudiados, no se observaron diferencias con respecto al resto del grupo, resultando artralgias y mialgias los más frecuentes (ambos con 15 individuos, y representando el 88,2%), seguidos en orden decreciente por: mareos (14; 82,4%), decaimiento (12; 70,6%), cefalea (11; 64,7%) y pérdida de la memoria (9; 52.9%).

Por otra parte muy interesante resulta el hecho que tanto la PCr como los ICC se encuentran alterados mayoritariamente en individuos con presencia del alelo histidina (H) (ICC: RR=10%, HH=50%, RH= 40%, PCr: RR=9%, HH=45.5%, RH= 45.5%), lo que denota una vez más la posible participación del polimorfismo del receptor FcγRIIa en el fenómeno clínico observado dos años después de haber padecido dengue

La etiología de las enfermedades autoinmunes no está clara aún, pero se conoce que depende de la interacción de factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos, los virus han sido

descritos como agentes desencadenantes de dichos fenómenos. Existen varios reportes, como ya se ha mencionado, sobre el mimetismo molecular entre las proteínas virales y del hospedero a través de epítopes capaces de establecer reacciones cruzadas con auto antígenos (28). Entre estos se destacan el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Citomegalovirus, Herpes Simple, Epstein- Barr, alfavirus y el parvovirus humano B19 (29-33).

Los flavivirus, entre ellos el virus de la hepatitis C, han sido involucrados en la inducción de la autoinmunidad a través del mimetismo molecular entre antígenos virales como el core, con proteínas del hospedero generando una respuesta autoinmune (26, 247). Entre las entidades descritas para este virus se destacan la Hepatitis Autoinmune Tipo II (248), las crioglobulinemias y algunos desórdenes tiroideos (249).

Existen evidencias que apuntan al posible desarrollo de fenómenos autoinmunes asociados a la infección por dengue (24, 27). Estudios recientes mostraron que anticuerpos dirigidos contra la proteína NS1 del VD 2 reconocen antígenos en plaquetas y las moléculas ATPasa, PDI (del inglés *protein disulfide isomerase*), vimentina, y HSP60 (del inglés *heat shock protein*) expresadas en células endoteliales humanas (30, 35). Por otra parte, anticuerpos contra la proteína E del VD 4, reconocen una región de 20 aminoácidos en el plasminógeno capaces de inhibir su forma activa y por tanto afectar la fibrinólisis (250). Existen reportes del desarrollo del síndrome Guillain Barre debido a la infección por VD (24, 27), que plantean que la amplificación inmune permite la generación de anticuerpos de reactividad cruzada y la desmielinización (24, 27).

De modo que tras una infección por el virus dengue se podría generar una respuesta humoral contra antígenos propios y esto podría explicar, al menos en parte, la detección de los IC circulantes en los individuos con manifestaciones clínicas estudiados.

Una vez determinado que el polimorfismo del receptor FcγRIIa podría estar implicado tanto en el fenómeno agudo de la enfermedad por dengue como en la persistencia de manifestaciones clínicas tras dos años de haber padecido la enfermedad, nos quedaba conocer qué subclases de IgG predominaban en la infección por dengue y su posible relación con las variantes polimórficas del receptor FcγRIIa.

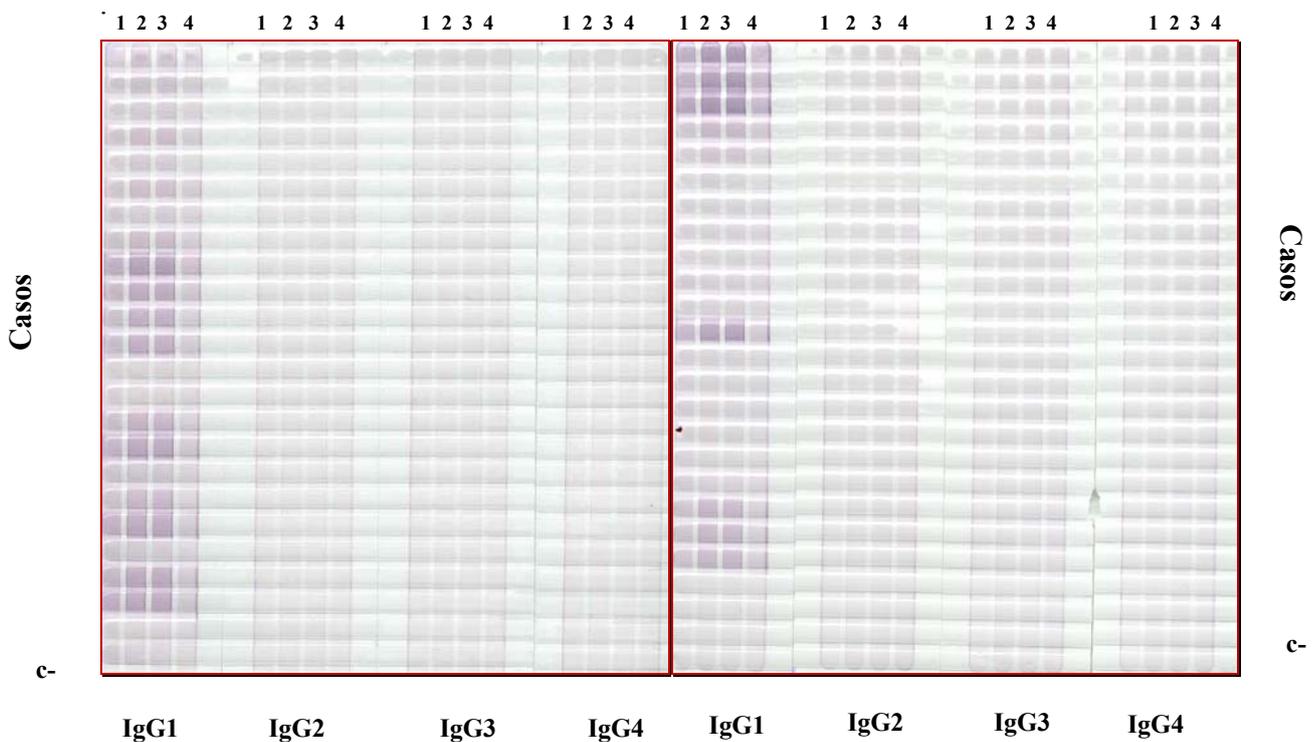
Objetivo 3 Evaluar si las variantes polimórficas del FcγRIIa al determinar las subclases de IgG con que interactúan, influyen sobre la evolución clínica de la infección por dengue.

#### IV-3 Subclases de IgG en muestras de suero agudo: FS e IC

En el empeño por comprender la inmunopatogénesis de la infección por Dengue, algunos estudios han sido centrados en la posible correlación entre la cinética de clases y subclases de Igs y la severidad de la enfermedad (15, 251, 252).

La figura 10 muestra la señal de reconocimiento de las diferentes subclases IgG (1-4) en la fracción soluble (FS) de los sueros estudiados.

**Fig. 10:** Representación de la determinación de las subclases IgG en la Fracción soluble (FS) obtenida a partir del suero de individuos con FHD o FD (Epidemia de dengue2 Santiago de Cuba)



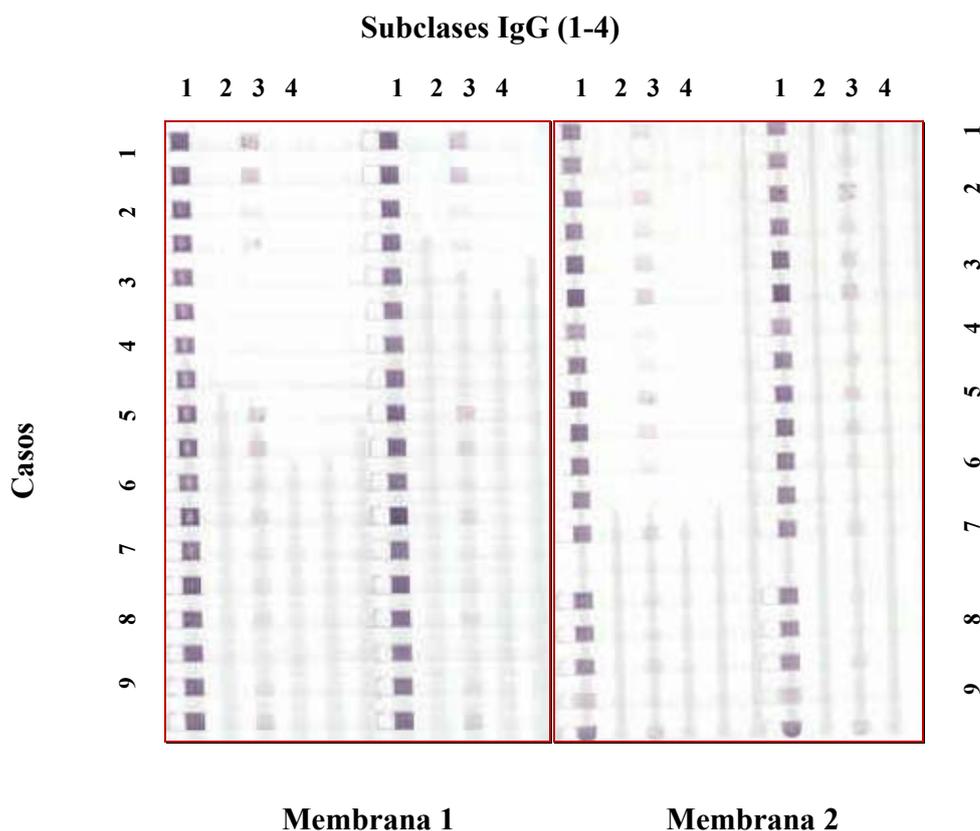
1- Virus Dengue 1, 2- Virus Dengue 2, 3- Virus Dengue 3, 4-virus Dengue 4 C- Suero control negativo. Representación del dot blot para la detección de las subclases de igG que predominan en la F.S. Como se observa solo se encuentra la IgG1 en su forma libre.

Como puede apreciarse, en la FS tanto de individuos con FHD como FD, sólo se observa un patrón IgG1 y un reconocimiento a los cuatro serotipos de dengue. Esto indica que los

anticuerpos de memoria anti-dengue 1, inducidos en la primo infección, fueron capaces de reconocer determinantes de los serotipos restantes del complejo dengue. Debido a la poca sensibilidad de la técnica y que la misma es cualitativa no podemos decir que exista un mayor reconocimiento a uno u otro serotipo o si existen diferencias entre los diferentes cuadros clínicos en al cantidad e IgG1 producida.

En la fase de IC fueron detectadas las subclases IgG1 e IgG3. La IgG1 mostró una señal más intensa en ambos cuadros clínicos, lo que podría indicar que es mayoritaria (Figura 11). La IgG3, en cambio se observa predominantemente en aquellos individuos que describieron un cuadro de FD.

**Fig. 11:** Representación de la determinación de las subclases IgG en la Fracción I.C obtenida a partir del suero de individuos con FHD o FD (Epidemia de dengue2 Santiago de Cuba)



Representación del dot blot para la detección de las subclases de IgG que predominan en el IC. Como se observa se reconocen la IgG1 mayoritariamente y la IgG3. Se representan 18 muestras aplicadas por cuaplicado  
**Membrana 1** Casos FD (1,2,5, 9) Casos FHD (3,4,6,7,8) **Membrana 2** Casos FD (1,2,5, 9) Casos FHD (3,4,6,7,8)

Encontramos los niveles mayores de inmunocomplejos en los individuos que desarrollaron la forma no grave de la enfermedad por dengue, la FD. Pensamos que ello podría obedecer a que los virus presentes en los inmunocomplejos de los individuos de FD estarían neutralizados por actividad de la subclase IgG3.

Estudios recientes realizados por Shanaka y col en el año 2009, apoyan nuestra hipótesis (252). Estos autores, empleando AcM humanizados y células CV1 transfectadas con receptores FcγR encontraron que la neutralización por las subclases de IgG1, IgG3 e IgG4 aumentaba en células transfectadas con el receptor Fc de alta afinidad FcγRI y disminuía en aquellas que expresaban el FcγRIIa de baja afinidad. Encontraron además que en células Vero, negativas a la expresión de receptores Fc, los AcM IgG3 mostraron la mayor actividad neutralizante. Estos autores demostraron que la neutralización al virus dengue es modulada, de manera conjunta por la unión del I.C a los receptores Fc y las subclases de IgG que lo forman (252).

En resumen podemos decir que la IgG1 e IgG3 son las subclases mayoritarias en la infección secundaria por dengue, coincidiendo con estudios anteriores donde se han encontrado estas IgGs predominantemente (15). Teniendo en cuenta la intensidad de la señal de IgG1 y que en la FS no se detectó IgG3, IgG1 es la subclase de IgG mayoritaria encontrada, en ambos cuadros clínicos.

En el estudio referido anteriormente se detectó la Ig libre en el suero, a diferencia de nuestro estudio, en el que se midieron las Igs libres (FS) y formando los IC. El empleo de la técnica de ELISA permitió detectar y cuantificar los bajos niveles de IgG2 e IgG4 presentes en los sueros estudiados(15).

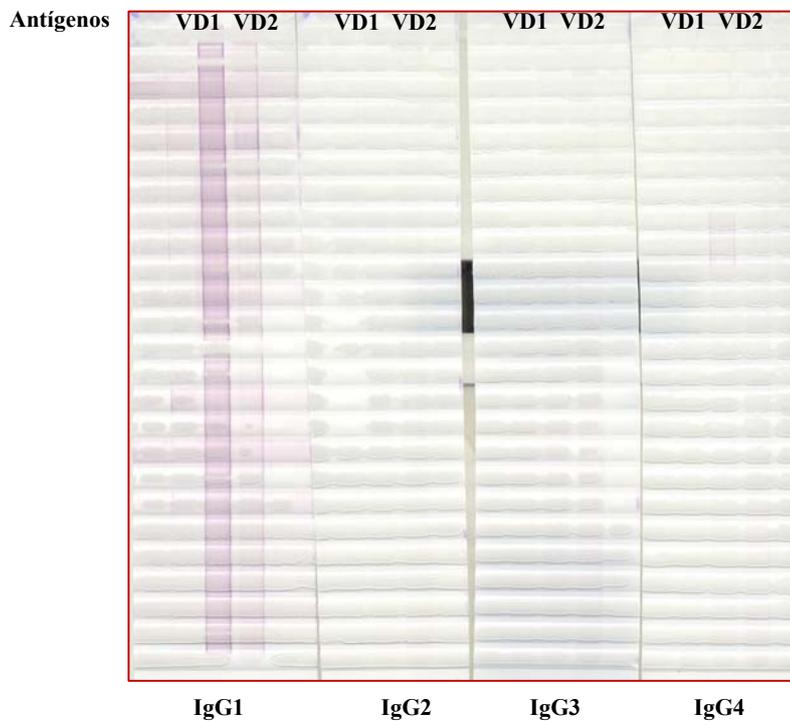
El hecho de no haber detectado en nuestro estudio ambas subclases pudiera explicarse por la menor concentración de estas en suero ya que el patrón de Igs esperado frente a una infección viral, es justamente IgG1 e IgG3, donde se detecta primero la IgG3 y prevalece por lo general la IgG1 (19). Ello, unido a la baja sensibilidad del sistema de Dotblot, método cualitativo que posee además la característica intrínseca de la subjetividad al hacer la lectura, podría explicar nuestra discrepancia con los resultados previamente reportados.

Según la estructura de las inmunoglobulinas IgG2 e IgG4, particularmente sus regiones bisagras poco flexibles, es menos factible que se hayan unido al virus para formar el IC o al virus utilizado para sensibilizar la membrana en el ensayo de Dotblot y por tanto, pudieran haber sido eluidas en un paso de lavado, no siendo detectadas en ningunas de las dos fases.

La detección y cuantificación de las subclases de IgG en individuos que desarrollan una infección subclínica o asintomática, permitiría corroborar nuestros resultados.

A partir del análisis de las subclases de IgG en las muestras de los mismos individuos tomadas 5 años post infección (figura 12), se observa un patrón de reconocimiento intenso en la detección de la IgG1.

**Fig 12:** Representación de la determinación de las subclases IgG en el suero de los individuos estudiados a los 5 años de haber padecido la enfermedad por dengue (Epidemia de dengue2 Santiago de Cuba)



Representación del dot blot para la detección de las subclases de IgG que predominan el suero de los individuos a los 5 años de haber padecido la enfermedad por dengue. Como se observa se reconoce solo la IgG1 y al serotipo primoinfectante.

Este estudio refleja además, un reconocimiento más intenso al serotipo de dengue 1, serotipo primo-infectante en estos individuos, que al serotipo 2 causante de la última infección, lo que concuerda con la teoría del sin antigénico(138).

La integración de los resultados obtenidos nos permite especular que, siendo las subclases IgG 1 e IgG 3 las inmunoglobulinas que predominan en la infección por dengue, aquellos individuos

cuyo receptor FcγRIIa presenta la forma polimórfica RR, unirían los inmunocomplejos VD-IgG1/3 transduciendo de manera eficiente la señal para la formación del fagolisosoma, con la consecuente activación de los mecanismos líticos y, de esta manera la eliminación de los inmunocomplejos y con ello el control de la diseminación viral. Sin embargo, en aquellos individuos homocigóticos para la histidina (FcγRIIa-HH) no se produciría una transducción correcta de la señal para la eliminación del inmunocomplejo en el fagolisosoma, por lo que el virus podría escapar del inmunocomplejo al citosol, integrarse al complejo replicativo de la célula, aumentando así la progenie viral y con ello la infección mediante el mecanismo de ADA, pudiendo ocasionar el cuadro severo. El estudio del mecanismo de transducción de señales a través del FcγRIIa en monocitos de individuos con polimorfismo HH y RR contribuiría a confirmar la hipótesis planteada.

Las manifestaciones que persisten tras la infección por dengue, detectadas dos años después de la infección, parecen indicar que en estos individuos se podría estar produciendo fenómenos de tipo inmunopatológicos y que los mismos podrían estar asociados al polimorfismo del Fcγ RIIa. Es atractivo especular que la detección de altos títulos de IgG e ICC en suero pudiera deberse a la existencia de clones de células B de memorias, generadas durante la infección contra las proteínas virales E y NS1, que poseen reactividad cruzada contra estructuras propias y que están siendo activados.

Esta estimulación constante conllevaría a la producción de anticuerpos y formación de IC que, al interactuar con la variante del receptor FcγRIIa-H/H, estimulan en los macrófagos la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNFα. Estos mediadores estimulan la producción, por parte del hígado, de proteínas como la PCr, acentuando de esta manera, la existencia de un proceso inflamatorio. Los IC, al no poder ser eliminados, permanecerían en la circulación y se depositarían en los tejidos lo que explicaría los síntomas clínicos detectados a los dos años de haber padecido la enfermedad. Obviamente, estudios adicionales son necesarios para confirmar (o rechazar) la especulación realizada.

## **V. CONCLUSIONES**

## **CAPÍTULO V. CONCLUSIONES**

1. La variante homocigótica para la arginina RR, que resultó predominante en la población normal, se asoció a protección contra el desarrollo de la FHD; en cambio, la variante HH se relacionó con susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad.
2. Las manifestaciones clínicas detectadas dos años después de la infección por virus dengue se asociaron a la variante polimorfa del gen FcγRIIa–HH y a altos títulos de IgG anti dengue.
3. En la infección por el virus dengue hay un incremento selectivo de anticuerpos IgG de las subclases IgG1 e IgG3, de mayor afinidad de unión por la variante polimórfica del gen FcγRIIa-RR, lo cual sugiere la activación de mecanismos intracelulares que controlarían la diseminación viral.

## **VI. RECOMENDACIONES**

## **CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES**

1. Determinar el polimorfismo asociado a otros receptores Fc y sus implicaciones en la infección por dengue.
2. Discernir los posibles mecanismos de internalización y procesamiento de los ICs asociado a las diferentes variantes polimórficas de los receptores Fc.
3. Identificar autoantígenos dianas de la respuesta inducida tras la infección por dengue.

## **VII. AUTOBIOGRAFÍA**

## **CAPÍTULO VII. AUTOBIOGRAFÍA DE LA ASPIRANTE**

### **VII-1 Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis**

1. Gissel García, Beatriz Sierra, Ana B. Pérez, Eglys Aguirre Ileana Rosado, Narjara Gonzalez, Alienys Izquierdo, Maritza Pupo, Didye Ruiz Danay Díaz, Lizet Sánchez, Beatriz Malcheco, Kenji Hirayama María G Guzmán. The asymptomatic dengue infection in Cuban population confirms the protective role of the RR variant associated to FcγRIIa polymorphism. **2010**. Am.J.Trop.Med.Hyg 82 (6):1153-1156.
2. Gissel García, Narjara González, Ana Beatriz Pérez, Beatriz Sierra, Eglis Aguirre , Damarys Rizo, Alienys Izquierdo, Lizet Sánchez, Danay Diaz, Magnolia Lescai, Beltsi Pacheco, Kenji Hirayama, Maria G Guzmán. Long persistence of clinical symptoms in dengue infected persons and its association with immunological disorders **Aceptada en IJID**.
3. Gissel García, Ileana Rosado, Beatriz Sierra Vázquez, Ana Beatriz Pérez, Eglys Aguirre Pérez, Beatriz Malcheco, Kenji Hirayama, María G. Guzmán. **2008**. Variantes genotípicas del receptor de baja afinidad Fcγ II a en la población cubana de Ciudad de la Habana. Rev.Cubana Genet Comunit. 2(2): 46-51.
4. Gissel García, Ileana Rosado, Beatriz Sierra, Ana B. Pérez, Eglis Aguirre, Beatriz Marcheco, Kenji Hirayayama, María G Guzmán. **2009**. Variantes genotípicas del receptor de baja afinidad Fcγgamma IIa en la población cubana de Santiago de Cuba. Rev.Cubana Genet Comunit; 3(1): 50-53.
5. G. García, A.B. Pérez, B. Sierra, E. Aguirre, A. Izquierdo, L. Sanchez, I. Rosado, S. Borroto, K. Hirayama, M.G. Guzmán **2008**. IgG Subclass and the FcγReceptor IIa Polymorphism Associate to Dengue Fever, Dengue Hemorrhagic Fever and Asymptomatic Dengue Infection in Cuba. Int. J.Inf. Dis. Vol. 12, Page e327.

### **VII-2 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis**

1. XVI Congreso Latino Americano de Microbiología (ALAM), VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, III Congreso cubano de Medicina Tropical, IPK, Habana, Cuba, Noviembre 2002.
2. Congreso Internacional de Higiene y Epidemiología 2007.
3. 13th International Congress of Immunology, August 21-25, 2007, Rio de Janeiro, Brasil.

4. Conferencia Universidad Autónoma de Aguascalientes , México, Febrero 2009
5. Congreso 70 Aniversario IPK Junio 2009.
6. Congreso de Inmunología Inmunochile Noviembre 2009.

### **VII-3 Tesis**

1. Tesis de Maestría en Virología (2005): **Cinética de anticuerpos mediadores de citotoxicidad frente al virus dengue.** Autor: Y.Medina
2. Tesis de Maestría en Virología (2009): **Síndrome post dengue: posible fenómeno autoinmune.** Autor N.Gonzalez

## **VIII. REFERENCIAS**

## CAPITULO VIII. REFERENCIAS

1. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev. 1998 Jul;11(3):480-96.
2. Chen WJ, King CC, Chien LY, Chen SL, Fang AH. Changing prevalence of antibody to Dengue virus in paired sera in the two years following an epidemic in Taiwan. Epidemiol Infect. 1997 Oct;119(2):277-9.
3. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science. 1988 Jan 29;239(4839):476-81.
4. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987;81(5):821-3.
5. Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A, Vaughn DW, Kalayanaroj S, Green S, et al. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 1998 Jan;58(1):96-101.
6. Mangada MN, Igarashi A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. Virology. 1998 May 10;244(2):458-66.
7. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. Virology. 1999 Apr 25;257(1):1-6.
8. Rascau A, Repp R, Westerdaal N, Kalden J, de Winkel J. Clinical relevance of Fc gamma polymorphisms. Ann NY Acad Sci 1997;815:282.
9. Pol Vd, van de Winkel JG. IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. Immunogenetics. 1998;48:222.
10. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, et al. Variant genotypes of the low affinity Fc gamma Receptors in two control populations and a review of low affinity receptor polymorphisms in control and disease population. Blood. 1999;94:4220-32.
11. Hogarth PM. Fc receptors are mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. Curr Opin Immunol. 2002;14:798-802.
12. Kimberly C, Altaf A, Lisa B, Steketeer R, Bernard L, Ya Ping S. Polymorphism of Fc Receptor IIa for Immunoglobulin G Is Associated with Placental Malaria in HIV-1-Positive Women in Western Kenya The Journal of Infectious Diseases 2004;190:1192-8.
13. Loke H, Bethell D, Phuong CXT, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to Dengue Hemorrhagic fever in Vietnam: Evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and Fc gamma receptor IIa genes. Am J Trop Hyg 2002;67:102-6.
14. Collins O, Christopher R, Keller C, Dorothy A, Were T, Richard O, et al. Association of Fc-receptor IIa (cd32) polymorphism with malarial Anemia and high-density parasitemia in infants and Young children Am J Trop Med Hyg. 2006;74(4):573-57.

15. Koraka P, Suharti C, Setiati TE, Mairuhu AT, Van Gorp E, Hack CE, et al. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *J Clin Microbiol.* 2001 Dec;39(12):4332-8.
16. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the Fc gamma receptor IIA cytoplasmic domain in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection *J Gen Virol.* 2010;91(1):103-11.
17. Soderstrom T, Enskog A, Samuelson BE, Cedergren B. Immunoglobulin subclass (IgG3) restriction of anti-P and anti-Pk antibodies in patients of the rare P blood group. *J Immunol.* 1985;134:1.
18. Burton DR, Woof JM. Human antibody effector function. *Adv Immunol.* 1992;511-84.
19. Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr J Infect Dis.* 1990; 9:16.
20. Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RP. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest.* 1992;89:1274–81.
21. Platonov AE, Kuiper EJ, Vershinina IV, Shipulin GA, Westerdaal N, Fijen CA. Meningococcal disease and polymorphism of Fc gamma R II a (CD 32) in late complement component- deficient individuals. *Clin Exp Immunol.* 1998;111:97.
22. Gómez LM, Cañas C, Anaya JM. Bogotá Jan./Mar *Acta Med Colomb* 2005 30(1).
23. Gonzalez D, Martinez R, Castro O, Serrano T, Portela D, Vazquez S, et al. Evaluation of Some Clinical, Humoral and Imagenological Parameters in Patients of Dengue Haemorrhagic Fever Six Months after Acute Illness. *Dengue Bulletin.* 2005;29:79-84.
24. Palma-da Cunha-Matta A, Moreno-Soares SA, Cardoso de Almeida A, Aquilera de Freitas V, Carod-Arta FJ. Neurological complications arising from dengue virus infection. *Rev Neurol.* 2004;39 (3):233-7.
25. Gregorio GV, Choudhuri K, Ma Y, Pensati P, Iorio R, Vergani D. Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol.* 2003;133(3):404-13.
26. Bogdanos DP, Rigopoulou EI. Self-mimicking autoimmune domains of hepatitis C virus core antigen Vaccine. *Epub.* 2006;24(9):6173-4.
27. Shah I. Dengue presenting as Guillain Barre Syndrome. *Den Bull.* 2007; 31:166-8.
28. Kumar V, Collins T, Cotran RS, editors. *Patología Estructural y funcional 6ta ed:* W B Saunders Company; 2000
29. Sevilla J, Escudero MC, Jiménez R, González-Vicent M, Manzanares J, García-Novo D. Severe systemic autoimmune disease associated with Epstein-Barr virus infection *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004 26(12):831-3.
30. Chiou-Feng L, Shu-Wen W, Hsien-Jen C, Huan-Yao L, Yee-Shin L. Autoimmune Pathogenesis in Dengue Virus Infection *Viral Immunology.* *Viral Immunology.* 2006;19(2):127-32.
31. Sedzik JJ. Myelin sheaths and autoimmune response induced by myelin proteins and alphaviruses. I. Physicochemical background. *Curr Med Chem.* 2008;15(19):1899-910.
32. Lunardi C, Tinazzi E, Bason C, Dolcino M, Corrocher R, Puccetti A. Human parvovirus B19 infection and autoimmunity. . Dec;():. . *Autoimmun Rev.* 2008;8(2):116-20.
33. Lopalco L, Burastero SE. HIV-1 and the self-nonsel self connection: how to sleep with the enemy and be much better off. *AIDS Rev.* 2008 10(3):162-71.

34. Raymond CS, Seet AB, Amy ML, Quek B, Erle CH, Lima B. Post-infectious fatigue syndrome in dengue infection. *Journal of Clinical Virology* 2007;38:1–6.
35. Hsien-Jen C, Chiou-Feng L, Huan-Yao L, Hsiao-Sheng L, Yee-Shin L. Proteomic Analysis of Endothelial Cell Autoantigens Recognized by Anti-Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Antibodies. *Exp Biol Med.* 2008;234.
36. Huang YH, Chang BI, Lei HY, Liu HS, Liu CC, Wu HL, et al. Antibodies against dengue virus E protein peptide bind to human plasminogen and inhibit plasmin activity. *Clin Exp Immunol.* 1997 Oct;110(1):35-40.
37. Hirsch A. Dengue, a comparatively new disease: its symptoms. *Handbook of Geographical and Historical Pathology*, Sydenham Society, London. 1883;1:55-81.
38. Smith CEG. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1959;59:243-51.
39. Rudnick A, Lim TW. Dengue fever studies in Malaysia. . *Bulletin from the Institute for Medical Research, Malaysia.*. 1986;23:1-241.
40. Gubler DJ. The emergence of dengue/dengue haemorrhagic fever as a global public health problem. In: Saluzzo JF, Dodet B, editors. *Factors in the Emergence of Arbovirus Diseases*. Paris; 1997. p. 83-92.
41. Gaunt MW, Sall AA, Lamballerie X, Falconar AK, Dzhibanian TI, Gould EA. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J Gen Virol.* 2001;82(8):1867-76.
42. Guzman MG, Garcia G, Kouri G. [Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities]. *Rev Panam Salud Publica.* 2006 Mar;19(3):204-15.
43. Calisher CH. Persistent emergence of dengue. *Emerging Inf Dis.* 2005;11:738-9.
44. Saker L, Lee K, Cannito B, Gilmore A, Campbell-Lendrum D. Globalization and infectious diseases: a review of the linkages. WHO. 2004.
45. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LT. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004;10:98-109.
46. Rice CM. Overview of flavivirus molecular biology and future vaccine development via recombinant DNA. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1990;21(4):670-7.
47. Hahn YS, Galler R, Hunkapillar T, Dalrymple JM, Strauss JH, Strauss EG. Nucleotide sequence of dengue RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flavivirus. *Virology.* 1985;162:167-80.
48. Russell PK, Nisalak A. Dengue virus identification by the plaque amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988(239):487-91.
49. Yamshchikov VF, Compans RW. Formation of the flavivirus envelope: role of the viral NS2B-NS3 protease. *J Virol.* 1995;69(4):1995-2003.
50. Falgout B, Miller RH, Lai CJ. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *J Virol.* 1993;67(4):2034-42.
51. Yamshchikov VF, Compans RW. Regulation of the late events in flavivirus protein processing and maturation. *Virology.* 1993;192(1):38-51.
52. Wengler G, Wengler G, Nowak T, Wahn K. Analysis of the influence of proteolytic cleavage on the structural organization of the surface of the West Nile flavivirus leads to the isolation of a protease-resistant E protein oligomer from the viral surface. *Virology.* 1987;160(1):210-9.

53. Murray JM, Aaskov JG, Wright PJ. Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J Gen Virol.* 1993;74(Pt 2):175-82.
54. Osatomi K, Sumiyoshi H. Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology.* 1990;176(2):643-7.
55. Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. In: Knippe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1043-125.
56. Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication.* In: Knippe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 991-1042.
57. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002 Mar 8;108(5):717-25.
58. Mazumder R, Hu ZZ, Vinayaka CR, Sagripanti JL, Frost SD, Kosakovsky Pond SL, et al. Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. *Virus Genes.* 2007 Oct;35(2):175-86.
59. Crabtree MB, Kinney RM, Miller BR. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: Construction and characterization of mutant viruses. *Arch Virol.* 2005 Apr;150(4):771-86.
60. Falconar AK, Young PR. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. *J Virol Methods.* 1990 Dec;30(3):323-32.
61. Guirakhoo F, Bolin RA, Roehrig JT. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology.* 1992;191(2):921-31.
62. Lobigs M, Arthur CE, Mullbacher A, Blanden RV. The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology.* 1994;202(1):195-201.
63. Wu CF, Wang SH, Sun CM, Hu ST, Syu WJ. Activation of dengue protease autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *J Virol Methods.* 2003 Dec;114(1):45-54.
64. Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol.* 2005 Sep;79(17):11053-61.
65. Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol.* 2005 Jul;79(13):8004-13.
66. Ishak R, Tovey DG, Howard CR. Morphogenesis of yellow fever virus 170 in infected cell cultures. *J Gen Virol.* 1988;69:325-35.
67. Halstead SB, O'Rourke EJ, Allison AC. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *J Exp Med.* 1977 Jul 1;146(1):218-29.
68. Limon-Flores AY, Perez-Tapia M, Estrada-Garcia I, Vaughan G, Escobar-Gutierrez A, Calderon-Amador J, et al. Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. *Int J Exp Pathol.* 2005 Oct;86(5):323-34.
69. Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates

- infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 2008 Apr 29.
70. Boonnak K, Slike BM, Burgess TH, Mason RM, Wu SJ, Sun P, et al. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol*. 2008 Apr;82(8):3939-51.
71. Ho LJ, Shaio MF, Chang DM, Liao CL, Lai JH. Infection of human dendritic cells by dengue virus activates and primes T cells towards Th0-like phenotype producing both Th1 and Th2 cytokines. *Immunol Invest*. 2004;33(4):423-37.
72. Blackley S, Kou Z, Chen H, Quinn M, Rose RC, Schlesinger JJ, et al. Primary human splenic macrophages, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus infection in vitro. *J Virol*. 2007 Dec;81(24):13325-34.
73. de Macedo FC, Nicol AF, Cooper LD, Yearsley M, Pires AR, Nuovo GJ. Histologic, viral, and molecular correlates of dengue fever infection of the liver using highly sensitive immunohistochemistry. *Diagn Mol Pathol*. 2006 Dec;15(4):223-8.
74. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*. 2004 Apr 15;189(8):1411-8.
75. Boonpucknavig S, Bhamarapravati N, Nimmannitya S, Phalavadhana A, Siripont J. Immunofluorescent staining of the surfaces of lymphocytes in suspension from patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Pathol*. 1976 Oct;85(1):37-48.
76. King A IB, Caudle L, Kulyanaruj S, Pattanapanyasat K, and Nisalak A. B cell are the principal circulating mononuclear cell infected by dengue virus. *FASEB , Journal* 5. 1991:A988.
77. McBride WJ, Bielefeldt Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect*. 2000;2(9):1041-50.
78. Marshal IJS, Jawadat DM. MASt Cell in innate immunity *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:21-7.
79. Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:416-24.
80. Basilio-de-Oliveira CA, Aguiar GR, Baldanza MS, Barth OM, Eyer-Silva WA, Paes MV. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005 Aug;9(4):341-7.
81. Gasperino J, Yunen J, Guh A, Tanaka KE, Kvetan V, Doyle H. Fulminant liver failure secondary to haemorrhagic dengue in an international traveller. *Liver Int* 2007.;27:1148-51.
82. Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch*. 2001;438(107-115).
83. Kangwanpong D, Bhamarapravati N, Lucia HL. Diagnosing dengue virus infection in archived autopsy tissues by means of the in situ PCR method: a case report. *Clin Diagn Virol*. 1995 Feb;3(2):165-72.
84. Sariol CA, Pelegriño JL, Martínez A, Arteaga E, Kouri G, Guzman MG. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen-year-old paraffin-embedded samples from Cuba. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Dec;61(6):994-1000.

85. Rosen L, Drouet MT, Deubel V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Nov;61(5):720-4.
86. Limonta D, Capo V, Torres G, Perez AB, Guzman MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol.* 2007 Sep;40(1):50-4.
87. Ludwig GV, Iacono Connors LC. Insect-transmitted vertebrate viruses: flaviviridae. In *Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993;29a(4):296-309.
88. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* 1997 Aug;3(8):866-71.
89. Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL, King CC. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology.* 1999;257(1):156-67.
90. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res.* 2005 Sep-Oct;36(5):425-35.
91. Wang JP, Liu P, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW, Libraty DH. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J Immunol* 2006;177:7114-21.
92. Porterfield JS. Antibody-dependent enhancement of viral infectivity. *Adv Virus Res.* 1986;31:335-55.
93. Daughaday CC, Brandt WE, McCown JM, Russell PK. Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect Immun.* 1981;32(2):469-73.
94. Randolph VB, Stollar V. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J Gen Virol.* 1990;71(Pt 8):1845-50.
95. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: Fields BN, editor. *Virology.* Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996. p. 961-1034.
96. Gollins SW, Porterfield JS. A new mechanism for the neutralization of enveloped viruses by antiviral antibody. *Nature.* 1986;321(6067):244-6.
97. He RT, Innis BL, Nisalak A, Usawattanakul W, Wang S, Kalayanarooj S, et al. Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. *J Med Virol.* 1995;45(4):451-61.
98. Kimura T, Ohayama A. Association between the pH - dependent conformational change of West Nile flavivirus protein and virus - mediated membrane fusion. *J Gen Virol* 1988;69 1247-54.
99. Becker Y. Dengue Fever Virus and Japanese Encephalitis Virus Synthetic Peptides, with Motifs to Fit HLA Class I Haplotypes Prevalent in Human Populations in Endemic Regions, Can Be Used for Application to Skin Langerhans Cells to Prime Antiviral CD8+ Cytotoxic T Cells (CTLs): A Novel Approach to the Protection of Humans. *Virus Genes.* 1994;9(1):33-45.
100. Kurane I, Kontny U, Janus J, Ennis FA. Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections. *Arch Virol.* 1990;110(1-2):91-101.
101. Hill A, Lobigs M, Blanden R. The Cellular Immune Response to Flaviviruses. In: Marcel De, editor. *Viruses and Cellular Immune Response.* New York; 1993. p. 263-87.
102. PAHO. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Scientific publication no.548. Washington: PAHO. 1994.
103. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol.* 2003 May;27(1):1-13.

104. Nimmannitya S. Clinical manifestations of dengue/dengue haemorrhagic fever. In: Asia WHOROfSE, editor. Monograph on dengue/dengue haemorrhagic fever; 1993; New Delhi. 1993.
105. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis.* 1997 Aug;176(2):313-21.
106. Chlebicki MP, Ang B, Barkham T, Laude A. Retinal hemorrhages in 4 patients with dengue fever. *Emerg Infect Dis.* 2005 May;11(5):770-2.
107. Gonzalez D, Castro OE, Kouri G, Perez J, Martinez E, Vazquez S, et al. Classical dengue hemorrhagic fever resulting from two dengue infections spaced 20 years or more apart: Havana, Dengue 3 epidemic, 2001-2002. *Int J Infect Dis.* 2005 Jul 13.
108. Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol.* 2005;79(17):11053-61.
109. Munoz-Jordan JL, Laurent-Rollel M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol.* 2005;79(13):8004-13.
110. Harris E, Videa E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Jul-Aug;63(1-2):5-11.
111. Navarro E, Despres P, Cedillo L. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res.* 2005 36(5):425-35.
112. Clasificación clínica y manejo de casos de dengue: Reunión de Expertos organizada por el TDR/OMS 2008).
113. Martinez E. Dengue. *Estud Av São Paulo* 2008;22(64).
114. Santamaría R, Martinez E, Kratochwill S, Soria C, Ran LH, Nuñez A, et al. On behalf of the World Health Organization (WHO/TDR)- European Union supported DENCO Study Group Comparison and critical appraisal of dengue clinical guidelines and their use in Asia and Latin America. *International Health.* 2009;1:133-40.
115. Nisalak A, Halstead SB, Singharaj P, Udomsakdi S, Nye SW, Vinijchaikul K. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. 3. Virologic studies of fatal disease. *Yale J Biol Med.* 1970 Apr;42(5):293-310.
116. Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, et al. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56(5):566-72.
117. Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 1990 Feb;42(2):179-84.
118. Morens DM. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis.* 1994 Sep;19(3):500-12.
119. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis.* 1989 May-Jun;11 Suppl 4:S830-9.
120. Kurane I, Ennis FE. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol.* 1992 Apr;4(2):121-7.
121. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med.* 1977 Jul 1;146(1):201-17.
122. Kurane I, Ennis FA. Cytotoxic T lymphocytes in dengue virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;189:93-108.

123. Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000 Jul;28(3):183-8.
124. Pacsa AS, Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000 Jun;28(2):151-5.
125. Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol.* 2007 Feb;88(Pt 2):365-75.
126. Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38(2):411-9.
127. Huang KJ, Yang YC, Lin YS, Huang JH, Liu HS, Yeh TM, et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):2825-32.
128. Chaturvedi UC, Tandon P, Mathur A, Kumar A. Host defence mechanisms against dengue virus infection of mice. *J Gen Virol.* 1978 May;39(2):293-302.
129. Byron. E, Martina. E, Koraka. P, Albert. D, Osterhaus. ME, . Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical Microbiology reviews.* 2009;22(4):564-81.
130. Kurane I, Okamoto Y, Dai LC, Zeng LL, Brinton MA, Ennis FA. Flavivirus-cross-reactive, HLA-DR15-restricted epitope on NS3 recognized by human CD4+ CD8- cytotoxic T lymphocyte clones. *Journal of General Virology.* 1995;76(9):2243-9.
131. Mathew A, Kurane I, Rothman AL, Zeng LL, Brinton MA, Ennis FA. Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. *J Clin Invest.* 1996;98(7):1684-91.
132. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest.* 1991 Nov;88(5):1473-80.
133. Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, Day NP, Pham TP, Buurman WA, et al. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 1998 Mar;177(3):778-82.
134. Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol.* 1999 May;73(5):3623-9.
135. Kontny U, Kurane I, Ennis FA. Gamma interferon augments Fc gamma receptor-mediated dengue virus infection of human monocytic cells. *J Virol.* 1988 Nov;62(11):3928-33.
136. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol.* 1998;161(11):6338-46.
137. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Jul-Aug;63(1-2):71-5.

138. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003;9:921-7.
139. Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol.* 2006 Mar 15;176(6):3821-9.
140. Beaumier CM, Mathew A, Bashyam HS, Rothman AL. Cross-reactive memory CD8(+) T cells alter the immune response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. *J Infect Dis.* 2008 Feb 15;197(4):608-17.
141. Kim SK, Cornberg M, Wang XZ, Chen HD, Selin LK, Welsh RM. Private specificities of CD8 T cell responses control patterns of heterologous immunity. *J Exp Med* 2005;201:523-33.
142. Bokisch VA, Top FH, Jr., Russell PK, Dixon FJ, Muller-Eberhard HJ. The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. *N Engl J Med.* 1973 Nov 8;289(19):996-1000.
143. Malasit P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1987 Sep;18(3):316-20.
144. Shaio MF, Chang FY, Hou SC. Complement pathway activity in serum from patients with classical dengue fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992 Nov-Dec;86(6):672-5.
145. Rothman AL. Cellular Immunology of Sequential Dengue Virus Infection and its Role in Disease Pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2010;338:83-97.
146. Markoff LJ, Innis BL, Houghten R, Henchal LS. Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *Journal Of Infectious Diseases.* 1991;164(2):294-301.
147. Chungue E, Poli L, Roche C, Gestas P, Glaziou P, Markof fLJ. Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. *J Infect Dis.* 1994;170(5):1304-7.
148. Rosen L. [Pathogenesis of hemorrhagic dengue: critical discussion of current hypotheses]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1986;79(3):342-9.
149. Guzman MG, Kouri G, Halstead SB. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? *Lancet.* 2000 May 27;355(9218):1902-3.
150. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999;73(6 ):4738-47.
151. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol.* 2003 Apr;77(7):3929-38.
152. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever [see comments]. *Lancet.* 1999;354(9188):1431-4.
153. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jul;9(7):800-9.
154. Kochel TJ, Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinoza A, Felices V, et al. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet.* 2002 Jul 27;360(9329):310-2.
155. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Montes T, Vazquez S, et al. Neutralizing antibodies after infection with dengue 1 virus. *Emerg Infect Dis.* 2007 Feb;13(2):282-6.

156. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Dec;75(6):1113-7.
157. Guzman MG, Kouri G. 1987-2007 . Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102:522-3.
158. Valdes L, Guzman MG, Kouri G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, et al. [Epidemiology of dengue and hemorrhagic dengue in Santiago, Cuba 1997]. *Rev Panam Salud Publica.* 1999 Jul;6(1):16-25.
159. Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis.* 2002 6(2):118-24.
160. Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006 Jul;47(2):155-66.
161. Cantelar de Francisco N, Fernandez A, Albert Molina L, Perez Balbis E. [Survey of dengue in Cuba. 1978-1979]. *Rev Cubana Med Trop.* 1981 Jan-Apr;33(1):72-8.
162. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ.* 1989;67(4):375-80.
163. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(1):89-92.
164. Pelaez O, Guzman MG, Kouri G, Perez R, San Martin JL, Vazquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis.* 2004 Apr;10(4):719-22.
165. Libel M. Brote de dengue en Cuba, 2006. Habana: OPS; 2006 Contract No.: Document Number].
166. Chiewsilp P, Scott RM, Bhamarapavati N. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1981 Sep;30(5):1100-5.
167. Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens.* 2002 Oct;60(4):309-18.
168. Paradoa Perez ML, Trujillo Y, Basanta P. Association of dengue hemorrhagic fever with the HLA system. *Haematologia (Budap).* 1987;20(2):83-7.
169. Guzman MG, Kouri G, Morier L, Soler M, Fernandez A. A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981. *Bull Pan Am Health Organ.* 1984;18(3):213-20.
170. Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrresse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens.* 2004 Oct;64(4):469-72.
171. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casadémont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Julier C. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet.* 2005;37(5):507-13.
172. Acioli-Santos B, Segat L, Dhaliya R, Brito CA, Braga-Neto UM, Marques ET, et al. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Hum Immunol.* 2008;69:122-8.
173. Soundravally R, Hoti SL. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. *Hum Immunol.* 2007 Dec;68(12):973-9.

174. Picard C, Casanova JL, Abel L. Mendelian traits that confer predisposition or resistance to specific infections in humans. . *Curr Opin Immunol* 2006;18:383-90.
175. Van de Winkel JGJ, Capel PJA. Hman IgG Fc Receptor heterogenicity: molecular aspects and clinical implications *Immunol Today*. 1993;14:215-21.
176. Van den Herik-Oudijk IE, Capel PJ, Van der Bruggen T, Van de Winkel JG. Identification of signalling motifs within human FcγRIIa and FcγRIIb isoforms. *Blood* 1995;85:2202-11.
177. Sanders L, van de Winkel JGJ, Rijkers GT, Voorhorst-Ogink MM, de Haas PJ, Capel A. Fc receptor IIa (CD32) heterogeneity in patients with recurrent bacterial respiratory tract infections. *J Infect Dis*. 1994;170:854-61.
178. Bredius RGM, Derkx BHF, Fijen CAP, de Wit TPM, van de Winkel JGJ. Fcγ receptor IIa (CD32) polymorphism in fulminant meningococcal septic shock in children. . *J Infect Dis* 1994;170:848-53
179. Yee AM, Phan HM, Zuniga R, Salmon JE, Musher DM. Association between FcγRIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2000;30:25-8.
180. Bossuyt X, Moens L, Van Hoeyveld E, Jeurissen A, Bogaert G, Sauer K, et al. Coexistence of (Partial) Immune Defects and Risk of Recurrent Respiratory Infections. *Clinical Chemistry* 2007;53(1124-130).
181. Mackay IR, Rosen FS. Autoimmunity *Diseases N Engl J Med*. 2001;345(5):340-9.
182. Dighiero G, Rose NR. Critical self epitopes are key to the understanding of self tolerance and autoimmunity. . *Immunol Today*. 1999;20:423-8.
183. Silverstein AM, Rose NR. There is only one immune system! The view from immunopathology. *Semin Immunol*. 2000 12 173-8.
184. Vergani D, Mieli-Vergani G. Molecular mimicry: Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis *World J Gastroenterol* 2008;14(21):3306-12.
185. Roitt IM, Delves PJ, editors. *Essential Immunology* 10ma ed: Blackwell Science; 2001.
186. Monson NL. The natural history of B cells. *Curr Opin Neurol*. 2008;21(1):3-8.
187. Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 2. 2002(580-592).
188. web. <http://www.enotes.com/nursing-encyclopedia/autoimmune-disease-tests>. 2008 [updated 2008; cited]; Available from.
189. Pritchard NR, Cutler AJ, Uribe S, Chadban SJ, Morley BJ, Smith KG. Autoimmune-prone mice share a promoter haplotype associated with reduced expression and function of the Fc receptor FcγRII. . *Curr Biol* 2000;10:227-30.
190. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity*. 2001;15:397-408. .
191. Barnes N, Gavin AL, Tan PS, Mottram P, Koentgen F, Hogarth PM. FcγRI-deficient mice show multiple alterations to inflammatory and immune responses. . *Immunity* 2002;16:379-89. .
192. Ioan-Facsinay A, de Kimpe S, Hellwig S, van Lent P, Nabbe K, Blom A, et al. FcγRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. . *Immunity* 2002;16:391-402.

193. Kleinau S, Martinsson P, Heyman B. Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct fgamma receptors. *J Exp Med* 2000;191:1611-6.
194. Sander D, Scholz CW, Eiben P, Klingelhofer J. Postvaccinal plexus neuropathy following vaccination against tick-borne encephalitis and tetanus in a competitive athlete. *Clin Investig.* 1994;72(5):399.
195. Sanders LA, van de Winkel JG, Rijkers GT, al. e, Dis JI. Fc gamma receptor Iia (CD32) heterogeneity in patients with recurrent bacterial respiratory tract infections. 1994;170:854-61.
196. Yun H, Koh HK, Kim SS, Chung WT, Kim DW, Hong KP, et al. Fc ganma RIIa/IIIa polymorphism and its association with clinical manifestation in Korean lupus patients. *Lupus* 2001;10:466
197. Duits AJ, Bootsma H, Derksen RH, al. e. Skewed distribution of IgG Fc receptor Iia (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* 1995;38:1832-6.
198. Meulenbroek AJ, Zeijlemaker WP. IgG subclasses and humoral immunity. In: CLB, editor. *Human immunosubclasses: Useful diagnostic markers for immunocompetence [CD-ROM]* Amsterdam; 1996.
199. Van de Winkel JGJ, Anderson CL. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leucocyte Biol* 1991;49:511.
200. Pumphrey R. Computer models of the human Immunoglobulins. *Today* 1986;7 174.
201. Flanagan JG, Rabbits TH. Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing Y, E and a genes. *Nature Immunology.* 1982;300:709.
202. Van Loghem E. Allotypic Markers. *Monographs Allergy* 1986;19:40.
203. García-García E, Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 2002;72:1092-108.
204. An T. Rapid endocytosis of soluble immune complexes by Fc receptors of normal human neutrophils. *Immunology.* 1982;45:413-22.
205. Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor 384 family. *Ann Hematol.* 1988;76(231-248).
206. Mero P, Zhang CY, Huang Z, Kim M, Schreiber AD, Grinstein S, et al. Phosphorylation-independent ubiquitylation and endocytosis of Fc gamma RIIA. *J Biol Chem.* 2006;281:33242-9
207. Booth JW, Kim M, Jankowski A, Schreiber AD, Grinstein S. Contrasting requirements for ubiquitylation during Fc receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. *EMBO J.* 2002;21:251-8.
208. Kwiatkowska K. Binding of IgG-opsonized particles to Fc gamma R is an active stage of phagocytosis that involves receptor clustering and phosphorylation. *J Immunol* 2005;175:4450-7.
209. Shanaka WW, Rodrigo I, Xia Jin S, Blackley D, Rose RC, Schlesinger JJ. Differential Enhancement of Dengue Virus Immune Complex Infectivity Mediated by Signaling-Competent and Signaling-Incompetent Human FcγRIA (CD64) or FcγRIIA (CD32). *J Virol.* 2006; 80(20):10128-38.
210. Bazilio AP, Viana VST, Toledo R, Woronik V, Bonfá E, Monteiro RC. Fc ganma RIIa polymorphism: a susceptibility factor for inmune complex-mediated lupus nephritis in Brazilian patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:1427-31.
211. WHO. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control.* 2nd edition. WHO, Geneva. 1997.

212. Vazquez S, Valdes O, Pupo M, Delgado I, Alvarez M, Pelegrino JL, et al. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods*. 2003 Jun 30;110(2):179-84.
213. Vazquez S, Perez AB, Ruiz D, Rodriguez R, Pupo M, Calzada N, et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol*. 2005 Jun;33(2):132-7.
214. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol*. 1985 Aug;22(2):250-4.
215. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Guzman G. Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of Some Factors. *Dengue Bulletin*. 2005;29.
216. Mongey AB, Hess EV. Antinuclear antibodies and disease specificity. *Adv Intem Med* 1991;36:151-69.
217. Borque L, Barozzi D, Ferrari L. The determination of rheumatoid factors by an immunoturbidimetric assay on Boehringer Mannheim/Hitachi Analysis Systems. *Klin Lab*. 1994;40:445-53.
218. Haskova V, Kasliv J, Riha IZ. Simple method of circulating immune complex detection in human sera by polyethylene glycol precipitation. *Immun-Forsh*. 1978;154:399-404.
219. Medina Y. Cinética de anticuerpos mediadores de Citotoxicidad Celular frente al virus dengue. Habana: IPK; 2005.
220. Cooke GS, Aucan C, Walley A, Segal S, Greenwood B, Kwiatkooowski D, et al. Association of Fcγ<sub>2</sub> Receptor II a (CD 32) Polymorphism with severe Malaria in west Africa. *Am JTropHyg*. 2003;69:565-68.
221. R. Guerra. Manual de Historia de Cuba desde su Descubrimiento. Colección Histórica. Editorial Nacional de Cuba, C. Habana. 1964.
222. Ulloa J. Archaeology and Rescue of the Aboriginal Presence in Cuba and the Caribbean. . KACIKE: The Journal of Caribbean Amerindian History and Anthropology [On-line Journal], <http://wwwkacikeorg/> 2002; (Lynne Guitar, Ed.Special Issue).
223. Israelsson E, Vafa M, Maiga B, Lysen A, Iriemenam N, Berzins K. Differences in Fc gamma receptor IIa genotypes and IgG subclass pattern of anti-malarial antibodies between sympatric ethnic groups in Mali. *Malar J*. 2008;15(7):175 -87.
224. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi D, Fernández N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fc gamma receptor and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009;113(16):3716-25.
225. van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JGJ. FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens*. 2003;61:189-202.
226. Van de Winkel JGJ, Capel PJA. Hman IgG Fc Receptor heterogenicity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today*. 1993;14 215-21.
227. Dennis L, Kasper EB, Anthony S, Fauci SL, Hauser DL, Longo J, et al. Parte II. Síntomas principales y cuadro inicial de las enfermedades > Sección 10. Alteraciones hematológicas. Capítulo 53. Hemorragia y trombosis. ONLINE EH, editor.; 2008.
228. Mitrakul C, Poshyachinda M, Futrakul P, Sangkawibha N, Ahandrik S. Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1977;26:975-84.

229. Srichaikul T, Nimmannitya S, Sripaisarn T, Kamolsilpa M, Pulgate C. Platelet function during the acute phase of dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1989;20:19–25.
230. Halstead SB. Dengue: hematologic aspects. *Semin Hematol.* 1982 Apr;19(2):116-31.
231. Vassalli JD, Baccino D, Belin D. Concomitant secretion of prokinase and a plasminogen activator-specific inhibitor by cultured human monocyte-macrophages. *J Exp Med.* 1984;59:1653-68.
232. Krishnamurti C, Wahl LM, Alving BM. Stimulation of plasminogen activator inhibitor activity in human monocytes infected with Dengue virus *AmJTropMedHyg.* 1989;40(1):102-7.
233. Suharti C, van Gorp ECMTE, Setiati TE, Dolmans WMV, Djokomoeljanto RJC, Hugo ten Cate EH, et al. The Role of Cytokines in Activation of Coagulation and Fibrinolysis in Dengue Shock Syndrome. *Thromb Haemost.* 2002;87: 42-6.
234. Trikalinos TA, Karassa FB, Ioannidis JP. Meta-analysis of the association between lowaffinity Fcγ receptor gene polymorphisms and hematologic and autoimmune disease. . *Blood.* 2001;98(1634-1635).
235. Harlow BL, Signorello LB, Dailey C, Komaroff AL. Reproductive correlates of chronic fatigue síndrome. *Am J Med.* 1998;105:94-9.
236. Prins JB, van der Meer JW, Bleinjenberg G. Chronic fatigue síndrome. *Lancet.* 2006;367:346-55.
237. Deale A, Chalder T, Wessely S. Illnes belief and treatment outcome in chronic fatigue síndrome. *J Psychosom Res.* 1998;45:77-83.
238. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease *Nature Immunology.* 2001;2:777 - 80.
239. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. . *Am J Pathol* 2008;173(3):600-9.
240. Gleicher N, Barad DH. Gender as risk factor for autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2007 28(1):1-6.
241. Knudsen GP. Gender bias in autoimmune diseases: X chromosome inactivation in women with multiple sclerosis *Journal of the Neurological Sciences.* 2009;286(1-2):43-6.
242. Sierra B, Garcia G, Perez AB, Morier L, Rodriguez R, Alvarez M, et al. Long-term memory cellular immune response to dengue virus after a natural primary infection. *Int J Infect Dis.* 2002 Jun;6(2):125-8.
243. Jönsen A, Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L. Analysis of HLA DR, HLA DQ, C4A, FcγRIIa, FcγRIIIa, MBL, and IL-1Ra allelic variants in Caucasian systemic lupus erythematosus patients suggests an effect of the combined FcγRIIa R/R and IL-1Ra 2/2 genotypes on disease susceptibility. *Arthritis Res Ther* 2004;6(6):557-62.
244. Sjöwall C, Wetterö J. Pathogenic implications for autoantibodies against C-reactive protein and other acute phase proteins *Clinica Chimica Acta* 2007;378:13-23.
245. Sowers M, Jannausch M, Stein E, Jamadar D, Hochberg M, Lachance L. C-reactive protein as a biomarker of emergent osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(8):595-601.
246. Aho K, Palosuo T, Knekt P, Alha P. C-reactive protein does not predict rheumatoid arthritis. *MJ Rheumatol.* 2000 27(5):1136-8.
247. Gregorio GV, Choudhuri K, Ma Y, Pensati P, Iorio R, Grant P, et al. Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies

- in chronic hepatitis C virus infection. Sep;133(3):404-13 , Bogdanos DP, Vegnente A, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clin Exp Immunol. 2003
248. Kammer AR, van der Burg SH, Grabscheid B, Hunziker IP, Kwappenberg KM, Reichen J. Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition. J Exp Med. 1999;190(2):169-76.
249. Ferri S, Muratori L, Lenzi M, Granito A, Bianchi FB, Vergani D. HCV and autoimmunity. Curr Pharm Des. 2008;14(17):1678-85.
250. Huang YH, Chang BI, Lei HY, Liu HS, Liu CC, Wu HL. Antibodies against dengue virus E protein peptide bind to human plasminogen and inhibit plasmin activity. Clin Exp Immunol 1997;110(1):35-40.
251. Thein S, Aaskov J, Myint TT, Shwe TN, Saw TT, Zaw A. Changes in levels of anti-dengue virus IgG subclasses in patients with disease of varying severity. J Med Virol. 1993 Jun;40(2):102-6.
252. Shanaka WW, Rodrigo I, Block OKT, Lane C, Sukupolvi-Petty S, Goncalvez AP, et al. Dengue virus neutralization is modulated by IgG antibody subclass and Fcγ receptor subtype. Virology,. 2009;394(2):175-82.

## **IX. ANEXOS**

## CAPÍTULO IX. ANEXOS

### Anexo 1

#### INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Ministerio de Salud Pública

PEDRO KOURI INSTITUTE

INSTITUTIONAL ETHICAL COMMITTEE



PROJECT: "Fcγ receptor IIa polymorphism in Dengue Fever, Dengue Hemorrhagic Fever and Asymptomatic Dengue infection"

To: **World Health Organization. Research Ethics Review Committee (ERC)**

We are stating that:

- The Institutional Ethical Committee of the Institute for Tropical Medicine "Pedro Kourí" has been informed about the ERC memorandum in relation with the project ID A 50225 entitled "Fcγ receptor IIa polymorphism in Dengue Fever, Dengue Hemorrhagic Fever and Asymptomatic Dengue infection".
- The Institutional Ethical Committee of the Institute for Tropical Medicine "Pedro Kourí" agrees with the criticisms and recommendations made by the **World Health Organization. Research Ethics Review Committee** to the project.
- The Institutional Ethical Committee of the Institute for Tropical Medicine "Pedro Kourí" encourages to the investigators of the project ID A 50225 to respect and carry out all the suggestions made by the WHO ERC.
- The investigators of the project ID A 50225 have sent to the Institutional Ethical Committee of the Institute for Tropical Medicine "Pedro Kourí" the necessary documents including the informed consent forms (The original with the annex regarding the storage of DNA for future dengue genetic studies, and the newly prepared ICF for future participants and controls, which already include the items related to the DNA storage and description of the studies for which it will be used).

Havana City, April 9, 2007

Dr. Luisa de Armas Perez



Dr. Carlos Fernández

Lic. Heana Valdés

Anexo 2

 <b>World Health Organization</b>	<b>Research Ethics Review Committee (WHO ERC)</b>	
<small>20, AVENUE APPIA – CH-1211 GENEVA 27 – SWITZERLAND – HTTP://INTRANET.WHO.INT/HOMES/RPC/ERC – HTTP://WWW.WHO.INT/RPC/RESEARCH_ETHICS</small>		
<b>WHO ERC</b> <b>Memorandum - ERC Approval of A55025</b>		
<b>Protocol ID:</b> A50225 <b>Protocol Title:</b> Fcy receptor IIa polymorphism in dengue fever, dengue hemorrhagic fever and asymptomatic dengue infection. <b>Responsible Officer:</b> Kroeger, A <b>Responsible Unit:</b> CDS/TDR		
<p>This research project was conditionally approved on 17<sup>th</sup> March 2006. It was put on hold by the ERC on 29<sup>th</sup> March 2007, due to the fact that the PI had started recruitment without a final approval from the ERC, and without adequate informed consent forms. Through a memo to the technical unit, the ERC further asked the PI to submit plans for re-consenting those that had already been recruited and to prepare new informed consent forms for fresh recruitments. Additionally the PI was asked to incorporate into the protocol, the amendments that were agreed upon (Ref ERC memo dated 29<sup>th</sup> March 2007).</p>		
<p>The ERC has now received an adequate response from the PI to the above mentioned memo, the revised informed consent forms and also forms for re-consenting recruited participants for storage of their blood samples. The Committee is now satisfied with the process, and approves the continuation of the project, using the new and revised informed consent forms. It requests the PI to submit the amended research protocol to the secretariat.</p>		
Chairperson ..... 	Dated. 23-04-07 .....	
<b>NOTE</b> Any changes to the proposal or to the attachments (informed consent/ questionnaires etc.) should be approved by ERC before being implemented. This approval is valid for a period of one year only. Please resubmit this proposal for a Continuing Review at least 2 months before the next re-approval period.		
<i>ERC, Secretariat</i>	Page 1/1	Date: 17.04.2007

**Anexo 3**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

para participar en la investigación

“Estudio de la variabilidad genética asociada a la infección por dengue en Cuba”

Los Estudios internacionales mas recientes afirman que algunas personas presentan mayor riesgo para padecer enfermedades infecciosas, y que ese incremento en el riesgo puede estar relacionado con sus características genéticas.

El Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) y el Centro Nacional de Genética Medica de Cuba (CNGM) están realizando una investigación que tiene el propósito de estudiar el riesgo en algunas personas a padecer dengue o dengue hemorrágico. Nos proponemos compara los genes entre personas que sufrieron dengue y dengue severo o que se enfermaron sin padecer síntomas. Toda la información que podamos obtener relacionada con los factores involucrados en el desarrollo del dengue severo, será muy útil para desarrollar estrategias que contribuyan a prevenir tempranamente la enfermedad severa.

Ud esta siendo entrevistado para participar en este proyecto. Su participación es completamente voluntaria. Antes de tomar una decisión, sobre su participación lea cuidadosamente las siguientes informaciones que le hablaran sobre que UD debe esperar. No tendrá que pagar por su participación. Por favor, pregunte si no entiende algún aspecto. Ud debe conocer que si decide no ser voluntario, podrá elegir y recibir cuidados médicos y tratamientos en nuestro centro de salud, IPK y CNGM.

Cuál sería su participación en el estudio?

En primer lugar necesitamos algunos datos relacionados con las enfermedades que Ud padece y si ha sido diagnosticado en algún momento con Dengue o Dengue hemorrágico.

Este estudio necesita además de una muestra de 15 ml de sangre la cual será extraída según los procedimientos normales y con todas las medidas adecuadas para que no constituya riesgo para su salud. Esta muestra de sangre será utilizada para los estudios que le hemos mencionado sobre sus características genéticas en particular para el riesgo de estas enfermedades.

La información que obtendremos de estos estudios no será revelada a persona alguna y solo serán de valor para el desarrollo de futuras estrategias de prevención y tratamiento de la enfermedad.

Sus datos de identidad serán confidenciales.

Los investigadores participantes en este estudio no obtendrán ventajas económicas de sus resultados.

Yo \_\_\_\_\_ vecino

de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

en uso de mis facultades y comprendiendo las razones explicadas estoy dispuesto a participar en esta investigación.

Fecha \_\_\_\_\_ Firma del participante \_\_\_\_\_ Firma del

Médico: \_\_\_\_\_

Por este medio doy mi consentimiento para que parte de estos estudios de comparación de genes entre personas que sufrieron dengue y dengue severo, o que se enfermaron sin padecer los síntomas, sean realizados en instituciones extranjeras por la persona responsable del estudio en Cuba .

Yo----- vecino de -----en uso de mis facultades y comprendiendo las razones explicadas estoy dispuesto a participar en esta investigación.

Fecha-----

Firma del participante----- Firma de Médico-----

“Estudio de la variabilidad genética asociada a la infección por dengue en Cuba”

Fecha de la visita: \_\_\_\_\_ FD \_\_\_\_\_ FHD \_\_\_\_\_ Asint \_\_\_\_\_

ID Muestra \_\_\_\_\_ Año de infección \_\_\_\_\_

ID Institucional \_\_\_\_\_

1. Información general del paciente			
2 do Apellido	1er Apellido	Nombre	
Iniciales		Raza	
		blanco	negro
Dirección de la casa			
Lugar de Nacimiento			
Fecha de Nacimiento			
Sexo: Masculino Femenino		edad: ____ Años	
Enfermedades crónicas			
Historia anterior de Fiebre dengue o Fiebre Dengue Hemorrágica		Nombre y firma del entrevistado.	

#### Anexo 4

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. DIRECCIÓN NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA.  
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

HISTORIA EPIDEMIOLÓGICA PARA CASO DE FIEBRE DEL DENGUE.

NOMBRE Y APELLIDOS: \_\_\_\_\_.

EDAD: \_\_\_\_\_. SEXO: \_\_\_\_\_ COLOR DE LA PIEL: \_\_\_\_\_. NO DE CARNET IDENTIDAD

DIRECCIÓN PARTICULAR: \_\_\_\_\_

No PERSONAS EN LA CASA \_\_\_\_\_

LUGAR DE NACIMIENTO \_\_\_\_\_

AREA DE SALUD: \_\_\_\_\_ CONSULTORIO: \_\_\_\_\_.

DIRECCIÓN: \_\_\_\_\_

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS PERSONALES: \_\_\_\_\_

HA PRESENTADO RECIENTEMENTE SÍNTOMAS DE DOLOR DE CABEZA, MALESTAR GENERAL, Y FIEBRE. \_\_\_\_\_ OTROS ANTECEDENTES \_\_\_\_\_ CUANDO \_\_\_\_\_

DENGUE ANTERIOR NO \_\_\_\_\_ SI \_\_\_\_\_ (ESPECIFICAR FECHA).

ALGUIEN HA TENIDO FIEBRE EN CASA SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ FECHA \_\_\_\_\_ -

ALGUN CONVIVENTE HA ESTADO ENFERMO EN LA CASA DURANTE ESTE EVENTO

OTROS DATOS DE INTERES A SEÑALAR: HA DONADO SANGRE RECIENTEMENTE \_\_\_\_\_ FECHA

DONDE \_\_\_\_\_

HA VIAJADO RECIENTEMENTE AL EXTERIOR Y/O INTERIOR DEL PAIS.

FECHA CONFECCION: \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL ENCUESTADOR: \_\_\_\_\_

LA PERSONA EN ESTUDIO SERÁ INFORMADA OPORTUNAMENTE DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN. ESTA LE REPORTARA SI HA PADECIDO O NO DE DENGUE. ESTA INFORMACIÓN, SERÁ DE UTILIDAD PARA EL MANEJO CLINICO DE LA PERSONA, SI SUFRIERA UNA NUEVA INFECCION POR DENGUE EN UN FUTURO.

**Anexo 5**

Nombres y Apellidos:

FD FHD

Municipio:

Teléfono

Síntomas	Mes1	Mes3	Mes 6	1 año	Actualmente
Astenia					
Anorexia					
Cefalea					
Dolor Retrocular					
Artralgias					
Mialgias					
Malestar general					
Diarreas					
Vómitos					
Nauseas					
Mareos					
Prurito					
Sangramiento Vaginal					
Gingivorragia					
Irritabilidad					
Insomnio					
Pérdida de memoria					
Caída del cabello					
Trastornos menstruales					
Palpitaciones					
Empeoramiento de artropatías crónicas					
Debilidad en las manos					
Aumento de la frecuencia de cólicos nefríticos					
Avidez exagerada por alimentos dulces					
Catarros frecuentes					
Otros (especificar)					

## Anexo 6

### Datos sobre el paciente:

**APP:** si ha tenido en el pasado o actualmente algún trastorno psicológico por lo que haya requerido atención especializada y/o tratamiento. Cuál fue el diagnóstico?

**APF:** familiares con igual situación.

### Guía de observación estructurada:

I. Porte y aspecto del paciente:

- a) \_\_\_\_\_ Bueno
- b) \_\_\_\_\_ Malo
- c) \_\_\_\_\_ Regular

II. Actividad motora:

- a) \_\_\_\_\_ Se mueve de forma inquieta
- b) \_\_\_\_\_ Está quieto la mayor parte del tiempo
- c) \_\_\_\_\_ Fluctúa entre ambas posiciones

III. Actividad verbal :

- a) \_\_\_\_\_ su forma de hablar es anormalmente rápida
- b) \_\_\_\_\_ su forma de hablar es anormalmente lenta
- c) \_\_\_\_\_ su forma de hablar se equilibra entre lenta y rápida normalmente
- d) \_\_\_\_\_ el volumen de su voz es muy alto
- e) \_\_\_\_\_ el volumen de su voz es muy bajo
- f) \_\_\_\_\_ el volumen de su voz se equilibra entre alto y bajo normalmente

IV. Estado de alerta:

- a) \_\_\_\_\_ se manifiesta normalmente alerta y atento
- b) \_\_\_\_\_ se manifiesta ligeramente somnoliento y poco atento
- c) \_\_\_\_\_ se manifiesta anormalmente distraído y poco atento

V. Estado de ánimo y afectos:

- a) \_\_\_\_\_ su estado anímico es constante y apropiado a la situación
- b) \_\_\_\_\_ su estado anímico fluctúa entre el júbilo y la tristeza anormalmente

VI. Procesos cognoscitivos:

La respuesta a las preguntas dan señales de:

- a) \_\_\_\_\_ dificultad o incapacidad para orientarse en el tema de lo preguntado
- b) \_\_\_\_\_ dificultad o incapacidad para recordar fechas o datos
- c) \_\_\_\_\_ adecuada capacidad de orientarse y recordar datos acorde al tema

VII. Actitud ante la entrevista:

- a) \_\_\_\_\_ se muestra hostil
- b) \_\_\_\_\_ se muestra evasivo
- c) \_\_\_\_\_ se muestra dramático
- d) \_\_\_\_\_ se muestra dispuesto y cooperador

VIII. Comentarios:

Impresión que causó el paciente en el entrevistador:

---