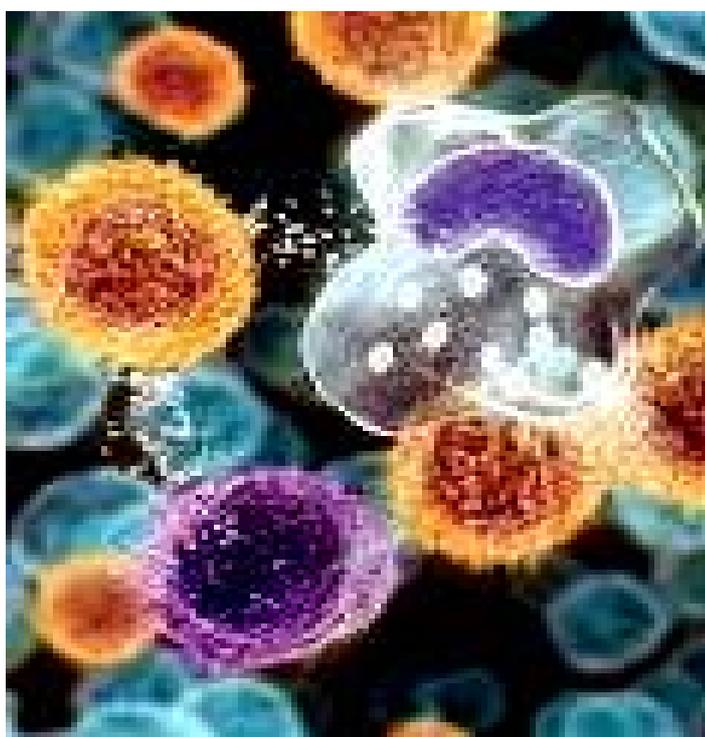


**Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí  
Departamento de Virología**

*“Citoquinas reguladoras de la inflamación y mediadores  
de citotoxicidad en la infección por dengue”*



**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

**Autora: Dra. Ana B. Pérez Díaz**

**Asesores: Prof. Maria G. Guzmán Tirado, DrCs  
Prof. Susana Vázquez Ramudo, DrCs  
Prof. Manuel Araña Rosainz, DrC**

**Ciudad Habana  
2010**

“Sería posible describir todo científicamente, pero no tendría ningún sentido; carecería de significado el que usted describiera a la sinfonía de Beethoven como una variación de la presión de la onda auditiva (...) La emoción más hermosa y más profunda que podemos experimentar es la sensación de lo místico: es el legado de toda ciencia verdadera”.

*A. Einstein*

*A José Julián y Amalia*

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**AcM:** Anticuerpo monoclonal

**ADA:** Amplificación dependiente de anticuerpos

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico

**AMV-RT:** Reversotranscriptasa del virus de Mieloblastosis aviar, del inglés *Aviar Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase*)

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNasa:** Enzimas degradantes del ARN

**Bcl-2:** Célula B de linfoma, del inglés-*B cell*

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

**CD:** célula dendrítica

**CMSP:** Células mononucleares de sangre periférica

**Tc:** Linfocito T citotóxico, del inglés *cytotoxic T lymphocyte*

**Th:** Linfocito T auxiliador, del inglés *helper T lymphocyte*

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

**DEN:** virus dengue

**DO:** densidad óptica

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

**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

**FoxP3:** Factor de la transcripción, del inglés, *Fork head box P3*

**HLA:** Antígenos leucocitarios humanos del Sistema principal de Histocompatibilidad, del inglés *Human Leucocyte Antigens*

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

**HSP:** Proteína de choque térmico, del inglés *heat-shock protein*

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

**IC:** Inmunocomplejos

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

**IFN:** Interferón

**IFI:** Inmunofluorescencia indirecta

**Ig:** Inmunoglobulina

**IL-:** Interleuquina

**IPK:** Instituto Pedro Kourí

**M (proteína):** Proteína de Membrana del virus dengue

**MEI:** Método de ELISA de Inhibición

**MIP-1 $\alpha$ :** proteína inflamatoria de macrófagos, del inglés *Macrophage inflammatory protein 1 alpha*)

**MCP-1:** Proteína quimo atrayente de monocitos 1, del inglés *MCP-1 es la proteína quimoatrayente de monocitos1*

**NCR:** secuencias no codificantes, del inglés *non-coding regions*

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

**NS (proteínas):** Proteínas no estructurales del virus dengue, del inglés *non structural*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPD:** Ortofenilendiamina, del inglés *Orthophenylendiamine*

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

**PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*

**PRRs:** receptores que reconocen patógenos, del inglés *pathogen recognition receptors*

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Tampón Fosfato salino, del inglés *Phosphate Buffer Solution*

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

**RCP:** Reacción en cadena de la polimerasa

**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

**SFB:** Suero de ternera fetal

**SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**SNP:** Polimorfismo nucleotídico único, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*

**STAT:** Proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción, del inglés *Signal Transducers and Activators of Transcription*

**TGFβ1:** Factor transformador de crecimiento, del inglés *Transforming grow factor1*

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

**TLR:** Receptor tipo toll, del inglés *Toll like receptor*

**TMB:** 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina

**TNFα:** Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés *Tumor Necrosis Factor*

**TRAIL:** Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral, del inglés *tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand lymphoma*

**Treg :** Células T reguladoras, del inglés *T regulator cells*

**ufp:** Unidades formadoras de placas

**UTR:** región 5' no traducida, del inglés *untranslated region*

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana

## SÍNTESIS

Se presentan nuevas evidencias científicas a favor de la participación de la respuesta inmune celular en la patogénesis de la Fiebre Hemorrágica por dengue. Se demostró la asociación de niveles elevados de IL-12 con el cuadro clínico benigno y niveles aumentados de IL-10 con la infección secundaria. Una mayor expresión de IL-10 en células mononucleares humanas se asoció al reto viral homotípico, mientras en el reto heterotípico predominó la expresión de TNF $\alpha$ . Un incremento en los niveles de granzima B y perforina se encontró en el suero de pacientes de dengue correlacionado con la presencia de la proteína viral NS1. Se detectó la expresión de genes de IFN $\gamma$  y TGF $\beta$ 1 en tejidos de bazo e hígado de fallecidos por dengue. Una variante génica correspondiente a una mayor producción de TNF $\alpha$  y una de menor producción de IL-10 se asociaron al dengue grave, mientras el genotipo de mayor producción de TGF $\beta$ 1 se asoció a protección. Niveles aumentados de IgE total y específica en el suero no se asoció a la severidad del cuadro clínico. Células mononucleares de asmáticos, mostraron una expresión disminuida de TGF $\beta$ 1 e IL-10 y de granzima B y perforina, al comparar con células de controles sanos, cuando fueron cultivadas con el virus. Los resultados obtenidos sugieren que un patrón Th1 (IL-12, IFN $\gamma$ ) se asocia a mejor evolución frente a la infección, y niveles elevados de TNF $\alpha$  juegan un papel importante en el desarrollo del Dengue hemorrágico. La liberación oportuna de TGF $\beta$ 1 e IL-10 modula la inflamación evitando la evolución hacia la gravedad y la muerte del paciente. La respuesta citotóxica frente a las células infectadas parece determinar también la evolución clínica ante la infección.

ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. ANTECEDENTES</b> .....	1
<b>I.2. HIPÓTESIS</b> .....	3
<b>I.3. OBJETIVOS</b> .....	3
<b>I.4. TAREAS</b> .....	3
<b>I.5. NOVEDAD CIENTÍFICA</b> .....	4
<b>I.6. VALOR TEÓRICO, PRÁCTICO Y SOCIAL</b> .....	4
<b>I.7. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DONDE HAN SIDO PRESENTADOS LOS RESULTADOS DE LA TESIS</b> .....	5
<b>I.8. TESIS TUTORADAS QUE HAN CONTENIDO PARTE DE LOS RESULTADOS DE LA TESIS</b> .....	5
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>7</b>
<b>II.1. EL DENGUE</b> .....	7
<i>II.1.1- Antecedentes y epidemiología</i> .....	7
<i>II.1.2- Situación epidemiológica del DEN en Cuba</i> .....	9
<i>II.1.3- El agente causal</i> .....	9
<i>II.1.4- Dinámica de la infección</i> .....	11
<i>II.1.5- La Enfermedad</i> .....	13
<i>II.1.6- Factores de riesgo para la FHD/SCD</i> .....	15
<i>II.1.7- Respuesta inmune e Immunopatología de la enfermedad</i> .....	19
<i>II.1.8- Diagnóstico</i> .....	23
<b>II.2. RESEÑA DE LAS CITOQUINAS Y SU PAPEL EN LA RESPUESTA INMUNE</b> .....	24
<b>II.3. MECANISMOS EFECTORES DE CITOTOXICIDAD CELULAR EN LA RESPUESTA INMUNE ANTI-VIRAL</b> .....	29
<b>II.4. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA A ENFERMEDADES INFECCIOSAS</b> .....	32
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
<b>ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	34
<b>III.1. CINÉTICA DE LOS NIVELES DE LAS CITOQUINAS IL-12 E IL-10 Y DE MARCADORES DE CITOTOXICIDAD EN PACIENTES CON DEN Y SU RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD</b> .....	34
<i>III.1.1 Cuantificación de los niveles de IL-12 e IL-10 en muestras séricas de pacientes de FD y FHD durante la infección por dengue 2</i> .....	34
<i>III.1.2 Determinación de marcadores de citotoxicidad (Granzima B, Perforina y FasL soluble) en muestras séricas seriadas de pacientes de FD infectados por virus dengue 4</i> .....	39
<b>III.2. NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES DE CITOQUINAS INDUCIDOS POR EL VIRUS DEN EN CULTIVOS DE CELULAS MONONUCLEARES DE INDIVIDUOS INMUNES AL VIRUS</b> .....	41
<i>III.2.1. Análisis de la expresión de genes de: IL-12, IL-10 y TNF<math>\alpha</math> en células mononucleares humanas frente a la infección homotípica y heterotípica con virus dengue</i> .....	41
<i>III.2.2. Determinación y comparación de los niveles de TNF<math>\alpha</math> en sobrenadante de células sanguíneas de individuos con antecedentes de FD y FHD cultivadas con virus dengue 3</i> .....	44
<b>III.3. EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS EN TEJIDOS DE FALLECIDOS POR DEN HEMORRÁGICO</b> .....	45
<i>III.3.1. Estudio de la expresión cualitativa de genes de IFN<math>\gamma</math>, TNF<math>\alpha</math>, IL-10 y TGF<math>\beta</math>1 en hígado y bazo de fallecidos por DEN hemorrágico durante la infección por virus DEN 3 o DEN 4</i> .....	45
<b>III.4. VARIANTES POLIMÓRFICAS DE GENES DE CITOQUINAS PRO Y ANTI-INFLAMATORIAS PREDOMINANTES EN PACIENTES DE FHD</b> .....	47
<i>III.4.1. Determinación y comparación de las frecuencias alélicas, genotípicas o haplotípicas de los genes de IFN<math>\gamma</math>, TNF<math>\alpha</math>, IL-6, IL-10 y TGF<math>\beta</math>1 en pacientes de FHD de la epidemia de Santiago de Cuba durante el año 1997 y en una muestra control de la población</i> .....	47
<b>III.5. POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE LA RESPUESTA TH2 Y LA PATOGENIA DEL DEN</b> .....	49

III.5.1 Comparación de los niveles de anticuerpos IgE total e IgE específicos anti-DEN en muestras séricas de pacientes con FD y FHD durante la infección secundaria.....	49
III.5.2. Determinación y comparación de la expresión de genes de las citoquinas (IFN $\gamma$ , IL-4, TNF $\alpha$ , IL-10, TGF $\beta$ 1) y de marcadores de citotoxicidad (Granzima B y Perforina) frente al virus DEN en células mononucleares de individuos inmunes a DEN con antecedentes de asma bronquial y controles.....	50
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>IV.1. CINÉTICA DE LOS NIVELES DE LAS CITOQUINAS IL-12 E IL-10 Y DE MARCADORES DE CITOTOXICIDAD EN PACIENTES CON DEN Y SU RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD.....</b>	<b>52</b>
IV.1.1 Cuantificación de los niveles de IL-12 e IL-10 en muestras séricas de pacientes de FD y FHD durante la infección por dengue 2.....	52
IV.1.2.- Determinación de marcadores de citotoxicidad (Granzima B, Perforina y FasL soluble) en muestras séricas seriadas de pacientes de FD infectados por virus dengue 4.....	59
<b>IV.2. NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES DE CITOQUINAS INDUCIDOS POR EL VIRUS DEN EN CULTIVOS DE CELULAS MONONUCLEARES DE INDIVIDUOS INMUNES AL VIRUS.....</b>	<b>69</b>
IV.2.1. Análisis de la expresión de genes de: IL-12, IL-10 y TNF $\alpha$ en células mononucleares humanas frente a la infección homotípica y heterotípica con virus dengue.....	69
IV.2.2. Determinación y comparación de los niveles de TNF $\alpha$ en sobrenadante de células sanguíneas de individuos con antecedentes de FD y FHD cultivadas con virus dengue 3.....	72
<b>IV.3. EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS EN TEJIDOS DE FALLECIDOS POR DEN HEMORRÁGICO.....</b>	<b>75</b>
IV.3.1. Estudio de la expresión cualitativa de genes de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 y TGF $\beta$ 1 en hígado y bazo de fallecidos por DEN hemorrágico durante la infección por virus DEN 3 o DEN 4.....	75
<b>IV.4. VARIANTES POLIMÓRFICAS DE GENES DE CITOQUINAS PRO Y ANTI-INFLAMATORIAS PREDOMINANTES EN PACIENTES DE FHD.....</b>	<b>82</b>
IV.4.1. Determinación y comparación de las frecuencias alélicas, genotípicas o haplotípicas de los genes de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 y TGF $\beta$ 1 en pacientes de FHD de la epidemia de Santiago de Cuba durante el año 1997 y en una muestra control de la población.....	82
<b>IV.5. POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE LA RESPUESTA TH2 Y LA PATOGENIA DEL DEN.....</b>	<b>87</b>
IV.5.1 Comparación de los niveles de anticuerpos IgE total e IgE específicos anti-DEN en muestras séricas de pacientes con FD y FHD durante la infección secundaria.....	87
IV.5.2. Determinación y comparación de la expresión de genes de las citoquinas (IFN $\gamma$ , IL-4, TNF $\alpha$ , IL-10, TGF $\beta$ 1) y de marcadores de citotoxicidad (Granzima B y Perforina) frente al virus DEN en células mononucleares de individuos inmunes a DEN con antecedentes de asma bronquial y controles.....	90
DISCUSION INTEGRADA.....	94
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>98</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>99</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>123</b>
<b>VIII.1. TABLAS.....</b>	<b>123</b>
<b>VIII.2. AVALES.....</b>	<b>127</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Antecedentes**

La infección por virus dengue (DEN) es la enfermedad más frecuente transmitida por artrópodos, encontrándose cerca de la mitad de la población mundial en riesgo de infección. Su alta prevalencia, con un gran incremento en las últimas décadas, junto a la ausencia de una vacuna eficaz y de un tratamiento específico se conciertan para convertir al dengue en un difícil problema de la salud pública mundial (Kyle y Harris, 2008).

El virus es un complejo de cuatro serotipos (1 al 4) antigénicamente relacionados que pertenecen a la familia Flaviviridae (Vaughan y cols., 2010). La infección puede ser asintomática o causar dos formas de enfermedad, la Fiebre DEN (FD), o forma benigna, y la Fiebre Hemorrágica del dengue/Síndrome de Choque por dengue (FHD/SCD), o forma grave que evoluciona con extravasación de plasma hacia los espacios intersticiales, hemoconcentración, trombocitopenia, y manifestaciones hemorrágicas (Pang y cols., 2007). Este síndrome grave amenaza la vida del paciente, conduciendo a la muerte al 5% de los casos.

La infección con un serotipo viral parece inducir inmunidad homotípica (contra ese serotipo) de por vida, sin embargo, la infección secuencial con dos serotipos diferentes (heterotípica) es considerada el factor de riesgo más importante del hospedero para el desarrollo de la forma grave de la enfermedad (Guzman y Kouri, 2008). Otros factores de riesgo como el asma bronquial, la anemia falciforme, y la Diabetes mellitus también han sido identificados (Bravo y cols., 1987; Valdes y cols., 1999; Gonzalez y cols., 2005).

Dos hipótesis principales tratan de explicar la etiopatogenia de la FHD. Una de las hipótesis sugiere que las cepas más virulentas del virus DEN constituyen la causa del agravamiento, mientras las cepas del virus DEN avirulentas causan la forma clínica benigna FD (Rosen, 1986; Rico-Hesse, 2007). La segunda hipótesis propone que la FHD es mediada por la respuesta inmune del hospedero frente a un segundo serotipo distinto al de la primera infección, y le otorga un papel protagónico a los anticuerpos heterotípicos no neutralizantes (Halstead y O'Rourke, 1977; Halstead, 2009) y a las células T de memoria de reactividad cruzada (Kurane y Ennis, 1992; Rothman, 2009).

Los anticuerpos IgG (inmunoglobulina G) que reconocen durante segundas infecciones heterólogas al nuevo serotipo infectante y son incapaces de neutralizarlo, facilitan la entrada del virus a la célula diana a través de sus receptores Fc (FcR). Esto provoca un aumento de la multiplicación y diseminación viral, fenómeno conocido como amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) (Sullivan, 2001; Halstead, 2003). Por otra parte, la

activación de los linfocitos T de memoria de reactividad cruzada aparentemente juega un papel crítico en el desarrollo de FHD/SCD durante infecciones secundarias. Se inicia la liberación de citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios que pueden llevar a la disfunción de células del endotelio vascular, aumento de la permeabilidad vascular con salida de plasma, problemas de coagulación, hipovolemia y choque (Kurane y Ennis, 1992; Green y Rothman, 2006). Se han constatado en el suero o plasma de pacientes con FHD niveles elevados de varias citoquinas, entre las cuales se destacan:  $TNF\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10,  $TGF\beta 1$  e  $IFN\gamma$ , entre otras (Kurane, 2007). Varios grupos de investigadores le otorgan un papel protagónico en la patogenia a las células de un patrón Th (patrón auxiliador, del inglés T helper) 1 (Chen y cols., 2005; Sun y cols., 2006; Rothman, 2009). Sin embargo, el patrón Th2 también se ha implicado en la patogénesis del cuadro grave (Chaturvedi y cols., 2000; (Tay y Tan, 2006) y la IgE ha sido sugerida como posible marcador de severidad (Koraka y cols., 2003). Además, otros estudios defienden que es la supresión inmunológica temprana lo que pudiera llevar a una mayor diseminación viral y al desarrollo de la FHD/SCD (Mongkolsapaya y cols., 2003). A pesar del número creciente de trabajos que abordan estas temáticas, aun queda mucho por esclarecer. Los estudios controlados de pacientes con formas clínicas leves y graves han aportado la mayor información acerca del papel del sistema inmune en la evolución clínica de la infección por DEN. No obstante su utilidad, con frecuencia estos estudios reflejan resultados discordantes (Rothman, 2010). Por otra parte, la investigación en tejidos de fallecidos cobra especial relevancia al ser muy informativa. Sin embargo, dadas las limitaciones socio-culturales en relación a las prácticas necrópsicas en múltiples países donde el dengue es endémico, son escasos este tipo de estudios (Mathew y Rothman, 2008). Se han empleado numerosos modelos *in vitro* de interacciones virus-célula, que contribuyen de manera más controlada a definir los mecanismos celulares o moleculares implicados en la patogenia, a pesar de que estos ignoran la compleja red de interconexiones celulares y humorales que ocurren *in vivo*, lo cual puede conducir a interpretaciones erradas (Bente y Rico-Hesse, 2006).

En el presente trabajo se indaga, en el contexto de las epidemias cubanas, acerca del papel de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ) y anti-inflamatorias (IL-10,  $TGF\beta$ ) en la patogénesis de la infección por dengue. Para esto se emplean distintos modelos que abarcan al paciente durante la infección aguda (*in vivo*), el cultivo de células de individuos inmunes a dengue en presencia del virus (*in vitro*), o tejidos de fallecidos por FHD/SCD, así como el estudio de las frecuencias de variantes de genes de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en pacientes con FHD. Al tener en cuenta la importancia de la respuesta citotóxica en la eliminación de células infectadas por virus, se explora también la participación de mediadores de citotoxicidad en el control de la infección por dengue.

La situación epidemiológica del DEN en Cuba propicia estudios como los que se proponen en este trabajo, al ser reconocida hasta el momento como única en el contexto internacional. Es conocido que, a diferencia de Cuba, la mayoría de las áreas que el dengue afecta son endémicas y reportan la co-circulación de varios serotipos virales, haciéndose difícil la determinación de los serotipos infectantes y la secuencia de infección en los individuos. Estos son aspectos esenciales en el aseguramiento de la validez de los estudios de patogenia y factores de riesgo (Guzman y Kouri, 2008). Por todo lo anterior se propone como hipótesis de la presente investigación:

## **I.2. Hipótesis**

La respuesta inflamatoria no controlada y la insuficiente respuesta citotóxica están implicadas en la patogénesis de la enfermedad grave por dengue.

## **I.3. Objetivos**

### *General*

Elucidar el papel de las citoquinas pro y anti-inflamatorias de la respuesta inmune en la defensa frente a la infección por virus dengue y la inmunopatogénesis de la FHD.

### *Específicos*

1. Determinar en suero la cinética de los niveles de las citoquinas IL-12 e IL-10 y de marcadores de citotoxicidad en pacientes con dengue y su relación con la evolución clínica de la enfermedad.
2. Cuantificar los niveles de expresión de genes de citoquinas inducidos por el virus dengue, tras el reto homotípico o heterotípico, en cultivos de células mononucleares de individuos inmunes al virus.
3. Determinar la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en tejidos de fallecidos por dengue hemorrágico.
4. Definir las variantes polimórficas de genes de citoquinas pro y anti-inflamatorias predominantes en pacientes de Fiebre Hemorrágica del Dengue.
5. Identificar posible asociación entre respuesta Th2 y patogenia del dengue.

## **I.4. Tareas**

1. Cuantificación de los niveles de IL-12 e IL-10 en muestras séricas de pacientes de FD y FHD durante la infección por dengue 2.

2. Determinación de marcadores de citotoxicidad (Granzima B, Perforina y FasL soluble) en muestras séricas seriadas de pacientes con FD infectados por virus dengue 4.
3. Análisis de la expresión de genes de: IL-12, IL-10 y TNF $\alpha$  en células mononucleares humanas frente a la infección homotípica y heterotípica con virus dengue.
4. Determinación y comparación de los niveles de TNF $\alpha$  en sobrenadante de células sanguíneas de individuos con antecedentes de FD y FHD cultivadas con virus dengue 3.
5. Estudio de la expresión cualitativa de genes de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 y TGF $\beta$ 1 en hígado y bazo de fallecidos por dengue hemorrágico durante la infección por virus dengue 3 o dengue 4.
6. Determinación y comparación de las frecuencias alélicas, genotípicas o haplotípicas de los genes de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 y TGF $\beta$ 1 en pacientes de FHD de la epidemia de Santiago de Cuba durante el año 1997 y en una muestra control de la población.
7. Comparación de los niveles de anticuerpos IgE total e IgE específicos anti-DEN en muestras séricas de pacientes con FD y FHD durante la infección secundaria.
8. Determinación y comparación de la expresión de genes de las citoquinas (IFN $\gamma$ , IL-4, TNF $\alpha$ , IL-10, TGF $\beta$ 1) y de marcadores de citotoxicidad (Granzima B y Perforina) frente al virus dengue en células mononucleares de individuos inmunes a dengue con antecedentes de asma bronquial y controles.

### **I.5. Novedad científica**

Se evidencia por primera vez a nivel mundial el papel protector de la respuesta inmune anti-inflamatoria en la infección por dengue y se aportan nuevos elementos que apoyan el papel de la respuesta inmune pro-inflamatoria en la patogénesis de la enfermedad grave por dengue.

### **I.6. Valor teórico, práctico y social**

#### **Valor teórico**

- Es un trabajo dirigido a una entidad que es hoy la más importante enfermedad viral transmitida por artrópodos en términos de morbilidad y mortalidad humana.
- Se contribuyó al conocimiento de la asociación de la respuesta inmune celular con la susceptibilidad de los individuos cubanos a desarrollar FHD.
- Se sugieren mediadores de la respuesta inmune celular y factores genéticos involucrados en este fenómeno.

- Se describen por primera vez las frecuencias de variantes de genes de citoquinas en población cubana.

#### **Valor práctico**

- El conocimiento de marcadores de susceptibilidad genética a desarrollar FHD aporta elementos para la evaluación de candidatos vacunales contra el DEN y el diseño de nuevas estrategias terapéuticas en el manejo del paciente grave.

#### **Valor social**

- Los resultados constituyen una contribución al sistema nacional de salud ya que aportan valiosa información sobre algunos de los factores de riesgo para la aparición de la FHD en la población cubana.

### **I.7. Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis**

1. **Pérez AB**, García G, Sierra B, Alvarez M, Vázquez S, Cabrera MV, Rodríguez R, Rosario D, Martínez E, Denny T, Guzmán MG. IL-10 levels in dengue patients. Some findings from the exceptional epidemiological conditions of Cuba. **J Med Virol**. 2004 Jun;73(2):230-4.
2. Vázquez S, Cabezas S, **Pérez AB**, Pupo M, Ruiz D, Calzada N, Bernardo L, Castro O, González D, Serrano T, Sanchez A, Guzmán MG. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. **Int J Infect Dis**. 2007 May;11(3):256-62.
3. **Pérez AB**, García G, Sierra B, Alvarez M, Vazquez S, Cabrera MV, Valdes L, Guzman MG. Producción ex vivo de TNF $\alpha$  y Oxido nítrico por células sanguíneas en presencia de virus dengue. **Rev Cub Med Trop** 2008; 60(1).
4. Sierra B, **Perez AB**, Vogt K, Garcia G, Schmolke K, Aguirre E, Alvarez M, Kem F, Kourí G, Volk HD, Guzman MG. Secondary heterologous dengue infection risk: Disequilibrium between immune regulation and inflammation? **Cell Immunol**. 2010; 262(2):134-40.
5. **Pérez AB**, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, Sanchez L, Valdes L, Volk HD, Guzman MG. TNF-alpha, TGF-beta 1 and IL-10 gene polymorphisms: Implication in protection or susceptibility to Dengue Hemorrhagic Fever. **Human Immunology** 2010 (en prensa).

### **I.8. Tesis tutoradas que han contenido parte de los resultados de la tesis**

- Marcadores solubles de citotoxicidad en pacientes de Fiebre dengue. Tesis de Maestría. Autora: Alienys Izquierdo Oliva. 2008

- Expresión de genes de citoquinas en tejidos de bazo e hígado de fallecidos por dengue hemorrágico. Tesis de Grado. Autora: Olga Lidia Pérez Guevara. 2009

**I.9. Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis**

- International Conference on Dengue. Chiang Mai, Thailand November 20-24, 2000.
- II Congreso Internacional de Dengue y Fiebre Amarilla, Habana, Cuba, 2004.
- 12th International Congress of Immunology, Canadá, 2004.
- 2nd Asian Regional Dengue Research Network Meeting. Singapur, 2005.
- 13th International Congress of Immunology, Río de Janeiro, Brasil, 2007.
- First Pan-American Dengue Research Network Meeting, Recife, Brasil, 2008.
- Congreso 70 Aniversario, Palacio de las Convenciones, Habana, Cuba, 2009.
- II International Congress of Immunology, Berlin, Germany, Septiembre 2009.
- Latin-American Congress of Immunology, Viña del Mar, Chile, Noviembre 2009.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **II.1. El Dengue**

Según la Organización de Salud Mundial (OMS), las enfermedades infecciosas causaron 14.7 millones de muertes en 2001, respondiendo de 26% de mortalidad humana total. La emergencia de nuevas enfermedades infecciosas y la re-emergencia de otras, asociado al aumento de los viajes internacionales, el deterioro de las condiciones socioeconómicas y el abuso de drogas anti-microbianas, ha causado la rápida diseminación de enfermedades infecciosas a través de las fronteras extendiéndose a países de diversas regiones del mundo. El DEN es la infección aguda viral transmitida por artrópodos más importante en términos de morbilidad y mortalidad de humanos y el *Aedes aegypti* es su vector más importante. La FD y su forma grave (FHD/SCD), son las formas clínicas de presentación de esta infección.

#### **II.1.1- Antecedentes y epidemiología**

El origen del nombre del DEN es incierto. El término 'denga' o 'dyenga' fue usado para nombrar la enfermedad en la costa oriental de África en 1823. Se ha supuesto que el término 'DEN' se importa con el comercio de esclavos de África Oriental a las islas caribeñas y particularmente a Cuba durante la epidemia de 1828 (Halstead, 1990).

Se han reconocido epidemias de DEN clásico por más de 200 años aunque aparentemente ocurrieron desde mucho tiempo antes. La primera descripción clínica exacta de DEN ocurrió durante una epidemia en Filadelfia (1780) y se publicó por Benjamín Rush en 1789. En el siglo XIX, las pandemias del DEN ocurrieron en períodos de 15 a 20 años, evolucionando a intervalos más cortos entre las pandemias durante la primera mitad del siglo XX. La asociación de enfermedad hemorrágica con los virus DEN fue por primera vez reportada durante una epidemia de Fiebre hemorrágica viral que ocurrió en las Filipinas, en 1954, y en 1956. De hecho, durante los años cincuenta, la FHD/SDD se reconoció como un síndrome asociado con los virus DEN a lo largo del sudeste de Asia (Halstead, 2002).

Según Gubler, la destrucción ecológica y los cambios demográficos que tuvieron lugar durante y después de la Segunda Guerra Mundial fueron decisivos para aumentar la transmisión de DEN en el mundo (Gubler, 2004). Nuevas áreas geográficas se afectaron a través del transporte de suministros y otros materiales de guerra. Las condiciones se crearon así para la emergencia de FHD/SCD en el sudeste de Asia.

La segunda mitad del siglo XX se caracterizó por la expansión geográfica de la enfermedad, precedido por la diseminación del mosquito y los virus DEN. La FHD/SCD se extendió primero a lo largo del sudeste asiático y después al Pacífico occidental para alcanzar la región americana finalmente. Los países evolucionaron de una situación no endémica o hipo-endémica a un estado de alta endemicidad. En los años ochenta y noventa, la FHD/SCD se volvió un problema pediátrico mayor en el sudeste de Asia y el Pacífico occidental (Gubler, 2004).

En los años cuarenta, el programa de prevención de la fiebre amarilla urbana en la región americana logra controlar el *Aedes aegypti*, eliminando el vector en muchos países, y por consiguiente, siendo disminuidas o eliminadas las epidemias de DEN de las Américas. Sin embargo, por los años setenta, debido al deterioro de los programas de control vectorial, empezó en algunos países la re-infestación por el *Aedes aegypti*, lo cual se acentuó durante los años ochenta y noventa (Gubler, 2005).

La primera epidemia de FHD/SCD en las Américas fue reportada en 1981 en Cuba. Más de 344 000 pacientes con más de 10.000 casos severos y muy severos y 158 fallecidos (101 niños) fueron informados por Kourí y cols. La segunda epidemia de FHD/SCD ocurrió ocho años después en Venezuela (Kouri y cols., 1989). Un incremento del número de casos de FHD y epidemias en países diversos de nuestro continente se reportan desde entonces (Guzman, 2005).

Por otra parte, la vigilancia de DEN en África ha sido muy pobre. Al final del pasado siglo, no obstante, se informaron algunas epidemias (Sharp y cols., 1995; Gubler y Meltzer, 1999; Diallo y cols., 2005; Franco y cols., 2010).

En la actualidad el DEN es un problema mayor de salud a nivel global, principalmente de regiones tropicales y subtropicales. El principio del nuevo milenio se ha caracterizado por la extensión de la distribución del *Aedes aegypti* a la mayoría de las áreas tropicales y subtropicales del mundo, la co-circulación de múltiples serotipos del virus DEN y el desarrollo de endemicidad de la FHD en muchos países del mundo. Según la OMS, el DEN se ha reconocido como problema de salud en más de 100 países y causa un estimado de entre 50 y 100 millones de infectados anualmente con más de 2.5 mil millones personas en riesgo. Se reportan al año 500.000 casos de FHD con alrededor de 20 000 muertes (Guha-Sapir y Schimmer, 2005).

La enfermedad es endémica en África, América, el Mediterráneo oriental, el sudeste asiático y el Pacífico occidental. La pandemia actual y el aumento de las epidemias de FHD son el resultado directo de cambios demográficos y las tendencias económicas de explosión de la población global, con aumento en la densidad de la población; la urbanización no planificada; las migraciones entre países, favoreciendo la introducción de virus

del DEN; el deterioro de la infraestructura de la salud pública y de los programas de control del vector que habían controlado décadas atrás las poblaciones de Aedes y otro mosquitos (Simmons y Farrar, 2009).

### **II.1.2- Situación epidemiológica del DEN en Cuba**

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

En la epidemia de DEN ocurrida en Cuba en 1977-79, 500 000 casos fueron diagnosticados, todos clínicamente clasificados como FD. En esa ocasión el 44,6% de la población cubana fue infectada con DEN1 (Cantelar de Francisco y cols., 1981).

En 1981 tiene lugar una segunda epidemia, provocada esta vez por 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 (Kouri y cols., 1989).

Dieciséis años más tarde, en 1997, vuelven a reportarse casos de DEN en nuestro país, localizados en una municipalidad de la provincia de Santiago de Cuba. Durante esta epidemia fueron infectadas 2946 personas; de estas 205 fueron diagnosticadas con FHD/SCD y 12 fallecieron (Kouri y cols., 1998). Las cepas aisladas mostraron gran homología con DEN2 Jamaica y se relacionaron por análisis de la secuencia nucleotídica, con cepas del genotipo asiático.

En el año 2000 se detectó un pequeño brote en Ciudad de la Habana, rápidamente controlado, durante el cual fueron aislados virus de los serotipos 3 y 4, y en el período 2001-2002 tuvo lugar un nuevo evento epidemiológico que afectó fundamentalmente a la provincia de Ciudad de la Habana. En esta oportunidad el serotipo 3 fue responsable de la infección, y se confirmaron serológicamente 1635 casos, de los cuales 152 desarrollaron FHD/SCD (Pelaez y cols., 2004).

En el año 2006 se vieron afectadas nuevamente algunas provincias del país, aislándose los serotipos 3 y 4 (Comunicación personal, Dra. Maria G. Guzmán, 2008)(Libel, 2006b; MINSAP-OPS, 2006).

### **II.1.3- El agente causal**

La enfermedad por DEN es causada por cuatro serotipos virales estrechamente relacionados que pertenecen al género flavivirus, el cual incluye más de 70 virus, entre ellos los transmitidos por artrópodos, de la familia Flaviviridae (Harris y cols., 2006).

Las partículas maduras del virus del DEN son esféricas, con un diámetro de 50 nm, y contienen múltiples copias de las tres proteínas estructurales del virus, una membrana lipídica derivada de la célula hospedera, y una sola copia de una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de sentido positivo. El genoma de ARN viral contiene un solo marco de lectura abierto de 10233 nucleótidos que codifica para una poliproteína cuya

secuencia es: 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3', procesada por proteasas codificadas por el propio genoma viral y del hospedero (Harris y cols., 2006).

Los genes ubicados hacia el extremo 5' codifican para las tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C) y dos proteínas de superficie: la de membrana (M) y la proteína de envoltura (E). Las proteínas no estructurales (NS) (del inglés *non structural*) son codificadas por genes situados hacia el extremo 3' y se denominan NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 respectivamente (Clyde y cols., 2006). En ambos extremos, 5' y 3', están presentes secuencias no codificantes o NCR (del inglés *non-coding regions*) que contienen secuencias conservadas involucradas en el proceso de amplificación, traducción y empaquetamiento del genoma (Paranjape y Harris, 2009).

**Proteínas estructurales virales:** La proteína C es pequeña (12 kD) y altamente básica, le permite su interacción con el ARN viral y forma de la ribonucleoproteína. Es el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción (Wang y cols., 2002).

La proteína prM (26 kD) es escindida proteolíticamente por la enzima furina que reside en el trans-Golgi, liberándose su extremo amino-terminal para dar lugar a la proteína M de 8 kD. La formación de M a partir de prM parece ser crucial en la morfogénesis del virus, lo que implica un incremento en la infectividad y la reorganización de la estructura de la superficie viral, existiendo al parecer una compleja regulación de su digestión (Burke y Monath, 2001).

La glicoproteína E (50 kD) forma parte de la envoltura viral y constituye la principal proteína estructural y más conservada de los flavivirus (Clyde y cols., 2006). En la proteína E radican las funciones biológicas principales del virión tales como: la inducción de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación, la maduración viral, el enlace al receptor celular, la fusión de membrana catalizada por ácidos y los epítomos de células T. Los determinantes antigénicos de la proteína E han mostrado especificidad de grupo, complejo y tipo (Heinz y Allison, 2003).

**Proteínas no estructurales virales:** NS1 es una glicoproteína de 39-41 kD que existe asociada a la célula, en la superficie celular y en forma extracelular. Es sintetizada en el retículo endoplásmico como una glicoproteína monomérica pero se une formando un homodímero que es transportado al aparato de Golgi (AG) donde sufre modificaciones y de aquí a la superficie celular, liberándose al medio extracelular (Lindenbach y Rice, 2003). La función de NS1 en la replicación viral no está completamente aclarada, aunque pudiera interactuar con la NS4A en su función de replicasa. La forma extracelular de NS1 provoca una potente respuesta humoral y la fijación de complemento, y la inmunización con NS1 recombinante o purificada puede ser protectora en

ratones (Wu y cols., 2003). La detección de NS1 se ha utilizado en el diagnóstico temprano del DEN, así como en su serotipificación (Xu y cols., 2006).

NS2 está constituida por dos proteínas NS2A y NS2B. NS2A (22 kD), puede encontrarse atravesando la membrana y además, ha sido localizada en posibles sitios de replicación del ARN, actuando en el reclutamiento de copias de ARN por la replicasa acoplada a la membrana al unirse a NS3 y NS5. La proteína NS2B (14 kD) está asociada a la membrana y forma un complejo con NS3 siendo un cofactor requerido para la función de serina proteasa de NS3 (Zuo y cols., 2009).

La proteína NS3 (69 kD), altamente conservada entre los flavivirus (67%), es una proteína trifuncional, con actividad de serina proteasa, helicasa y nucleótido trifosfatasa (Arakaki y cols., 2002; Bartelma y Padmanabhan, 2002). Es fuente principal de epítopes de linfocitos T citotóxicos. Recientemente se demostró que algunas mutaciones pueden disminuir las tres funciones de esta proteína, lo que abre un camino para el diseño de inhibidores antivirales alostéricos (Lescar y cols., 2008).

NS4 da origen a dos proteínas relativamente pequeñas NS4A y NS4B, de 16 y 27 kD. NS4A participa en la replicación del ARN, y la NS4B se localiza en sitios de replicación del ARN, pero también aparece dispersa en la membrana citoplasmática y en el núcleo (Bartenschlager y Miller, 2008).

NS5 es la más grande (103 kD) y conservada entre las proteínas de los flavivirus. Funciona como ARN polimerasa ARN dependiente y metiltransferasa en la metilación de la caperuza del extremo 5' del ARN viral (Bartenschlager y Miller, 2008).

#### **II.1.4- Dinámica de la infección**

Los monocitos y otras células de origen reticuloendotelial se reconocen como las células diana de la infección del virus DEN (Halstead y cols., 1977; Marianneau y cols., 1999). Estudios recientes, sin embargo, postulan que las células dendríticas (CD) son las células blancas iniciales en la infección por DEN, entre ellas las células de Langerhans (epidermis), las CD intersticiales (dérmicas) y las CD plasmocitoides (Wu y cols., 2000; Ho y cols., 2001). En la infección natural el virus parece ser inoculado por el vector en el espacio subcutáneo. Veinticuatro horas post inoculación, el virus ha podido ser detectado en los ganglios linfáticos regionales (Marchette y Halstead, 1973) desde donde se disemina, por lo que puede ser aislado en el plasma (período de viremia) así como en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (Killen y O'Sullivan, 1993).

Otros autores han encontrado que el virus puede infectar, pero no replicarse, en las células de Kupffer (Marianneau y cols., 1999). El linfocito B también podría ser un blanco importante de la infección (King y cols., 1999). Además, se ha reportado, *in vitro*, que el virus puede infectar y replicarse en células de origen endotelial y epitelial (McBride y Bielefeldt Ohmann, 2000).

Aún cuando se cuenta con todos estos hallazgos se desconoce a ciencia cierta el progreso de la infección viral *in vivo*. Continúa siendo un reto para el futuro conocer qué células son las infectadas 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*.

El estudio de las bases moleculares de la entrada del virus sugiere el empleo de múltiples receptores de los cuales sólo algunos son específicos para DEN. A pesar de esto se reconocen dos mecanismos de interacción con la célula que son comunes para flavivirus: la interacción del virus con el receptor celular y la unión del virus a la célula por formación de inmunocomplejos (IC) (Hung y cols., 1999).

La primera interacción del virus se cree que tiene lugar con elementos de unión de baja afinidad presentes en la superficie celular, para después ser transferido a un segundo receptor proteico capaz de unir e internalizar el virus. Entre los elementos que interactúan con baja afinidad se encuentran el heparán sulfato, una lectina de tipo C (DC-SIGN) y un homólogo de DC-SIGN, el L-SIGN. De ellos el mejor caracterizado es el DC-SIGN también llamado CD209. Este es un receptor de baja afinidad y la internalización del virión tiene lugar con el auxilio de un receptor de alta afinidad (Tassaneetrithep y cols., 2003; Clyde y cols., 2006).

Una vez formada la vacuola endocítica mediada por el (los) receptor (es), ocurre un proceso de fusión entre las membranas de dicho compartimento y la envoltura viral, liberándose la nucleocápsida en el citoplasma que facilita la salida del ARN viral al citosol (Bartenschlager y Miller, 2008).

En algunos tipos celulares la entrada del virus se facilita mediante la unión de los complejos virus-anticuerpos formados en respuesta a la reinfección, con los receptores para la porción Fc de las moléculas de IgG (FcγR) sobre la superficie de esas células, potenciando la infectividad dada por el incremento de la entrada del virus a la célula diana (Burke y Kliks, 2006). Ocurre la internalización de los mismos formándose el endosoma y es en ese compartimento ácido donde tras la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular, se libera la nucleocápsida en el citoplasma (Bartenschlager y Miller, 2008).

Ocurrida la liberación del genoma viral, la región 5' no traducida (5'UTR) conduce al ARN hacia los ribosomas, donde ocurre la traducción del marco de lectura (Alvarez y cols., 2006a). La poliproteína resultante es procesada co y post-traduccionalmente para dar lugar a las 10 proteínas virales.

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 retículo endoplásmico 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 (Perera y Kuhn, 2008).

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 (Martina y cols., 2009).

### **II.1.5- La Enfermedad**

La mayoría de las infecciones por virus DEN no son sintomáticas. Una fiebre indiferenciada, la FD, la FHD y el SCD constituyen el espectro de esta enfermedad.

Un aumento abrupto de la temperatura caracteriza el debut de la enfermedad en la FD. Cefalea, dolor retroorbital, fotofobia, dolor muscular y articular en las extremidades, debilidad extrema, y anorexia caracterizan la enfermedad. Después de tres o cuatro días de fiebre (39-40°C), la temperatura vuelve a la normalidad, aunque en algunos pacientes se puede mantener la fiebre durante 2-3 días más. Un rash maculopapular en el pecho y tronco extendiéndose a las extremidades se observa a menudo después de 3 o 4 días del inicio de la fiebre. En algunos pacientes, la FD puede acompañarse de sangramientos como epistaxis, sangrado gingival o gastrointestinal y menorragia. La leucopenia es el principal hallazgo del laboratorio, aunque se puede constatar la trombocitopenia en un porcentaje de pacientes. El pronóstico del cuadro de FD es bueno, aunque la convalecencia puede tomar varias semanas, y se puede asociar a astenia prolongada y depresión (Esler, 2009).

Por su parte, el debut del cuadro de FHD/SCD es normalmente abrupto, con la fiebre elevada acompañada por síntomas que se parecen a la FD. Después de los primeros 2-6 días de iniciada la fiebre, ocurre una caída rápida en la temperatura a menudo acompañada por náuseas, vómitos, dolor abdominal y tos seca, los que son reconocidos como signos de alarma. Señales de fallo circulatorio pueden constatarse en el paciente sudoroso, con extremidades frías, tronco caliente, rubicundez, intranquilidad, irritabilidad, dolor epigástrico y pueden progresar a un pulso débil, rápido y filiforme. Letargo o inquietud pueden caracterizar esta fase que suele ser la antesala del choque (Gubler, 2006). La extravasación de plasma hacia el espacio intersticial se manifiesta por la efusión pleural o pericárdica y la ascitis, los que pueden ser hallazgos al examen físico, la radiografía, o el ultrasonido, con hemoconcentración resultante (una elevación en el hematocrito del 20%) o proteinemia (Halstead, 2007). La trombocitopenia de menos de 100 000 plaquetas /mm<sup>2</sup>, prueba del lazo positiva y manifestaciones hemorrágicas de diversa magnitud como petequias, epístasis, melena, hematemesis, o al menos una prueba del torniquete positiva son rasgos de esta fase. La crisis dura de 24 a 36 horas y los pacientes se recuperan una vez que comienza la convalecencia (Gubler, 2006).

La OMS definió 4 categorías para los distintos grados de FHD, desde el menos severo (grado 1) hasta el más severo (grado 4). En los grados 3 y 4 la liberación de plasma es más profunda y conlleva al denominado SCD

(WHO., 1997). Sin embargo, recientemente se ha propuesto una nueva clasificación clínica en DEN y DEN severo por ser ineficiente la anteriormente aceptada en las condiciones actuales (Blacksell y cols., 2006).

El reconocimiento temprano de los signos de alarma (vómitos persistentes, dolor abdominal intenso, inquietud, o letargo) y la aplicación inmediata de infusiones intravenosas constituyen herramientas cruciales para asegurar un buen resultado en la evolución del paciente que se agrava, factores que definen su pronóstico (Martínez-Torres, 1995).

Un aumento en el reporte de casos con manifestaciones inusuales se ha registrado en los últimos años. Entre estas manifestaciones se reportan desórdenes neurológicos (irritabilidad, depresión, convulsiones) (Pancharoen y Thisyakorn, 2001; Misra y cols., 2006), miocarditis (Salgado y cols., 2009), fallo renal agudo (Wiwanitkit, 2005), hepatitis fulminante (Ling y cols., 2007; Shah, 2008), etc.

La aplicación inmediata de infusiones intravenosas garantiza evitar complicaciones que comprometan irreversiblemente la vida del paciente. El pronóstico depende principalmente del reconocimiento temprano, la supervisión cuidadosa y el tratamiento endovenoso oportuno. La mortalidad puede ser tan alta como de 10-20% (más de 40% si el choque ocurre) sin tratamiento apropiado temprano, pero puede ser menor como 0.2-1% en hospitales con personal experimentado en el manejo de la enfermedad (Gubler, 2006).

Los hallazgos macropatológicos en la FHD/SCD incluyen petequias, equimosis, y hemorragias focales viscerales, derrames serosos y sanguinolentos, edema retroperitoneal y en algunos casos aumento de tamaño del hígado.

En el examen histopatológico se observan cambios difusos en los pequeños vasos de las vísceras y tejidos blandos, con fuga capilar y edema perivascular. El bazo y los ganglios linfáticos muestran proliferación de células linfoides con necrosis de las áreas dependientes del timo. En el hígado se describen una necrosis mediozonal y a veces centrolobulillar, hepatocitos apoptóticos, hipertrofia de las células de Kupffer, esteatosis e infiltración portal mononuclear (Seneviratne y cols., 2006). En la médula ósea se presenta interrupción de la maduración de los megacariocitos (Srichaikul y Nimmannitya, 2000; Miranda y cols., 2003).

Estudios en muestras obtenidas de pacientes con FHD/SCD utilizando inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica, han revelado antígenos del virus DEN principalmente en células mononucleares fagocíticas de muchos tejidos, incluyendo hígado, bazo, ganglios linfáticos, timo, riñón, pulmón, cerebro y piel (Boonpucknavig y cols., 1979; Huerre y cols., 2001; Jessie y cols., 2004). Estudios inmunopatológicos y de patología molecular realizados *in vivo* además de estudios *ex vivo* (King y cols., 1999) y reportes *in vitro* (Lin y cols., 2002), sugieren que el virus DEN se replica *in vivo* en los linfocitos B y monocitos/macrófagos del sistema retículo-endotelial (Halstead y cols., 2005; Clyde y cols., 2006; Green y Rothman, 2006).

En tejido hepático se observaron antígenos de DEN localizados en células de Kupffer (Hall y cols., 1991; Basilio-de-Oliveira y cols., 2005), hepatocitos (Basilio-de-Oliveira y cols., 2005) y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Jessie y cols., 2004). En el bazo se han detectado antígenos virales en macrófagos (Miagostovich y cols., 1997) y en células linfoides de la pulpa roja y blanca (Jessie y cols., 2004).

La convalecencia es generalmente corta con una recuperación rápida, sin embargo, un porcentaje de pacientes aquejan fundamentalmente astenia, cefalea y artralgia, aún 2 meses (Seet y cols., 2007) y hasta 2 años (García y cols., 2010) después de la enfermedad aguda.

El diagnóstico diferencial del DEN incluye la influenza, las infecciones exantemáticas (sarampión, rubéola), infecciones bacterianas graves (meningococemia, sepsis bacteriana, fiebre de la tifoidea, leptospirosis), y otras fiebres hemorrágicas virales.

### **II.1.6- Factores de riesgo para la FHD/SCD**

La dinámica de transmisión de virus del DEN es determinada por la interacción del ambiente, el agente, el hospedero, y el vector. Estos factores pueden ser clasificados en macrodeterminantes o microdeterminantes. Entre los factores macrodeterminantes se destacan los medioambientales y los sociales (Flauzino y cols., 2009). Kouri y cols. propusieron una hipótesis integral para el desarrollo de epidemias de FHD en la que la intersección de tres grupos de factores -dependientes del virus, dependientes del hospedero y dependientes del ambiente- determinan la ocurrencia de las epidemias de DEN severo a través de un complejo mecanismo en que estos actúan recíprocamente (Kouri y cols., 1989). Entre los factores dependientes del ambiente se destacan los factores epidemiológicos (susceptibilidad de las poblaciones, etc.) y ecológicos (como la densidad de mosquitos adultos hembras, los sitios de producción, frecuencia de picadas, etc.), los cuales son reconocidos como microdeterminantes.

Exponemos a continuación los factores dependientes del virus y del hospedero.

#### *Factores dependientes del virus*

Está demostrado que en la patogénesis de la infección por DEN el virus también juega un papel importante (Clyde y cols., 2006). Se han identificado serotipos, genotipos, cepas con mayor potencial patogénico, y hasta proteínas virales que se asocian a agravamiento en el paciente (Martina y cols., 2009). Se ha descrito un gradiente de severidad para los serotipos virales durante la infección secundaria: DEN2>DEN3>DEN1>DEN4. Además, los genotipos asiáticos de DEN 2 y 3 parecen ser más virulentos que los circulantes en el continente americano. Cambios aminoacídicos en las proteínas E y prM se han asociado a una mayor capacidad replicativa de algunos genotipos en células humanas. Adicionalmente, variantes

mutantes del virus pueden escapar eficazmente de la neutralización por los anticuerpos, o modular las funciones efectoras específicas de las células T (Guzmán y cols., 2000).

Se ha descrito en diferentes investigaciones el efecto directo de proteínas virales sobre el daño tisular, o en la evasión de la respuesta inmune del hospedero. En este sentido, la interacción de NS1 recombinante con el STAT-3 $\beta$  de CD4 conduce a un incremento de la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6, dos citoquinas estrechamente relacionadas a la inmunopatología de la FHD/SCD (Chua y cols., 2005). Se ha asociado la reactividad cruzada de anticuerpos IgM anti-NS1 con las plaquetas (Cheng y cols., 2009). Altos niveles plasmáticos de NS1, encontrados en períodos tempranos de la enfermedad, podrían correlacionarse con el desarrollo de las formas más severas de la enfermedad (Young y cols., 2000; Alcon y cols., 2002; Libraty y cols., 2002b; Avirutnan y cols., 2006), al activar el complemento y contribuir a la disfunción vascular (Kurosu y cols., 2007). Además, las proteínas prM, NS2b, NS3 y C median apoptosis en células infectadas (Duarte dos Santos y cols., 2000; Catteau y cols., 2003; Shafee y AbuBakar, 2003; Limjindaporn y cols., 2007; Nasirudeen y Liu, 2009; Netsawang y cols., 2009). Las proteínas NS2a, NS4b y NS5 bloquean la transducción de señales inducidas por IFN aparentemente por disminuir la fosforilación o favorecer la degradación de STAT1/STAT2 (Jones y cols., 2005; Ashour y cols., 2009). La NS5, por su parte, se ha demostrado también induce la transcripción y traducción del gen de IL-8, potente mediador proinflamatorio (Rawlinson y cols., 2009).

#### *Factores dependientes del hospedero*

Los factores de riesgo individuales determinan la expresión de la enfermedad en una persona particular en una población dada. La presencia o ausencia de estos factores en la matriz de determinantes epidemiológicos y virales define si una persona con una infección secundaria por DEN desarrolla un cuadro clínico de FHD. Se han descrito un conjunto de factores dependientes del hospedero que se asocian a la FHD, entre los cuales se destacan:

- La infección secuencial

La infección secundaria heterotípica, o sea, causada por un serotipo viral diferente al de la primoinfección, es considerada el principal factor de riesgo individual para el desarrollo de la FHD/SCD (Halstead, 2007). Se le da especial valor al hecho de la presencia de anticuerpos IgG que reconocen de forma cruzada las proteínas E y prM del nuevo serotipo infectante pero no son capaces de neutralizar al virus. El inmunocomplejo anticuerpo-virus facilita la entrada de los virus a las células mieloides susceptibles y provoca un aumento de la multiplicación viral y la diseminación de la infección (Halstead, 2003). El papel de este fenómeno conocido como ADA, es fundamentalmente apoyado por el desarrollo de la FHD en recién nacidos hijos de madres inmunes. Los anticuerpos transferidos o naturalmente adquiridos de la madre al feto sensibiliza a los neonatos y

los hace más susceptibles a padecer la FHD durante una infección primaria con otro serotipo al que la madre padeció (Simmons y cols., 2007).

Durante la infección secundaria heterotípica las células T de reactividad cruzada aportan un papel esencial en la disfunción endotelial que causa la extravasación de líquidos y agravamiento del paciente (Mathew y Rothman, 2008).

La secuencia de los virus infectantes se ha asociado a la severidad en las epidemias por DEN. Alvarez y cols. demostraron que el antecedente de una infección por DEN 1 implica una mayor severidad en epidemias cubanas (Alvarez y cols., 2008a). Por otra parte, una infección secundaria por virus DEN 2 ha sido involucrada en mayor riesgo de FHD (Guzman y cols., 1999). Así mismo, un intervalo mayor entre las infecciones primaria y secundaria también se han relacionado con una mayor gravedad (Guzman y cols., 2007).

- Edad

La FHD se ha presentado principalmente como una enfermedad de niñez en el sudeste Asiático, mientras que en los países tropicales de Américas afecta a todos los grupos etareos. La primera epidemia de FHD en el adulto se describió por vez primera en Cuba en 1981. En los niños, la FHD se presenta como una infección primaria en lactantes hijos de madres inmunes a DEN y en niños mayores durante la infección secundaria (Halstead, 2007).

En general la enfermedad es más grave y con más letalidad en niños que en adultos. Está reconocido el riesgo de mortalidad de 15 veces superior en niños que adultos durante una infección secundaria por DEN2 (Guzman y Kouri, 2008).

En ancianos una mayor fragilidad capilar y tendencia al sangramiento pudiera hacerlos especialmente susceptibles a la FHD (Garcia-Rivera y Rigau-Perez, 2003)

- Estado nutricional

Algunos autores han sugerido que la desnutrición moderada a severa reduce el riesgo de padecer la FHD/SCD (Thisyakorn y Nimmannitya, 1993), sin embargo, estudios más recientes no apoyan tal hipótesis (Kalayanaroj y Nimmannitya, 2005).

- Raza

Los individuos asiáticos son muy susceptibles a padecer la FHD. Se ha reportado por hallazgos en epidemias cubanas un riesgo reducido de FHD en las personas de color de la piel negro comparado con las personas de color blanco. Estas diferencias en la susceptibilidad al DEN grave entre los distintos grupos étnicos coincide con las observaciones epidemiológicas en el continente africano y las poblaciones negras de las islas caribeñas

(Sierra y cols., 2007b). Diferencias en la respuesta inmune celular frente al virus DEN en diferentes grupos étnicos pudieran explicar en parte esta asociación (Sierra y cols., 2006).

- Factores genéticos

Los factores genéticos se han relacionado a la susceptibilidad de sufrir FHD/SCD o a la protección frente a este cuadro (Coffey y cols., 2009). Variantes alélicas de diferentes genes que codifican receptores celulares (DC-SIGN, FcγRIIa, Receptor de Vitamina D), moléculas involucradas en el reconocimiento o presentación antigénica (HLA clase I y II, TAP), y citoquinas (TNFα, TGFβ1), entre otros, han sido estudiadas y asociadas por diferentes autores a la patogenia de la FHD. En la Tabla 1 se muestran algunos de los resultados más importantes de estudios de polimorfismo genético en el DEN.

Tabla 1. Referencias de estudios de polimorfismo genético humano asociado a la susceptibilidad o protección frente a la infección por DEN.

Gen	Alelo/Genotipo	Protección/Riesgo	Población	Referencias
HLA I	A*0203,A29,A33, B13,B14,B44,B52, B62,B76,B77	<b>Prot (FD)</b>	Tailandia, Cuba, VietNam	(Stephens y cols., 2002) (Loke y cols., 2001) (Paradoa y cols., 1987) (Sierra y cols., 2007a)
	A1, A2, A*0207, A24 B, B46, B51 B48, B57	<b>Riesgo (FHD)</b>	Tailandia, Cuba, VietNam	Stephens, 2002 / Loke y cols., 2001 (Chiewsilp y cols., 1981; Paradoa y cols., 1987) (Lan y cols., 2008) (Vejbaesya y cols., 2009)
HLA II	DRB1*04	<b>Prot (FD)</b>	Mexico	(LaFleur y cols., 2002)
	DQ1, DR1 DRB1*0901 DPB1*0501 DQB1*0302	<b>Riesgo (FHD)</b>	Brasil VietNam	(Polizel y cols., 2004) (Lan y cols., 2008) (Falcon-Lezama y cols., 2009) (Vejbaesya y cols., 2009)
TNFα	-308A	<b>Riesgo (FD + MH)</b>	Venezuela	(Fernandez-Mestre y cols., 2004)
FcγR	131H	<b>Prot(FHD)</b>	VietNam	(Loke y cols., 2002)
VitDR	T	<b>Prot(FHD)</b>	VietNam	(Loke y cols., 2002)
DC-Sign	G	<b>Prot(FHD)</b>	Francia	(Sakuntabhai y cols., 2005)
TAP1	333 Ile y 637Asp	<b>Prot(FHD/SCD)</b>	India	(Soundravally y Hoti, 2008)
TAP2	665 Thr/Ala	<b>Riesgo (FHD)</b>		
MBL2	AA	<b>Riesgo (Trombocitopenia)</b>	Brasil	(Acioli-Santos y cols., 2008)
CTLA-4	+49 G	<b>Riesgo (FHD)</b>	Taiwan	(Chen y cols., 2009)
TGFβ1	-509 CC	<b>Riesgo (FHD)</b>	Taiwan	(Chen y cols., 2009a)

- Enfermedades crónicas

El asma bronquial, la anemia falciforme, y la Diabetes mellitus se han reconocido como factores de riesgo para la ocurrencia de FHD en las epidemias cubanas causadas por DEN 2 y DEN 3 (Bravo y cols., 1987; Valdes y cols., 1999; Gonzalez y cols., 2005). Figueiredo y cols. recientemente demuestran la asociación del asma tratada con esteroides con la FHD en Brasil (OR = 2.94; 1.01–8.54) (Figueiredo y cols., 2010).

Guzmán y cols. reportaron la habilidad aumentada de las CMSP de asmáticos para amplificar la infección por el virus DEN 2 en condiciones de ADA (en presencia de anticuerpos anti-DEN 1) al compararse con un grupo control (Guzman y cols., 1992).

La asociación entre Diabetes y la Silemia con el DEN hemorrágico ha sido explicada por Limonta y cols. a partir de las afectaciones vasculares que tienen de base los pacientes con estas enfermedades crónicas. Esto pudiera condicionar una mayor propensión a las complicaciones en el curso de la infección por DEN (Limonta y cols., 2008; Limonta y cols., 2009).

### **II.1.7- Respuesta inmune e Inmunopatología de la enfermedad**

La infección con un serotipo del virus DEN brinda inmunidad homotípica de por vida. Varios mecanismos de las respuestas innata y adquirida del hospedero parecen estar involucrados en la protección contra la enfermedad y en la recuperación de la infección. La secreción de IFN $\alpha$  y  $\beta$  por las células infectadas y las células NK activadas son procesos de las fases tempranas de la infección que previenen la diseminación del virus y se asocian a un curso clínico benigno (Navarro-Sanchez y cols., 2005).

Las CD activadas secretan citoquinas (IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-12, IL-10) y presentan antígenos virales a las células T CD4+. El virus DEN entra a los monocitos/macrófagos a través de los receptores celulares específicos descritos en dichas células como la proteínas de choque térmico 70 ó 90 (HSP70/90, del inglés *heat-shock protein*) o CD14 (Reyes-Del Valle y cols., 2005). En ese caso el virus parece inducir una producción aumentada de IL-12. Sin embargo, en las CD, se describe una inhibición de la síntesis de IL-12 (Libraty y cols., 2001). En ellas se ha demostrado la presencia de la molécula DC-SIGN reconocida por las partículas virales (Tassaneetrithep y cols., 2003) y los TLRs que interactúan con el ácido nucleico viral (Sun y cols., 2009; Tsai y cols., 2009). Análogo a lo que ocurre en las infecciones bacterianas, la interacción de las señales transmitidas por las moléculas DC-SIGN y los TLRs parecen inducir una disminución de la síntesis de IL-12 y un aumento de IL-10 (Gringhuis y cols., 2007).

Las células de T ejercen dos funciones principales: (1) la producción de citoquinas (IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ ) que juegan un papel crucial en la regulación de las funciones inmunológicas, el desarrollo de una respuesta anti-

viral eficaz, y la activación de células T CD8+, macrófagos y células B, y (2) la lisis de células infectadas. Tanto los linfocitos T CD4+ como los CD8+ son capaces de eliminar células infectadas por mecanismos citotóxicos, lo que contribuye a la recuperación de la infección (Rothman, 2009).

Las células B activadas por virus producen anticuerpos que median las funciones de neutralización del virus extracelular al bloquear la unión o fusión de la envoltura viral a su receptor en la membrana plasmática celular, pero también son capaces de mediar la eliminación de células infectadas por virus a través de un mecanismo de citotoxicidad celular (ADCC) o de citólisis mediada por complemento (CMC) (Laoprasopwattana y cols., 2007). La presencia de anticuerpos neutralizantes al serotipo viral (Vaughn y cols., 2000) o anticuerpos mediadores de ADCC (Laoprasopwattana y cols., 2007) se han asociado a mejor curso clínico de la infección. Además, los anticuerpos IgM e IgG se unen a los antígenos virales solubles y favorecen la eliminación de estos de la circulación por células fagocíticas.

La patogenia de la FHD/SCD es todavía controversial, compleja y no se encuentra completamente bien esclarecida. Dos propuestas, apoyadas por evidencias de laboratorio y epidemiológicas, que no se pueden excluir mutuamente, citan a la respuesta inmune frente a la infección secundaria versus la virulencia del virus como factores determinantes en la progresión hacia las formas severas de la infección por DEN. La más aceptada es la infección secundaria que genera la ADA. Una infección con un serotipo del virus DEN induce la formación de anticuerpos heterotípicos que reaccionan cruzadamente con el resto de los serotipos. Estos anticuerpos heterotípicos en concentraciones subneutralizantes son capaces de reconocer epítopes presentes en los nuevos virus y, al formar inmunocomplejos, facilitar su penetración en los monocitos/macrófagos. Se plantea que la infección se amplifica, pues los inmunocomplejos pueden acceder con más facilidad a los receptores Fc, favoreciendo que un mayor número de células sean infectadas (Hastead, 1989).

El fenómeno de ADA ha sido asociado a un cambio en el tropismo celular del virus y a un aumento del número de células infectadas lo que, en consecuencia, repercute en una mayor producción de virus (Tan y Alonso, 2009). Las células infectadas supuestamente liberan mediadores que participan en la hiperpermeabilidad vascular, el choque hipovolémico y la muerte (Kurane, 2007). Sin embargo, la importancia de este fenómeno sólo ha sido apoyada *in vivo* por la evidencia de anticuerpos anti-DEN de madres inmunes que sensibilizan a sus neonatos a padecer FHD durante una infección primaria (Chau y cols., 2008). Goncalvez y cols, demostraron que la interacción entre la región Fc del anticuerpo y el receptor Fc $\gamma$  son necesarias para que tenga lugar, *in vitro*, el fenómeno de ADA (Goncalvez y cols., 2007). Recientemente, Balsitis y cols. evidenciaron en un modelo en ratones que, tras ser infectados estos animales por DEN eran capaces de desarrollar un aumento de la permeabilidad vascular y letalidad atribuible a la ADA (Balsitis y cols., 2010).

La importancia de la ADA en el desarrollo de la FHD/SCD ha sido sustentada fundamentalmente por experiencias epidemiológicas en las que nuestro país presenta un relevante papel por los estudios realizados durante las epidemias cubanas de DEN (Guzman y cols., 1984; Guzman y cols., 1999; Gonzalez y cols., 2005). Sin embargo, la ADA no logra explicar la descarga masiva de citoquinas o la activación importante de células efectoras que caracterizan la enfermedad. Una regulación inadecuada de las células T se asocia a la estimulación heterotípica de estas durante la infección secuencial.

Clones de linfocitos T de memoria de reactividad cruzada se expanden preferentemente durante una infección secundaria al tener un menor umbral de activación (Green y Rothman, 2006), conduciendo a una elevada producción de citoquinas (Chaturvedi y cols., 2000; Mongkolsapaya y cols., 2003; Simmons y cols., 2005)(Screaton y Mongkolsapaya, 2006). Estas células de menor afinidad además son potencialmente menos eficientes aclarando virus (Imrie y cols., 2007).

Niveles elevados de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  se han asociado significativamente a la gravedad de la enfermedad y se correlacionan con la activación de las células T. De hecho, se han encontrado aumentados durante la infección natural los marcadores de activación de células T CD69, CD38 y CCR7 (Mathew y Rothman, 2008). Se ha constatado un aumento de la activación de células T CD8 $^{+}$  efectoras, las cuales se ha demostrado son importantes en el control de la infección viral (Yauch y cols., 2009), sin embargo, una intensa proliferación de estas células se ha implicado en la patogénesis del DEN (Rothman, 2003).

Una cascada de citoquinas (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, RANTES, MCP-1 y VEGF) con acción pro-inflamatoria o anti-inflamatoria, contribuyen a complicaciones de la FHD/SCD como la fuga capilar, al actuar directamente sobre la permeabilidad de las células endoteliales vasculares (Green y cols., 1999b; Bosch y cols., 2002; Nguyen y cols., 2005; Chaturvedi, 2006; Seet y cols., 2009)(Talavera y cols., 2004; Azizan y cols., 2006; Basu y Chaturvedi, 2008). Los niveles elevados de TNF $\alpha$  e IL-10 parecen estar involucradas en la patogénesis de la trombocitopenia y las manifestaciones hemorrágicas (Libraty y cols., 2002).

Por otra parte, varios autores han defendido el papel de la respuesta Th2 en la patogénesis de la FHD. Un cambio de respuesta Th1 predominante en el 66% de los pacientes de FD a respuesta Th2 dominante en el 71% de los pacientes con FHD grado IV, ha sido sustentado por el grupo de Chaturvedi y cols. desde finales de la década del 90 (Chaturvedi y cols., 1999; 2000; 2009). Los estudios de este grupo mostraron un incremento máximo en los niveles de IL-4, IL-6 e IL-10 en casos con FHD grado IV, mientras los mayores niveles de IFN $\gamma$  e IL-2 fueron detectados en los pacientes con FD. Otros trabajos publicados han tratado de apoyar esta hipótesis refiriendo la existencia de elevados niveles de IL-13 e IL-18 (Mustafa y cols., 2001) y TGF- $\beta$

(Agarwal y cols, 1999), o un incremento en la expresión del gen de IL-13 en la FHD durante la defervescencia (Simmons y cols., 2007).

Estudios *in vitro* realizados con leucocitos humanos infectados con el virus también proponen un cambio de patrón Th1 a Th2, basado en un predominio de TNF $\alpha$ , IL-2, e IL-6 en los primeros 2 días de cultivo con el virus, seguido por un incremento de IFN $\gamma$  entre el 2 do y 3er días para pasar luego a un aumento de IL-10 e IL-5 el 4to día y de IL-4 en el día 6 (Chaturvedi y cols., 1999), mientras otros demuestran la inhibición de la liberación de IL-12 e IFN $\gamma$  en condiciones de ADA (Chareonsirisuthigul y cols., 2007). Además, el pretratamiento de monocitos con IL-4 e IL-13 aumenta la susceptibilidad de las células a la infección por DEN (Millar y cols., 2008). Chen y cols. (2007) por su parte, sugieren que una respuesta predominante Th1 con alta producción de IFN $\gamma$  lleva a FD sin complicaciones hemorrágicas, mientras una respuesta Th2 se asocia a FD con manifestaciones hemorrágicas y a FHD con extravasación de plasma, sin embargo se refiere a Th2 teniendo en cuenta los niveles de IL-10 en el plasma de los pacientes.

Se ha sugerido la acción de los inmunocomplejos Ig-proteína NS1 en la activación del complemento y la liberación de C3a y C5a, con efecto directo sobre la permeabilidad vascular (Avirutnan y cols., 2006). Otros mediadores solubles como el PAF, las prostaglandinas y metabolitos del estrés oxidativo parecen estar involucrados también en la génesis de la gravedad (Preeyasombat y cols., 1999; Soundravally y cols., 2008; Souza y cols., 2009).

Anticuerpos específicos a las proteínas E, NS1 o prM son capaces de reconocer de forma cruzada plaquetas y endotelio vascular y ser causantes de daño a través de citotoxicidad o apoptosis (Lin y cols., 2006). Se ha explicado este fenómeno a partir de un mimetismo molecular entre las proteínas virales y factores de la coagulación, plasminógeno y moléculas de adhesión expresadas sobre las plaquetas y células endoteliales (Lin y cols., 2006).

De esa forma, ante una infección secundaria heterotípica ocurre la reactivación de clones de células B y T de memoria, que aumentan la producción de anticuerpos pobremente o no neutralizantes y células T de reactividad cruzada que reconocen los péptidos virales con baja avidéz. Este fenómeno conocido como pecado original contribuye a la diseminación de la infección viral y a una exagerada liberación de citoquinas proinflamatorias y capacidad citotóxica sub-óptima (Monkgolsapaya 2003).

Los estudios en fallecidos tratan de dilucidar los mecanismos que llevan a la gravedad y a la muerte al paciente. De estos un 81% se limitan al estudio de los hallazgos anátomo-patológicos y a la detección de antígenos o

ácido nucleico viral, el 15% aborda el tema de la apoptosis en los tejidos y sólo un trabajo explora la presencia de mediadores de respuesta inmune como las citoquinas (de Macedo y cols., 2006).

Diferentes investigaciones han tratado de identificar las dianas virales de la respuesta inmune celular. Las células T CD4<sup>+</sup> reconocen péptidos de las proteínas NS3, E, NS1, NS4a y C (Mangada y Rothman, 2005). Epítopes de células T citotóxicas efectoras también han sido reconocidos en diferentes proteínas, incluyendo la NS3, la NS5, NS1, NS2a y C (Green y cols., 1997; Mathew y cols., 1998; Gagnon y cols., 1999; Spaulding y cols., 1999; Imrie y cols., 2007)

### **II.1.8- Diagnóstico**

El diagnóstico de laboratorio del DEN puede realizarse a través de: el aislamiento del virus, la detección de su genoma o de antígenos virales, y la serología, esta última la más ampliamente aplicada en el diagnóstico rutinario (Teixeira y Barreto, 2009).

El aislamiento del virus suele realizarse en los sueros colectados en la fase aguda de la enfermedad o de los tejidos (hígado, bazo, linfonodos, pulmón, o timo) obtenidos de la necropsia. Para el aislamiento se inocula la muestra en líneas celulares de mosquito o por inoculación directa en el mosquito. La inoculación intracerebral en ratones lactantes es el método más viejo y sensible para el aislamiento viral. Un ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpos serotipo-específicos permite la identificación del virus; sin embargo, la RCP o el ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA, del inglés, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) también pueden ser empleados (Domingo y cols., 2009).

Detección de antígeno: Se ha demostrado que la detección de NS1 mediante técnicas de ELISA puede emplearse como un marcador de diagnóstico durante la fase temprana de la infección. Por otro lado, técnicas inmunohistoquímicas son útiles para la detección de antígeno de DEN en muestras del tejido de los casos fatales (de Araujo y cols., 2009).

Detección del Genoma: Mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) puede detectarse el ARN viral directamente de muestras clínicas como: el suero, el plasma, o los tejidos. En la actualidad la RCP en tiempo real está suplantando a la RCP convencional por su sensibilidad y rapidez (Sadon y cols., 2008; Anwar y cols., 2009).

Diagnóstico serológico: Durante una infección del DEN primaria, los anticuerpos IgM anti-DEN se detectan 5 a 6 días después del inicio de la fiebre, y persiste entre 30 y 60 días. La IgG se hace detectable al noveno a décimo día después del inicio de la fiebre. Por el contrario, en una infección secundaria, hay un rápido aumento de la IgG (1 o 2 días después del inicio de la fiebre) (Guzman y Kouri, 2004). Para definir serológicamente el

serotipo infectante es necesario determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes por un ensayo de reducción del número de placas (Guzman y Kouri, 2004).

## **II.2. Reseña de las citoquinas y su papel en la respuesta inmune**

Citoquinas es un termino que describe proteínas de bajo peso molecular (por lo general menos de 30 kDa) organizadas en familias estructuralmente diversas que actúan mediando interacciones complejas entre células principalmente del sistema inmunitario de origen linfoide, células inflamatorias y células hematopoyéticas. Las citoquinas “controlan” el sistema inmune y sus funciones son muy variadas: activación, proliferación, diferenciación y maduración de células, comunicación entre células del sistema inmunitario y en algunos casos, ejercen funciones efectoras directas como la apoptosis. Aunque su fuente primaria son los leucocitos, pueden ser producidas por otras muchas células. Son moléculas pleiotrópicas, es decir, que la misma citoquina es capaz de actuar en múltiples tipos celulares. Inician su acción tras unirse a receptores celulares específicos de la superficie celular a los cuales se asocian con una elevada afinidad ( $K_a=10^{-10}$ - $10^{-12}$ ), y en consecuencia hacen falta cantidades muy pequeñas de citoquinas para saturar los receptores. La mayoría de las respuestas celulares a estas moléculas son lentas, ocurriendo en período de horas y requieren síntesis de novo de ARNm y proteínas (Detrick y cols., 2008).

Las citoquinas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad innata y específica y sirven para regular las respuestas inmunitarias. Su producción y secreción es un hecho breve y autolimitado y sus actividades funcionales son redundantes, pues distintas citoquinas pueden producir el mismo efecto. Algunas citoquinas inducen la síntesis de otras, lo que conlleva a la producción de cascadas en la que la segunda o tercera citoquina puede mediar el pretendido efecto de la primera.

Algunas citoquinas pueden influir sobre el efecto de otras a través de un efecto antagonista o sinérgico.

Las citoquinas pueden clasificarse funcionalmente como:

- Proinflamatorias: que estimulan las reacciones inflamatorias y caracterizan o favorecen un patrón de respuesta Th1: IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  (Dinarello, 2000)
- Anti-inflamatorias o reguladoras de la inmunidad: TGF $\beta$ , IL-10 (Opal y DePalo, 2000)
- Las predominantes en un patrón Th2: IL-4, IL-13, IL-5
- Quimioquinas: que atraen quimiotácticamente a leucocitos a las zonas de inflamación y comprenden más de 50 proteínas conocidas

- Estimuladoras de la proliferación y diferenciación de leucocitos maduros, siendo activadores potentes del crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas como SCF, IL-3, IL-7, G-CSF, GM-CSF, M-CSF.

Describimos a continuación características de algunas citoquinas:

### IL-12

La IL-12 es un heterodímero formado por dos cadenas codificadas por genes distintos: una cadena pesada de 40 kDa (p40) (cromosoma 5) y otra ligera de 35 kDa (p35) (cromosoma 3), unidas covalentemente. Las CD maduras y los macrófagos son las fuentes más importantes de esta citoquina reconocida como el principal regulador de la respuesta inmune adaptativa. Juega un papel central en la respuesta inflamatoria temprana a la infección y en la generación de células Th1, lo cual favorece la inmunidad mediada por células. La producción aumentada de IL-12 se ha asociado a la patogénesis de enfermedades inflamatorias autoinmunes como: la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus y la artritis (Jana y Pahan, 2009). Aunque la actividad biológica de la IL-12 se asociaba al heterodímero, la cadena p40 es secretada de 10 a 100 veces más, lo cual parece actuar en el control biológico de esta citoquina, y cuenta con acciones biológicas aditivas que no tiene la molécula completa (Jana y cols., 2009). El gen de la subunidad IL-12 p40 se localiza en el cromosoma 5q 31.1-33.1 y se han descrito 4 puntos polimórficos en este en las posiciones 641 (A/G), 684 (C/T), 1094 (T/C), y 1132 (G/C), con posibles implicaciones en sus niveles de expresión. En la infección por DEN se han estudiado los niveles de esta citoquina *in vivo* durante la infección natural (Green y cols., 1999; Pacsa y cols., 2000; Braga y cols., 2001; de Kruif y cols., 2008), así como en experimentos *in vitro* (Ho y cols., 2001; Libraty y cols., 2001; Sun y cols., 2006).

### IL-10

La IL-10 es un miembro de una familia de citoquinas que incluyen la IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 y la IL-26. Inicialmente se identificó como un producto de los clones murinos de células Th2 que inhiben la producción de clones Th1. La principal acción biológica de la IL-10 parece ser ejercida sobre las CD y los macrófagos. Esta citoquina es un potente inhibidor de la presentación antigénica, inhibe la expresión de moléculas MHC II y la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. De esta forma, suprime la inducción de células Th1 y la liberación por estas de IFN $\gamma$  e IL-2. Además, la IL-10 tiene un potente efecto inhibitorio sobre la producción de citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, IL-12, y TNF $\alpha$  de los macrófagos y CD (Rajasingh y cols., 2006). En su acción sobre las células T vírgenes la IL-10 causa inhibición de la vía de transducción por la molécula CD28. Aunque la función fundamental de esta citoquina es suprimir la respuesta

inmune, también promueve efectos estimulantes al favorecer la activación de los linfocitos B, prolongando su supervivencia y contribuye al cambio de clase de inmunoglobulinas (Scumpia y Moldawer, 2006). El gen que codifica la IL-10 se encuentra en el cromosoma 1, habiéndose descrito diversos polimorfismos en la región promotora: -1082 (G/A), -819 (C/T) y -592 (C/A), si bien se ha demostrado que los polimorfismos en los pb -592 y -819 están en completo desequilibrio de ligamiento. Se ha comprobado que en la mutación en posición -1082, el cambio de G por A conlleva modificaciones en la síntesis de esta citoquina ya que en los pacientes homocigóticos GG la producción es significativamente superior que en los sujetos homocigóticos que poseen un residuo de A en dicha posición. Por otra parte, los sujetos homocigóticos CC en posición -592 tienen la más elevada liberación de esta citoquina (Ollier, 2004a). La mayoría de los estudios que exploran el papel de esta citoquina en el DEN sugieren su papel patogénico durante la infección (Green y cols., 1999b; Azeredo y cols., 2001; Libraty y cols., 2002; Mongkolsapaya y cols., 2003; Chen y cols., 2005; Chen, 2006; Palmer y cols., 2005; Chareonsirisuthigul y cols., 2007; Reis y cols., 2007).

#### IFN $\gamma$

Los interferones (IFN) son mejor conocidos por sus funciones en los mecanismos de defensa del hospedero. Los IFN tipo I incluyen la familia alfa, beta, omega, -kappa y Limitin y son moléculas muy importantes en el control de las infecciones virales. El grupo de IFN tipo II sólo incluye el IFN $\gamma$ , citoquina que ejerce efectos inmunoreguladores, anti-proliferativos y pro-inflamatorios cardinales en numerosos mecanismos de la respuesta inmune. El IFN $\gamma$  es producido fundamentalmente por linfocitos T activados y células NK y tiene receptores virtualmente sobre todas las células del organismo. Ejerce un sinnúmero de efectos biológicos, entre ellos se destacan que es el principal activador de los macrófagos y también activa las células endoteliales, estas dos actividades son la base del papel pro-inflamatorio de esta citoquina. La función reguladora de esta molécula sobre la fase antígeno-específica deriva de su efecto sobre las células presentadoras de antígeno y sobre los linfocitos B y T. El IFN $\gamma$  aumenta la expresión de moléculas MHC en las células presentadoras tanto profesionales como facultativas y sus efectos sobre la proliferación y la diferenciación de las células B y T son complejos. Este es un marcador de las células de fenotipo Th1, las cuales se asocian a la respuesta inmune contra patógenos intracelulares, pero también a la inmunopatología de enfermedades autoinmunes y asociada a infecciones a través de una Hipersensibilidad tipo IV. La producción de esta citoquina es genéticamente controlada, conociéndose dos polimorfismos en su gen codificante. La posición 12 (C/A) de la región no codificante del primer intrón se asocia a altos niveles de la citoquina *in vitro*. Este alelo está en completo desequilibrio de ligamiento con la posición +874 (T/A), sitio de unión del factor de la transcripción NF- $\kappa$ B, lo

cual determina que los alelos T y A en esa posición se asocien a alta o baja expresión de IFN $\gamma$ , respectivamente. En la infección por DEN se describe una relación entre elevados niveles de IFN $\gamma$  y la gravedad de la enfermedad por varios autores (Kurane y cols., 1989; Kurane y cols., 1991; Kurane y cols., 1995; Imrie y cols., 2007; Bozza y cols., 2008; Dejnirattisai y cols., 2008), mientras su papel en el control de la infección también ha sido demostrado (Diamond y cols., 2000; Mangada y cols., 2002; Mangada y Rothman, 2005)

### TNF $\alpha$

El Factor de Necrosis Tumoral alfa, también conocido como caquectina, juega un papel central en la inflamación, la apoptosis, y el desarrollo del sistema inmune. Es producido por una amplia variedad de células epiteliales y del sistema inmunitario. La mayoría de los miembros de la superfamilia son proteínas transmembrana tipo II. Consta de un dominio citoplasmático de 35 aa, un segmento transmembrana de 21 aa y un dominio extracelular de 177 aa. El dominio extracelular puede ser escindido por metaloproteinasas específicas (TACE/ADAM17) para generar citoquinas solubles de 55 kDa. Esta molécula soluble se une a sus receptores de membrana TNF RI (ampliamente diseminado) y TNF RII (restringido a células hematopoyéticas). El TNF $\alpha$  produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Esto lleva al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetaria y, probablemente, la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral, de donde proviene el nombre. Además, el TNF $\alpha$  regula el desarrollo del tejido linfoide a través del control de la apoptosis y es una citoquina clave en el desarrollo de enfermedades inflamatorias (Apostolaki y cols., 2010). Diversos polimorfismos han sido identificados en el gen que codifica el TNF $\alpha$  y que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6, lo cual explicaría que la producción de TNF $\alpha$  varíe de un paciente a otro. De todos ellos, de especial interés y ampliamente estudiados es el polimorfismo en la región promotora del gen que codifica el TNF $\alpha$ , en la posición -308, es decir, 308 nucleótidos antes de que empiece la región transcritora. Normalmente, este lugar está ocupado por un residuo de G pero en un menor % de personas está ocupado por A. Dado que existen dos copias en el cromosoma, esta mutación puede ser G/G, G/A o A/A. La presencia del alelo A se asocia con una mayor producción *in vitro* de TNF $\alpha$ . Existen otros polimorfismos descritos en esta región promotora pero no se traducen en general en modificaciones en la producción del TNF $\alpha$  y han sido escasamente estudiados (Falvo y cols., 2010). Numerosas referencias apoyan el papel decisivo del TNF $\alpha$  en la patogénesis de la gravedad en la infección por DEN (Green y cols., 1999; Gagnon y cols., 2002; Azeredo y

cols., 2001; Libraty y cols., 2003; Fernandez-Mestre y cols., 2004; Chen y cols., 2007; Kurane, 2007; Wang y cols., 2007; Yen y cols., 2008).

### TGF $\beta$

El TGF- $\beta$  es una familia de citoquinas pleiotrópicas que secretan virtualmente todos los tipos celulares e incluye TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y TGF $\beta$ 3. Son muy conservadas evolutivamente y detectables en cualquier sitio del organismo jugando un papel en casi todos los procesos biológicos. Estas citoquinas actúan como controladores celulares que regulan procesos como la función inmune, la proliferación, diferenciación, morfogénesis, migración y la transición mesénquimo-epitelial. TGF $\beta$ 1 está involucrado en la hematopoyesis, la diferenciación endotelial y es crucial en la modulación de la respuesta inmunitaria (Taylor 2009). Se han identificado varios polimorfismos nucleotídicos puntuales en el gen de TGF $\beta$ 1. Estos incluyen un sitio en el promotor del gen -509 (C/T) y dos dentro de la región codificante: codón 10 (T/C) y codón 25 (G/C). En los dos últimos sitios, el cambio nucleotídico define un cambio aminoacídico, siendo Leu/Pro para el codon 10 y Arg/Pro para el codón 25. Los alelos T(c10) y G(c25) se asocian a un nivel de expresión mayor de la citoquina. Varios estudios han asociado al TGF $\beta$ 1 con el cuadro grave por DEN, al encontrarse sus niveles elevados en los pacientes con FHD/SCD (Laur y cols., 1998; Agarwal y cols., 1999; Azeredo y cols., 2006b).

### IL-6

La IL-6 es expresada por diversas células incluyendo los monocitos/macrófagos, linfocitos T, fibroblastos y células endoteliales. Participa en la fisiopatología de enfermedades inflamatorias y vasculares con alteraciones hemodinámicas. Controla la secreción hepática de la Proteína C Reactiva y participa en la activación de Linfocitos T y B. Aunque han sido identificados diversos polimorfismos en la región promotora del gen de la IL-6 que se encuentra en el cromosoma 7, sólo se ha evaluado en su relación con enfermedades el localizado en la posición -174 (G/C). El alelo G se asocia con niveles más elevados de IL-6 en adultos sanos (Shi y cols., 2006). La IL-6 también se ha vinculado a la respuesta inflamatoria sistémica exacerbada y a la coagulopatía en la infección por DEN (Suharti y cols., 2002; Chen y cols., 2006; Rachman y Rinaldi, 2006; Restrepo y cols., 2008a; Levy y cols., 2010; Priyadarshini y cols., 2010)

### IL-4

Es sintetizada como parte del patrón Th2 por las células T y participa en la cooperación con los linfocitos B, favoreciendo su activación, crecimiento y diferenciación. Estimula en estas células un cambio de isotipo de Ig a IgE. Actúa con la IL-3 en la proliferación de mastocitos y es considerado también un factor de crecimiento y diferenciación de Linfocitos T. El promotor del gen de la IL-4 contiene un polimorfismo en la posición -590 (C/T) que se ha probado tiene influencia sobre los niveles de IL4 así como en el incremento de los títulos de

IgE total. Se ha demostrado la presencia de IL-4 en células sanguíneas de pacientes de DEN y cultivos *in vitro* con el virus (Chaturvedi y cols., 1999; Gagnon y cols., 2002; Mabalirajan y cols., 2005; Bozza y cols., 2008).

### **II.3. Mecanismos efectores de citotoxicidad celular en la respuesta inmune anti-viral**

Las células citotóxicas reconocen y destruyen células infectadas por virus mediante un mecanismo conocido como citotoxicidad celular. Esta función es ejercida por células NK y células T citotóxicas (Tc). El 90% de estos linfocitos T son CD8+.

Las células NK son capaces de reconocer células anormales a través de una variedad de receptores de activación (Hamerman y cols., 2005). Estas forman dos tipos distintos de sinapsis inmunológicas: una sinapsis de activación que dirige la secreción de citoquinas y liberación del contenido de los gránulos hacia la célula diana de la citotoxicidad, y una sinapsis inhibitoria, la cual previene la iniciación de estos procesos (Krzewski y Strominger, 2008). Una célula NK puede establecer ambas sinapsis con dianas susceptibles y resistentes respectivamente al mismo tiempo, matando sólo aquellas que son susceptibles (Davis y Dustin, 2004). Muchos de los ligandos reconocidos por los receptores de activación son expresados por células normales. Para prevenir el daño a la célula normal, las células NK expresan receptores inhibitorios, muchos de los cuales reconocen moléculas MHC I (Krzewski y Strominger, 2008). Durante la infección viral las moléculas MHC I son reguladas negativamente por una variedad de mecanismos, lo cual evita el reconocimiento temprano por los linfocitos Tc (Lorenzo y cols., 2001) y conlleva a la muerte de células diana mediada por células NK.

En la células T el proceso de reconocimiento se efectúa a través del receptor específico (TcR) que reconoce a los péptidos de proteínas virales asociados a las moléculas MHC-I. Cerca del 10% de los linfocitos Tc son CD4+ y reconocen el Ag sobre MHC-II. Los linfocitos Tc en reposo, al activarse apropiadamente, terminan diferenciándose a los llamados linfocitos T citolíticos (CTL), que son los efectores de la inmunidad celular específica. Tanto los linfocitos Tc como las células NK presentan gránulos citolíticos lisosomales que contienen proteínas capaces de penetrar en el citoplasma de la célula diana e iniciar una cascada de eventos que resultan en una destrucción controlada (Raja y cols., 2003a). Además de las células T CD8+, existen en la sangre periférica humana un subset de células T CD8+ con los marcadores celulares de las NK (células T tipo NK) (Takayama y cols., 2003).

El proceso apoptótico, ampliamente vinculado a la eliminación de células infectadas durante la infección viral, puede dividirse en tres fases: la iniciación, en la que la célula recibe un estímulo que puede activar la cascada apoptótica; la ejecución, donde las señales de muerte son irreversibles; y la degradación, en que la célula presenta los cambios bioquímicos y morfológicos del estado final de la apoptosis. Este proceso de muerte

celular es regulado por un grupo de proteínas citoplasmáticas miembros de la familia Bcl-2, que tienen funciones anti y proapoptóticas (Wyllie, 2010).

*Gránulos citolíticos que median apoptosis:*

Los gránulos citolíticos contienen un grupo de proteínas cuya función es activar pro-enzimas, alterar la membrana celular de la célula diana, actuar como moléculas chaperonas protegiendo a los linfocitos Tc de sus propios mecanismos citolíticos e iniciar la apoptosis en la célula diana (Lieberman, 2003b):

Granzima B:

Las granzimas el componente clave de los gránulos citolíticos y son responsables de la iniciación de muchos de los eventos asociados a la apoptosis que ocurren en la célula diana durante la destrucción por células citotóxicas. Estas son miembros de la familia serina proteasa estructuralmente relacionadas a la quimotripsina y exhiben las características catalíticas de la tríada His-Asp-Ser en el sitio activo (Sattar y cols., 2003). Son producidas como zimógenos y activadas por una proteasa localizada en los gránulos, la Catepsina C, mediante el corte de un péptido N terminal (Brown y cols., 1993). La granzima B es el miembro más ampliamente estudiado de la familia de las granzimas, y es un potente activador de la apoptosis dependiente e independiente de las caspasas. Inician la vía dependiente de caspasas mediante el corte de la proteína Bcl-2, después del corte son transportadas hacia la mitocondria donde tiene lugar la liberación del citocromo c (Heibein y cols., 2000; Sutton y cols., 2000; Wang y cols., 2001). Este último dispara la formación del apoptosoma y libera una cascada de eventos que dan lugar a la apoptosis (van Gurp y cols., 2003; Saelens y cols., 2004; Cullen y Martin, 2008). Además del citocromo c, otros mediadores de apoptosis son también secretados por la mitocondria. Por ejemplo, el factor inductor de apoptosis y la Endonucleasa G, los cuales son transportados al núcleo para mediar la condensación de la cromatina y la fragmentación del ácido desoxiribonucleico (ADN) (Li y cols., 2001; Widlak y cols., 2001)

Perforina:

Es el componente mayoritario de los gránulos citolíticos y permiten la entrada de las granzimas hacia el interior del citoplasma de la célula hospedera. Experimentos en ratones muestran que los linfocitos Tc deficientes en perforina tienen comprometida su actividad citolítica mediada por los gránulos, siendo susceptibles a la infección por patógenos intracelulares y a la formación de tumores (Kägi y cols., 1994; van den Broek y cols., 1996). La perforina es activada al escindir su extremo C terminal, se polimeriza en presencia de  $Ca^{2+}$  y es capaz de formar poros en las membranas lipídicas (Voskoboinik y Trapani, 2006), esto permite que las granzimas entren a la célula diana por difusión pasiva. La granzima B puede encontrarse formando un complejo de ~300 kDa con el proteoglicano serglycina, dificultando su entrada al citosol a través del poro (Metkar y cols., 2002).

Se ha visto, sin embargo, que la granzima B puede penetrar a las células por un mecanismo perforina independiente y sólo ejercer sus efectos cuando la perforina se adiciona al medio (Pipkin y Lieberman, 2007).

FasL:

Además de los mecanismos citotóxicos mediados por los gránulos, los linfocitos Tc utilizan la vía de activación a través de “receptores de muerte”. Estos receptores son activados por miembros de la superfamilia del TNF como el TNF $\alpha$  (TNFSF1A), FasL (TNFSF6) y TRAIL (TNFSF10) conduciendo a una cascada de eventos intracelulares (Ware, 2003). Tras la síntesis de la proteína FasL, esta es mantenida en almacenes intracelulares que son liberados tras la activación celular. Las metaloproteinasas de la matriz celular causan la proteólisis de FasL de la superficie celular. El FasL soluble, generado por corte alternativo del ARN mensajero, se ha demostrado ser funcionalmente activo contra células altamente sensibles a la apoptosis mediada por Fas, y se sugiere estar involucrada en daño histico (Nagata y Golstein, 1995a). Cuando una célula que expresa la molécula Fas encuentra a otra que expresa el FasL, la molécula receptora forma un trímero para unir el ligando, y actúan reclutando al FADD (proteína de dominio de muerte asociada al Fas). Además del dominio de muerte, el FADD tiene un dominio efector de muerte (DED) capaz de reclutar y escindir la procaspasa-8 a su forma activa, la caspasa 8 (Krammer, 2000). La concentración que se genera de la caspasa 8 determina cual de los dos caminos seguir hacia la apoptosis. Si los niveles son altos, ella directamente escinde a la caspasa-3 (Maher y cols., 2002). La ADNasa activada por caspasa 3 queda libre en el núcleo y corta al ADN en longitudes de aproximadamente 180 pares de bases (Ju y cols., 1999). La caspasa-9 escinde a la caspasa-3 y se activa el mecanismo descrito anteriormente. Los inhibidores de la apoptosis Bcl-2 y Bcl-X bloquean este mecanismo a través de la vía mediada por BID pero no por la vía directa de las caspasas (Maher y cols., 2002). Existen otro grupo de inhibidores conocidos como FLIPs que contienen dos dominios de muerte capaces de unirse al complejo Fas/FADD y de esta manera inhibir ambas vías de la apoptosis.

Como hemos visto los linfocitos Tc y las NK son responsables de la destrucción de las células infectadas con patógenos intracelulares mediante la inducción del mecanismo de apoptosis, evitando de esta forma la diseminación del patógeno. Durante la apoptosis el ADN es escindido por las enzimas, y libera proteasas tóxicas dentro del citoplasma. El ambiente tóxico sacrifica a la célula y usualmente elimina al patógeno que la infecta. Este mecanismo puede ser iniciado a través del Fas asociado a la vía de las perforinas y las granzimas. Ambos métodos de inducir la apoptosis son activados cuando el receptor de las células T encuentra a su antígeno específico y son expresados en las células que proliferan el FasL, las perforinas y las granzimas. Cuando la célula T se encuentra nuevamente con su antígeno el FasL estimula en la célula diana el inicio de la cascada de las caspasas (Nagata y Golstein, 1995b). Las perforinas atacan la célula creando un poro a través del

cual las granzimas difunden al citoplasma celular y son capaces de activar la vía de las caspasas de forma similar al Fas (Darmon y cols., 1995). Si se activa un mecanismo u otro, esto depende del tipo celular y del patógeno.

Se considera que la activación del programa de muerte celular en respuesta a las infecciones virales es un mecanismo de defensa temprano para prevenir la diseminación de la infección seguido de la acción de las células NK y los linfocitos Tc (Chen y cols., 2004).

#### **II.4. Susceptibilidad genética a enfermedades infecciosas**

Aunque la inmunidad natural asegura la supervivencia de las especies como un todo, los individuos per sé no son inmunocompetentes a todos los patógenos, existiendo diferencias individuales en la susceptibilidad a patógenos específicos comúnmente. El desarrollo del Proyecto de Genoma Humano en 1990 impulsó a la comunidad científica a entrar en una era que ha permitido el mapeo genético y desarrollo a gran escala de la identificación genética facilitando los estudios de polimorfismos genéticos.

Los avances en el campo de la inmunogenética de la respuesta del hospedero ante las infecciones y el abordaje interdisciplinario de esta rama con la epidemiología genética, la genómica y la biología celular y molecular han aportado al entendimiento de las bases patogénicas de las enfermedades infecciosas. Estos conocimientos contribuyen al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento preventivo y terapéuticas (Nolan y cols., 2006).

Existe poca variación dentro del genoma humano entre individuos. De hecho, todas las diferencias genéticas entre individuos se estima estén causadas por variabilidad en 3 millones de pares de bases (pb), lo que representa un 0.01% del genoma humano total. Partiendo de que el ritmo de mutaciones en el genoma de mamíferos es bajo ( $10^9$  por pb por año), la mayoría de las variaciones se heredan. Una de las principales causas de esta variabilidad es lo que conocemos como polimorfismo genético. El polimorfismo genético es una variante de un gen que existe de forma estable en una población. Para ser considerado un polimorfismo, debe presentar una frecuencia de al menos el 1%. Son, por lo tanto, diferentes de las mutaciones, que son mucho menos frecuentes y van asociadas, habitualmente, a enfermedades hereditarias (Pacheco y Moraes, 2009).

El tipo más frecuente de polimorfismo es el de un solo nucleótido que aparece en la secuencia del ADN entre individuos de una población. Se estima que 1 de cada 200-300 bases del ADN humano podría ser un polimorfismo nucleotídico único o SNP (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*). Los SNP pueden ocurrir tanto en regiones codificantes (exones) como en no codificantes (intrones y promotores) del genoma. Debido a que sólo el 3-5% del ADN humano codifica para la producción de proteínas, la mayoría de los SNP se encuentran fuera de las regiones codificantes. Cuando el SNP ocurre dentro del exón la probabilidad de que se altere la función biológica de la proteína es mayor, ya que el cambio de base puede traducirse en la sustitución

de un aminoácido por otro. Mucho más frecuentemente, los SNP ocurren en regiones del gen que no se traducen en proteína. Sin embargo, estos SNP también pueden tener efectos biológicos. Por ejemplo, un SNP en la región promotora de un gen (parte de un gen que contiene la información necesaria para activarlo o desactivarlo) puede alterar la afinidad por la unión con factores de transcripción, o alterar la actividad *enhancer* (potenciador de la expresión de un gen), variando de esta forma los niveles de transcripción del gen y produciéndose, como consecuencia, cambios en los niveles de expresión de la proteína (McLeod, 2005).

Otro hecho muy interesante que se debe tener en cuenta en los análisis es el desequilibrio de ligamiento. Este es el fenómeno por el que dos alelos en diferentes *loci* aparecen juntos más frecuentemente de lo esperado por probabilidad, lo cual pudiera llevar a conclusiones erradas.

Las tecnologías de genotipaje de SNP se basan en reacciones bioquímicas básicas que usan diferentes soportes y medios. Estos genotipajes pueden ser detectados por diferentes métodos: hibridación, RCP con extensión diferencial de cebadores específicos, ligamiento específico y digestión enzimática diferencial. Una vez que son genotipados los marcadores se pueden hacer análisis de cambios nucleotídicos puntuales o análisis haplotípicos. El haplotipo es el ordenamiento de dos o más alelos en el mismo cromosoma y aporta más información que el análisis de un solo marcador (Pacheco y Moraes, 2009).

Varios polimorfismos se han descrito en las enfermedades infecciosas. Estos pueden asociarse con una mayor incidencia de una infección determinada en la población general, o con una mayor gravedad y a la mortalidad una vez que la infección se ha establecido (Arcaroli y cols., 2005b).

Se han reportado polimorfismos de los genes HLA, que son los más polimórficos en el humano y tienen relevancia especialmente vinculada a la presentación antigénica a células T con implicaciones en el diseño de vacunas. Otros genes menos polimórficos también se han reportado importantes en la susceptibilidad a las infecciones, especialmente los que codifican para citoquinas (van Deventer, 2000).

La implicación de factores genéticos humanos en la patogénesis de la FHD pueden ser inferidos a partir de la evidencia de que sólo una pequeña proporción de personas positivas a anticuerpos anti-DEN son quienes desarrollan la FHD (Coffey y cols., 2009), así como las diferencias raciales en la susceptibilidad a la FHD (Sierra y cols., 2007). Estudios previos han sugerido la asociación del polimorfismo HLA clase I y clase II, el FC $\gamma$ RIIIa, el TNF $\alpha$ , el DC-SIGN (del inglés DC-specific *ICAM-3-grabbing nonintegrin molecules*) y el receptor de la vitamina D con un riesgo mayor de padecer la FHD (Chaturvedi y cols., 2006; Sierra y cols., 2007a; García y cols., 2010).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN**

Todo el procedimiento experimental que se expone en el presente trabajo ha sido formulado en Proyectos de Investigación aprobados por el Comité de Ética del IPK (Adjunto en Anexos), que actúa en conformidad con las leyes y reglamentos vigentes dictados por el MINSAP y el CITMA, y que contempla los principios enunciados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial para las investigaciones médicas en seres humanos (OMS, 2008). Cada una de las tareas de investigación que conforman la tesis, en las que participan individuos enfermos o sanos, ha sido precedida de una información adecuada acerca de los objetivos, métodos, afiliaciones institucionales de los investigadores, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento. De igual manera, las personas incluidas en los estudios fueron informadas del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Después de asegurar la comprensión de la información, se recogió por escrito, el consentimiento informado y voluntario de cada persona. Se respetó la confidencialidad de la información de los individuos estudiados, y las muestras obtenidas sólo se utilizaron en las investigaciones para las cuales fueron previstas originalmente. Se muestran en la sección de Anexos los modelos de consentimiento informado de cada estudio y los avales del Comité de Ética del IPK de aprobación de los proyectos donde están contenidas las investigaciones expuestas en el presente trabajo.

#### **III.1. CINÉTICA DE LOS NIVELES DE LAS CITOQUINAS IL-12 E IL-10 Y DE MARCADORES DE CITOTOXICIDAD EN PACIENTES CON DEN Y SU RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD.**

##### **III.1.1 Cuantificación de los niveles de IL-12 e IL-10 en muestras séricas de pacientes de FD y FHD durante la infección por dengue 2.**

###### **III.1.1.1- *Muestras***

Se utilizaron muestras de suero de pacientes tomadas de forma seriada en días alternos a partir de su admisión en el Hospital General de Santiago de Cuba durante la epidemia de DEN 2 de 1997 (Guzman y cols., 1999;

Valdes y cols., 1999). Los casos se clasificaron clínicamente como FD y FHD según la Guía de la OPS/OMS para el diagnóstico del DEN y DEN Hemorrágico (WHO, 1997). El diagnóstico de DEN se confirmó mediante el aislamiento del virus (Rodríguez-Roche y cols., 2000), la detección del ácido nucleico viral utilizando la RCP (Rosario y cols., 1998) y la detección de IgM específica (Vazquez y cols., 1998). La clasificación de la infección en primaria o secundaria se realizó mediante el Método de ELISA de Inhibición (MEI) en muestras de suero de la etapa convaleciente (Vazquez y cols., 1997), y la presencia de anticuerpos neutralizantes a otro serotipo viral (diferente al serotipo 2) se detectó a través del ensayo de neutralización (Morens y cols., 1985) para definir el serotipo viral de la primoinfección. Se utilizaron como controles negativos muestras de suero de donantes de Banco de Sangre de Santiago de Cuba, con IgM a DEN negativa. Los sueros fueron separados rápidamente y congelados en nitrógeno líquido en el Laboratorio del CPHEM de Santiago de Cuba. Luego transportados al IPK en hielo seco y almacenados a -80°C hasta su uso.

#### **III.1.1.2- *Aislamiento viral***

Para el aislamiento viral se aplicó el método de centrifugación rápida (Rodríguez-Roche y cols., 2000) utilizando la línea celular de *Aedes albopictus* (C636/HT). Las células fueron crecidas en placas de poliestireno (Coming Life Sciences Corp., MA; EE.UU.) de 24 pozos, a 33°C, en medio esencial mínimo (MEM) suplementado (10% de suero fetal bovino inactivado (SFB), 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de una solución de glutamina 200 mM) (SIGMA Aldrich Corp., St. Louis; EE.UU.). Tras la confluencia de la monocapa celular, se retiró el medio de cultivo y se añadió la muestra de suero de los pacientes (100 µL) diluida (1/30) en MEM. Las placas fueron centrifugadas durante una hora a 1000 x g a 33°C, los inóculos fueron descartados y se agregó 1mL de MEM conteniendo 2% de SFB. Las placas se mantuvieron a 33°C y se observaron diariamente en búsqueda de efecto citopático. Al cabo de 11 días de inoculadas, las células fueron fijadas para la detección de antígeno de DEN mediante la técnica de IF indirecta (IFI) utilizando un líquido ascítico hiperinmune contra el DEN. En los casos positivos se realizó una segunda IFI con el objetivo de identificar el serotipo utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra los cuatro serotipos del virus (Henchal y cols., 1983).

#### **III.1.1.3- *ELISA de captura para determinación de IgM anti-DEN* (MAC-ELISA)**

Para la detección de anticuerpos IgM se empleó la técnica de MAC-ELISA desarrollada en el laboratorio de Arbovirus del IPK (Vazquez y cols., 1998; Vazquez y cols., 2003). Para ello se utilizaron placas MaxiSorp de tiras desmontables de 8 pozos, las cuales fueron sensibilizadas con 100 µL de anticuerpos de tipo IgG de camero anti-IgM Humana (SIGMA Aldrich Corp., St. Louis, EE.UU.) a una concentración de 7.5µg/mL, en solución tampón carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Las placas fueron incubadas en cámara húmeda a 4°C

durante toda la noche (18 horas). Al siguiente día se lavaron 5 veces con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffer solution*, pH 7.4) y se bloquearon con una solución de seroalbúmina bovina (SAB) (SIGMA Aldrich Corp., St. Louis; EE.UU.) al 1% en PBS (150  $\mu$ L por pozo), incubándose durante 1h a 37°C. Luego las placas se lavaron nuevamente (5 veces) y se añadieron 50  $\mu$ L de los sueros diluidos 1:20 en PBS conteniendo 0.5% de SAB. Se añadieron además, un suero control positivo por duplicado y uno negativo por cuadruplicado a la misma dilución. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se lavaron y se añadieron 50  $\mu$ L por pozo de una mezcla de antígenos conteniendo los cuatros serotipos del virus DEN a 16 unidades hemaglutinantes cada uno, más suero humano normal (SHN) al 5%. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Al siguiente día, se lavaron (5 veces) y se añadieron 50  $\mu$ L por pozo de una dilución 1:7000 de conjugado de IgG humana anti-DEN/enzima peroxidasa (SIGMA Aldrich Corp., St. Louis; EE.UU.) en PBS-SHN al 5%. Tras 1h de incubación a 37°C y 7 lavados con PBS, se añadieron 100  $\mu$ L por pozo del sustrato (25 mg de ortofenilendiamina (OPD) (SIGMA Aldrich Corp., St. Louis; EE.UU.) con 4  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno en 10 mL de solución tampón de fosfato citrato pH 5). La reacción se detuvo con 100  $\mu$ L por pozo de ácido sulfúrico al 12.5%. Las placas se leyeron a una longitud de onda de 492 nm en un lector de ELISA tipo MRX Revelation Microplate Reader (Dynex Tech., Denkendorf; Alemania). Como criterio de positividad se calculó la relación de densidad óptica (DO) para cada suero según la siguiente fórmula:  $DO = P/N$ , donde P es la DO de la muestra y N es la media aritmética de las DO de las réplicas del control negativo. Un suero fue considerado positivo si la relación de  $DO \geq 2$ .

#### **III.1.1.4- Método de ELISA de Inhibición (MEI)**

Para la detección de anticuerpos IgG se utilizó el MEI desarrollado en el Laboratorio de Arbovirus del IPK (Vazquez y cols., 1997; Vazquez y cols., 2003). Placas de poliestireno (Coming Life Sciences Corp., MA; EE.UU.) de 96 pozos fueron sensibilizadas con anticuerpos IgG humanos anti-DEN a una concentración de 10 $\mu$ g/mL en solución carbonato-bicarbonato pH 9.5 e incubadas toda la noche a 4°C. Posteriormente se bloquearon con SAB al 1% (150 $\mu$ L por pozo) y tras 1 h de incubación a 37°C, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween20 (PBS-T20). Seguidamente se añadieron 100 $\mu$ L por pozo de una dilución 1/50 en PBS-T20 de antígeno de DEN 2. La incubación se realizó a 37°C por 1h y se lavó nuevamente para ser adicionados los sueros de los pacientes diluidos en PBS-T20 desde 1:20 hasta 1:10240 (diluciones al doble), incluyendo además un control positivo y un control negativo en las mismas condiciones. La incubación se realizó a 37°C por 1h. Después de lavar se añadieron 100 $\mu$ L del conjugado IgG humana anti-DEN/peroxidasa diluido 1/7000 en PBS-T20, más SFB al 2%. Se realizó el último lavado, adicionando posteriormente el

sustrato (OPD, peróxido de hidrógeno en solución tampón de fosfato citrato pH 5). La reacción se detuvo con 100  $\mu$ L por pozo de ácido sulfúrico al 12.5%. La lectura de la DO se realizó a una longitud de onda 490 nm en un lector de ELISA tipo MRX Revelation Microplate Reader (Dynex Tech., Denkendorf, Alemania). El porcentaje de inhibición fue calculado según la siguiente fórmula: % Inhibición =  $(1 - (DO \text{ muestra}/DO \text{ control negativo})) \times 100$ . Aquellos sueros que presentaron un porcentaje de inhibición mayor o igual al 50% con relación al control negativo fueron considerados como positivos. El título de anticuerpos se definió como el inverso de la mayor dilución a la cual se cumplió el criterio de positividad. *Criterio de infección primaria:* Seroconversión en el título de anticuerpos entre los sueros de fase aguda y convaleciente. *Criterio de infección secundaria:* Incremento del título de anticuerpos en cuatro veces o más entre los sueros de fase aguda y convaleciente o elevación del título de anticuerpos en ambos sueros.

#### **III.1.1.5- *RCP para detección de ácido nucleico viral***

La detección y tipificación de los virus DEN fue realizada según el protocolo de Lanciotti y cols. con las modificaciones de Rosario y cols., donde se amplifica la región C-prM-M del genoma viral. (Lanciotti y cols., 1992; Rosario y cols., 1998). Se adicionaron 10  $\mu$ L del ARN viral a una mezcla de 90  $\mu$ L, la cual contiene los siguientes componentes: 50 mM KCl, 10mM Tris (pH 8.5), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatina, 0.1 M ditiotreitolo, los deoxinucleótidos trifosfato (Promega Corp., Madison WI; EE.UU.), 100 pmoles de los cebadores consenso (DEN1 y DEN2) diseñados para alinearse con cualquiera de los 4 serotipos de los virus DEN; 40U de RNase Inhibitor (Promega Corp., Madison WI; EE.UU.), 10U de AMV-RT (del inglés, *Aviary Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase*) (Promega Corp., Madison WI; EE.UU.) y 5U de Taq ADN polimerasa (Promega Corp., Madison WI; EE.UU.). La reacción de transcripción-reversa se llevó a cabo en un termociclador (Techne Genius, Science Technology Innovation, Chorley; Reino Unido), durante 40 min. a 42°C, seguido de la reacción de RCP: 94°C, 4 min.; (94°C, 30 seg; 55°C, 1 min.; 72°C, 2 min.) por 30 ciclos, luego se mantuvo a 72°C por 10 min para completar la extensión del ADN amplificado. El producto amplificado de la reacción se constató por una corrida electroforética en un gel de agarosa al 2% y visualización en un transiluminador Spectroline (Spectronics Corp., New York; EE.UU.).

#### **III.1.1.6- *Ensayo de Neutralización por reducción del número de placas***

Para identificar el serotipo que causó la infección primaria en los individuos incluidos en el estudio se utilizó la técnica de neutralización por reducción del número de placas descrito por Morens y Halstead para los virus DEN con modificaciones de Alvarez y cols. (Morens y cols., 1985; Alvarez Vera y cols., 1998). Los sueros a estudiar fueron inactivados a 56°C por 30 min, tratados con cloroformo y diluidos 1/30. Controles positivo y

negativo se probaron a la dilución 1/10. Las cepas virales utilizadas en el ensayo virus DEN1 (Angola), virus DEN2 (A15), virus DEN3 (116/00) y virus DEN4 (Dominica), fueron diluidas en MEM a 40 ufp (unidades formadoras de placas) por cada 50µL. Los sueros diluidos se mezclaron a razón de 100µL volumen-volumen con la dilución de trabajo de cada cepa viral por separado, y estas mezclas fueron incubadas durante 1h a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se inocularon por triplicado 50µL de cada una de las mezclas virus-suero y de los controles, en 500µL de suspensión de células BHK 21 clono 15, en placas de 24 pozos a una concentración de 2x10<sup>5</sup> células/mL. Las células se incubaron durante cuatro horas en similares condiciones y luego le fueron añadidos 500µL de medio de recubrimiento (MEM-E 2X, Glutamina, SFBI, Carboximetilcelulosa viscosidad media y antibióticos) a cada pozo, incubándose a 37°C por cinco días para virus DEN2, seis días para DEN4 y siete para los virus DEN1 y DEN3. Tras la incubación se decantó el medio y las monocapas celulares fueron lavadas con agua corriente. A cada pozo de las placas le fue añadido 0,5 mL de una solución colorante Naphtol Blue Black (Ácido Acético 60 mL, Naphtol Blue Black 1g y 13,6g de Acetato de Sodio). El valor porcentual de reducción del número de placas con respecto al control viral se calculó a cada dilución de suero según la ecuación: % reducción = [1- (Xs/Xm)] x 100%, donde: Xs= promedio del número de placas obtenidas por cada dilución del suero, y Xm= Promedio del número de placas obtenido para el control del virus. Estos datos se llevaron a un papel semi-logarítmico para determinar la dilución de suero que reduce en un 50% el número de placas virales con respecto al control viral, la que representa el título de anticuerpos neutralizantes del suero en cuestión.

#### **III.1.1.7- Determinación de IL-12 e IL-10 en muestras de suero**

Para la determinación de los niveles de IL-12 (p70/p40) e IL-10 fueron utilizados los estuches comerciales de inmunoensayos específicos para cada citoquina (ENDOGEN, Ins., Wobum MA; EE.UU.). Las curvas estándar de las citoquinas IL-12 e IL-10 humanas recombinantes (6 puntos) se prepararon por diluciones seriadas 1:2, de 0 a 250 pg/mL para la IL-12 y entre 0 y 600 pg/mL para IL-10. A las placas MaxiSorp (Nunc GmbH & Co. KG, Langensfeld; Alemania) de tiras desmontables de 8 pozos prefijadas con anticuerpos monoclonales anti-IL-12 o anti-IL-10 se añadieron 50 µL de las diluciones de la curva estándar y las muestras de suero de los pacientes por duplicado. Posteriormente, se añadieron 50 µL del segundo anticuerpo anti-citoquina biotinilado y se incubó la placa a TA durante 2 hs. Después de tres lavados con el tampón de lavado, se añadió 100 µL de la Solución preparada de peroxidasa de rábano picante – Estreptavidina e incubó durante 30 min a TA. Seguidamente, se repitieron tres lavados y se añadieron 100 µL de la Solución del Sustrato (3,3', 5,5'tetrametilbenzidina: TMB), incubando a TA por 30 min. Transcurrido ese tiempo se detuvo la reacción con

la solución de parada y se procedió a medir la absorbancia en un lector de ELISA tipo MRX Revelation Microplate Reader (Dynex Tech., Denkendorf, Alemania) a 450 y 550 nm. La concentración de las citoquinas fue calculada por extrapolación de los valores de DO contra la curva montada en paralelo por diluciones seriadas del estándar de cada citoquina. Los resultados se expresaron en pg/mL.

#### **III.1.1.8- *Análisis estadístico***

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, las muestras de suero colectadas entre el 1er al 3er día del inicio de la fiebre se agruparon como “1era determinación”. Las muestras tomadas entre el 4to y 5to días fueron denominadas “2da determinación” y “3ra determinación” las muestras colectadas del 6to al 8vo días. El rango de normalidad de los valores de las citoquinas se definieron como la media +/- 2 desviaciones estándar de la media de los controles sanos. Las diferencias en los niveles de IL-12 e IL-10 entre pacientes y controles, casos de FD y FHD, o infección primaria y secundaria, fueron analizadas por el test no paramétrico de Mann Whitney U Rank Sum. Un valor de p de dos colas menor de 0.05 se consideró representativo de una diferencia significativa. Todos los cálculos estadísticos se realizaron mediante el empleo del programa SPSS versión 11.5 sobre Windows.

### **III.1.2 Determinación de marcadores de citotoxicidad (Granzima B, Perforina y FasL soluble) en muestras séricas seriadas de pacientes de FD infectados por virus dengue 4.**

#### **III.1.2.1- *Muestras***

Se utilizaron muestras de suero seriadas de 30 pacientes de FD, internados en el Hospital Salvador Allende de Ciudad de la Habana con un diagnóstico clínico, serológico y virológico de infección por DEN durante la epidemia ocurrida en el año 2006, las cuales se mantuvieron almacenadas a -80°C hasta su uso. La confirmación del diagnóstico de DEN se realizó en el Departamento de Virología del IPK mediante diagnóstico serológico (Sección III.1.1.3) y aislamiento viral (Sección III.1.1.2). Mediante el empleo del MEI (Sección III.1.1.4) los sueros se clasificaron infección primaria o secundaria. Tras el análisis de las historias clínicas de los pacientes estudiados se recogió, por los resultados de los exámenes del laboratorio clínico, el dato de la presencia de trombocitopenia (conteo de plaquetas inferior a 150 000/mL) y leucopenia (leucocitos totales menos de  $5 \times 10^9$ /mL) en cada uno de ellos.

#### **III.1.2.2- *Determinación de la proteína NS1 del virus DEN***

La determinación semicuantitativa del antígeno NS1 del virus DEN en el suero se realizó mediante la utilización del ELISA comercial Platelia™ DEN NS1 Ag (Bio-Rad, Marnes la Coquette, Francia) (Alcon y cols., 2002), útil como marcador indirecto del nivel de replicación viral *in vivo*. Se siguió el protocolo

recomendado por el fabricante en este ensayo inmuno-enzimático tipo sándwich en una etapa, que utiliza anticuerpos monoclonales (AcMs) de ratón para su captura y revelación, para lo cual se emplea el segundo AcM conjugado a Peroxidasa de rábano picante y su sustrato TMB. Tras la detención de la reacción enzimática, se realizó la lectura de la placa en un lector de ELISA tipo MRX Revelation Microplate Reader (Dynex Tech., Denkendorf, Alemania) a una longitud de onda de 450/620 nm. Los resultados se expresaron como una relación entre la DO de la muestra y el valor umbral (VU), donde el VU corresponde al valor medio de las DO de los duplicados del control positivo del estuche. Dicha relación se denominó Índice NS1 (I-NS1). Si  $I-NS1 \geq 1$ , la muestra fue considerada positiva para el antígeno NS1 y se refiere en el texto como niveles de la proteína NS1.

### ***III.1.2.3- Determinación de marcadores de citotoxicidad celular***

Los marcadores de citotoxicidad se estudiaron en las muestras séricas de los pacientes mediante el uso de estuches comerciales: granzima B (Cell Sciences, MA; EE.UU.), perforina (Cell Sciences, MA; EE.UU.) y FasL (R&D System GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt; Alemania). En cada caso se siguieron las recomendaciones del fabricante para la determinación sérica de tales mediadores.

*ELISA para la determinación de granzima B:* A las tiras de poliestireno recubiertas con AcM anti-granzima B, se añadió 100µL del estándar, la muestra de estudio o los controles del estuche. Tras dispensar el AcM biotinilado anti-granzima B a todos los pozos se incubó 3 hs a TA. Luego se realizaron tres lavados y añadió el conjugado estreptavidina/peroxidasa, incubándose por 30 min a TA. Una vez repetidos los pasos de lavado y añadido el sustrato (TMB), se incubó durante 15 minutos a TA. Se procedió a detener la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las DOs se leyeron en un lector de ELISA tipo MRX Revelation Microplate Reader (Dynex Tech., Denkendorf, Alemania) a una longitud de onda de 450nm. La concentración de granzima B de cada muestra se determinó extrapolando los valores de DO de cada muestra a las concentraciones de granzima B de la curva estándar en un rango de 0 a 2000 pg/mL.

*ELISA para la determinación de perforina:* Añadir 100µL de las diluciones del estándar, la muestra o los controles a las tiras recubiertas con un AcM anti-perforina. Se incubaron 1 h a TA y realizaron posteriormente tres lavados. Se añadieron 50µL del anticuerpo biotinilado anti-perforina a todos los pozos e incubaron 1 h a TA. Después de tres lavados, se dispensó el conjugado estreptavidina/peroxidasa a todos los pozos e incubó 20 min a TA. Luego de repetir los pasos de lavado, se añadió el sustrato TMB. Se detuvo la reacción a los 15 min y leyeron las placas en un lector de ELISA tipo MRX Revelation Microplate Reader (Dynex Tech., Denkendorf, Alemania) a una longitud de onda de 450nm. Para conocer la concentración de perforina de cada

muestra se extrapolaron los valores de DO con las concentraciones de perforina de la curva estándar en un rango de 0 a 1000 pg/mL.

*ELISA para la determinación de FasL:* Se añadieron 50µL del estándar, controles del estuche o muestras de suero a 100µL del diluyente RD1S a cada pozo de la tira recubierta con AcM anti-FasL. Se incubaron las tiras durante 2 hs a TA. Luego de realizar cuatro lavados, se añadió el conjugado (policlonal anti-FasL/peroxidasa) a cada pozo. Se incubaron las placas por 2 hs en iguales condiciones y tras repetir los lavados, se añadió la solución sustrato y se dejó reaccionar durante 30 minutos a TA. Se detuvo con la solución de parada y se determinó la DO en el lector de ELISA tipo MRX Revelation Microplate Reader (Dynex Tech., Denkendorf, Alemania) a la misma longitud de onda. La concentración de FasL de cada muestra se determinó extrapolando los valores de DO con las concentraciones de FasL de la curva estándar (rango de 0 a 1000 pg/mL).

#### **III.1.2.4- *Análisis estadístico***

Las medias de los valores de perforina, granzima B y FasL fueron analizadas en los grupos de pacientes de acuerdo a la clasificación de la infección, o a la presencia o no de trombocitopenia o leucopenia, mediante el test no paramétrico de Mann Whitney. Para conocer el grado de correlación entre los marcadores de citotoxicidad y el I-NS1 se utilizó el método de correlación de Spearman. Con el fin de evaluar la asociación entre los niveles de granzima B, perforina y FasL con los hallazgos de laboratorio Trombocitopenia y Leucopenia se utilizó el método no paramétrico de Mann Whitney. Los valores obtenidos se interpretaron de la siguiente manera:  $p < 0.05$  diferencias estadísticamente significativas y  $p \geq 0.05$  diferencias no significativas (ns). Los datos fueron procesados empleando el programa SPSS versión 11.5.

## **III.2. NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES DE CITOQUINAS INDUCIDOS POR EL VIRUS DEN EN CULTIVOS DE CELULAS MONONUCLEARES DE INDIVIDUOS INMUNES AL VIRUS**

### **III.2.1. Análisis de la expresión de genes de: IL-12, IL-10 y TNF $\alpha$ en células mononucleares humanas frente a la infección homotípica y heterotípica con virus dengue.**

#### **III.2.1.1- *Muestra***

Se incluyeron en el estudio células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 20 individuos supuestamente sanos, 10 de ellos inmunes a DEN1 y 10 inmunes a DEN2 con títulos de anticuerpos séricos

IgG anti-DEN de 1/40 o más determinados por MEI (Sección III.1.1.4). En el suero de los sujetos se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-DEN1 o DEN2 (Sección III.1.1.6).

### **III.2.1.2- *Virus***

Los virus DEN1 (cepa 13, Perú) y DEN2 (cepa A15, Cuba) fueron inoculados a una multiplicidad de 0.1 en una monocapa de células C6/36 de *Aedes albopictus*, y cultivadas en medio MEM suplementado al 2% con SFB. Al alcanzarse más del 50 % de efecto citopático, se colectó el sobrenadante de cultivo y se sometió a centrifugación a 16770 g por 30 minutos a 4°C. Células C6/36 no inoculadas con el virus y procesadas de igual forma fueron empleadas como control negativo de antígeno. Los virus fueron titulados mediante inoculación de diluciones seriadas de estos ( $10^1$  a  $10^6$ ) por triplicado en 0.5 mL de suspensión de la línea celular BHK21 (Alvarez y cols., 2005).

### **III.2.1.3- *Cultivo de Células mononucleares***

Las células mononucleares fueron aisladas de la sangre venosa periférica colectada de cada individuo incluido en el estudio en presencia de Citrato de sodio como anticoagulante. Brevemente, 20 mL de la sangre diluida 1:2 en Solución de Hank fue colocada sobre 10 mL de la solución de Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) y aisladas las células por centrifugación y separación en gradiente de densidad a 800 x g, 30 min, a TA (Boyum, 1968). Una vez lavadas, centrifugadas a 400 x g, y contadas, las células se ajustaron a  $2 \times 10^6$  por mL en medio RPMI 1640 suplementado con antibiótico (Penicilina 100UI/Estreptomina 100µg por mL), Hepes (20 mM), glutamina (2 mM) y el suero autólogo de cada individuo al 5%. Las células se cultivaron en crioviales de 2.5 mL estériles, en presencia de virus DEN 1 y DEN 2 a una multiplicidad de 0.01 (1 ufp por cada 100 células mononucleares) a 37°C en atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas, fueron centrifugados los crioviales, decantado el sobrenadante de cultivo y almacenado el botón celular a -80°C hasta su uso.

### **III.2.1.4- *Extracción de ARN y Reacción de Reverso-transcripción***

Para la extracción de ARN de las células estimuladas de individuos inmunes a DEN y controles se siguió el protocolo recomendado según el manual del estuche comercial QIAamp RNA Blood Mini kit (Qiagen GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt; Alemania), que tiene como fundamento la separación del ARN total a través de un procedimiento de unión selectiva del ácido nucleico a una membrana de sílice y pasos sucesivos de micro-centrifugación. Se dispensó el lisado celular a la columna QIAshredder (Qiagen GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt; Alemania) seguido de una breve centrifugación, se añadió posteriormente un volumen de etanol al 70% al eluido, se mezcló bien y se dispensó en la columna QIAamp (Qiagen GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt; Alemania). Durante un paso de centrifugación a 8000 x g por 15 seg se favoreció la unión del

ARN a la membrana de sílica. Finalmente, los contaminantes se lavaron y se descartaron con soluciones tamponadas de lavado (RW1 y RPE) (Centrifugaciones sucesivas a 8000 y 20000 x g de 15 seg y 3 min respectivamente) y se obtuvo el ARN en agua libre de enzimas degradantes del ARN (ARNasas).

Tras el tratamiento con la enzima degradante del ADN (ADNasa), el ADN complementario (ADNc) fue sintetizado a partir del ARNm utilizando cebadores poli(dT) y la enzima reverso-transcriptasa Superscript II (Invitrogen Corp., California; EE.UU.). El ADNc resultante fue conservado a -20°C hasta su uso.

### **III.2.1.5- RCP en tiempo real para genes de citoquinas**

La expresión de los genes de las citoquinas se determinó por PCR en tiempo real empleando un sistema de detección ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA; EE.UU.), empleando un juego de oligonucleotidos y sonda diseñados con el programa Primer Express Software (Applied Biosystem) de acuerdo a las recomendaciones del productor. A cada pozo de la placa de 96 pocillos se le añadió 1 ul de cDNA copia y 12 ul de la mezcla, consistente en 6,2 ul de la mezcla universal de PCR de Applied Biosystem, 3ul de oligonucleotidos y 0.5 ul de sonda, mas 2 ul de agua. Los parámetros de los ciclos fueron 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, y 40 ciclos de 95 °C 15 seg y 60 °C 1 min. Cada muestra fue analizada por triplicado para la expresión de FoxP3, FasLigand, Perforina, GranzimaB, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , IL-10, IL-8, RANTES, MIP-1  $\alpha$ , MCP-1 y TNF $\alpha$  respectivamente, así como para el gen de expresión continua (del inglés *housekeeping gene*) hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1 (HPRT-1). La expresión específica se calculó con relación a la expresión de HPRT-1 por el método delta/delta Ct, recomendado por ABI. Los genes se seleccionaron a fin de cubrir un amplio espectro de diferentes patrones de respuesta inmune.

Para la cuantificación de la expresión de genes de las citoquinas se empleó la RCP en Tiempo real usando un sistema de detección ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA; EE.UU.) y siguiendo los procedimientos orientados por el fabricante. Las muestras se analizaron para la expresión de los genes de TNF $\alpha$ , IL-12, e IL-10. La expresión específica se calculó por el método relativo delta/delta Ct con respecto a la expresión del gen constitutivo de referencia HPRT-1 (del inglés *hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1*). Los datos se expresaron en pg de ARNm de las citoquinas por ng de ARNm de HPRT-1, empleando una curva estándar para cada citoquina.

### **III.2.1.6- Análisis estadístico**

La comparación de la expresión de genes entre las diferentes condiciones experimentales estudiadas (estimulación homotípica y heterotípica, en presencia y en ausencia de suero autólogo) se realizó por el método de Mann Whitney estimando como significativo un valor de  $p < 0.05$ . Los datos fueron procesados empleando el programa SPSS versión 11.5.

### **III.2.2. Determinación y comparación de los niveles de TNF $\alpha$ en sobrenadante de células sanguíneas de individuos con antecedentes de FD y FHD cultivadas con virus dengue 3.**

#### **III.2.2.1- *Muestra***

Se utilizó sangre venosa periférica con citrato de sodio como anticoagulante, de 30 individuos sanos con antecedentes de una infección secundaria por virus DEN 2 durante la epidemia de Santiago de Cuba de 1997 (Guzman y cols., 2000), divididos en dos grupos de acuerdo a la forma clínica de presentación de la infección: 15 FD y 15 FHD. Todos los individuos seleccionados, de sexo masculino y con un rango de edad entre 20 y 45 años, habían padecido una infección primaria por DEN1, comprobado por la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-DEN1 y anti-DEN2 en el suero (Sección III.1.1.6).

#### **III.2.2.2- *Virus***

El virus DEN 3 (cepa 116/00) fue crecido en células Vero inoculadas a una multiplicidad de 0.1 ufp. El sobrenadante de cultivo fue cosechado a las 48 horas, clarificado por centrifugación a 16770 x g por 30 min a 4°C, y titulado por técnica de placas en las células BHK21 (Alvarez y cols., 2005). Se preparó en iguales condiciones un control celular de células Vero sin inocular con el virus.

#### **III.2.2.3- *Estimulación de células sanguíneas***

La sangre venosa periférica de los individuos colectada en presencia de anticoagulante citrato de sodio, fue incubada en tubos de 4.5mL a razón de 1mL por tubo en presencia de 10<sup>4</sup> ufp (0.1mL) de virus DEN 3, o el control celular, por 18 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. Pasado este tiempo los sobrenadantes de cultivo fueron cosechados siguiendo una centrifugación a 300 x g y congelados a -80°C hasta su uso.

#### **III.2.2.4- *Determinación de TNF $\alpha$***

Se realizó la cuantificación de TNF $\alpha$  en los sobrenadantes del cultivo celular mediante un estuche de ELISA comercial tipo sándwich (R&D systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt; Alemania). La curva estándar de la citoquina TNF $\alpha$  humana recombinante (6 puntos) se preparó por diluciones seriadas 1:2, desde 0 hasta 1000 pg/mL. A la placa MaxiSorp de tiras desmontables de 8 pozos prefijada con AcM anti-TNF $\alpha$  se le añadió 50 $\mu$ L/pozo de la Solución diluyente del ensayo y luego 200 $\mu$ L de las diluciones del estándar y las muestras de suero de los pacientes por duplicado. Se incubó la placa durante 2 hs a TA y seguidamente se lavó 3 veces. Fue añadido el conjugado anticuerpo policlonal anti-TNF $\alpha$ /peroxidasa a razón de 200 $\mu$ L por pozo y se sometió la placa a 2 hs de incubación a TA. Después de 3 lavados se añadió el sustrato TMB (200 $\mu$ L a cada pozo) y tras 20 min a TA y tres lavados, se detuvo la reacción con la solución de parada. Se procedió a medir la absorbancia en un lector de ELISA tipo MRX Revelation Microplate Reader (Dynex Tech., Denkendorf; Alemania) a 540

y 570 nm. La concentración fue calculada por extrapolación de los valores de DO contra la curva montada en paralelo por diluciones seriadas del estándar de la citoquina. Los resultados se expresaron en pg/mL.

### III.2.2.5- *Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos en los dos grupos de la muestra (FD y FHD) fueron comparados por un el test de Mann Whitney usando el programa SPSS version 11.5 sobre Windows. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

## III.3. EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS EN TEJIDOS DE FALLECIDOS POR DEN HEMORRÁGICO

### III.3.1. Estudio de la expresión cualitativa de genes de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 y TGF $\beta$ 1 en hígado y bazo de fallecidos por DEN hemorrágico durante la infección por virus DEN 3 o DEN 4.

#### III.3.1.1- *Muestras*

Se estudiaron 9 muestras frescas de tejidos de bazo y 8 de hígado procedentes de 10 fallecidos con el diagnóstico de FHD/SCD durante la epidemia cubana del 2006 (Libel, 2006a), en los que se confirmó como causa básica de muerte la infección por DEN a través del aislamiento del virus (Sección III.1.1.2) o detección de su genoma en los tejidos (Sección III.1.1.5). En la Tabla 2 se muestran los datos generales de los 10 fallecidos incluidos en el estudio.

Tabla 2. Datos generales de los fallecidos por FHD/SCD en la epidemia de DEN del 2006 del estudio.

No. Caso	Serotipo viral	Edad	Sexo	Días de la fiebre	Tejidos procesados
1	Den3	70	M	¿?	Hígado y Bazo
2	Den3	69	F	5	Hígado y Bazo
3	Den3	73	F	12	Hígado y Bazo
4	Den3	48	F	6	Bazo
5	Den3	30	M	6	Hígado y Bazo
6	Den3	24	F	5	Hígado y Bazo
7	Den3	74	M	6	Hígado
8	Den4	37	M	5	Hígado y Bazo
9	Den4	31	F	6	Hígado y Bazo
10	Den4	36	F	6	Bazo

### **III.3.1.2- Procesamiento del tejido**

Se emplearon fragmentos de bazo e hígado de aproximadamente 30 mg (5x5 mm<sup>3</sup>) que se almacenaron en viales estériles a -80°C hasta su empleo. Se procedió al macerado de las piezas en nitrógeno líquido y el tejido pulverizado se colocó en viales fríos estériles libres de enzimas degradantes del ARN (ARNasa). Tras la evaporación del nitrógeno, se añadieron 600µL del Tampón de lisis (RLT) (Qiagen GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt; Alemania) que, en condiciones altamente desnaturizantes, inactiva ARNasas y libera el ARN intacto.

### **III.3.1.3- Extracción de ARN y reacción de reverso-transcripción**

Para la extracción de ARN se siguió el protocolo El ARN total fue extraído mediante el uso del estuche comercial QIAamp RNA Blood Mini kit (Qiagen), y se sintetizó el ADNc (Ver Sección III.2.1.4).

Tras el tratamiento con la enzima degradante del ADN (ADNasa), el ADN complementario (ADNc) fue sintetizado a partir del ARNm utilizando cebadores poli(dT) y la enzima reverso-transcriptasa Superscript II (Invitrogen Corp., CA; EE.UU.). El ADNc resultante fue conservado a -20°C hasta su uso.

### **III.3.1.4- RCP para detección de la expresión de genes de citoquinas**

La amplificación de segmentos de genes de las citoquinas IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ 1, IL-10 y TNF $\alpha$  y del gen de expresión constitutiva la unidad ribosomal 18S se realizó empleando pares de cebadores específicos. Para las citoquinas IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ 1 y IL-10 se utilizaron cebadores procedentes de un sistema de detección para RCP en Tiempo real de ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU), que permitieron la amplificación de productos de RCP de 108, 89, 93 pb respectivamente, mientras que los cebadores empleados para la amplificación de secuencias de TNF $\alpha$  y 18S formaron parte del estuche comercial para RCP Semicuantitativa de citoquinas (Maxim Biotech, Inc., South San Francisco; EE.UU.), amplificándose productos de RCP de 306 y 488 pb respectivamente. Se utilizaron como controles positivos los estándares del estuche comercial (Maxim Biotech, Inc., South San Francisco; EE.UU.) de cada citoquina y como control negativo un tubo de mezcla con agua en lugar de ADNc. La RCP se realizó empleando la enzima Taq polimerasa (Qiagen GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt; Alemania) con su tampón, la mezcla de deoxinucleótidos, MgCl (25mM), los cebadores y el ADNc, para un volumen total de 50 µL. El programa para IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ 1 e IL-10 fue de 1 ciclo de 50°C, 2 min / 95°C, 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C, 1 min / 60°C, 1 min y un ciclo de 72°C, 1 min. Por su parte, para los genes de TNF $\alpha$  y 18S, por su mayor talla se amplió el tiempo de hibridación de 60°C a 1:30 min, manteniendo el resto de los pasos similares. Para dar curso a la RCP se empleó un termociclador (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania). Para chequear el producto amplificado se sometió a una corrida electroforética en un gel de agarosa al 2% (SIGMA Aldrich Corp., St. Louis; EE.UU.), teñido con bromuro de

etidio (SIGMA Aldrich Corp., St. Louis; EE.UU.) y se observaron las bandas de amplificación con un transiluminador Spectroline de luz ultravioleta (Spectronics Corp., New York; EE.UU.).

### **III.4. VARIANTES POLIMÓRFICAS DE GENES DE CITOQUINAS PRO Y ANTI-INFLAMATORIAS PREDOMINANTES EN PACIENTES DE FHD**

#### **III.4.1. Determinación y comparación de las frecuencias alélicas, genotípicas o haplotípicas de los genes de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 y TGF $\beta$ 1 en pacientes de FHD de la epidemia de Santiago de Cuba durante el año 1997 y en una muestra control de la población.**

##### **III.4.1.1- *Muestra***

Se utilizó sangre venosa periférica de 43 individuos sanos (edad entre 20 y 60 años, promedio de 35.8) con antecedentes de FHD durante la epidemia de DEN 2 de Santiago de Cuba, en 1997 (Kouri y cols., 1998). Para el presente estudio se colectaron las muestras de los individuos 5 años después de haber padecido la enfermedad y se constató en todos la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-DEN1 y anti-DEN2 por ensayo de neutralización (Sección III.1.1.6). Se seleccionaron como controles un total de 99 individuos donantes de banco de sangre (edad entre 18 y 55, edad media 32.6), étnica y geográficamente equivalentes. Como criterio de exclusión se tomó en consideración el padecimiento de una enfermedad crónica o el desacuerdo con los procedimientos del estudio.

##### **III.4.1.2- *Extracción de ADN***

Se procedió a obtener el ADN genómico de la sangre con anticoagulante de cada individuo mediante el uso de un estuche comercial para este fin (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt; Alemania). A 20  $\mu$ L de Proteinasa K se adicionaron 200 $\mu$ L de la muestra de sangre total. Tras añadir el Buffer Lisis (AL), se mezcló e incubó a 56°C por 10 min. Se añadió Etanol absoluto a la muestra y luego de mezclar, se aplicó a la columna y centrifugó a 6000 x g en Microcentrífuga (Eppendorf) por 1 min. Posteriormente se añadió a la columna el Tampón de Lavado 1 (AW1), el Tampón de Lavado 2 (AW2) y Agua destilada en pasos sucesivos con centrifugaciones intercaladas de 5 min a 20000 x g. Se incubó 10 min a TA, se centrifugó 10 min a 20000 x g y el eluido se almacenó a -20°C para el posterior análisis de genes.

#### **III.4.1.3- Genotipaje**

Se estudió genotípicamente a todos los individuos (casos FHD y controles) para los polimorfismos puntuales (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) en los genes o sus promotores correspondientes a cinco citoquinas: TNF- $\alpha$  (-308 A/G), IFN- $\gamma$  (+874A/T), TGF- $\beta$ 1 (codón 10 T/C y codón 25 G/C), IL-10 (-1082 A/G, -819 C/T, -592 A/C), IL-6 (-174 G/C). El genotipaje se realizó con el empleo de un ensayo de RCP con cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP: del inglés *polymerase chain reaction with sequence specific primers*) mediante el uso del estuche de genotipaje de citoquinas comercialmente disponible One Lambda (Cytokine Genotyping Tray, de One Lambda, Inc.; EE.UU.) (Mattar y cols., 2006). Se procedió según las instrucciones del fabricante. Se preparó la mezcla de reacción para la RCP según orienta el fabricante del estuche con 7  $\mu$ L de D-Mix (Mezcla dNTP y tampón), 2  $\mu$ L de los cebadores de la citoquina correspondiente y 0,05  $\mu$ L de Taq polimerasa. Se adicionó 1  $\mu$ L de ADN más 9  $\mu$ L de la mezcla por tubo de RCP y se colocaron los tubos en el termociclador (Eppendorf AG, Hamburg; Alemania) con el programa de 1 ciclo de 96°C, 130 seg / 63°C, 1 min, seguido de 9 ciclos de 96°C, 10 seg / 63°C, 1 min, 20 ciclos de 96°C, 10 seg / 59°C, 50 seg / 72°C, 30 seg y terminar a 4°C. Los productos de la RCP fueron corridos en una electroforesis de ADN en gel de agarosa al 2% en tampón Tris Borato EDTA y bromuro de etidio). El producto de la RCP se sometió a corrida electroforética y las bandas de ADN se visualizaron con luz ultravioleta con un transiluminador, siendo fotografiadas para posterior análisis. Los alelos, genotipos y haplotipos fueron clasificados en altos productores o bajos productores, de acuerdo a reportes previos (Ollier, 2004b; Arcaroli y cols., 2005a; Holegaard y Bidwell, 2006).

#### **III.4.1.4- Análisis estadístico**

Los análisis fueron realizados con el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versión 11.5, SSPS Inc, Chicago, Ill; EE.UU.). Las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los genes de citoquinas TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10 y TGF $\beta$ 1 fueron estimadas por conteos directos y expresados en porcentos. La comparación entre los grupos de pacientes y controles fue hecha mediante el test Chi-cuadrado ( $X^2$ ) de Pearson y el riesgo de error por estimación de la probabilidad (valor de P) fue corregida por corrección de Yates, obteniéndose un valor fortalecido de P corregido (Pc). Se consideró estadísticamente significativa un valor de P <0.05. Fueron calculados los Odds ratio (OR) como estimado del riesgo, e intervalos de confianza en el nivel de 95% (95% IC). Un OR de <1 fue indicativo de protección, mientras un OR >1 lo fue de riesgo aumentado.

### **III.5. POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE LA RESPUESTA TH2 Y LA PATOGENIA DEL DEN**

#### **III.5.1 Comparación de los niveles de anticuerpos IgE total e IgE específicos anti-DEN en muestras séricas de pacientes con FD y FHD durante la infección secundaria.**

##### **III.5.1.1- *Muestra***

Se utilizaron muestras de suero seriadas obtenidas de 17 pacientes tras su ingreso hospitalario durante la epidemia de DEN 3 de Ciudad Habana, 2001-2002 (Pelaez y cols., 2004). Los pacientes habían sido diagnosticados clínica, virológica y serológicamente, clasificados como infección secundaria por DEN3. Clínicamente los pacientes fueron clasificados como 14 FD y 3 FHD de acuerdo a las Guías de la OPS/OMS para el Control y Prevención del DEN (1994). 5 de los pacientes con FD presentaron manifestaciones hemorrágicas (MH), por lo que decidimos analizarlos con el grupo de los pacientes de FHD, resultando los dos grupos: 9 FD y 8 FH+FD con MH.

##### **III.5.1.2- *Determinación de IgE total (UMELISA)***

Para la determinación de IgE total en el suero de los pacientes se realizó un Ensayo ultramicroanalítico (UMELISA) cuyo estuche comercial es producido por TecnoSUMA (Centro de Inmunoensayo, Cuba). La técnica consistió en un ensayo inmunoenzimático heterogéneo tipo “sandwich”, en el cual, en tiras revestidas previamente con anticuerpos monoclonales anti-IgE, fueron dispensadas las muestras problema (10 mL/pozo) por duplicado. De la misma forma, se añadieron los controles positivos y negativos suministrados en el estuche, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Las placas se incubaron 1 h a 37°C en cámara húmeda y seguidamente los pocillos se lavaron 6 veces en lavador MW2001 (TecnoSUMA, La Habana; Cuba), con la Solución de lavado. Seguidamente se adicionó el conjugado anti-IgE/fosfatasa alcalina y se incubó 2 hs en iguales condiciones. Previo lavado (6 veces) se añadió el sustrato fluorogénico (4-metilumbilifosfato) y la placa se incubó en cámara húmeda a TA, por 30 min. Se utilizó el lector de la serie PR-521 (TecnoSUMA, La Habana; Cuba) que cuantificó la intensidad de la fluorescencia emitida por cada determinación. La validación e interpretación de los resultados se realizó automáticamente por el programa UMELISA IgE. Rango de Valores Normales: 0-150 UI/mL.

##### **III.5.1.3- *Determinación de IgE específica anti-DEN o ELISA (EAC-ELISA)***

El protocolo del EAC-ELISA diseñado por Vazquez y cols. se empleó para la detección de IgE anti-DEN (Vazquez y cols., 2005). Placas MaxiSorp (Nunc GmbH & Co. KG, Langensfeld; Alemania) fueron recubiertas con 100 µL por pozo de IgG anti-IgE humana obtenida en camero a 10 µg/mL en tampón carbonato-bicarbonato, pH 9.6, e incubadas durante la noche a 4°C. Posteriormente las placas fueron

bloqueadas con 1% de SAB (SIGMA Aldrich Corp., St. Louis; EE.UU.) y fueron añadidos 50 µl del suero de los pacientes a una dilución 1/5 en PBS más 0.5 % de SAB. Se incluyó un control positivo (duplicado) y uno negativo (cuadruplicado) para DEN y se procedió a una incubación de 2 hs a 37°C. Seguidamente, fue añadida una mezcla de antígenos del virus DEN de los cuatro serotipos a 16 U hemaglutinantes, obtenida de cerebro de ratones lactantes infectados y procesados por el método de sacarosa-acetona (Clarke y Casals, 1958). Las placas se mantuvieron durante 18 hs a 4°C, y se añadió el conjugado de IgG humana anti-DEN/peroxidasa preparado en el Laboratorio de Arbovirus a una dilución de 1/4000 y se dejó incubar durante 1 h a 37°C. Se administró el sustrato (OPD, peróxido de hidrógeno en tampón citrato pH 5) y luego de 30 min de reacción a TA, esta se detuvo con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las placas se leyeron seguidamente en un lector de ELISA tipo MRX Revelation Microplate Reader (Dynex Tech., Denkendorf, Alemania) a 492 nm. Los resultados fueron expresados en Relación de DO (RDO) equivalente al cociente de la DO de las muestras y la media aritmética de la DO del control negativo. Se consideró como criterio de positividad un valor de RDO ≥ 1.4.

#### **III.5.1.4- Análisis estadístico**

El programa GraphPad Prim 2.0 (1995) se empleó para el análisis de datos. Para comparar las RDO de los anticuerpos IgE entre grupos de pacientes se empleó la T de Student. Un valor de p < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

### **III.5.2. Determinación y comparación de la expresión de genes de las citoquinas (IFN $\gamma$ , IL-4, TNF $\alpha$ , IL-10, TGF $\beta$ 1) y de marcadores de citotoxicidad (Granzima B y Perforina) frente al virus DEN en células mononucleares de individuos inmunes a DEN con antecedentes de asma bronquial y controles.**

#### **III.5.2.1- Muestra**

Se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica de 24 individuos divididos en dos grupos: casos y controles (edad de 20 a 55 años). Los casos se conformaron por 6 individuos con el diagnóstico de asma bronquial desde la infancia, que contaban con el antecedente personal de otras atopias (rinitis o eczema) y familiar de 1er y/o 2do grado de asma bronquial. Como controles se seleccionaron 18 individuos sin antecedentes de asma o alergia. Para ambos grupos se consideró el antecedente de una infección previa por DEN, determinado por la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero a algún serotipo del virus DEN (Sección III.1.1.6).

#### **III.5.2.2- Estimulación de células mononucleares**

Las células mononucleares aisladas por centrifugación mediante gradiente de densidad con el uso de Ficoll-Paque (SIGMA Aldrich Corp., St. Louis; EE.UU.) (Boyum, 1968) se lavaron y ajustaron a 2x10<sup>6</sup>/mL en

medio RPMI 1640 suplementado (Penicilina 100 Uds, Estreptomicina 100µg/mL, glutamina 100µM y suero autólogo al 5%). Seguidamente las células se incubaron en crioviales de 2.5 mL por 24 horas en presencia de los virus DEN1, DEN2 o DEN3, obtenido de sobrenadante de células C6/36 infectadas (Sección III.3.1.2), a una multiplicidad de 0,01. Una vez transcurrido el tiempo de incubación fueron centrifugados los crioviales, el sobrenadante se eliminó por decantación y se almacenó el botón celular a -80°C hasta su uso.

#### **III.5.2.3- Extracción de ARN y Reacción de Reverso-transcripción**

El ARN total fue extraído mediante el uso del estuche comercial RNeasy Mini kit (Qiagen GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemania) de las células estimuladas de asmáticos y controles y sintetizado el ADNc (Ver Sección III.2.3).

#### **III.5.2.4- RCP en tiempo real para cuantificación de la expresión de genes**

Para la cuantificación de la expresión de genes se empleó la RCP en Tiempo real usando el sistema de detección ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), siguiendo los procedimientos orientados por el fabricante. Las muestras se analizaron para la expresión de los genes de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4, TGF $\beta$ 1, IL-10, granzima B y perforina. La expresión específica se calculó por el método relativo con respecto a la expresión del gen constitutivo de referencia HPRT-1. Los datos se expresaron en pg de ARNm de los marcadores por ng de ARNm de HPRT-1, empleando una curva estándar para cada gen (Ver Sección III.2.1.5).

#### **III.5.2.5- Análisis estadístico**

La comparación de los niveles de expresión de genes de marcadores de respuesta celular entre asmáticos y controles se realizó a través de un test de Mann Whitney con el programa SSPS 11.5 sobre Windows. Una  $p < 0.05$  fue considerada estadísticamente significativa.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **IV.1. CINÉTICA DE LOS NIVELES DE LAS CITOQUINAS IL-12 E IL-10 Y DE MARCADORES DE CITOTOXICIDAD EN PACIENTES CON DEN Y SU RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD.**

#### **IV.1.1 Cuantificación de los niveles de IL-12 e IL-10 en muestras séricas de pacientes de FD y FHD durante la infección por dengue 2.**

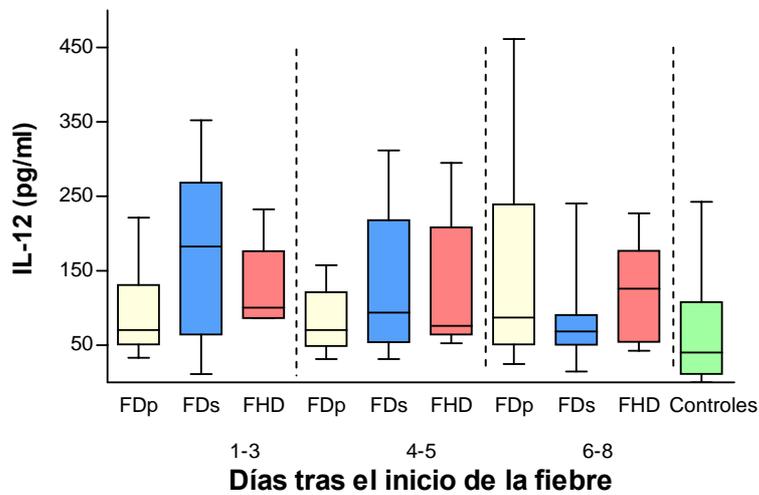
En el agravamiento del paciente de DEN las citoquinas parecen ser cruciales a través de su acción sobre las células del endotelio vascular. La mayoría de los estudios reportan el papel de las células T en esa explosión de citoquinas (Kurane, 2007), sin embargo, la participación de los mediadores de la respuesta innata se explora relativamente menos. Estos mediadores pudieran condicionar tempranamente la evolución clínica en el paciente. Los mecanismos de defensa innata son decisivos en la inducción de una respuesta inmune específica contra una infección viral (Koyama y cols., 2008). Del rápido inicio de estos mecanismos depende el éxito de evitar precozmente la diseminación de la misma. Las citoquinas liberadas por las células diana de la infección, CD y monocitos, pudieran aportar una señal temprana que anuncie el posterior agravamiento. El TNF $\alpha$  se ha reconocido como el mediador más asociado a la disfunción del endotelio (Chen y cols., 2007a; Kurane, 2007; Wang y cols., 2007; Yen y cols., 2008). Sin embargo, la cinética de otras citoquinas como la IL-12 o la IL-10, sintetizadas por estas células desde muy temprano tras la infección (Yang y cols., 2001; Palmer y cols., 2005; Chareonsirisuthigul y cols., 2007), y que pueden contribuir al desarrollo de un proceso pro-inflamatorio o anti-inflamatorio en el paciente, ha sido menos estudiada.

La IL-12 es un producto de las CDs activadas que promueve la diferenciación de las células T vírgenes a células Th1 (Ueno y cols., 2007). Por su parte, la IL-10 es una citoquina secretada por células de la respuesta innata (CD, monocitos y células epiteliales, entre otras) y de la respuesta adquirida (linfocitos T y B) cuyo efecto inhibe la producción de citoquinas Th1 como IFN $\gamma$  e IL-12 y otras moléculas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1, IL-8, y óxido nítrico por monocitos.(Scumpia y Moldawer, 2005).

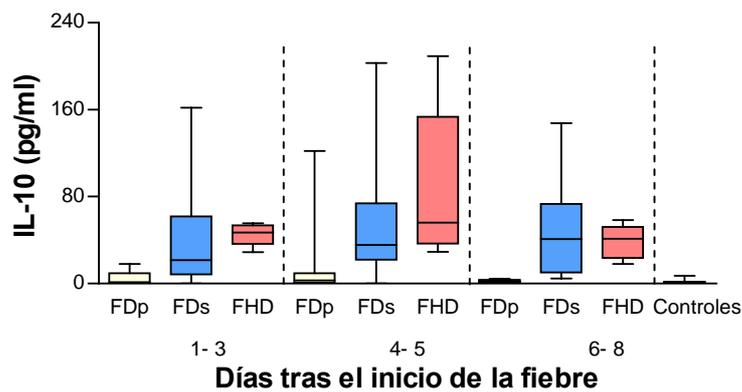
Dada la importancia de la IL-12 en la inducción de la respuesta Th1, ampliamente explorada y asociada a la defensa frente a infecciones virales aunque también a la patogénesis en el DEN, y el protagonismo de la IL-10 en el control de la inflamación, en nuestro trabajo se estudian los niveles séricos de ambas citoquinas en muestras colectadas seriadamente de pacientes de FD y FHD de la epidemia de Santiago de Cuba, 1997. Pacsa y cols. habían descrito un aumento en los niveles de IL-12 en los pacientes de FD (Pacsa y cols., 2000) y una asociación de niveles elevados de IL-10 con la FHD (Green y cols., 1999b; Chen y cols., 2005). Esto podría sugerir el papel de la respuesta Th1 en el control adecuado de la infección y la participación de la IL-10 en el agravamiento, lo cual era aparentemente contradictorio con lo reportado por múltiples estudios acerca del papel de la respuesta pro-inflamatoria exagerada en el choque por DEN.

De los 34 casos incluidos en el estudio confirmados como DEN, con un rango de edad entre los 16 y 59 años, 28 fueron diagnosticados como FD y 6 como FHD. La determinación de los anticuerpos IgG anti-DEN permitió clasificarlos según el tipo de infección en 11 con infección primaria y 17 con infección secundaria en el grupo de FD. Los 6 pacientes con FHD tuvieron una infección secundaria. Del ensayo de neutralización resultó el DEN1 como serotipo causante de la primoinfección en todos los casos secundarios.

Al analizar los niveles de IL-12, no encontramos diferencias estadísticamente significativas con respecto a los niveles obtenidos en los controles sanos. Sólo en el 35.7% de los pacientes de FD se detectaron niveles aumentados. En la Figura 1(a) se muestran, en un gráfico de cajas, los resultados de la determinación de IL-12 en el suero de los pacientes según la clasificación clínica y el tipo de infección. Al comparar los grupos de pacientes con infección primaria y secundaria, observamos que sólo aquellos que sufrieron FD durante la infección secuencial tenían niveles significativamente aumentados de IL-12 en la muestra tomada en los primeros 3 días del cuadro clínico ( $p=0.01$ ), no así para los casos que desarrollaron FHD o que sufrieron una infección primaria (Figura 1a).



a



b

Figura 1. Niveles de IL-12 en muestras de sueros seriadas de pacientes de FD (n=28) y FHD (n=6) con infección primaria o secundaria tomadas durante la epidemia de DEN2, Santiago de Cuba, 1997. Las cajas se extienden desde el 25 al 75 percentil, con una línea horizontal que representa la mediana (50 percentil). Las líneas verticales superiores e inferiores muestran los valores máximos y mínimos.

FDp: Fiebre dengue infección primaria / FDs: Fiebre dengue infección secundaria

\*:  $p < 0.05$  o significativa (Graph Pad Prism sobre Windows, Método de Mann Whitney)

Los resultados expuestos concuerdan con lo descrito por Pacsa y cols. quienes refieren el incremento en los niveles de IL-12 en los pacientes de FD a diferencia de una disminución en la FHD grado I y II, no siendo detectada esta citoquina en los casos de FHD grado III y IV (Pacsa y cols., 2000). Otros estudios que cuantificaron esta citoquina en el suero o plasma de pacientes tampoco la encontraron elevada (Green y cols., 1999b; Braga y cols., 2001). Por su parte, de Kruijff y cols. estudiaron la expresión del gen de IL-12 en células sanguíneas de niños graves, no detectando aumentada su expresión (de Kruijff y cols., 2008).

El hecho de que los niveles de IL-12 no se eleven significativamente en la infección primaria puede estar relacionado con una menor diseminación de la infección y carga viral comparada con la infección secundaria heterotípica, en que el fenómeno de ADA puede contribuir a aumentar el número de células infectadas por el virus (Vaughn y cols., 2000; Wang y cols., 2003; Thomas y cols., 2008; Srikiatkhachorn y Green 2009). Sin embargo, se ha asociado el fenómeno de ADA *in vitro* con una disminución de la síntesis de la IL-12, al parecer vinculado al entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$  y activación del factor nuclear Ikb- $\alpha$  (Polumuri y cols., 2007). Pero además hay otro factor a tener en cuenta: estudios *in vitro* con CD humanas infectadas con virus DEN demuestran una baja expresión y síntesis de IL-12 (Ho y cols., 2001; Libraty y cols., 2001), y es sólo en presencia de células T específicas de memoria que las CD recuperan su capacidad de secretar la IL-12, ante la expresión de moléculas CD40L por las células T (Sun y cols., 2006), lo cual tendría lugar en la infección secuencial. Esto podría explicar el incremento de los niveles de esta citoquina en pacientes de FD con infección secundaria en los primeros 3 días de la enfermedad (por acción de las células T de memoria presentes) y la disminución de los niveles en los pacientes clasificados como FHD (por predominar en ellos el fenómeno de ADA en la patogenia de la enfermedad).

Es conocido que la IL-12 es una citoquina inmunoregulatoria que está involucrada en el control temprano de un amplio número de enfermedades infecciosas (Romani y cols., 1997b) y asegura la inducción y mantenimiento de la inmunidad protectora liderada por las células Th1 y mediada por células citotóxicas y fagocíticas. Tiene generalmente entre sus funciones más relevantes activar las células NK y regular la magnitud de la respuesta de IFN $\gamma$ , inhibiendo el patrón Th2, lo cual, en las infecciones virales es crítico. Se ha demostrado, por ejemplo, que la IL-12 es un importante mediador para establecer el control inmune de la replicación del virus de hepatitis B en pacientes con infección crónica (Naoumov y Rossol, 2008). Así mismo los niveles de IL-12 son significativamente elevados en pacientes con mononucleosis infecciosa aguda (Corsi y cols., 2004) y es un mediador importante para asegurar un curso clínico favorable en pacientes infectados con los virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) (Smed-Sørensen y cols., 2004; Liu y cols., 2009), influenza (Komastu y cols., 1998) y herpes simple (Malmgaard y cols., 2000) y en pacientes con infecciones bacterianas entre las que se encuentran las causadas por Salmonela (Stoycheva y Murdjeva, 2005), Micobacterias de la tuberculosis y la lepra, Legionela, Helicobacter, etc. (Romani y cols., 1997a).

Si se tiene en cuenta el papel relevante de la IL-12 en infecciones intracelulares, y acorde a los resultados aquí obtenidos, pudiéramos inferir entonces que en aquellos individuos que sufren una infección secundaria heterotípica por DEN y desarrollan tempranamente altos niveles de esta citoquina, el curso clínico de la

infección sería benigno. Por el contrario, cuando no se alcanzan a sintetizar los niveles requeridos de IL-12, la respuesta inmune no logra controlar adecuadamente la infección en sus primeros estadios, y el paciente evoluciona clínicamente hacia la gravedad.

El hecho de ser esta una citoquina de la respuesta innata, y que la determinación sérica de sus niveles en los pacientes sea a partir del inicio de la fiebre, presupone que probablemente sólo detectamos los niveles correspondientes a la fase descendiente de la curva cinética. En el tiempo transcurrido entre la inoculación del virus por la picada del mosquito y el inicio del cuadro clínico, o período de incubación, en el que tiene lugar la primera fase virémica (Gubler, 1998), posiblemente se alcancen los niveles máximos de IL-12 en sangre. Esta constituye una limitación de los estudios en pacientes a la que los modelos experimentales pudieran dar respuesta, sin embargo, un modelo idóneo para el estudio de la infección por DEN es una meta aún no alcanzada. En su defecto, los estudios *in vitro* pudieran aportar nuevas evidencias con vistas a apoyar la hipótesis de la IL-12 como un mediador importante para la protección en el DEN.

A continuación se analizan los niveles de IL-10. A diferencia de lo observado con la IL-12, sus niveles fueron elevados en la mayoría de los pacientes, y al comparar con los niveles de los controles (media  $1.3 \pm 2.1$  pg/mL, rango 0-7.3 pg/mL), fueron significativamente mayores tanto en los pacientes de FD ( $p=0.04$ ) como en los de FHD ( $p=0.003$ ) en las tres determinaciones. Los niveles más elevados de la citoquina se constataron en los pacientes de FHD ( $p=0.03$  en la 1era y 2da determinación), alcanzando los valores máximos en la 2da determinación (coincidente con el 4to o 5to días del cuadro clínico). Los niveles declinaron posteriormente a partir del 6to día de la evolución.

En la Figura 1(b) se muestran los niveles de IL-10 de acuerdo a la clasificación de la infección en primaria o secundaria, encontrándose un comportamiento bien diferente entre los dos grupos. Los casos de FD, que sufrían una infección primaria, mostraron un comportamiento similar a los controles sanos, con valores casi indetectables. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Avila-Aguero y cols., quienes no detectaron la elevación de la IL-10 en pacientes durante la infección primaria (Avila-Aguero y cols., 2004). Sin embargo, en los casos de infección secundaria se obtuvieron niveles significativamente mayores en toda la cinética ( $p=0.03$ ). La comparación entre los niveles de IL-10 en pacientes de FD y FHD dentro de la infección secundaria, aunque no mostraron diferencias significativas, es relativamente mayor en el cuadro grave. Esto coincide con los altos niveles de IL-10 encontrados por otros autores en pacientes de FHD (Green y cols., 1999b; Chen y cols., 2005). Los niveles elevados han sido vinculados igualmente en otros trabajos a mortalidad en el paciente grave por DEN (Chen, 2006), a trombocitopenia (Azeredo y cols., 2001; Libraty y cols., 2002) y a la afectación de la función linfocitaria y plaquetaria (Azeredo y cols., 2001). Por su parte, Mongkolsapaya y cols. asoció la

inducción de apoptosis en las células T durante la infección secundaria con los niveles elevados de esta citoquina (Mongkolsapaya y cols., 2003).

Distintos estudios *in vitro* demuestran la síntesis de IL-10 por las células monocíticas y CD infectadas con DEN (Palmer y cols., 2005; Chareonsirisuthigul y cols., 2007; Reis y cols., 2007), y anticuerpos heterotípicos a DEN, los cuales parecen mediar el fenómeno de ADA, inducen la síntesis y liberación de IL-10 en monocitos o CMSP (Chen y cols., 2001; Yang y cols., 2001; Chareonsirisuthigul y cols., 2007). Partiendo de esto, las diferencias de los niveles de IL-10 entre pacientes con infección primaria y secundaria pudieran ser explicadas por un mayor número de células infectadas compatible con la mayor carga viral que se asocia a la infección secundaria y a la FHD (Vaughn y cols., 2000; Wang y cols., 2003; Thomas y cols., 2008; Srikiatkachorn y Green, 2009). De hecho, teniendo en cuenta que los pacientes con infección secundaria presentaban una secuencia de infección viral DEN1/DEN2, con 19-20 años de diferencia entre ambas infecciones, se pudiera hipotetizar que el fenómeno de ADA pudo estar involucrado.

Los mayores niveles de IL-10 en los pacientes con FHD pudieran sugerir una asociación de esta citoquina con la patogenia de la enfermedad, como ha sido propuesto por otros autores (Green y cols., 1999b; Chen y cols., 2005; Chen, 2006; Libraty y cols., 2002; Azeredo y cols., 2001; Mongkolsapaya y cols., 2003). Sin embargo, no fue estadísticamente significativa la diferencia en los niveles del grupo de FD con respecto a FHD dentro de la infección secundaria. Por otra parte, los niveles máximos de IL-10 se alcanzaron entre el 4to y 5to días del inicio de la fiebre, coincidiendo cronológicamente con el momento de la defervescencia y agravamiento en el paciente, pero esta coincidencia no basta para otorgarle una relación causal entre los valores elevados de la citoquina y la severidad.

La IL-10 es una citoquina sintetizada también en respuesta a altos niveles de TNF $\alpha$ . Su principal función se asocia a su capacidad de regular la proliferación y diferenciación celular definiendo su efecto inmunosupresor y anti-inflamatorio. En varias enfermedades infecciosas en las que la inflamación constituye un componente crítico de la patogénesis, se ha reportado su efecto beneficioso al limitar la magnitud de la inflamación (Saraiva y O'Garra, 2010). En la infección por DEN niveles exageradamente altos de TNF $\alpha$  en los primeros tres días del cuadro clínico se han relacionado con una mayor gravedad (Wang y cols., 2007), lo cual pudiera disparar, como parte de un lazo regulatorio del sistema inmune, la síntesis de IL-10. Cabe preguntarse entonces:

¿Estará la síntesis de esta citoquina condicionada por los elevados niveles de TNF $\alpha$  y otros mediadores pro-inflamatorios que ocurren al inicio del cuadro clínico? ¿Está el aumento de sus niveles sujeto más a un efecto compensador anti-inflamatorio? Es conocido que las células T de memoria pudieran ser una fuente importante

de IL-10 durante la infección secuencial (Rogers y cols., 2003; Kvale y cols., 2007; Garcia y cols., 2009), y las células Treg median su función anti-inflamatoria a través de la liberación de citoquinas como la IL-10. Interesantemente, Luhn y cols. observaron que la relación células Treg (CD4+CD25++): T efectoras era significativamente menor en pacientes con FHD, sugiriendo una disfunción de las células Treg (fuente importante de IL-10) que aparentemente llevaba a la gravedad a los pacientes. (Luhn y cols., 2007).

Es cierto que existen diferentes trabajos que asocian los efectos de la IL-10 en el humano con algunas de las complicaciones presentes en la FHD como la trombocitopenia (Sosman y cols., 2000; Casals-Pascual y cols., 2006), o la extravasación de plasma (Kurane y Ennis, 1992). No obstante, en otras enfermedades que cursan con plaquetas disminuidas esta citoquina se ha vinculado a mejoría (Panitsas y cols., 2004) y hallazgos recientes han relacionado la IL-10 con la normalización de la función endotelial en estudios experimentales (Tinsley y cols., 2010).

En infecciones como la hepatitis B (Avrămescu y cols., 2008) y C (Carpentier y cols., 2009), Ébola (Hutchinson y Rollin, 2007), Rotavirus (Jiang y cols., 2003) y sepsis (Suárez-Santamaría y cols., 2010) se han asociado elevados niveles de IL-10 con la gravedad, la cronicidad o el bloqueo del aclaramiento del patógeno en los pacientes. Sin embargo, en otras infecciones agudas y enfermedades autoinmunes el bloqueo de la IL-10 puede resultar en patología severa y mortalidad aumentada en el hospedero (Sanjabi y cols., 2009).

Diversos tipos de células pueden ser la fuente de IL-10. En la sepsis bacteriana los niveles de IL-10 se han correlacionado con los porcentajes de células CD14+, CD3+, y CD4+ con actividad del factor nuclear  $\kappa$ B (Hotta y cols., 2007). En la infección por VIH, por su parte, ARNm de IL-10 fue detectado en células T, B, y NK, siendo los monocitos la fuente más importante de esta citoquina en los pacientes (Brockman y cols., 2009).

No se han identificado *in vivo* las células productoras de esta citoquina durante la infección aguda por DEN, lo cual sería crucial para elucidar el papel de este mediador.

En el presente estudio se asocian los altos niveles de la IL-12 a la forma clínica leve durante la infección secundaria por DEN, lo cual sugiere el papel de esta citoquina en el control de la infección en estadios tempranos, y del patrón de respuesta Th1 que ella induce, en la protección.

Además, los resultados aquí obtenidos constituyen la primera evidencia *in vivo* de la relación directa entre la infección secundaria por DEN y los elevados niveles de IL-10. El papel patogénico o no de esta citoquina, sin embargo, queda por dilucidar, pues no encontramos una asociación con la severidad de la infección. Al tener en cuenta que la IL-10 es un mediador clave en el control de una respuesta inmune exacerbada que regula la

inflamación causante de daño en los tejidos. Además, es esencial para la homeostasis del sistema inmune, por lo que es preciso esclarecer el verdadero papel de esta citoquina en el DEN.

La situación epidemiológica tan singular del universo muestral empleado para este estudio, le aporta especial relevancia a los resultados de la presente investigación. No obstante, será necesario conocer cuáles son las células productoras de estas citoquinas, su verdadero papel y los mecanismos moleculares involucrados en sus acciones que constituirán prioridades en la investigación futura en DEN.

#### **IV.1.2.- Determinación de marcadores de citotoxicidad (Granzima B, Perforina y FasL soluble) en muestras séricas seriadas de pacientes de FD infectados por virus dengue 4.**

Los linfocitos Tc (CD8+) y las células NK tienen un papel central en la respuesta inmune a virus a través del reconocimiento y la iniciación de la apoptosis en las células infectadas. Tanto los linfocitos Tc como las NK presentan gránulos citolíticos lisosomales que contienen proteínas capaces de penetrar en el citoplasma de la célula diana e iniciar una cascada de eventos que resultan en una destrucción controlada (Lieberman, 2003a; Raja y cols., 2003b).

La activación temprana de células NK parece ser importante para el aclaramiento de la infección primaria por DEN. Sin embargo, no se conoce el papel de estas células en la definición de la evolución clínica del paciente (Navarro-Sanchez y cols., 2005). Por su parte, las células Tc parecen jugar un rol importante en la recuperación de la infección, pero también en la patogénesis (Yauch y cols., 2009).

Identificar los mecanismos moleculares por los que ocurre la eliminación de células infectadas en la infección por DEN es de especial interés con vistas a esclarecer los eventos involucrados en el aclaramiento viral y la recuperación de la enfermedad en el paciente.

En el presente trabajo, mediante la determinación cinética de marcadores solubles citotóxicos en pacientes de FD, se correlacionó la respuesta inmune celular citotóxica con la presencia de la proteína viral NS1 como un indicador de la replicación viral.

Los pacientes se clasificaron según el título de anticuerpos IgG anti-DEN en infección primaria o secundaria, resultando 9 casos con infección primaria y 21 casos con infección secundaria.

La cinética de granzima B en los sueros de pacientes de FD mostró niveles elevados a partir del tercer día del comienzo de la fiebre, teniendo en cuenta el rango de valores normales (0-11.5 pg/mL) referido por Spaeny-Dekking y cols. (Spaeny-Dekking y cols., 1998) y encontrados por nosotros en donantes supuestamente sanos de banco de sangre. Se alcanzaron los niveles máximos al quinto día de la fiebre ( $127 \pm 134$  pg/mL), los que tienden a alcanzar los valores normales hacia los días sexto y séptimo.

Se han descrito niveles elevados de granzimas solubles en otras infecciones virales como las causadas por el virus Epstein barr y el VIH, los cuales varían dramáticamente entre los individuos en dependencia de la intensidad de la respuesta de linfocitos Tc/NK, así como del estadio de la infección (Spaeny-Dekking y cols., 1998).

Al comparar los niveles de granzima B (Figura 2) en las muestras de pacientes con infección primaria y secundaria, se constataron diferencias significativas.

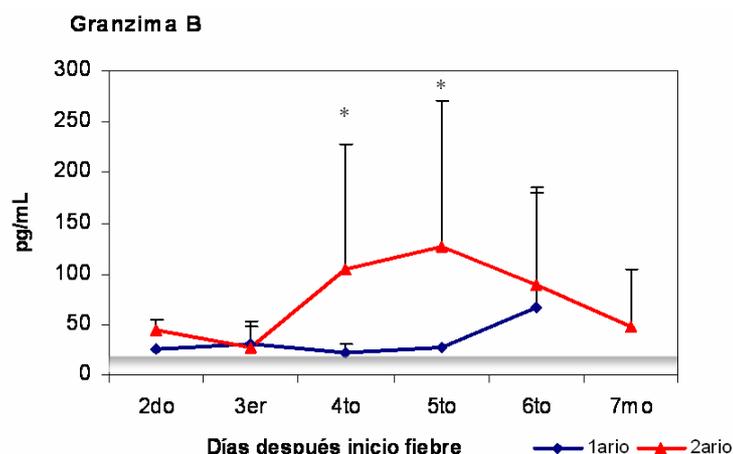


Figura 2. Cinética de los niveles de granzima B en muestras séricas de pacientes de FD con infección primaria (n=9) y secundaria (n=21) por DEN durante la epidemia de DEN4 de Ciudad Habana, 2006. En el gráfico la curva enlaza los puntos que representan la media de las concentraciones + desviación estándar de cada día del cuadro clínico. La línea horizontal representa el límite superior del rango de valores normales.

\*:  $p < 0.05$  o significativa en la comparación de los niveles de granzima B entre ambos grupos de infección primaria y secundaria (SPSS sobre Windows, Método de Mann Whitney)

Llama la atención el hecho de que los niveles de granzima B en los casos de infección primaria tienden a aumentar hacia el sexto día. De esto se infiere su participación en la citólisis mediada por linfocitos T. El incremento en los niveles es más anticipado durante la infección secundaria, lo que pudiera explicarse por la activación más temprana de los clones de células Tc de memoria en esos pacientes. Gwinn y cols. reportaron la expresión de ARNm de granzima B en células T CD4+ específicas a DEN en un estudio de re-estimulación de CMSP de individuos vacunados (Gwinn y cols., 2003).

También a diferencia de la infección primaria, en la secundaria se observa gran dispersión en los niveles de granzima B, lo que pudiera deberse, en primer lugar, a una magnitud y patrón de respuesta celular variable entre pacientes, lo cual ha sido reportado por Mongkolsapaya y cols. (Mongkolsapaya y cols., 2003). Factores genéticos del hospedero pueden influir en la variabilidad de la respuesta citotóxica. Se ha demostrado que los

genes polimórficos que codifican para moléculas asociadas al procesamiento y presentación antigénica son determinantes en la inducción de este tipo de mecanismos y definen patrones heterogéneos de respuesta entre los individuos (Chaturvedi y cols., 2006; Sierra y cols., 2007a). Los genes que codifican para la granzima B, la perforina y el FasL también presentan variantes alélicas con implicaciones funcionales en los niveles de expresión de estos marcadores (Zaitso y cols., 2004; McIlroy y cols., 2006; Jung y cols., 2007; Orilieri y cols., 2008). A su vez, a esta variabilidad podría estar contribuyendo el que distintos serotipos virales hayan causado la infección primaria en los pacientes, dados los antecedentes de epidemias de DEN 1, DEN 2 y DEN 3 (1977-79 / 1981 / 2001) en Ciudad Habana, a las cuales estas personas pudieron estar expuestas. Según Sierra y cols. (Sierra y cols., 2008), se han constatado diferencias en la respuesta citotóxica de células mononucleares de individuos inmunes a DEN *ex vivo* enfrentadas a distintas secuencias de infección.

Al analizar los niveles de perforina, estos fueron detectables en todos los casos estudiados (Figura 3).

Entre los días segundo y quinto del inicio de la fiebre el promedio de los niveles osciló entre 30 y 33 ng/mL. A partir del quinto día se observó una tendencia a la disminución de estos niveles, detectándose al séptimo día de evolución los valores próximos a los niveles basales ( $8.0 \pm 2.79$  ng/mL) encontrados en muestras de donantes de banco y reportados por Klingström J y cols. (Klingström y cols., 2006).

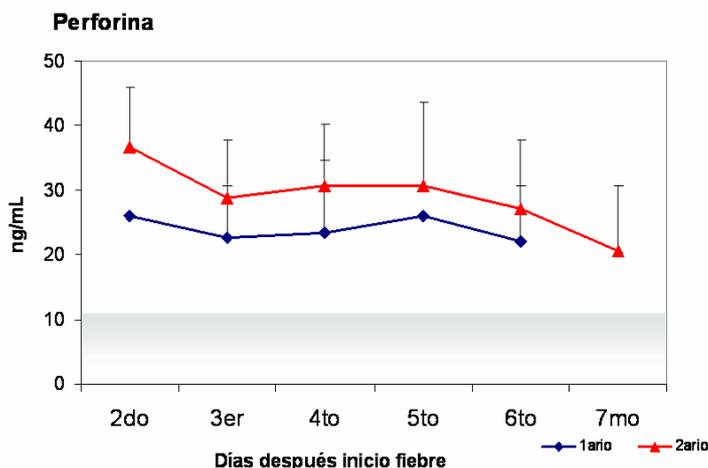


Figura 3. Niveles de perforina en muestras seriadas de suero de pacientes de FD con infección primaria y secundaria. Se exponen los resultados como la media de las concentraciones + desviación estándar. (n=9) y secundaria (n=21) por DEN durante la epidemia de DEN4 de Ciudad Habana, 2006. En el gráfico las curvas enlazan los puntos que representan la media de las concentraciones + desviación estándar de cada día del cuadro clínico para cada grupo de pacientes. La línea horizontal representa el límite superior del rango de valores normales de perforina.

Al comparar los casos de infección primaria y secundaria no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, aunque los niveles de perforina detectados son ligeramente superiores en los casos con infección secundaria al inicio del cuadro clínico ( $37 \pm 9$  ng/mL), con respecto a la infección primaria ( $26 \pm 10$  ng/mL) (Figura 3).

Gagnon y cols. (Gagnon y cols., 1999) demostraron la participación de un mecanismo dependiente de perforina en la acción citotóxica de clones de células T CD4+ específicos a DEN, lo cual sugiere su papel en el aclaramiento de la infección viral. Teniendo en cuenta el predominio de la citotoxicidad por células NK en fase aguda temprana y que las células T CD8+ parecen activarse en fase aguda tardía de la infección por DEN (Azeredo y cols., 2006a; Dung y cols., 2010), los resultados sugieren una participación del mecanismo mediado por perforina en la actividad de células NK, mientras predominaría el mecanismo mediado por granzima B en la citotoxicidad de las células T.

Por otra parte, en la totalidad de los pacientes estudiados se encontraron niveles elevados de FasL en suero, se conoce que en individuos sanos los niveles de FasL son indetectables (Stur y cols., 2007). Dichos valores oscilaron en un rango promedio entre 70 y 140 pg/mL desde el segundo al sexto día de evolución clínica, con una tendencia a disminuir hacia el séptimo día de evolución clínica. Tras el análisis del comportamiento de este mediador en los casos con infección primaria o infección secundaria (Figura 4), no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

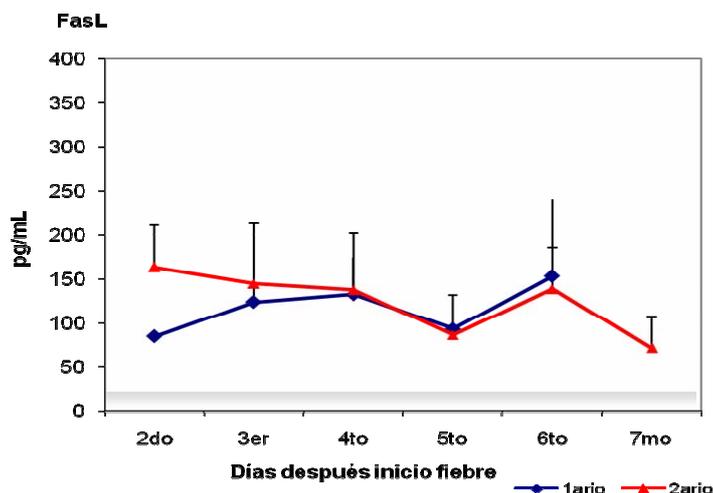


Figura 4. Cinética de los niveles de FasL en el suero de pacientes de FD con infección primaria (n=9) y secundaria (n=21) por DEN durante la epidemia de DEN4 de Ciudad Habana, 2006. En el gráfico las curvas enlazas los puntos que representan la media de las concentraciones + desviación estándar de cada día del cuadro clínico. La línea horizontal representa el límite superior del rango de valores normales.

Existen varios reportes de la determinación de FasL soluble en el suero, asociados a enfermedades infecciosas, tumorales y autoinmunes (Tomokuni y cols., 1999; Perianayagam y cols., 2000; Kuwano y cols., 2002; Mustafa y cols., 2005). Se ha descrito el aumento de los niveles séricos de Fas y FasL solubles en la infección por VIH (Fadeel y cols., 1996; Bahr y cols., 1997). En pacientes con infecciones virales agudas como rubéola, viruela, mononucleosis infecciosa y herpes, los niveles séricos de FasL soluble fueron similares a los de los controles sanos, e indetectables en muchos de ellos (Stur y cols., 2007). Pero en enfermedades dermatológicas eruptivas se ha descrito un aumento de los niveles de FasL en suero seguido de una disminución significativa de sus valores entre los días 3ro y 6to después del debut de la enfermedad (Abe y cols., 2003).

En el DEN, la molécula FasL ha sido asociada a la lisis "inocente" de células no infectadas por parte de células T CD4+ mediante la interacción FasL-Fas (Gagnon y cols., 1999).

Con vistas a correlacionar los niveles de los marcadores de citotoxicidad solubles con algún indicador de replicación viral, determinamos el Índice de la proteína NS1 presente en el suero de los pacientes. En la Figura. 5 se muestran estos índices en pacientes con infección primaria o secundaria.

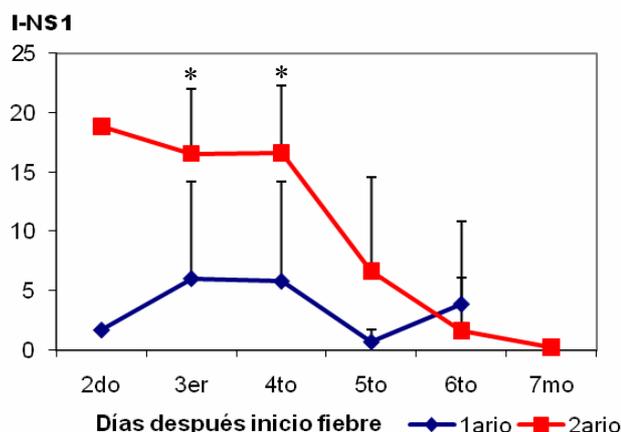


Figura 5. Promedio de los Índices NS1 en muestras seriadas de suero de pacientes con infección primaria y (n=9) y secundaria (n=21) por DEN durante la epidemia de DEN4 de Ciudad Habana, 2006 (I-NS1: media aritmética de la relación  $DO_{muestra}/DO_{valor\ de\ corte}$ ). Se exponen los resultados como la media de las concentraciones + desviación estándar. \*:  $p < 0.05$  o significativa en la comparación de los I-NS1 entre ambos grupos de infección primaria y secundaria (SPSS sobre Windows, Método de Mann Whitney).

Como se observa en el gráfico, los niveles de la proteína NS1 fueron significativamente más elevados en los pacientes con infección secundaria con respecto a aquellos que sufrieron la primoinfección. Esto se puede correlacionar con el reporte de una mayor carga viral asociada a la infección secundaria y la FHD (Vaughn y cols., 2000; Wang y cols., 2003; Thomas y cols., 2008; Srikiatkachorn y Green, 2009).

Aunque el resultado en relación a la NS1 no refleja la concentración real de la proteína en sangre, es de señalar que existen reportes sobre una valoración semi-cuantitativa del ensayo, con una traducción indirecta de los niveles de replicación viral (Lolekha y cols., 2004).

En la cinética de ambos grupos se describen los mayores niveles entre el 2do y el 4to día del inicio de la fiebre, entonces ocurre un descenso brusco al 5to día. Esta caída de los valores pudiera deberse, más a la formación de inmunocomplejos NS1-anticuerpos (IgM o IgG) que impiden o bloquean la detección de la proteína en el inmunoensayo, que a una disminución real de la replicación viral. Dicha interferencia en la determinación de la proteína viral falsea la cinética de este marcador a partir del 5to día del cuadro clínico y constituye una limitación de nuestro estudio para inferir el efecto de los mecanismos citotóxicos sobre el control de la infección viral.

La Tabla 3 muestra los resultados del análisis estadístico realizado que correlaciona los niveles séricos de los marcadores de citotoxicidad estudiados y la presencia de la proteína NS1.

Tabla 3. Correlación entre los niveles de perforina, granzima B y FasL soluble con el Índice de NS1 en muestras seriadas de suero de pacientes (n=30) con DEN durante la epidemia de DEN4 de Ciudad Habana, 2006 según los días de la toma de la muestra. (SPSS sobre Windows, Método de Correlación de Spearman)

		<b>I-NS1</b>		
<b>Marcadores</b>	<b>Determinación</b>	<b>1ra</b>	<b>2da</b>	<b>3ra</b>
<b>Granzima B</b>	1ra	ns	ns	ns
	2da	ns	ns	ns
	3ra	p=0.022	p=0.000	ns
<b>Perforina</b>	1ra	p=0.000	p=0.056	ns
	2da	p=0.001	p=0.025	ns
	3ra	p=0.001	p=0.023	ns
<b>FasL</b>	1ra	ns	ns	ns
	2da	ns	ns	ns
	3ra	ns	ns	ns

ns: No significativo estadísticamente (p>0.05)

A pesar de que no se correlacionaron en el tiempo los mayores niveles de granzima B con el I-NS1, si se encontró una correlación directa estadísticamente significativa entre el incremento en los I-NS1 en los primeros días del cuadro clínico (entre el 1er y 5to días) y los niveles de granzima B en la tercera determinación (después del quinto día del cuadro clínico) (Tabla 3). Esto es comprensible teniendo en cuenta que la granzima B

aparentemente se asocia más a la actividad citotóxica de linfocitos T y parece implicar que a una mayor diseminación de la infección y replicación viral (lo cual se constata al inicio del cuadro clínico) se induce una mayor activación de células Tc y, por tanto, un incremento en la citotoxicidad mediada por granzima B.

Al analizar el comportamiento de los niveles de perforina y su asociación con la presencia de la proteína NS1, se encontró una correlación significativa entre los I-NS1 en la 1ra y 2da determinaciones y los niveles de perforina en las tres muestras seriadas de la cinética. El estudio del comportamiento de los niveles de FasL en su relación con la proteína NS1 (Tabla 3) no mostró correlación estadísticamente significativa durante la cinética evaluada, lo cual pudiera asociarse con la participación de este mecanismo de citotoxicidad en la lisis “bystander o inocente” de células no infectadas.

Tanto para las células NK como para los linfocitos Tc la citotoxicidad puede estar mediada a través de la vía perforina/granzima B o por la interacción Fas-FasL. Se ha intentado caracterizar fenotípica y funcionalmente las células T de memoria CD8+ en diferentes modelos de infección por virus (Lanzavecchia y Sallusto, 2005). El estudio de los patrones de distribución de los gránulos citotóxicos en células T humanas ha demostrado por ejemplo, que las células T CD8+ específicas a influenza son perforina<sup>-</sup>/granzima B<sup>-</sup>, las anti-citomegalovirus se comportan con un patrón perforina<sup>+</sup>/granzima B<sup>+</sup>, y en virus Ebstein barr y VIH son perforina<sup>+/+</sup>/granzima B<sup>+</sup> (Harari y cols., 2009). Así mismo, se ha descrito en algunas infecciones una predilección de un mecanismo sobre otro bajo determinadas condiciones. Por ejemplo, en pacientes con hepatitis C, también de la familia de los flavivirus, en la citotoxicidad por células NK el IFN $\alpha$  actúa induciendo principalmente la vía de perforina, mientras que en las células T esta citoquina no estimuló ni la vía de la perforina ni la de FasL (Kaser y cols., 1999).

Pudiéramos sugerir que en el transcurso de la infección primaria por DEN existe una actividad mediada principalmente por células NK y da paso más tardíamente (hacia el 6to del cuadro clínico) a la citotoxicidad por linfocitos Tc. Mientras que en el curso de una infección secundaria, la activación temprana de la respuesta mediada por células T de memoria conlleva a la liberación de mediadores y el aumento de la expresión de moléculas MHC I por lo que la actividad de las células NK no predomina (Borrego y cols., 2002; Hershkovitz y cols., 2008).

Durante una infección secundaria heterotípica ocurre una diseminación mayor de la infección favorecida por el fenómeno de ADA (Halstead, 2007), que induciría una mayor respuesta citotóxica. Esto explicaría el incremento secuencial de los niveles de perforina y luego de granzima B, ambos marcadores correlacionados directamente con los mayores niveles de la proteína NS1. Estas observaciones sugieren la inducción de este mecanismo efector por la presencia de células infectadas y su función en el control de la infección.

Dadas las diferencias estadísticamente significativas obtenidas al comparar los índices de la proteína NS1 del virus DEN en la infección primaria y secundaria se esperaría un comportamiento similar para los marcadores citotóxicos. Es decir, niveles significativamente mayores de estos en la infección secundaria respecto a la primaria. Sin embargo, esto sólo ocurre así para los niveles de granzima B. Este fenómeno pudiera explicarse por un incremento de los niveles de perforina durante la infección primaria asociados a la actividad citotóxica predominante de las células NK.

Variantes peptídicas de proteínas virales son reconocidas por células Tc CD8+ de forma específica o cruzada, generando una función citotóxica aumentada, disminuida o suprimida para el reconocimiento cruzado al comparar con el reconocimiento específico (Imrie y cols., 2007). Patrones alterados de respuesta pudieran contribuir al agravamiento en el curso clínico de la infección, teniendo en cuenta que la proporción de células T CD8+ y NK que expresan CD69 es significativamente mayor en niños con FHD que en aquellos que evolucionan con la FD (Green y cols., 1999a). Se ha demostrado que durante la infección secundaria, una posible inhibición de la respuesta citotóxica pudiera ocurrir a pesar del mayor reto antigénico, debido a la muerte por apoptosis inducida por activación de clones de linfocitos Tc de memoria, lo cual ha sido reportado por Mongkolsapaya y cols. (Mongkolsapaya y cols., 2003). Estos autores demostraron presencia de marcadores de activación en un porcentaje elevado de células T CD8+ específicas a virus DEN seguida de una apoptosis masiva de estas células en la sangre de pacientes durante la fase aguda de la enfermedad, llevando a frecuencias de células T específicas extremadamente bajas en contraste con otras infecciones virales. Por su parte, un aumento de los niveles de Fas soluble en pacientes de DEN se han asociado a la apoptosis de células T en el transcurso de la infección (Myint y cols., 2006). Nuevas investigaciones serán necesarias para dilucidar este fenómeno.

Al explorar si había alguna relación entre los niveles de granzima B, perforina y FasL con los hallazgos de laboratorio Trombocitopenia y Leucopenia, se encontró una asociación significativa entre mayores niveles de perforina entre el 2do y 5to días ( $p=0.043/p=0.011$ ) y mayores niveles de granzima B en el cuarto y quinto día, con la presencia de trombocitopenia ( $p=0.03$ ). Así mismo, mayores niveles de FasL en los primeros 3 días de la enfermedad se asociaron al desarrollo de leucopenia en los pacientes ( $p=0.019$ ) (Tabla 4).

Tabla 4. Asociación entre los niveles de granzima B, perforina y FasL con los hallazgos de laboratorio Trombocitopenia y Leucopenia en pacientes con infección por DEN (n=30) durante la epidemia de DEN4 de Ciudad Habana, 2006 (SPSS sobre Windows, Método de Mann Whitney)

	<b>Trombocitopenia</b>	<b>Leucopenia</b>
<b>Perforina</b>	<b>P1=0.043</b> <b>P2=0.011</b>	ns
<b>Granzima</b>	<b>P2=0.030</b>	ns
<b>FasL</b>	ns	<b>P1=0.019</b>

ns: p no significativa ( $p>0.05$ )

El desarrollo de trombocitopenia se describe como un hallazgo de laboratorio entre el 35 y el 50% de los pacientes con FD, y entre el 50 y el 90% de los pacientes de FD se ha reportado el desarrollo de leucopenia (Gubler, 1997). En los pacientes del presente estudio la trombocitopenia estuvo presente en el 59% de los pacientes (44.4% en infección 1aria y 70.6% en 2aria), y mostró asociación con la infección secundaria ( $p=0.037$ ).

La verdadera causa de la trombocitopenia en la infección por DEN no está bien dilucidada. La caída en el conteo de plaquetas puede resultar de una disminución de la producción en la médula ósea o, una vez en circulación, ser secuestradas en el bazo y destruidas por macrófagos producto de un hiperesplenismo asociado a esplenomegalia (Putintseva y cols., 1986). Las plaquetas en periferia pueden disminuir por consumo debido al depósito en las superficies dañadas de las células endoteliales, pues un endotelio dañado descubre a un subendotelio trombogénico capaz de aglutinar plaquetas y se hace propenso a la coagulación intravascular diseminada (Elghetany y Walker, 1999). También la infección directa de las plaquetas por el virus puede ser causa de la afectación de su función así como de la disminución de su número (Funahara y cols., 1987). Por otra parte, anticuerpos auto-reactivos que se unen a plaquetas acortan su vida media al ser rápidamente aclaradas por macrófagos del sistema reticuloendotelial. Se ha sugerido que la IgG asociada a plaquetas induce trombocitopenia en el DEN, la cual pudiera estar mediada por macrófagos a través de los receptores Fc o del complemento, o mediante la lisis directa de plaquetas inducida por complemento (Saito y cols., 2004). Sin embargo, se ha demostrado en otras enfermedades que las plaquetas cubiertas por anticuerpos IgG son susceptibles también a ser destruidas por células NK por un mecanismo de ADCC (Gengozian y Rice, 1982), lo cual es perfectamente viable en la infección por DEN. Los resultados del estudio apoyan esta hipótesis si se

tiene en cuenta la asociación de la trombocitopenia con los niveles elevados de perforina en la infección secundaria donde los niveles de IgG anti-DEN son mayores.

Por su parte, la leucopenia se presentó en el 29% de los pacientes (22.2% en infección primaria y 35.2% en secundaria). El desarrollo de leucopenia en el DEN se ha vinculado a una supresión de la médula ósea que acontece en los 3-4 días del transcurso de la infección aguda por DEN (La Russa y Innis, 1995). Si se conoce que el FasL es liberado de las células Tc activadas y, una vez soluble, pudiera unirse a células que expresan la molécula Fas (Linkermann y cols., 2005), al ocurrir la interacción FasL-Fas se induciría la muerte por apoptosis de estas células. En pacientes de Hepatitis C el sistema Fas-FasL parece estar involucrado en una eliminación aumentada de células T activadas, limitando la respuesta de dichas células en esta infección viral (Kaser y cols., 1999).

En el DEN la molécula FasL se ha vinculado a la lisis "inocente" de células no infectadas por el virus (Gagnon y cols., 1999) y se ha descrito un elevado porcentaje de células T específicas que sufren apoptosis masiva en la sangre de pacientes, llevando a una mayor linfopenia en comparación con otras infecciones virales. (Liu y cols., 2000; Holm y cols., 2006). Si se parte de este hecho, la asociación encontrada entre niveles elevados de FasL soluble y la leucopenia pudiera sugerir que la disminución en el conteo de leucocitos totales pudiera deberse, entre otros factores, a la apoptosis de los linfocitos mediada por la interacción Fas-FasL. La unión de esta molécula soluble a su receptor de membrana expresado sobre los leucocitos u otras células pudiera explicar su "consumo" o reducción de sus niveles séricos y que por tanto no se constata un aumento de esta en el suero de pacientes con infección secundaria (Hoffmann y cols., 2002b).

Se ha demostrado en modelos experimentales que niveles aumentados de IFN $\gamma$  provocan una sobre-expresión de la molécula Fas sobre las células endoteliales y de esta forma las hacen susceptibles a sufrir apoptosis mediada por la interacción Fas-FasL (Koide y cols., 2007). De hecho, en varias enfermedades se ha descrito la inducción de apoptosis en las células endoteliales por la acción de FasL soluble (Okura y cols., 2002; Wan-Uk y cols., 2007). Acorde con estos antecedentes, recientemente se ha descubierto la participación de la vía Fas/FasL en la apoptosis inducida por el DEN en las células endoteliales vasculares *in vitro* (Liao y cols., 2010), lo cual sugiere el papel de esta interacción en la apoptosis de células endoteliales encontrada en la FHD (Limonta y cols., 2007) y la extravasación de plasma en el paciente grave.

Los resultados expuestos en el presente estudio sugieren el papel protector de la respuesta citotóxica frente a la infección por DEN, teniendo en cuenta que un mayor reto antigénico induce la activación de células citotóxicas y liberación de granzima B y perforina a la circulación. La granzima B parece vincularse predominantemente a la citotoxicidad mediada por células Tc, mientras que en la citotoxicidad por células NK pudiera predominar un

mecanismo mediado por perforina. La perforina pudiera asociarse a un evento citotóxico causante de la trombocitopenia, y la molécula FasL estar involucrada en la leucopenia del paciente de DEN. Sin embargo, es necesario profundizar en el estudio de estos mecanismos y resulta imprescindible estudiar estos marcadores en pacientes que desarrollan el cuadro grave.

## **IV.2. NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES DE CITOQUINAS INDUCIDOS POR EL VIRUS DEN EN CULTIVOS DE CELULAS MONONUCLEARES DE INDIVIDUOS INMUNES AL VIRUS**

### **IV.2.1. Análisis de la expresión de genes de: IL-12, IL-10 y TNF $\alpha$ en células mononucleares humanas frente a la infección homotípica y heterotípica con virus dengue.**

Las células de la respuesta innata tienen proteínas de membrana especializadas responsables del reconocimiento de la infección, y otras que son liberadas para combatirla. La respuesta anti-viral se origina cuando los receptores que reconocen patógenos (PRRs, del inglés *pathogen recognition receptors*) interactúan con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) presentes en las proteínas y ácidos nucleicos virales. La unión PRR–PAMP dispara una cascada de señales que resultan en la activación de factores de transcripción, los cuales, a su vez, inducen la producción de IFNs tipo I, genes estimulados por IFN, citoquinas y quimoquinas pro-inflamatorias (Katze y cols., 2008). Entre las citoquinas pro-inflamatorias secretadas se destacan la IL-12 y el TNF $\alpha$ .

Con vistas a conocer la acción de la infección por el virus DEN2 en células mononucleares humanas sobre la inducción de las citoquinas IL-12, IL-10 y TNF $\alpha$ , nos propusimos reproducir *in vitro*, las secuencias de infección secundaria que acontecieron en la epidemia de Santiago de Cuba de 1997. En ese brote había personas con antecedentes de infección por virus DEN1 (epidemia por DEN1 1977-79) y por virus DEN2 (epidemia por DEN2, 1981). El 98% de los individuos que sufrieron la FHD tuvieron una secuencia de infección DEN1 / DEN2. Los que se enfrentaron en infección secundaria a DEN2 (DEN 2/DEN 2) supuestamente se protegieron, teniendo en cuenta que la inmunidad homóloga a un serotipo es de por vida en el DEN (Gubler, 1997). En base a lo anterior, células mononucleares de individuos con antecedentes de infección primaria por DEN 1 o por DEN 2, y de un grupo de individuos no inmunes a DEN, fueron

enfrentadas *in vitro* al virus DEN2 en presencia o no de suero autólogo. Este diseño nos permitió explorar el papel que podrían jugar los anticuerpos heterotípicos en la inducción de las citoquinas.

Los resultados obtenidos de la expresión de genes de citoquinas en las células mononucleares incubadas con virus DEN2 se muestran en la Figura 6 en un gráfico de cajas.

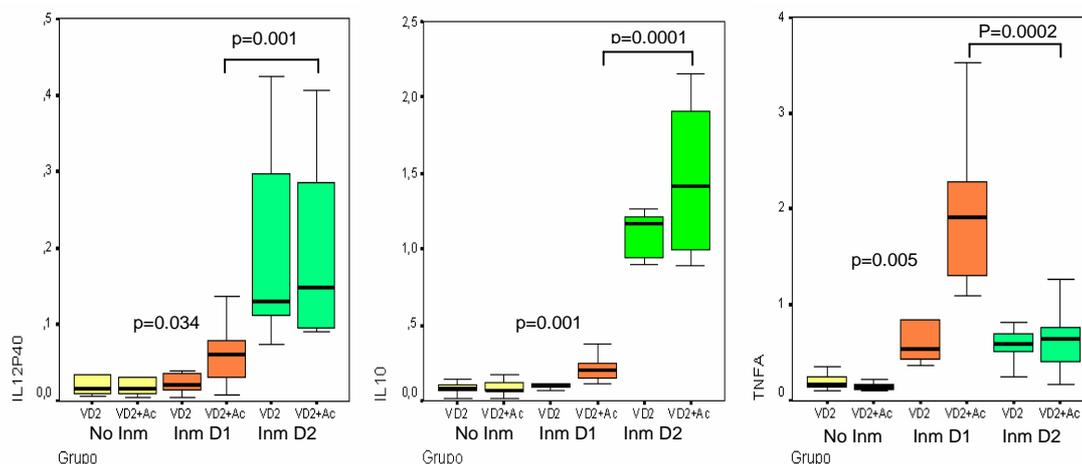


Figura 6. Niveles de expresión de los genes de IL-12p40, IL-10 y TNF $\alpha$  en células mononucleares de individuos inmunes a DEN1 (n=1) o inmunes a DEN2 (n=2) cultivadas en presencia del virus DEN2. Las cajas se extienden desde el 25 al 75 percentil, con una línea horizontal que representa la mediana (50 percentil). Las líneas verticales superiores e inferiores muestran los valores máximos y mínimos.

p: valores de p asociados a la comparación estadística entre los niveles de expresión en los grupos señalados (SPSS sobre Windows, Método de Mann Whitney)

No Inm: Individuos no inmunes a DEN; Inm Den: Individuos Inmunes a DEN (1 o 2); VD2: cultivo con virus DEN2 sin suero autólogo; VD2+Ac: cultivo con virus DEN2 y suplementación con suero autólogo

Como puede apreciarse en la figura, los niveles de expresión de los genes de las tres citoquinas fueron mínimos en las células de los individuos no inmunes a DEN. Al analizar la respuesta inmune heteróloga a virus DEN2 *in vitro* (individuos inmunes a DEN1), aunque para la IL-12p40 e IL-10, la expresión no difirió con respecto a los controles en ausencia de suero autólogo, si lo hizo para el TNF $\alpha$  (p=0.0001) Podemos observar, sin embargo, que la presencia del suero autólogo en el cultivo, aumentó significativamente la expresión de los genes de las tres citoquinas: IL-12p40 (p=0.034), IL-10 (p=0.001) y TNF $\alpha$  (p=0.005) en las condiciones de reto heterotípico. O sea que, aparentemente, en condiciones de ADA, la formación de inmunocomplejos Ac anti-DEN1: virus DEN2, y la entrada del virus a las células a través de receptores Fc, induce la síntesis aumentada de estas citoquinas. Estudios anteriores concuerdan con nuestros resultados de IL10 y TNF $\alpha$ : un aumento de la IL-10 y TNF $\alpha$  ha sido reportado en cultivos primarios de CD (Palmer y cols. 2005), monocitos (Reiss y cols., 2007), células mononucleares humanas de individuos no inmunes a DEN (Yang y cols., 2001) y

células de línea THP1 (Chareonsirisuthigul y cols., 2007) en presencia del virus DEN2 y anticuerpos a virus DEN1, en condiciones que tratan de reproducir el fenómeno de ADA. Los resultados obtenidos sugieren que la fuente productora principal de estas citoquinas en condiciones amplificantes de la infección, son las células de la respuesta inmune innata, posiblemente a través de un mecanismo de internalización del IC mediado por el entrecruzamiento entre los receptores Fc $\gamma$ R y entre ellos y los TLRs (Drechsler y cols., 2002). Sin embargo, los resultados de este estudio no son coincidentes con esos trabajos en relación a la IL-12, en la que describen una disminución en condiciones de ADA. Esto puede deberse a que difieren las condiciones experimentales al realizar los cultivos con monocitos, CD o CMSP de donantes no inmunes, mientras en nuestro caso son donantes inmunes, y se ha demostrado que la presencia de células T de memoria induce la liberación de IL-12 en células infectadas por virus a través de la expresión de la molécula CD40L (Sun y cols., 2006).

Al comparar la respuesta heteróloga (inmunes a DEN1 frente a virus DEN2) con la homóloga (inmunes a DEN2 frente a virus DEN2), en presencia de suero autólogo, se evidenció una disminución significativa en la expresión del gen de TNF $\alpha$  ( $p=0.0002$ ), y un incremento significativo de la expresión de los genes de IL-12p40 e IL-10 ( $p=0.001$  y  $p=0.0001$ , respectivamente) en la respuesta homóloga. Estos resultados del modelo *in vitro* sugieren que en la infección secundaria por DEN, el incremento de TNF $\alpha$  parece asociarse a la patogenia y el aumento de IL-12 e IL-10 a la protección.

El papel patogénico del TNF $\alpha$  en el DEN ha sido ampliamente fundamentado (Chen y cols., 2007a; Kurane, 2007; Wang y cols., 2007; Yen y cols., 2008), y es ahora apoyado por los resultados de este trabajo.

Por su parte para la IL-12, cuyos mayores niveles se han asociado a la forma leve de la enfermedad en la presente investigación y en previos estudios (Pacsa y cols., 2000; de Kruif y cols., 2008), los resultados del experimento *in vitro* sustentan lo que sugiere la determinación *in vivo* de la citoquina acerca de su papel en la protección. El estudio en pacientes de la epidemia de DEN2 en Santiago de Cuba refleja similares resultados a los observados *in vitro* en los individuos no inmunes (infección primaria) e inmunes a DEN1 (infección secundaria), aunque esta vez monitoreada la expresión del gen *ex vivo* a sólo 24 horas después de la exposición al virus.

Sin embargo, con respecto a la IL-10, los resultados *in vitro* son paradójicos con lo publicado acerca del papel de esta citoquina en la patogenia. Al igual que en el estudio *in vivo*, la infección primaria (individuos no inmunes) indujo niveles basales de expresión del gen, y en la infección secundaria DEN1/DEN2 (inmunes a DEN1, en presencia de suero autólogo) los niveles de expresión fueron significativamente mayores. Sin embargo, sorprendentemente, en condiciones de cultivo de reto homotípico (inmunes a DEN2 enfrentados al

DEN2), lo cual no es abarcado en el estudio *in vivo* por ser un grupo silente, que no desarrolla manifestaciones clínicas, ocurrió la mayor expresión de la citoquina. Estos resultados sugieren el papel de este mediador en la protección, más que en la patogenia de la enfermedad. Lo cual apoya más la función de IL-10 en el control de la inflamación sistémica en la infección por DEN grave, que como citoquina inmunosupresora que favorece el agravamiento de la infección. No obstante, no se puede ignorar el papel que tienen los anticuerpos neutralizantes en bloquear una infección secundaria homotípica tempranamente, lo cual llevaría a un segundo plano el protagonismo de otros mediadores solubles.

Al analizar dentro de la respuesta inmune homóloga a virus DEN2, comparando las condiciones sin y con suero autólogo, un aumento significativo de la expresión de IL-10, no así de IL-12p40 ( $p=0.820$ ) o TNF $\alpha$  ( $p=0.650$ ) se constató en presencia del suero. Estos resultados sugieren el papel de los anticuerpos heterotípicos en la inducción de IL-10. Si bien el mecanismo molecular por el cual tiene lugar la ADA no está totalmente esclarecido se conoce que, *in vitro*, no sólo implica un aumento significativo del título viral (Sullivan, 2001), sino también una alteración en la síntesis de mediadores celulares (Thomas y cols., 2006). Sin embargo, además de los monocitos, las células B o T pudieran aportar en la producción de IL-10 en esas condiciones. Evaluar el origen celular de estos mediadores a través de futuros experimentos de tinción intracelular de citoquinas y estudio de subpoblaciones en triple marcaje por citometría de flujo, y emprender estudios que dilucidan los mecanismos moleculares que disparan la síntesis de estos deberá ayudar a desentrañar su verdadero papel en la infección por DEN.

A modo de resumen del presente estudio, a partir de la importancia de la IL-12 en la defensa inmune frente a infecciones virales (Ueno y cols., 2007) y el protagonismo del TNF $\alpha$  en la disfunción endotelial de la FHD (Cardier y cols., 2005; Chaturvedi, 2006), los resultados de la expresión de estos genes obtenidos en CMSP de individuos inmunes cultivadas con el virus son sustentables. Sin embargo, la expresión significativamente mayor de IL-10 ante el reto viral homotípico, en contraposición al papel de esta citoquina en la patogénesis de la FHD referido anteriormente, sugiere que la misma podría tener una función protectora al controlar la respuesta pro-inflamatoria anti-viral.

#### **IV.2.2. Determinación y comparación de los niveles de TNF $\alpha$ en sobrenadante de células sanguíneas de individuos con antecedentes de FD y FHD cultivadas con virus dengue 3.**

Partiendo del importante papel del TNF $\alpha$  en la patogénesis de la extravasación de líquido y la trombocitopenia por DEN, nos propusimos evaluar si existía en los individuos con antecedentes de FHD una predisposición a

producir mayores niveles de dicha citoquina con respecto a los que desarrollaron la FD. Para ello, células de sangre periférica de individuos con historia de infección secundaria (DEN 1 / DEN 2), y antecedentes de diferentes formas clínicas de la enfermedad, se enfrentaron al virus DEN 3 con vistas a cuantificar la síntesis de TNF $\alpha$  en el cultivo.

Teniendo en cuenta lo anterior, se exploró si existían diferencias entre individuos con antecedentes de FD o FHD en la capacidad de producir TNF $\alpha$  al estimular, simulando una infección terciaria, sus células sanguíneas con el virus DEN *ex vivo*.

En la Figura 7, se exponen los valores de concentración de TNF $\alpha$  en el cultivo con el virus DEN 3 y con un control de las células donde fue obtenido el virus (Vero) de ambos grupos de estudio.

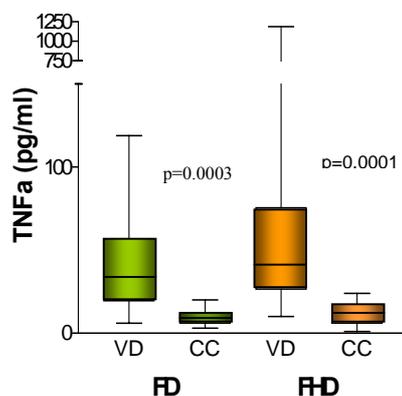


Figura 7. Niveles de TNF $\alpha$  producidos *in vitro* por células de la sangre de individuos con antecedentes de FD (n=15) y FHD (n=15) enfrentadas al virus DEN 3. Las cajas se extienden desde el 25 al 75 percentil, con una línea horizontal que representa la mediana (50 percentil). Las líneas verticales superiores e inferiores muestran los valores máximos y mínimos. (SPSS sobre Windows, Método de Mann Whitney)  
VD: virus DEN 3 / CC: control de células Vero, donde fue crecido el virus

Los resultados mostraron que en el 70% de los casos, independientemente de si eran FD o FHD con anterioridad, se detectó una concentración al menos tres veces mayor de TNF $\alpha$  en presencia del virus con respecto al control celular (p=0.0003; p=0.0001).

Se ha constatado *in vitro* que los monocitos y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son fuentes celulares de producción de TNF $\alpha$  (Gagnon y cols., 1999; Carr y cols., 2003). Contrario a otros trabajos en que se emplean sistemas celulares aislados con concentraciones de anticuerpos subneutralizantes (Chareonsirisuthigul y cols., 2007), nuestro diseño trata de reproducir al menos en parte, el ambiente natural en que ocurriría la infección secuencial *in vivo*, empleando el cultivo de células de sangre total, así como los anticuerpos del individuo en concentraciones reales.

Estudios genéticos recientes fundamentan que individuos capaces de producir altos niveles de TNF $\alpha$  tienen un riesgo mayor a desarrollar manifestaciones hemorrágicas (Fernandez-Mestre y cols., 2004). Sin embargo, si bien la media de los niveles de la citoquina en el cultivo de los individuos que sufrieron FHD fue mayor que la de los casos de FD, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Esto pudiera explicarse por el hecho de que ambos grupos comparados son de individuos que sufrieron una infección secundaria y, por tanto, frente al serotipo 3 del virus, simulan una infección terciaria *ex vivo*. Hasta el momento, basado en observaciones epidemiológicas, se especulaba que una infección terciaria por DEN estaba asociada al desarrollo de las formas leves de la enfermedad o a la protección (Gubler, 2002). Esto podría explicarse a partir de la respuesta de reactividad cruzada desarrollada por anticuerpos heterotípicos y células de memoria a los serotipos 1 y 2 expuestos a un tercer virus que, en alguna medida, neutralizarían la infección. Sin embargo, a partir del estudio de la epidemia de DEN3 que tuvo lugar en Ciudad Habana, Cuba, en el año 2001, se reporta por primera vez, que el 15% de los casos de FHD tenían antecedentes de infecciones por los virus DEN1 y DEN2 (Alvarez y cols., 2006b).

Teniendo en cuenta lo anterior entonces cabe preguntarse: ¿Podría la hiper-producción de TNF $\alpha$  detectada *in vitro* estar relacionada con el desarrollo de FHD en una infección terciaria? Si así fuera, los individuos que produjeron niveles significativamente mayores en el presente estudio, podrían desarrollar la forma clínica grave de exponerse por tercera vez a la infección natural. Se conoce tras un estudio prospectivo en niños inmunes a DEN que aquellos cuyas células producían *in vitro* altos niveles de TNF, desarrollaron cuadros más severos al sufrir la infección natural (Mangada y cols., 2002).

Lograr una muestra homogénea de individuos con historias de infecciones naturales por DEN similares, nos dio la posibilidad de controlar las variables serotipo infectante, secuencia de infección e intervalo entre estas, lo cual otorga mayor rigor a los resultados obtenidos, pues dichos parámetros constituyen factores de riesgo conocidos en la patogenia de la FHD (Guzman y Kouri, 2008). Estudios futuros serán necesarios para demostrar la asociación entre la infección secuencial y los niveles de TNF $\alpha$  en humanos, así como la predisposición genética de los individuos altos productores de esta citoquina a padecer el DEN hemorrágico.

### **IV.3. EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS EN TEJIDOS DE FALLECIDOS POR DEN HEMORRÁGICO**

#### **IV.3.1. Estudio de la expresión cualitativa de genes de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 y TGF $\beta$ 1 en hígado y bazo de fallecidos por DEN hemorrágico durante la infección por virus DEN 3 o DEN 4.**

La extravasación de plasma que caracteriza la FHD/SCD se traduce en efusión pleural o ascitis, hemoconcentración, tendencia al sangramiento e hipoproteinemia (Halstead, 1989). Como hallazgos histopatológicos predominan el edema perivascular sin destrucción del endotelio, necrosis del parénquima hepático y esplénico e hiperplasia celular del timo (Bhamarapavati y cols., 1967). El hígado puede estar aumentado de tamaño y suele haber un aumento de las enzimas hepáticas (Kuo y cols., 1992). Se reconoce que en el estudio de la fisiopatología del DEN grave cobran especial relevancia los estudios realizados en tejidos de fallecidos obtenidos por necropsias al ser los más informativos, pero dada la baja tasa de mortalidad de la enfermedad y las limitaciones socio-culturales en relación a las prácticas necróticas en múltiples países endémicos, estos estudios son escasos. Existen aproximadamente 3 decenas de reportes publicados que abordan la descripción de tejidos de pacientes o fallecidos por FHD. De estos un 81% se limitan al estudio de los hallazgos anátomo-patológicos y la detección de antígenos o ácido nucleico viral, el 15% aborda el tema de la apoptosis en los tejidos y sólo un trabajo explora la presencia de mediadores de respuesta inmune como las citoquinas (de Macedo y cols., 2006).

En nuestro trabajo seleccionamos tejidos de bazo e hígado por ser órganos afectados durante la infección por este virus. En casos de FD se demuestra hepatomegalia entre el 10 y el 30%, es mucho más frecuente en el curso de la FHD, y se reporta el incremento de las transaminasas hepáticas en sangre entre el 30 y el 90% de los pacientes de FD (Gubler, 1997). También la esplenomegalia ha sido reportada en un rango de 5 a 25% de los pacientes con FHD (Gubler 1997). Las afectaciones de estos órganos se ha vinculado a la presencia de proteínas o ARN virales en los mismos (de Macedo y cols., 2006; Miagostovich y cols., 2006; Limonta y cols., 2007).

Los mecanismos por los cuales el virus DEN puede causar complicaciones fatales no están totalmente esclarecidos, sin embargo, niveles significativamente mayores de TNF $\alpha$ , IL-10, TGF $\beta$ 1 e IFN $\gamma$  se han constatado en suero o plasma de pacientes de FHD (Green y Rothman, 2006).

Por la importancia que reviste el estudio de marcadores de respuesta inmune en casos graves y fallecidos para esclarecer los mecanismos inmunológicos involucrados en el agravamiento de la infección, nos propusimos en

este estudio investigar la expresión de genes de dichas citoquinas en tejidos de hígado y bazo de fallecidos por DEN en la epidemia del 2006.

La Figura 8 muestra el % de positividad en la expresión de cada citoquina según el órgano (hígado o bazo) en un gráfico de barras.

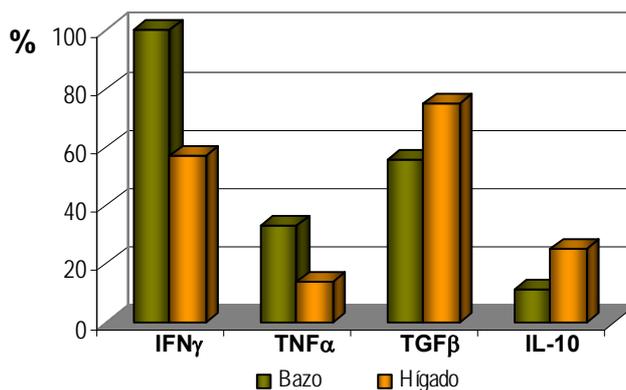


Figura 8. Expresión de genes de las citoquinas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  e IL-10 en tejidos de Bazo e Hígado de fallecidos por FHD (n=10) durante la epidemia cubana de DEN del año 2006. Resultados expresados en valores porcentuales de casos en que se constató cualitativamente la expresión de cada citoquina.

Como se aprecia en el gráfico, en un porcentaje elevado de fallecidos se constató la expresión de IFN $\gamma$  y TGF $\beta$ 1 en los tejidos (entre el 55 y el 100% de los casos), a diferencia de la expresión de TNF $\alpha$  e IL-10, que sólo se expresaron en 3 de los casos (entre el 10 y el 30% de los casos).

La expresión de IFN $\gamma$  en el bazo se detectó en el 100% de los casos, mientras en el hígado se demostró en el 57% de los fallecidos. El IFN $\gamma$  es una citoquina producida por las células NK y las células T, la cual predomina en la circulación y en los órganos. Su efecto principal se ejerce sobre la activación de las funciones del macrófago tales como: la fagocitosis, la presentación de antígenos y la secreción de citoquinas. Además, actúa sobre la síntesis de anticuerpos por las células B y la maduración de células T citotóxicas (Bonjardim, 2005). Si tenemos en cuenta que en el momento de la muerte de los pacientes de FHD la respuesta inmune adquirida tiene su papel protagónico, pudiéramos inferir que la fuente de esta citoquina son principalmente las células T y por tanto, un predominio de un patrón de respuesta Th1 se estaría evidenciando en los casos estudiados. La expresión de IFN $\gamma$  en el total de los casos concuerda con lo reportado por múltiples autores que han asociado niveles elevados de IFN $\gamma$  en sangre con el cuadro grave de la enfermedad (Braga y cols., 2001; Libraty y cols., 2002a). La cinética descrita en los pacientes de FHD refiere un máximo de su concentración hacia los días 4-5to de iniciada la fiebre, con un descenso lento posterior, lo cual está en correspondencia con los resultados aquí

obtenidos. A partir de estos hallazgos, pudiéramos sugerir un predominio del patrón de respuesta de células Th1 (función proinflamatoria y antiviral).

En el caso del TGF $\beta$ 1, considerando que esta citoquina tiene un papel pleiotrópico en la respuesta inmune y es ampliamente expresada por las células T, por los leucocitos y células del estroma (Li y cols., 2007), sería de interés identificar las células productoras de la misma en el tejido por inmunohistoquímica. No obstante no podemos aseverar la participación de un patrón Th3 productor de TGF $\beta$ 1 (función predominantemente reguladora) (Taylor y cols., 2006), pues el origen celular de esta no necesariamente son las células T. Se ha reportado que células del tejido conectivo y del endotelio, ante condiciones de hipoxia, aumentan la transcripción del gen de TGF $\beta$ 1 (Sánchez-Elsner y cols., 2001; Qin y cols., 2009 ) En la FHD/SCD la extravasación de plasma conduce al choque hipovolémico en el paciente y a la hipoxia en los tejidos, lo cual podría explicar la expresión de TGF $\beta$ 1 en el bazo e hígado de los fallecidos.

La expresión de TGF $\beta$ 1 comprobada en la mayoría de los casos concuerda con lo descrito por algunos autores que lo asocian a la severidad de la enfermedad (Laur y cols., 1998; Agarwal y cols., 1999). Su cinética en sangre describe una curva creciente que va en ascenso hasta el 9no día del cuadro de FHD (Azeredo y cols., 2006b). Sin embargo, al ser esta una citoquina reguladora, pudiera estar actuando, como un efecto compensador, en respuesta a altos niveles de citoquinas Th1.

Por otra parte, es de interés destacar cómo a diferencia de los elevados niveles séricos o plasmáticos de TNF $\alpha$  reportado en pacientes con FHD (Mathew y Rothman, 2008), en la mayoría de los tejidos analizados no hay una expresión constatable de esta citoquina. Debemos considerar lo reportado en estudios cinéticos de los niveles de TNF $\alpha$  en suero o plasma durante la fase aguda de la enfermedad. En las investigaciones realizadas en los últimos años (Chakravarti y Kumaria, 2006; Bozza y cols., 2008; Restrepo y cols., 2008a) se asocian niveles elevados de TNF $\alpha$  a trombocitopenia o a infección secundaria, pero no a severidad. Wang y cols. encontraron niveles significativamente mayores de TNF $\alpha$  en pacientes de FHD que en FD y controles sólo en los primeros 3 días del cuadro clínico, luego esta citoquina iba declinando en sangre y no se detectaban diferencias en sus concentraciones entre las distintas formas clínicas (Wang y cols., 2007). O sea, los mayores niveles de TNF $\alpha$  descritos en los pacientes graves no coinciden cronológicamente con el momento de la muerte, entre el quinto y sexto días del cuadro clínico para la casi totalidad de los fallecidos. Si además tenemos en cuenta que la expresión de ARNm en las células es un evento anterior en el tiempo a la constatación de la proteína en sangre, y que bastan 6 a 24 horas de elevadas concentraciones para que logren causar los cambios

histopatológicos y agravamiento clínico (Talwar y cols., 2006; Zhang y cols., 2009), pudiera ser explicable la infrecuente detección en la expresión de ese gen en los tejidos encontrada en nuestro estudio.

La IL-10 fue también pobremente expresada en los tejidos, a pesar de los reportes que refieren el aumento de los niveles séricos de esta citoquina asociado a infección secundaria y a FHD (Green y cols., 1999b; Nguyen y cols., 2004). Es de subrayar, sin embargo, que resultados más recientes vinculan la IL-10 a un mecanismo de regulación compensatorio frente a la liberación sistémica de citoquinas proinflamatorias y a protección frente al cuadro grave. Lühn y cols. postularon que la severidad de la enfermedad por DEN parece deberse a una deficiente activación de las células Treg (Luhn y cols., 2007). De ser así, la ausencia de expresión de IL-10 en las muestras analizadas en nuestro estudio es esperada al ser casos que no logran controlar el agravamiento clínico progresivo y terminan su evolución en la muerte. Interesante resulta que dos de los tres casos cuyos tejidos expresaron IL-10 procedían de pacientes ancianos (de 69 y 73 años respectivamente), lo cual pudiera haberles hecho más susceptibles al agravamiento y la muerte a pesar de la expresión detectada de IL-10. Es conocido que en esa etapa de la vida tiene lugar la inmuno-senescencia, caracterizada por una desregulación de la inflamación asociada a niveles plasmáticos aumentados de IL-6 y TNF $\alpha$  (Krabbe y cols., 2004; Huang y cols., 2005) que parece acompañarse de un incremento de la frecuencia de células Treg CD4+FoxP3+ en los órganos linfoides secundarios (como el bazo) (Lages y cols., 2008).

El comportamiento tan disímil en la expresión de los genes de citoquinas estudiadas entre el bazo y el hígado de los mismos pacientes pudiera deberse a diferencias sustanciales en la histología y función de estos órganos. El estudio de la expresión de citoquinas en tejidos de bazo e hígado procedentes de fallecidos por trauma quirúrgico o accidentes, que por razones éticas no pudieron ser incluidos, aportaría, sin lugar a dudas, un control muy útil a la presente investigación.

El hígado es un órgano que realiza una importante contribución a la defensa del hospedero sintetizando varias moléculas defensivas que incluyen componentes del Sistema de complemento y Factores de la coagulación, sin embargo, el parénquima hepático es formado casi en su totalidad por los hepatocitos los cuales componen del 70 al 80% de la masa del órgano. En condiciones normales las células T activadas por las células endoteliales sinusoidales no se diferencian hacia Th1, que expresan IFN $\gamma$  e IL-2, sino en células T regulatorias que expresan IL-4 y IL-10, pero no TGF $\beta$ 1 (Knolle y cols., 1999). Sin embargo, bajo la influencia de IFN tipo I producido por hepatocitos infectados, las células endoteliales sinusoidales producen IL-12 y promueven la diferenciación de las células T CD4+ a células pro-inflamatorias Th1 (Crispe, 2003). En un estado de inflamación hepática se ha constatado la producción de citoquinas por diferentes células: IL-8, IP-10, y MIP-1

por los hepatocitos, RANTES, MCP-1, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , IL-10 e IL-12 por las Células endoteliales sinusoidales, y IL-1, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  y RANTES por las células de Kupffer (Ramadori y cols., 2008).

El bazo, a diferencia del hígado, es uno de los órganos linfoides secundarios importantes, donde las CD y linfoides predominan. Su estructura histológica organizada permite la interacción eficiente de gran densidad de células de la respuesta inmune innata y adquirida que se concentran en la pulpa blanca del órgano, las cuales consisten en zonas de células T, arteriolas y folículos de células B.

En el bazo son procesados todos los antígenos que viajan por vía sanguínea. Usualmente las CD activadas por virus migran al bazo, donde el microambiente del estroma esplénico puede regular negativamente la función de estas células a través de la síntesis de TGF $\beta$ , citoquina que se libera constitutivamente en ese microentorno (Li y cols., 2008). La estructura y función diferente de ambos órganos pudiera ser la base de una mayor expresión de los genes estudiados en tejidos de bazo que en el hígado de los fallecidos.

De Macedo y cols. (2006) desarrollaron el único estudio encontrado en la literatura revisada que antecede al nuestro donde se explora la presencia de citoquinas, particularmente el TNF $\alpha$  y la IL-2 por inmunohistoquímica en muestras de tejidos de fallecidos por DEN. Los autores reportan muy pocas células positivas a estas citoquinas en una observación que abarcó hasta 20 lóbulos del órgano. Las células positivas tenían la apariencia de células de Kupffer (de Macedo y cols., 2006). La mayoría de los hepatocitos y las células de Kupffer son infectadas por el virus DEN durante la infección aguda, llegando a ser hasta un 70% (De Macedo et al., 2006); no obstante, en ambos estudios la expresión de TNF $\alpha$  es casi no constatable. Además del desfase cronológico entre la fase febril (de mayores niveles de TNF $\alpha$ ) y el momento de la muerte, ya descrito, esto pudiera deberse a una inhibición de la producción de citoquinas inducida por el virus en las células infectadas, una inhibición del reclutamiento de células productoras de esta citoquina, o la toxicidad directa sobre las células de Kupffer, que constituyen la principal fuente de citoquinas pro-inflamatorias en este órgano (Velazquez y cols., 2008).

Estudios realizados en otras infecciones virales también han hallado diferencias en el comportamiento de la infección en cuanto a la respuesta inmune en dependencia del órgano afectado: En un estudio que comprendía la expresión de citoquinas en 53 hígados de pacientes infectados con el virus de la fiebre amarilla, flavivirus que se caracteriza por causar daño hepático con esteatosis, apoptosis y necrosis, similar al DEN, se encontró la infección de hepatocitos con apoptosis en la mayoría de ellos e infiltración de células mononucleares a expensas de células T CD4+ principalmente. Sin embargo, sólo algunas células expresaban TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  y en una proporción mucho más intensa las células expresaron TGF $\beta$ 1 (Juarez y cols., 2006). En ese estudio

relacionan la apoptosis de hepatocitos con la intensa expresión de la citoquina TGFβ1 en el área mediozonal y asocian su presencia también a la pobre respuesta inflamatoria local y baja expresión de TNFα, mientras proponen a la célula T CD4+ como la principal célula inmune presente en el hígado durante la infección fatal por el virus de la fiebre amarilla. La escasa expresión de TNFα y elevada de TGFβ1 en el hígado de los fallecidos es un resultado comparable con el nuestro.

Por otra parte, y en concordancia con los resultados aquí obtenidos, Llorent y cols. encontraron altos niveles de expresión de TGFβ1 en hígado con cirrosis post Hepatitis C, y sugieren el papel de esta citoquina en la inflamación y la fibrosis hepática (Llorent y cols., 1996).

Al comparar la expresión de las citoquinas en fallecidos infectados con los serotipos virales DEN3 y DEN4, constatamos que en el bazo la expresión de IFNγ para DEN3 se comportó similar a la de DEN4, detectándose en el 100% de los casos. En cambio, para el TGFβ1, se comprobó su expresión en 1 fallecido con DEN4 y 3 fallecidos con DEN3.

En la Figura 9 se presentan los resultados de la expresión de estos genes en el hígado. Tanto las citoquinas proinflamatorias como las anti-inflamatorias se expresaron mayoritariamente en fallecidos que padecieron la infección por DEN3 con respecto a los infectados con DEN4, llegando a expresarse el TGFβ1 en el 80% de los casos. En la infección por DEN4 sólo detectamos expresión de TGFβ1 en uno de los tres casos estudiados.

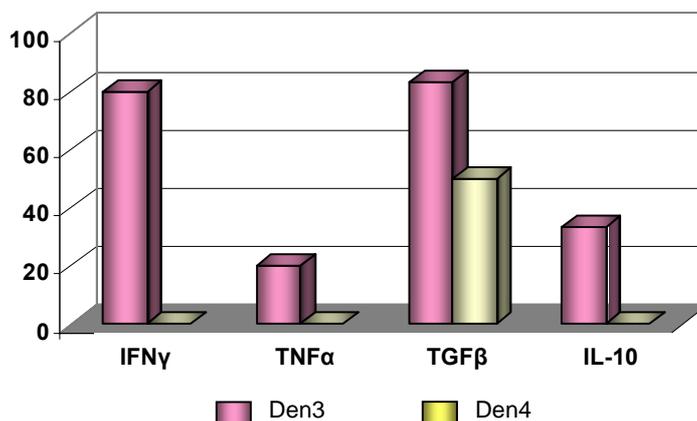


Figura 9. Expresión de genes de las citoquinas IFNγ, TNFα, TGFβ e IL-10 en tejidos de hígado de fallecidos por FHD (n=10) tras la infección por virus DEN3 o DEN4 durante la epidemia cubana del 2006. Resultados expresados en valores porcentuales de casos en que se constató cualitativamente la expresión de cada citoquina.

Para analizar la diferencia en la expresión de los genes de citoquinas entre casos infectados con DEN3 y aquellos con DEN4, debemos referir primero que todo el escaso número de casos con el diagnóstico de DEN4

que entraron en este estudio, lo cual limita en el arribo de conclusiones. Sin embargo, consideramos útil exponer algunas observaciones: En primer lugar, se ha comprobado *in vitro* la menor capacidad replicativa del virus DEN4 con respecto a otros serotipos (Guzman y cols., 2003). Además, una menor carga viral en suero de pacientes de DEN4 se ha detectado al comparar con otros serotipos (Castellanos, 2009). Por otra parte, se conoce que epidemias de DEN 3 se han comportado con una mayor severidad respecto a otras en las que ha circulado el DEN4 (Alvarez y cols., 2006b; Alvarez y cols., 2008b). Estudios *in vitro* empleando células mononucleares de sangre periférica de individuos inmunes a DEN que han sido enfrentadas a diferentes serotipos virales, han demostrado niveles significativamente mayores de expresión de los genes de citoquinas al serotipo 3 que frente a otros serotipos (Sierra y cols., 2005). Conocemos además que el comportamiento clínico de pacientes infectados con DEN 3 difirió del desarrollado por aquellos que padecieron la infección con DEN 4 durante la epidemia cubana del 2006. Particularmente la presencia de hepatomegalia en casos de FHD fue 29 veces más frecuente durante la infección con DEN3 que con DEN4, constatándose en el 85,2% de esos pacientes niveles elevados de enzimas hepáticas en suero compatible con daño hepático (Pacheco y cols., 2009; Zayas y cols., 2009).

Teniendo en cuenta que la síntesis de citoquinas responde a una red compleja de interconexiones y que dicha red frecuentemente involucra varias citoquinas, algunas con efectos sinérgicos que se potencian y otras con efectos antagónicos, se hace notar la importancia de los estudios en órganos de fallecidos para dilucidar el papel de estos mediadores.

Los resultados del presente estudio nos permiten inferir el papel del IFN $\gamma$  en la patogénesis del DEN. No obstante, la ausencia de la expresión de TNF $\alpha$  en los tejidos, no excluye su papel como inductor primario de la patogénesis del cuadro grave. La escasa expresión de IL-10 en los tejidos estudiados pudiera ser un signo que asocie esta citoquina con la prevención de la evolución al choque irreversible por DEN, lo cual apoyaría su posible papel protector en el control de la respuesta inflamatoria sistémica ante la infección secundaria. Este trabajo constituye el primer reporte del estudio de citoquinas proinflamatorias y anti-inflamatorias en órganos de fallecidos por DEN, lo cual implica un aporte al conocimiento mundial de la enfermedad.

#### **IV.4. VARIANTES POLIMÓRFICAS DE GENES DE CITOQUINAS PRO Y ANTI-INFLAMATORIAS PREDOMINANTES EN PACIENTES DE FHD**

##### **IV.4.1. Determinación y comparación de las frecuencias alélicas, genotípicas o haplotípicas de los genes de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 y TGF $\beta$ 1 en pacientes de FHD de la epidemia de Santiago de Cuba durante el año 1997 y en una muestra control de la población.**

Teniendo en cuenta la pequeña proporción de personas que durante una infección secuencial heterotípica desarrollan FHD (Chaturvedi y cols., 2006), así como las diferencias en la susceptibilidad a la FHD en distintos grupos étnicos (Sierra y cols., 2007b), se infiere que los factores genéticos deben jugar un papel importante en la patogenia del DEN.

Dados los múltiples estudios donde se ha sugerido que la extravasación de plasma característica de la FHD ocurre por la disfunción que inducen las citoquinas proinflamatorias sobre las células endoteliales vasculares (Rothman, 2010), y considerando que la producción de citoquinas es regulada por polimorfismos genéticos, nos propusimos estudiar el impacto que puede tener el estudio de los genes de citoquinas sobre la susceptibilidad a padecer DEN grave. Se conoce que diferentes variantes genéticas de estos genes se han asociado a la susceptibilidad de disímiles enfermedades (Knight, 2001; Ollier, 2004; Arcaroli y cols., 2005a).

Contraria a la situación epidemiológica que ha acontecido en Cuba en las últimas décadas, la mayoría de las áreas endémicas del mundo reportan la co-circulación de varios serotipos virales, siendo muy difícil determinar el virus infectante de los individuos y las secuencias de infección (Malavige y cols., 2004). Estas circunstancias epidemiológicas afectan la validez y rigor de los estudios de factores de riesgo del hospedero para la FHD, y particularmente los estudios genéticos. Es por esto que consideramos nuestro escenario único y potencialmente útil para arribar a conclusiones más valederas a través de estudios inmunogenéticos.

Partiendo del conocimiento de que en 1977, Cuba sufrió una gran epidemia de FD causada por DEN 1, y cuatro años después el país se vio inmerso en otra gran epidemia esta vez de FHD causada por DEN 2 (Guzman y cols., 1990; Guzman y Kouri, 2003), cuando en 1997 se presenta el brote de Den 2 en el Municipio de Santiago de Cuba, las secuencias esperadas de infección por DEN debían ser DEN1/ DEN2 o DEN2/DEN2. Al ser estudiados por ensayo de neutralización los 205 casos de FHD, el 98 % de ellos sufrieron una infección secundaria y tenían anticuerpos séricos neutralizantes a DEN1 y DEN2, o sea, sufrían una infección secuencial DEN1/DEN2. Por la gran homogeneidad de la muestra de individuos, en que todos tenían la misma secuencia de infección, con los mismos genotipos virales, en similares condiciones, y un intervalo entre ambas infecciones de 19 a 20 años, nos pareció de notable interés poder estudiar marcadores

genéticos del hospedero en esa población en que la interferencia de los factores medioambientales, epidemiológicos, virales y vectoriales estaba notablemente controlada.

Incluimos en nuestro estudio varios genes o sus promotores que han sido vinculados de alguna manera con la patogénesis del DEN grave: como genes de citoquinas pro-inflamatorias, el  $TNF\alpha$ , el  $IFN\gamma$  y la IL-6, y como genes de citoquinas anti-inflamatorias la IL-10 y el  $TGF\beta 1$ .

Los 43 individuos que formaron parte del estudio representan el 20% del universo de 205 casos que fueron confirmados con el diagnóstico clínico de FHD durante la epidemia de DEN2 de Santiago de Cuba, 1997. De acuerdo al ensayo de neutralización todos tenían antecedentes de infección por Den 1.

Las Tablas 5, 6 y 7 que se exponen en el acápite de Anexos se muestran las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas respectivamente y los valores de p asociados al análisis comparativo entre el grupo de FHD y los controles.

Las frecuencias genotípicas de IL-10 observadas se comportaron de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg; sin embargo esto no ocurrió con las frecuencias génicas de  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ,  $TGF\beta 1$ , IL-6. Razones no causales pudieran influir en que muchos SNPs burlen el equilibrio de Hardy-Weinberg, particularmente si las poblaciones de estudio son étnicamente heterogéneas (Weinberg y Morris, 2003). En la población cubana, donde se mezclan ancestros europeos, africanos y algunas razas amerindias (Alegre y cols., 2007), la etno-diversidad pudiera estar influyendo en los resultados aquí obtenidos.

Las frecuencias alélicas de los puntos polimórficos estudiados en los controles de la población de Santiago de Cuba se compararon a las frecuencias alélicas descritas en las poblaciones Hispana y Africana, teniendo en cuenta los datos reportados por Hoffmann y cols. (Hoffmann y cols., 2002a). La distribución de las frecuencias alélicas cubanas difirió de las de poblaciones hispanas para el gen del  $TGF\beta 1$  (c10 y c25), resultando significativamente más frecuente el alelo C en el c10 en los cubanos (70.7 vs 50%,  $p=0.003$ ) y el alelo G en c25 para los hispanos (96 vs 82.6%,  $p=0.005$ ). Al comparar con población negra, el alelo G del gen de la IL-6 (+174) fue portado por más individuos de dicha población que por los cubanos (90 vs 72.3%,  $p=0.02$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el resto de los genes estudiados entre los controles de Santiago y lo reportado para estas poblaciones.

El polimorfismo del promotor del gen de  $TNF\alpha$  (-308) mostró una asociación del alelo A a la FHD (OR=3.51, CI=1.77-7.00,  $p<0.0001$ ) (Tabla 5). Sin embargo, en el grupo control se constató una mayor frecuencia de portadores del genotipo -308 GG (OR=0.35, CI=0.16-0.75,  $p<0.01$ ); mientras el grupo de FHD mostró una mayor distribución de los genotipos AA y AG (Tabla 6).

Aunque la frecuencia del genotipo AA fue mayor en el grupo de FHD, la asociación no fue significativa, sin embargo, si predominó el genotipo heterocigótico en este grupo (OR=4.07, CI=1.45-11.43, pc=0.01).

Fernandez-Mestre y cols. demostraron la asociación entre el alelo A del TNF $\alpha$  (-308) de pacientes de FD con la aparición de manifestaciones hemorrágicas, lo cual sugiere la participación de esta citoquina en la génesis de la hemorragia en el paciente de DEN (Fernandez-Mestre y cols., 2004).

Se ha reportado por otros grupos la asociación del polimorfismo de TNF $\alpha$  (-308A/G) juega un importante papel en la severidad del asma bronquial (Gao y cols., 2006) y en la Diabetes mellitus (Settin y cols., 2009). Estas dos enfermedades crónicas se reconocen como factores de riesgo para la FHD a partir de hallazgos reportados en epidemias cubanas (Guzman y Kouri, 2008).

El TNF $\alpha$  es liberado por los monocitos infectados por DEN e induce en las células endoteliales vasculares la producción de especies nitrógeno y oxígeno-reativas y finalmente, la muerte por apoptosis de estas lo cual parece tener implicaciones en la extravasación de plasma. Ha sido vinculado además por otros autores a la hemorragia en el paciente grave (Cardier y cols., 2005; Yen y cols., 2008). La asociación encontrada entre el alelo de alta expresión de TNF $\alpha$  A (-308) y la FHD apoya el papel patogénico de esta citoquina en la infección por DEN.

Otra citoquina proinflamatoria e importante inmunomoduladora asociada a la patogénesis del DEN grave y a los altos niveles de TNF $\alpha$  es el IFN $\gamma$ . En los resultados de este estudio genético (Tablas 5 y 6), a pesar de que observamos que el alelo T y genotipo TT de alta expresión de esta citoquina (+874) predominó en el grupo de pacientes de FHD, no se observaron diferencias significativas entre este grupo y el control. Tampoco Fernández-Mestre y cols., en su estudio en población venezolana (Fernández-Mestre y cols., 2004), demostró la asociación entre el polimorfismo del IFN $\gamma$  y el cuadro clínico severo.

El IFN $\gamma$ , tanto por su efecto sobre la inmunidad celular propiciando la respuesta citotóxica tan necesaria para la eliminación de células infectadas, como por el efecto sobre las células diana de la infección por el virus DEN, que contribuye a eliminar al virus, debe ser considerada como una citoquina crucial en la defensa frente a la infección por DEN, como sucede en la mayoría de las infecciones con patógenos intracelulares (Billiau y Matthys, 2009). Es por eso que, a pesar de que los mayores niveles de IFN $\gamma$  han sido asociados a la infección secuencial heterotípica (Bashyam y cols., 2006) y a la severidad en DEN (Libraty y cols., 2002), no necesariamente la baja producción de esta citoquina se asocia a protección. Esa pudiera ser la razón por la que no se observen diferencias significativas en ambos grupos de estudio.

Con respecto a la IL-6, la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen (-174) tampoco mostraron diferencias significativas entre pacientes de FHD y los controles poblacionales (Tablas 5 y 6). Aunque se ha reportado el papel de la IL-6 con la patogénesis del DEN (Leong y cols., 2007; Levy y cols., 2009), recientemente se han asociado los niveles aumentados de esta citoquina más a la infección secundaria o a determinados serotipos virales que a la severidad en sí (Restrepo y cols., 2008b).

Al analizar las frecuencias génicas de las citoquinas anti-inflamatorias encontramos que los alelos y genotipos del promotor del gen de la IL-10 para los tres puntos polimórficos estudiados (-1082, -819, -592) no difirieron significativamente entre los grupos de pacientes de FHD y los controles (Tabla 5 y 6). Sin embargo, el análisis haplotípico de la combinación de estos tres puntos polimórficos demostró que el haplotipo ACC/ATA fue significativamente más frecuente en FHD que en los controles (OR=2.54, CI=1.12-5.73,  $p=0.02$ ) (Tabla 7).

Junto al  $TNF\alpha$ , la IL-10 ha sido involucrada en la trombocitopenia y las manifestaciones hemorrágicas observadas durante la infección por DEN (Schexneider y Reedy, 2005). En pacientes de la propia epidemia de Den 2 (Santiago de Cuba, 1997) encontramos niveles aumentados de IL-10 asociados a infección secundaria y una peor evolución clínica en los pacientes. Sin embargo, es importante dilucidar si esos niveles aumentados son una causa primaria de enfermedad o reflejan un efecto de regulación secundario a una exacerbación inflamatoria previa. Similarmente, los genes de las citoquinas están sometidos a regulación positiva o negativa en dependencia de su interacción con factores de transcripción. Estudios realizados en gemelos han demostrado que el 74% de la variabilidad en la producción de IL-10 está determinada genéticamente (Turner y cols., 1997). Los estudios genéticos por tanto tratan de dilucidar la interrogante acerca del rol de la citoquina en la enfermedad. La inclusión de tres SNPs (-1082G/A, -819C/T, y -592C/A) en el promotor de IL-10 en el presente estudio permite un análisis haplotípico más completo. El haplotipo ACC/ATA asociado a FHD ha sido previamente relacionado a baja expresión de esta citoquina (Turner y cols., 1997). De esta forma los resultados sugieren que una insuficiente expresión de IL-10 en la infección secundaria por DEN (al menos para la secuencia de infecciones DEN 1/ DEN2) pudiera estar asociada a una ineficiente regulación inmune. Esto implicaría la sobre-expresión de los mediadores pro-inflamatorios característica del cuadro de FHD que ha sido reportada en múltiples publicaciones (Kurane, 2007). Sin embargo, no debe dejar de considerarse que el polimorfismo en -819 está en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo en -592 (Opdal y cols., 2004).

El polimorfismo del gen  $TGF\beta 1$  (c10 / c25) se muestra en las Tablas 5, 6 y 7. Como se puede apreciar no se constataron diferencias significativas entre estos en el codón 10 del gen. Sin embargo, en el codón 25 se hallaron diferencias estadísticamente significativas, siendo el alelo G y el genotipo GG con mayor

representación en el grupo de los Controles ((OR=0.38, CI=0.21-0.69, pc=0.002) y (OR=0.34, CI=0.15-0.76, pc=0.01) respectivamente). El análisis de la distribución haplotípica no mostró diferencias significativas entre los grupos (Tabla 7).

Recientemente Chen y cols. encontraron una asociación del polimorfismo del promotor del gen de TGFβ1 (-509 C/T) con la susceptibilidad a FD en población de Taiwán (Chen y cols., 2009b).

En la infección por DEN los niveles de TGFβ1 elevados se han vinculado al cuadro clínico grave (Laur y cols., 1998). Sin embargo, en nuestro estudio, el alelo G en el codón 25 que codifica para Arginina, asociado a la mayor producción de la citoquina, predominó significativamente en los controles sobre el alelo C (Prolina), de baja expresión. Lo mismo se observó para el genotipo GG. Este resultado sugiere la protección o una evolución clínica benigna a una alta producción de TGFβ1.

Después de evaluar el riesgo relativo de presentar una forma génica determinada para cada gen de citoquina a padecer o no la FHD, (definido por la distribución significativamente diferente entre FHD y controles de alelos, genotipos o haplotipos), se analizó el riesgo que tiene un individuo con un patrón genético de citoquinas determinado, a padecer la FHD. Para ello se estudiaron las combinaciones definidas de variantes génicas para las diferentes citoquinas lo cual se realizó mediante un análisis univariado de tabla de contingencia 2x2. El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 8.

Como se observa en la tabla 8, el portar combinaciones de variantes génicas de alta expresión de TNFα e IFNγ con baja expresión de IL-10 y TGFβ1, va sumando significación estadística a la asociación llegando a tener 7.1 veces más riesgo el individuo alto productor de TNFα e IFNγ y bajo productor de IL-10 (p=0.000). Este análisis multigénico sugiere la importancia del equilibrio entre citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias para lograr una respuesta inmune capaz de controlar la infección en el individuo evitando los daños inmunopatológicos propios de la FHD.

El polimorfismo de genes de citoquinas ha sido asociado a la evolución clínica de otras muchas infecciones virales (Babel y cols., 2004; Miyairi y DeVincenzo, 2008; Gao y cols., 2009; Oleksyk y cols., 2009).

Los estudios de asociación del polimorfismo de genes de citoquinas con las enfermedades, su severidad o complicaciones, difieren al definir la relevancia de cada polimorfismo debido a problemas en su interpretación. Establecer totalmente una relación etiopatogénica de los niveles de una citoquina con la enfermedad se hace difícil. Es por esto que se recomienda hacer la correlación entre el genotipo asociado a la enfermedad y los niveles de expresión del gen de la citoquina *in vivo* en los pacientes tanto en ARNm por PCR en Tiempo Real, como en proteína por métodos inmuno-enzimáticos. Es importante tener en cuenta además que muchas

citoquinas parecen tener efectos reguladores sobre la expresión de otras citoquinas. De esta forma sería un análisis simplista si consideramos el nivel de expresión de una citoquina aislado y no en el contexto de la red de citoquinas y las vías de activación a que ellas pertenecen. Igualmente muchos de éstos genes pueden aumentar su expresión por la infección u otro factor del medio ambiente, siendo necesario por tanto el análisis genético en el contexto de las interacciones gen-gen y gen-medio ambiente.

Consecuentemente, sólo en el análisis de las múltiples interacciones será posible estimar con precisión el verdadero riesgo que representa una variante génica para el padecimiento de una enfermedad. En los últimos años se han estado desarrollando métodos computacionales analíticos de algoritmos que procuran descifrar los efectos aditivos o interactivos de otros genes o del ambiente en el estudio de polimorfismo genético

En el DEN, tal como ocurre con otras enfermedades complejas como el cáncer, el asma bronquial y las enfermedades autoinmunes, probablemente se influencia por polimorfismos en múltiples genes. La asociación de genes de HLA en la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad del DEN se informó previamente por nuestro grupo (Sierra y cols., 2007). En el presente trabajo se proporcionan nuevas evidencias del papel de las citoquinas TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1 e IL-10 en la patogénesis del DEN. Se impone el estudio de otras epidemias con otros serotipos virales y la inclusión de grupos de asintomáticos en que se demuestren variantes de estos genes asociadas a protección. El estudio de otros genes importantes de receptores virales y de otros marcadores de inmunidad en los mismos individuos aportará nuevas evidencias que nos acercarán aún más a definir las bases de la susceptibilidad genética en la infección por DEN.

#### **IV.5. POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE LA RESPUESTA TH2 Y LA PATOGENIA DEL DEN**

##### **IV.5.1 Comparación de los niveles de anticuerpos IgE total e IgE específicos anti-DEN en muestras séricas de pacientes con FD y FHD durante la infección secundaria.**

Contrario a la hipótesis de la participación de una respuesta Th1 en la patogénesis de la FHD/SCD, varios grupos tratan de explicar el agravamiento en la infección por DEN a partir de un predominio del patrón de citoquinas Th2 (Chaturvedi y cols., 2000; Mabalirajan y cols., 2005; Tay y Tan, 2006; Chen y cols., 2007; Chaturvedi, 2009).

Está demostrado que la síntesis de anticuerpos IgE específicos es dependiente de la cooperación de células Th con los linfocitos B. Específicamente los linfocitos Th2 producen las citoquinas IL-4 e IL-13, las cuales inducen un cambio de clase de inmunoglobulina para la producción de IgE por las células B (Poulsen y

Hummelshoj, 2007). Es por esto que nos propusimos explorar el comportamiento de los niveles de IgE total y específica a DEN en el suero de pacientes con infección secundaria que desarrollaron diferentes formas clínicas.

Los resultados de la determinación de IgE total en las muestras de suero de los pacientes de DEN se exponen en la Figura 10.

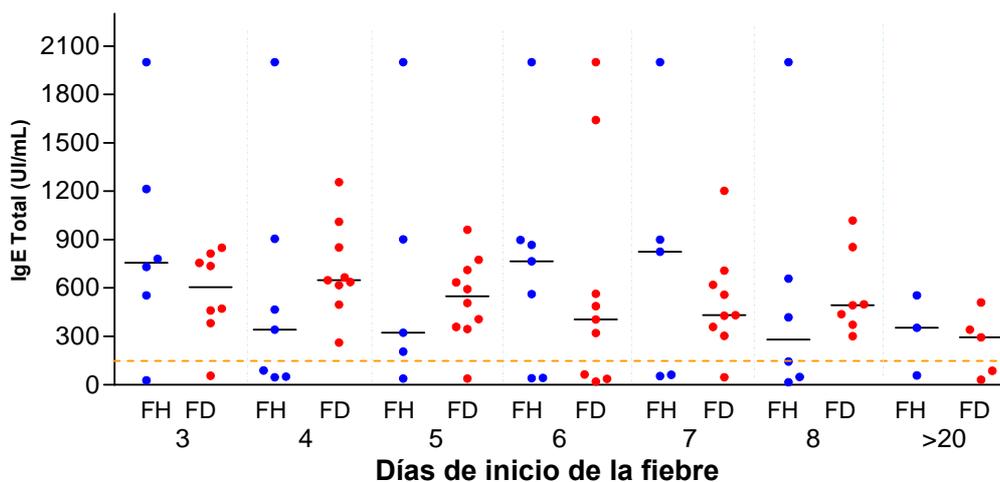


Figura 10. Niveles de IgE sérica total en muestras seriadas de pacientes de FD (n=9) y FD con complicaciones (n=8) durante la epidemia de DEN3 de Ciudad Habana, 2001. Cada punto del gráfico se corresponde con el nivel de IgE de un individuo en un día de la cinética determinado, la marca horizontal por columna concierne a la mediana de cada grupo. El límite superior del rango de valores normales (0-150 U/mL) está representado por la línea discontinua horizontal. FD: pacientes con fiebre DEN / FH: pacientes con FHD y FD con manifestaciones hemorrágicas

Se detectaron, en más del 80% de los pacientes, niveles mayores de IgE total que el rango de valores normales (0-150 U/mL) descrito para la población adulta cubana (Solís y cols., 1992). Sin embargo, la comparación entre los grupos FD y FHD no mostró diferencias significativas.

En DEN, hasta la fecha, varios trabajos abordan la detección de niveles de IgE, y los mismos sugieren que los niveles aumentados encontrados de este anticuerpo podrían estar asociados a co-infecciones parasitarias en los individuos debido a condiciones socio-económicas propicias (Pavri y cols., 1979; Miguez-Burbano y cols., 1999; Mabalirajan y cols., 2005). Se conoce que las infestaciones parasitarias son inductoras de una respuesta Th2 y que transcurren con elevados niveles de IgE (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003). Sin embargo, dicha asociación no ha sido demostrada en los estudios mencionados.

En la Figura 11, se muestran los niveles de IgE específica anti-DEN. Como se puede apreciar, en la mayoría de los pacientes con infección secundaria (>60%), independientemente de su cuadro clínico, los niveles de IgE aumentan a partir del 6to día después del inicio de la fiebre, tendiendo a disminuir después de los 20 días de iniciada la enfermedad. No se constataron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio.

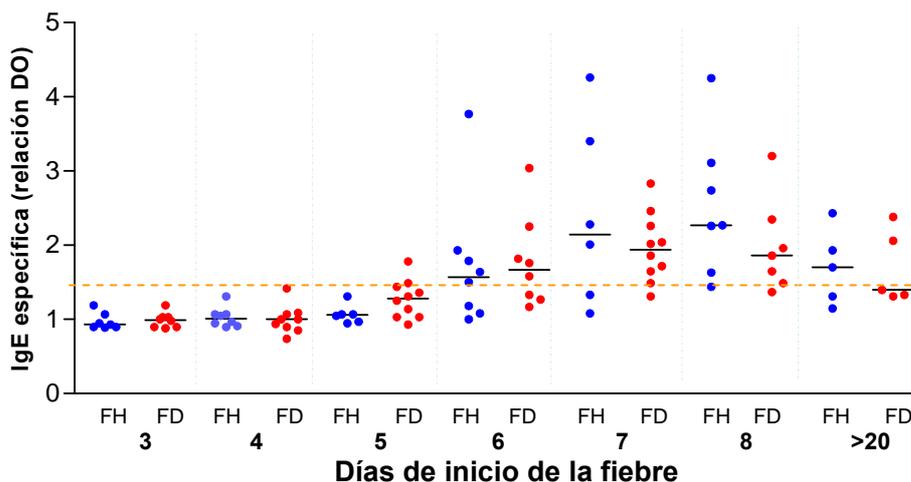


Figura 11. Niveles de IgE en muestras cinéticas de suero de pacientes con Fiebre DEN y Fiebre hemorrágica. Niveles de IgE anti-DEN en muestras seriadas de pacientes de FD (n=9) y FD con complicaciones (n=8) durante la epidemia de DEN3 de Ciudad Habana, 2001. Cada punto del gráfico se corresponde con el nivel de IgE de un individuo en un día de la cinética determinado, la marca horizontal por columna concierne a la mediana de cada grupo. El valor de corte del ensayo (RDO=1.4) está representado por la línea discontinua horizontal. FD: pacientes con fiebre DEN / FH: pacientes con FHD y FD con manifestaciones hemorrágicas

Los niveles aumentados de la IgE anti-DEN fueron asociados en estudios previos con la FHD (Pavri y cols., 1979; Koraka y cols., 2003), sin encontrar diferencias entre la infección primaria y secuencial con cuadro clínico leve. Contrastando con esos estudios, la IgE específica en pacientes cubanos se asoció a la infección secundaria y no a la severidad del cuadro clínico (Vazquez y cols., 2005).

Un aumento de los niveles de IgE específica se ha reportado en otras infecciones virales como: Sarampión, Herpes simple, virus Ebstein barr, Varicela zoster, VIH, Sincicial respiratorio, Rotavirus, Hepatitis C, etc. (Imani y cols., 1999; Bowser y cols., 2007; Ege y cols., 2008; Gohara y cols., 2008; Khan y cols., 2008; Nilsson y cols., 2009; Reimerink y cols., 2009; Saghafian-Hedengren y cols., 2009; Smith-Norowitz y cols., 2009).

El mecanismo por el cual se induce la síntesis de IgE en la infección por DEN no se conoce. El virus es capaz de infectar y replicarse eficientemente en los linfocitos B (King y cols., 1999; Lin y cols., 2002). Se conoce que la activación viral de la proteína quinasa activada por ARN y subsiguiente activación del complejo NF- $\kappa$ B en

células B humanas lleva a la inducción de un cambio de clase a IgE (Rager y cols., 1998). Se ha reportado que algunas cepas del virus DEN son capaces de activar la PKR (Umareddy y cols., 2008). De ser este el mecanismo de inducción de la síntesis de IgE, sin embargo, sus niveles aumentados serían detectables también en la infección primaria, lo cual no coincide con lo descrito por Vázquez y cols., que encuentra un aumento de estos anticuerpos sólo en la infección secundaria (Vazquez y cols., 2005). Esto sugiere que una respuesta de células T de memoria que cooperan con las células B a través de un patrón de respuesta Th2 pudieran estar provocando el cambio de clase a IgE. Se han detectado niveles aumentados de IL-4 (Mabalirajan y cols., 2005) y de IL-13 (Mustafa y cols., 2001) en suero o su expresión aumentada en células (Gagnon y cols., 2002) en pacientes asociados a gravedad, y se ha reportado la expresión de IL-4 en cultivos de células mononucleares humanas con el virus (Chaturvedi y cols., 1999).

El papel de esta Ig frente a la infección no se ha esclarecido. La IgE acomplejada con antígenos virales puede unirse potencialmente a receptores Fcε en la superficie de mastocitos y basófilos y favorecer la respuesta proinflamatoria mediante la secreción de citoquinas y sustancias vasoactivas. Sin embargo, los resultados del presente trabajo no asocian este marcador serológico a una peor evolución. Estudios futuros serán necesarios para dilucidar el papel de esta inmunoglobulina en el DEN.

#### **IV.5.2. Determinación y comparación de la expresión de genes de las citoquinas (IFN $\gamma$ , IL-4, TNF $\alpha$ , IL-10, TGF $\beta$ 1) y de marcadores de citotoxicidad (Granzima B y Perforina) frente al virus DEN en células mononucleares de individuos inmunes a DEN con antecedentes de asma bronquial y controles.**

El asma bronquial es una enfermedad pulmonar crónica asociada a broncoconstricción e inflamación en la cual las células Th2, predominantes en las vías respiratorias, juegan un papel central pues producen las citoquinas que caracterizan la respuesta inmune frente a alérgenos ambientales (IL-4, IL-5 e IL-13). La IL-4 induce la producción de IgE por las células B, la IL-5 regula la eosinofilia, y la 13 es responsable de la mayoría de los cambios fenotípicos del asma (Holgate, 2008).

Determinados cambios genéticos en dichas citoquinas han sido asociados también con la predisposición al asma alérgica. Así, el polimorfismo del gen de IL-13 se ha asociado a niveles elevados de anticuerpos IgE, y el gen de la IL-4 causa el cambio de isotipo de inmunoglobulina IgM a IgE en los linfocitos B propiciando la sensibilización alérgica. La interacción entre genes del receptor de IL-4 y la IL-13 se asocia a asma (Kabesch y cols., 2006). Por otra parte, una deficiente función de las células Treg se ha descrito en pacientes asmáticos, lo que parece favorecer la hiperrespuesta Th2 no controlada (Wang y cols., 2009; Xu y cols., 2010).

El asma bronquial ha sido reconocida como un factor de riesgo para el desarrollo de la FHD/SCD en epidemias cubanas causadas por DEN 2, DEN 3 y DEN 4 (Bravo y cols., 1987; Guzman y cols., 1992b; Orozco Hechavarria y cols., 2001; Pelaez y cols., 2004; Gonzalez y cols., 2005). Conociendo esto, nos propusimos dilucidar si el patrón Th2, característico en individuos que padecen esta enfermedad, pudiera estar determinando una mayor susceptibilidad a padecer la FHD. Para ello, estudiamos la respuesta inmune celular en un grupo de individuos asmáticos y no asmáticos inmunes a DEN *in vitro*, cuantificando la expresión de los genes TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10, TGF $\beta$ 1, granzima B y perforina.

Teniendo en cuenta que la enfermedad grave por DEN ocurre principalmente durante una infección secundaria heterotípica, analizamos en cada caso la expresión de los genes en condiciones de reto heterotípico, o sea, frente a los dos serotipos a los cuales los individuos no eran inmunes, simulando las diferentes secuencias de infección. En nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos asociadas a la expresión de los genes TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-4 que caracterizan un patrón de citoquinas Th1 (IFN $\gamma$ ) o Th2 (IL-4), y si en la expresión de genes que codifican citoquinas reguladoras (IL-10, TGF $\beta$ 1) y de moléculas involucradas en la citotoxicidad (granzima B y perforina) (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis estadístico de la comparación de la expresión de genes en CMSP de asmáticos y controles frente al reto heterotípico con virus DEN. (SPSS 11.5 sobre Windows, Prueba de Mann Whitney, p<0.05)

	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>IL4</b>	<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>IL10</b>	<b>TGF<math>\beta</math></b>	<b>Granz B</b>	<b>Perforina</b>
<b>U</b>	<b>0,728</b>	<b>1,336</b>	<b>0,149</b>	<b>0,002</b>	<b>4,626</b>	<b>5,482</b>	<b>6,967</b>
<b>p</b>	<b>0,393</b>	<b>0,248</b>	<b>0,699</b>	<b>0,02</b>	<b>0,001</b>	<b>0,003</b>	<b>0,01</b>

U: U de Mann Whitney; p: significación asociada

La Figura 12 muestra la comparación en la expresión de estos genes en las células mononucleares de asmáticos y controles tras la estimulación heterotípica por DEN.

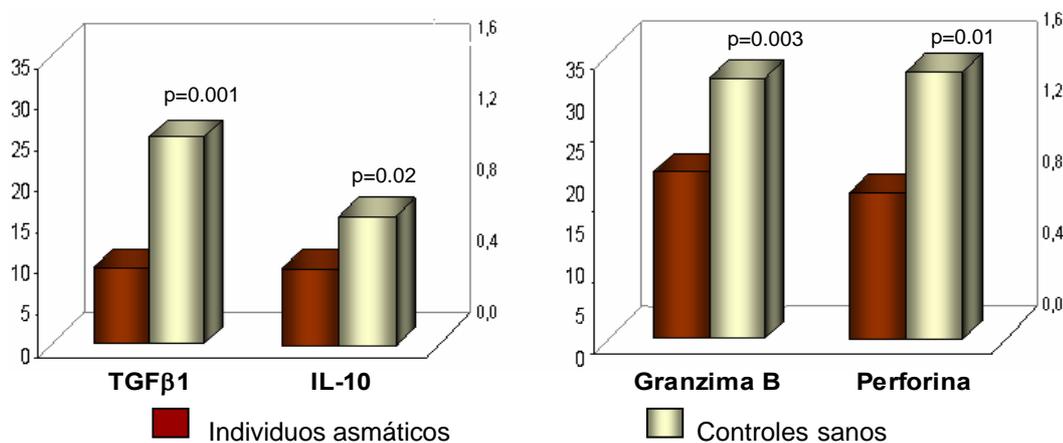


Figura 12. Niveles de expresión de los genes de TGFβ, IL-10, granzima B y perforina en células mononucleares de individuos inmunes a DEN asmáticos (n=6) y controles (n=18) en respuesta de reactividad cruzada frente a distintos serotipos del virus DEN.

Se observó una menor expresión de TGFβ1 e IL-10, y de granzima B y perforina en el grupo de asmáticos con respecto al grupo control.

La mayor ocurrencia de la FHD durante infecciones secuenciales heterotípicas ha sugerido el papel de una respuesta de células T de memoria ineficiente o aberrante, esencial a la inmunopatología del cuadro clínico grave. La expansión selectiva de clones de células T de memoria de reactividad cruzada predominan durante una infección secundaria sobre la activación y expansión de células T vírgenes específicas, fenómeno que, al parecer, puede modificar la eficacia de la respuesta celular antiviral (Mathew y Rothman, 2008).

El predominio de un patrón de respuesta Th2 distingue la respuesta inmune celular de asmáticos frente a una diversidad de antígenos (Ngoc y cols., 2005). Y el hecho de que las citoquinas que caracterizan este patrón (IL-4 e IL-13) aumentan la susceptibilidad de los monocitos a una infección productiva con el virus DEN (Miller y cols., 2008), pudiera ser una razón por la que dichos pacientes presentan un mayor riesgo de desarrollar la FHD durante una infección por DEN. Sin embargo, al ser similar la expresión de los genes de IFNγ e IL-4 entre ambos grupos de estudio, no parece ser un predominio de respuesta tipo Th2 lo que explique la mayor susceptibilidad de los asmáticos a padecer la FHD.

Se ha reportado previamente en el asma la participación del TNFα como un intermediario en la inflamación de vías aéreas (Berry y cols., 2007). Por otra parte, esta citoquina ha sido reconocida como la principal mediadora

de la disfunción de células endoteliales en la FHD (Cardier y cols., 2005). Sin embargo, los niveles de expresión de esta citoquina no difirieron entre asmáticos y controles frente al virus DEN.

Interesantemente, los niveles de ARNm de las citoquinas reguladoras TGFβ1 y la IL-10 fueron significativamente mayores en las células de los controles que en los asmáticos al ser incubadas con los serotipos virales heterólogos. Aunque se ha reportado la asociación de niveles aumentados de TGFβ1 y la IL-10 con el cuadro grave en la infección por DEN (Agarwal y cols., 1999; Green y cols., 1999), el papel de estas citoquinas, que son producidas por células Treg (Li y Flavell, 2008), no ha sido esclarecido en la FHD.

Tomando en consideración que la disminución relativa de la relación células Treg/células T efectoras parece favorecer la evolución clínica hacia el cuadro severo (Luhn y cols., 2007), y la implicación de una ineficiente función reguladora celular en el desarrollo del asma y la alergia (Umetsu y DeKruyff, 2006) podríamos especular a través de este mecanismo, la mayor susceptibilidad en asmáticos a padecer la FHD.

Las CMSP de asmáticos mostraron niveles de expresión disminuidos de los genes de perforina y granzima B comparados con el grupo control ( $p=0,008$  y  $p=0,019$ ; respectivamente). La vía Perforina-granzima B representa uno de dos mecanismos que median la citotoxicidad de células T y células NK (Sandberg y cols., 2001). Se ha reportado previamente una frecuencia significativamente menor de células T CD4+, CD8+ y NK que expresan granzima B y perforina en la sangre de individuos asmáticos comparando con individuos controles sanos (Bratke y cols., 2006). Considerando que en la infección por DEN la respuesta citotóxica contra células infectadas es considerada un mecanismo crucial para el aclaramiento viral y la recuperación de los pacientes (Mongkolsapaya y cols., 2003; Yauch y cols., 2009), una respuesta citotóxica perturbada en individuos asmáticos frente al virus pudiera predisponerlos a padecer la FHD/SCD.

Los resultados obtenidos en la presente investigación constituyen la primera evidencia inmunológica para sustentar el papel del asma como factor de riesgo de la FHD. A través del estudio de la respuesta inmune celular frente al virus, los resultados del presente trabajo sugieren que la asociación entre el asma bronquial y la enfermedad severa por DEN durante la infección secuencial heterotípica pudiera explicarse, no por un predominio de la respuesta Th2 en los individuos que aquejan esta enfermedad crónica, sino por una débil respuesta anti-inflamatoria frente a la infección y la insuficiente expresión de marcadores de citotoxicidad, decisivos en la eliminación de células infectadas.

Estudios futuros se requerirán para profundizar en las bases biológicas, genéticas y/o moleculares que propicien el entendimiento de la patogénesis de la FHD a partir de sus factores de riesgo.

## **DISCUSION INTEGRADA**

La patogénesis de la FHD es multifactorial (Kouri y cols., 1989; Guzman y Kouri, 2008). Dependiendo de las condiciones epidemiológicas y ecológicas, los factores virales y del hospedero favorecen el desarrollo de epidemias de FHD. Se ha demostrado el potencial patogénico de los distintos serotipos y genotipos del virus y sus implicaciones en la patogénesis de la forma grave de la enfermedad (Harris y cols., 2006). El antecedente de una infección primaria predispone a los individuos a desarrollar una enfermedad más severa en el transcurso de una segunda infección por un serotipo diferente (Halstead, 2007). Sin embargo, ante condiciones epidemiológicas similares, en una misma población expuesta incluso a un único genotipo viral y con un *background* inmunológico similar frente al virus, la mayoría de los individuos que se exponen a la infección por DEN no desarrollan síntomas o evolucionan como FD, sólo el 1-3% de los casos sufren la FHD/SCD, y alrededor de uno de cada 20 pacientes que se agravan, mueren (Shekhar, 2007). Estas evidencias sugieren que los factores dependientes del hospedero son muy importantes en la forma de presentación de la infección.

La activación de linfocitos T de memoria específicos o de reactividad cruzada durante infecciones secundarias pueden jugar un importante papel en el control de la fase aguda de la FD o en el desarrollo de la FHD/SCD. Esto puede ser a través de la citólisis directa o al iniciarse la liberación de citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios que pueden contener la infección o llevar a un aumento de la permeabilidad vascular con salida de plasma, problemas de coagulación, hipovolemia y choque (Kurane, 2007; Martina y cols., 2009).

El presente trabajo incluye diferentes investigaciones dirigidas a dilucidar en el modelo humano el papel de la respuesta inmune celular en la patogenia de la enfermedad, así como precisar mecanismos inmunológicos involucrados en la recuperación de la infección y/o la protección. Específicamente, se abordó el estudio de citoquinas de la defensa innata (IL-12, IL-10, TNF $\alpha$ ), las que caracterizan los patrones de respuestas pro-inflamatoria (patrón Th1 -IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ - o patrón Th2 -IL-4-) y anti-inflamatoria (IL-10, TGF $\beta$ 1). Partiendo de que la actividad citotóxica mediada por células NK y linfocitos T es crucial en la eliminación de células infectadas, se incluyó también el análisis del como se comportan de marcadores citotóxicos durante la infección por DEN.

El estudio de citoquinas en el suero de los pacientes durante la etapa aguda de la enfermedad mostró que la IL-12, aumentada en el cuadro benigno (FD) y disminuida en pacientes de FHD, parece asociarse a la protección. Los resultados obtenidos en el estudio *in vitro* de células mononucleares infectadas apoyaron el resultado anterior detectándose niveles significativamente mayores de IL-12 frente al reto viral homotípico. A partir de estos resultados, podríamos inferir que, al igual que ocurre en la generalidad de las infecciones virales o con

microorganismos intracelulares, la IL-12 y por tanto, el patrón Th1 que esta citoquina induce, son importantes en el control adecuado de la infección por DEN. Sin embargo, el estudio de tejidos de fallecidos por FHD, mostró una expresión significativa de IFN $\gamma$ , citoquina inherente al patrón Th1. Para dar respuesta a esta aparente contradicción se exploró a nivel genético si variantes génicas asociadas a una mayor producción de IFN $\gamma$  pudieran estar vinculadas a la FHD. Este estudio sugirió que aquellos individuos que producen altos niveles IFN $\gamma$  no están predispuestos a padecer FHD, sin embargo, si la producción elevada de dicha citoquina se acompaña a la vez de altos niveles de producción de TNF $\alpha$ , se desarrolla, con más probabilidad, la FHD durante una infección secundaria por DEN2. De esta manera, los resultados obtenidos apoyaron el papel patogénico del TNF $\alpha$ , tanto en el estudio de CMSP *in vitro*, en que los niveles de expresión de este gen fueron significativamente mayores en el reto viral heterotípico, y menores en el homotípico, como en el estudio inmunogenético. De gran interés fue la observación de que en los tejidos de fallecidos por FHD no se detectó la presencia de ARNm de TNF $\alpha$  de manera representativa, lo cual pudiera explicarse debido a que esta citoquina tiene su papel protagónico al inicio de la enfermedad, bastando 24 a 48 horas de su liberación masiva a la circulación, para que ocurra toda la disfunción vascular sistémica que se describe en el DEN grave.

Ante una exacerbada respuesta pro-inflamatoria, ¿cual sería el papel de la respuesta anti-inflamatoria? El estudio de dos citoquinas, IL-10 y TGF $\beta$ 1, mediadores centrales en la regulación inmune, trató de responder esta interrogante. Se confrontaron entonces hallazgos contradictorios: niveles aumentados de IL-10 detectados en pacientes durante una infección secundaria heterotípica la asociaron a la patogenia, y, por otra parte, una infrecuente expresión de su ARNm en los tejidos de los fallecidos. La ausencia de IL-10 en el fallecido podría sugerir su posible papel de reacción reguladora, y por tanto protector (más que patogénico). Los estudios *in vitro* y el estudio genético apuntan a una función predominantemente protectora, demostrando el primero la mayor expresión de IL-10 ante el reto viral homotípico, y el segundo que individuos bajos productores de esta citoquina tienen mayor riesgo de padecer la FHD. De manera que podemos proponer que es la infección secuencial y no la gravedad en los pacientes, la que se asocia a la síntesis aumentada de esta citoquina posiblemente como resultado de la gran descarga pro-inflamatoria a que se ven sometidos esos pacientes.

El TGF $\beta$ 1, vinculado por otros autores a gravedad, fue detectado de forma significativa en tejidos de órganos de fallecidos. Sin embargo, asociamos su papel a una función tardía en la hipoxia y la fibrosis de los tejidos en el paciente en choque. Esto se sustenta al encontrar que individuos predispuestos genéticamente a producir niveles menores de TGF $\beta$ 1, tienen más riesgo de desarrollar el DEN severo, lo cual apoya la importancia de este mediador como inmunoregulador, involucrado en el control de la inflamación.

Los resultados sugieren, hasta este punto, que una respuesta exagerada tipo Th1 e inadecuadamente controlada es la que conduce a un agravamiento de la enfermedad durante la infección por DEN. Sin embargo, varios autores han polemizado con esta hipótesis, sugiriendo el protagonismo del patrón Th2 en la fisiopatología del DEN. Nos propusimos por tanto determinar los niveles de la IgE total y específica en muestras seriadas de pacientes de FD y FHD, por ser un marcador de respuesta Th2. Además, se evaluó la expresión de algunos marcadores de respuesta Th1, Th2 y anti-inflamatorios en asmáticos y controles frente a la infección viral heterotípica, partiendo de la predisposición de este tipo de pacientes a desarrollar un patrón de respuesta Th2. Una insuficiente respuesta anti-inflamatoria (IL-10 y TGF $\beta$ 1), más que un predominio del patrón Th2, parece vincularse a la mayor susceptibilidad de los asmáticos a padecer la FHD, lo que corrobora el resto de los resultados obtenidos en nuestro estudio. Los mayores títulos de IgE tampoco se asociaron a severidad.

Al estudiar marcadores moleculares de respuesta citotóxica, se observó que niveles mayores de perforina y granzima B fueron liberados a la sangre en aquellos pacientes con una mayor presencia de la proteína viral NS1 circulante. La granzima B parece mediar preferentemente la citotoxicidad a expensas de linfocitos T, mientras la perforina aparentemente está más vinculada a la citotoxicidad por NK. La menor expresión de granzima B y perforina en células mononucleares de asmáticos frente al virus confirma la importancia de la respuesta citotóxica en la infección por DEN. Niveles aumentados de perforina y granzima B se correlacionaron con la trombocitopenia y los niveles de FasL soluble se asociaron a leucopenia, sin embargo, al no poder extender nuestro estudio a pacientes de FHD, no pudimos comprobar el posible papel patogénico de estos mecanismos.

En resumen, estos resultados apoyan el papel del TNF $\alpha$  como marcador de patogenia, pero la definición del papel protector o patogénico del resto de los mediadores inmunológicos estudiados no depende sólo de los niveles de expresión que estos alcancen en el paciente durante la infección aguda, sino también de la etapa de la infección donde actúan y de las interacciones entre ellos. Es importante tener en cuenta que muchas citoquinas parecen tener efectos reguladores sobre la expresión de otras citoquinas, por lo cual sería un análisis simplista si consideramos el nivel de expresión de una citoquina aislado y no en el contexto de la red de citoquinas y las vías de activación a que ellas pertenecen.

Una nueva hipótesis deriva de los resultados obtenidos en el presente trabajo, la cual propone que, aunque un patrón Th1 se asocia a adecuada recuperación y mejor evolución frente a la infección, niveles elevados de TNF $\alpha$  en etapas tempranas de la infección unido a niveles aumentados de IFN $\gamma$  juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad grave. La síntesis y liberación oportuna de TGF $\beta$ 1 e IL-10 como parte de una respuesta inmune anti-inflamatoria, modula la inflamación evitando el desarrollo de la FHD y la muerte del

paciente. De no ocurrir así, en el paciente que evoluciona al SCD, el TGFβ1 sintetizado por el estroma de los tejidos tiene un efecto dañino. En este contexto también la respuesta citotóxica frente a las células infectadas por virus determina la evolución clínica ante la infección, ya que una respuesta insuficiente de células NK o células Tc, no controla oportunamente la infección, o es incapaz de garantizar la recuperación adecuada.

Serán necesarias nuevas investigaciones que profundicen en los mecanismos moleculares que median estos procesos.

Si se considera que la mayoría de los candidatos vacunales en DEN centran su atención en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus, y que es exigua en la literatura la alusión a búsquedas de correlatos de protección de inmunidad celular (Durbin y Whitehead, 2010), los resultados obtenidos en el presente trabajo proponen la necesidad de afrontar la evaluación de la respuesta inmune celular en los ensayos preclínicos y clínicos de los futuros candidatos vacunales. Así mismo, los resultados aquí expuestos sugieren herramientas terapéuticas potenciales para su empleo en el paciente grave.

## **V. CONCLUSIONES**

1. El aumento de IL-10 en la sangre de los pacientes de FD se asocia más a la infección secundaria por DEN que a la gravedad del cuadro clínico.
2. Los mayores niveles de IL-12 al inicio de la infección secundaria por DEN en la forma clínica leve sugieren el papel de esta citoquina en la protección.
3. Niveles elevados de Granzima B y Perforina en suero de pacientes de FD parecen responder a una mayor diseminación de la infección viral.
4. Los mayores niveles de IL-10 detectados *in vitro* ante el reto viral homotípico, comparados con los observados ante el reto heterotípico, sugieren un papel protector de esta citoquina en la infección por DEN.
5. En tejidos de hígado y bazo de fallecidos por FHD predomina la expresión de: IFN $\gamma$  lo que indica un patrón de respuesta Th1; y de TGF $\beta$ 1, que pudiera estar asociado a hipoxia tisular.
6. Los pacientes predispuestos genéticamente a producir mayores niveles de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  y menores de IL-10 y TGF $\beta$ 1 tienen más riesgo de sufrir FHD, lo cual asocia la respuesta proinflamatoria y un déficit en el control de esta con la etiopatogenia del DEN grave.
7. Niveles aumentados de IgE total se constatan en individuos con infección clínica por DEN y un incremento en la IgE específica anti-DEN se vincula a la infección secundaria y no a la gravedad del cuadro clínico.
8. En la predisposición de los asmáticos a padecer DEN hemorrágico puede estar influyendo ante el reto heterotípico por DEN un déficit en la regulación inmune y en la respuesta citotóxica, más que un patrón de respuesta Th2.
9. Una respuesta pro-inflamatoria (TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ ) exagerada y su insuficiente control (IL-10/TGF $\beta$ 1) están implicados en la patogenia de la FHD.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Monitorear cinéticamente el papel de las células y mediadores en pacientes con diferentes formas clínicas y con diferentes serotipos virales.
2. Determinar las subpoblaciones celulares que producen los mediadores de la respuesta inmune.
3. Realizar estudio multigénico de alta resolución en pacientes de DEN severo y asintomáticos cubanos.
4. Identificar marcadores pronósticos tempranos de origen bioquímico de fácil determinación.

## VII. REFERENCIAS

- Abe, R., T. Shimizu, A. Shibaki, H. Nakamura, H. Watanabe y H. Shimizu. (2003): Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome are induced by soluble Fas ligand. **Am J Pathol** 162:1515-1520.
- Acioli-Santos, B., L. Segat, R. Dhalia, C. A. Brito, U. M. Braga-Neto, E. T. Marques y S. Crovella. (2008): MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. **Hum Immunol** 69(2): 122-8.
- Alcon, S., A. Talarmin, M. Debruyne, A. Falconar, V. Deubel y M. Flamand. (2002): Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J Clin Microbiol** 40(2): 376-81.
- Alegre, R., J. Moscoso, J. Martínez-Laso, M. Martín-Villa, J. Suarez, A. Moreno, J. I. Serrano-Vela, G. Vargas-Alarcon, R. Pacheco y A. Amaiz-Villena. (2007): HLA genes in Cubans and the detection of Amerindian alleles. **Mol Immunol** 44:2426-37.
- Alvarez, D. E., M. F. Lodeiro, C. V. Filomatori, S. Fucito, J. A. Mondotte y A. V. Gamarnik. (2006a): Structural and functional analysis of dengue virus RNA. **Novartis Found Symp** 277:120-32; discussion 132-5, 251-3.
- Alvarez, M., A. Pavón-Oro, A. Vázquez, L. Morier, A. M. Álvarez y M. G. Guzman. (2008a): [Viral infection sequences related to dengue fever in dengue 3 epidemics occurred in the City of Havana, 2001-2002]. **Rev Cub MED TROP** 60(1): 18-23.
- Alvarez, M., A. Pavón-Oro, S. Vázquez, L. Morier, A. A.M. y M. G. Guzmán. (2008b): Secuencias de infección viral asociadas a la fiebre del dengue durante la epidemia de dengue 3 en la ciudad de La Habana, 2001-2002. **Rev Cubana Med Trop** 60(1).
- Alvarez, M., R. Rodríguez-Roche, L. Bernardo, L. Morier y G. Guzman. (2005): Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of Some Factors. **Dengue Bulletin** 29.
- Alvarez, M., R. Rodríguez-Roche, L. Bernardo, S. Vazquez, L. Morier, D. Gonzalez, O. Castro, G. Kouri, S. B. Halstead y M. G. Guzman. (2006b): 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** 75(6): 1113-7.
- Alvarez Vera, M., D. Valdes Palacios, S. Vazquez Ramudo, I. Delgado Hernandez, S. Garcia Infante, L. Morier Diaz y M. G. Guzman Tirado. (1998): [The standardization of the plaque reduction technic for differentiating a dengue infection from a yellow fever infection]. **Rev Cubana Med Trop** 50(3): 177-81.
- Anwar, A., G. Wan, K. B. Chua, J. T. August y H. P. Too. (2009): Evaluation of pre-analytical variables in the quantification of dengue virus by real-time polymerase chain reaction. **J Mol Diagn** 11(6): 537-42.
- Apostolaki, M., M. Armaka, P. Victoratos y G. Kollias. (2010): Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. **Curr Dir Autoimmun** 11:1-26.
- Arcaroli, J., M. B. Fessler y E. Abraham. (2005a): Genetic Polymorphism and Sepsis. **Shock** 24:300-13.

- Arcaroli, J., M. B. Fessler y E. Abraham. (2005b): Genetic polymorphisms and sepsis. **Shock** 24:300-12.
- Ashour, J., M. Laurent-Rolle, P. Y. Shi y A. Garcia-Sastre. (2009): NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **Journal of Virology** 83(11): 5408-18.
- Avila-Aguero, M. L., C. R. Avila-Aguero, S. L. Um, A. Soriano-Fallas, A. Canas-Coto y S. B. Yan. (2004): Systemic host inflammatory and coagulation response in the Dengue virus primo-infection. **Cytokine** 27(6): 173-9.
- Azeredo, E. L., L. M. De Oliveira-Pinto, S. M. Zagne, D. I. Cerqueira, R. M. Nogueira y C. F. Kubelka. (2006a): NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. **Clin Exp Immunol** 143(2): 345-56.
- Azeredo, E. L., S. M. Zagne, A. R. Alvarenga, R. M. Nogueira, C. F. Kubelka y L. M. de Oliveira-Pinto. (2006b): Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 101(4): 437-49.
- Azeredo, E. L., S. M. Zagne, M. A. Santiago, A. S. Gouvea, A. A. Santana, P. C. Neves Souza, R. M. Nogueira, M. P. Miagostovich y C. F. Kubelka. (2001): Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. **Immunobiology** 204(4): 494-507.
- Azizan, A., J. Sweat, C. Espino, J. Gemmer, L. Stark y D. Kazanis. (2006): Differential proinflammatory and angiogenesis-specific cytokine production in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with dengue-2 and dengue-3 virus. **J Virol Methods** 138(1-2): 211-7.
- Babel, N., G. Y. Cherepnev, A. Kowalenko, J. Horstrup, H. D. Volk y P. Reinke. (2004): Nonimmunologic complications and gene polymorphisms of immunoregulatory cytokines in long-term renal transplants. **Kidney International** 66:428-432.
- Bahr, G. M., A. Capron, J. Dewulf, S. Nagata, M. Tanaka, J. M. Bourez y Y. Mouton. (1997): Elevated serum level of Fas ligand correlates with the asymptomatic stage of human immunodeficiency virus infection. **Blood** 90:896.
- Bartenschlager, R. y S. Miller. (2008): Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future Microbiol** 3:155-65.
- Bashyam, H. S., S. Green y A. L. Rothman. (2006): Dengue virus-reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. **J Immunol** 176(5): 2817-24.
- Basilio-de-Oliveira, C. A., G. R. Aguiar, M. S. Baldanza, O. M. Barth, W. A. Eyer-Silva y M. V. Paes. (2005): Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis** 9(4): 341-7.
- Basu, A. y U. C. Chaturvedi. (2008): Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. **FEMS Immunol Med Microbiol** 53(3): 287-99.
- Bente, D. A. y R. Rico-Hesse. (2006): Models of dengue virus infection. **Drug Discov Today Dis Models** 3(1): 97-103.
- Bhamarapravati, N., P. Tuchinda y V. Boonyapaknavik. (1967): Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. **Ann Trop Med Parasitol** 61(4): 500-10.
- Billiau, A. y P. Matthys. (2009): Interferon-gamma: a historical perspective. **Cytokine Growth Factor Rev** 20:97-113.
- Blacksell, S. D., J. A. Doust, P. N. Newton, S. J. Peacock, N. P. Day y A. M. Dondorp. (2006): A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of rapid immunochromatographic assays for the detection of dengue virus IgM antibodies during acute infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 100(8): 775-84.

- Bonjardim, C. A. (2005): Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses—and viruses counteract IFN action. **Microbes Infect** 7(3): 569-78.
- Borrego, F., J. Kabat, D. K. Kim, L. Lieto, K. Maasho, J. Peña, R. Solana y J. E. Coligan. (2002): Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. **Mol Immunol** 38(9): 637-660.
- Bowser, C. S., J. Kaye, R. O. Joks, C. A. Charlot y H. J. Moallem. (2007): IgE and atopy in perinatally HIV-infected children. **Pediatr Allergy Immunol** 18298-303.
- Boyum, A. (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. . **Scand J Clin Lab Invest** 2177-89.
- Bozza, F. A., O. G. Cruz, S. M. Zagne, E. L. Azeredo, R. M. Nogueira, E. F. Assis, P. T. Bozza y C. F. Kubelka. (2008): Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC Infect Dis** 886.
- Braga, E. L., P. Moura, L. M. Pinto, S. R. Ignacio, M. J. Oliveira, M. T. Cordeiro y C. F. Kubelka. (2001): Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 96(2): 229-32.
- Bratke, K., F. Haupt, M. Kuepper, B. Bade, S. Faehndrich y W. Luttmann. (2006): Decrease of cytotoxic T cells in allergic asthma correlates with total serum immunoglobulin E. **Allergy** 611351-7.
- Brockman, M. A., D. S. Kwon, D. P. Tighe, D. F. Pavlik, P. C. Rosato, J. Sela, F. Porichis, S. L. Gall, M. T. Waring, K. Moss, H. Jessen, F. Pereyra, D. G. Kavanagh, B. D. Walker y D. E. Kaufmann. (2009): IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. **Blood** 114346-356.
- Brown, G. R., M. J. McGuire y D. L. Thiele. (1993): Dipeptidyl peptidase I is enriched in granules of in vitro- and in vivo-activated cytotoxic T lymphocytes. **J Immunol** 150(11): 4733-42.
- Burke, D. S. y S. Kliks. (2006): Antibody-dependent enhancement in dengue virus infections. **J Infect Dis** 193(4): 601-3; author reply 603-4.
- Burke, D. S. y T. P. Monath. (2001) Flaviviruses. In: D.M. Knippe y P.M. Howley (Eds), *Fields Virology*, Vol. 1, Lippincott Williams & Wilkins, London-New York-Tokyo, pp. 1043-1125.
- Cantelar de Francisco, N., A. Fernandez, L. Albert Molina y E. Perez Balbis. (1981): [Survey of dengue in Cuba. 1978-1979]. **Rev Cubana Med Trop** 33(1): 72-8.
- Cardier, J. E., E. Marino, E. Romano, P. Taylor, F. Liprandi, N. Bosch y A. L. Rothman. (2005): Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. **Cytokine** 30(6): 359-65.
- Carpentier, A., F. Conti, F. Stenard, L. Aoudjehane, C. Miroux, P. Podevin, O. Morales, S. Chouzenoux, O. Scatton, H. Groux, C. Auriault, Y. Calmus, V. Pancre y N. Delhem. (2009): Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. **Am J Transplan** 92102-12.
- Carr, J. M., H. Hocking, K. Bunting, P. J. Wright, A. Davidson, J. Gamble, C. J. Burrell y P. Li. (2003): Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers. **J Med Virol** 69(4): 521-8.
- Casals-Pascual, C., O. Kai, C. R. Newton, N. Peshu y D. J. Roberts. (2006): Thrombocytopenia in falciparum malaria is associated with high concentrations of IL-10. **Am J Trop Med Hyg** 75434-6.
- Castellanos, Y. (2009): Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la detección y cuantificación del virus dengue. Tesis Maestría en Virología, IPK.
- Clarke, D. H. y J. Casals. (1958): Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **Am J Trop Med Hyg** 7561-73.

- Clyde, K., J. L. Kyle y E. Harris. (2006): Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol** 80(23): 11418-31.
- Coffey, L. L., E. Mertens, A. C. Brehin, M. D. Fernandez-Garcia, A. Amara, P. Despres y A. Sakuntabhai. (2009): Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes Infect** 11(2): 143-56.
- Corsi, M. M., M. Ruscica, D. Passoni, M. G. Scarmozzino y E. Gulletta. (2004): High Th1-type cytokine serum levels in patients with infectious mononucleosis. **Acta Virol** 48:263-6.
- Crispe, I. (2003): Hepatic T cells and liver tolerance. **Nat Rev Immunol** 3:51-62.
- Cullen, S. P. y S. J. Martin. (2008): Mechanisms of granule-dependent killing. **Cell Death and Differentiation** 15:251-262.
- Chareonsirisuthigul, T., S. Kalayanaroj y S. Ubol. (2007): 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** 88(Pt 2): 365-75.
- Chaturvedi, U., R. Nagar y R. Shrivastava. (2006): Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. **FEMS Immunol Med Microbiol** 47(2): 155-66.
- Chaturvedi, U. C. (2006): Tumour necrosis factor & dengue. **Indian J Med Res** 123(1): 11-4.
- Chaturvedi, U. C. (2009): Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever. **Indian J Med Res** 129(1): 1-3.
- Chaturvedi, U. C., R. Agarwal, E. A. Elbishbishi y A. S. Mustafa. (2000): Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunol Med Microbiol** 28(3): 183-8.
- Chaturvedi, U. C., E. A. Elbishbishi, R. Agarwal, R. Raghupathy, R. Nagar, R. Tandon, A. S. Pacsa, O. I. Younis y F. Azizieh. (1999): Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. **J Med Virol** 59(3): 335-40.
- Chau, T. N., N. T. Quyen, T. T. Thuy, N. M. Tuan, D. M. Hoang, N. T. Dung, B. Lien le, N. T. Quy, N. T. Hieu, L. T. Hieu, T. T. Hien, N. T. Hung, J. Farrar y C. P. Simmons. (2008): Dengue in Vietnamese infants—results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. **J Infect Dis** 198(4): 516-24.
- Chen, L. C., H. Y. Lei, C. C. Liu, S. C. Shiesh, S. H. Chen, H. S. Liu, Y. S. Lin, S. T. Wang, H. W. Shyu y T. M. Yeh. (2006): Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **Am J Trop Med Hyg** 74(1): 142-7.
- Chen, R. F., J. W. Liu, W. T. Yeh, L. Wang, J. C. Chang, H. R. Yu, J. T. Cheng y K. D. Yang. (2005): Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunol Med Microbiol** 44(1): 43-50.
- Chen, R. F., L. Wang, J. T. Cheng, H. Chuang, J. C. Chang, J. W. Liu, I. C. Lin y K. D. Yang. (2009a): Combination of CTLA-4 and TGFβ1 gene polymorphisms associated with dengue hemorrhagic fever and virus load in a dengue-2 outbreak. **Clin Immunol** 131(3): 404-9.
- Chen, R. F., L. Wang, J.-T. Cheng, H. Chuang, J.-C. Chang, J.-W. Li, I.-C. Lina y K. D. Yanga. (2009b): Combination of CTLA-4 and TGFβ1 gene polymorphisms associated with dengue hemorrhagic fever and virus load in a dengue-2 outbreak. **Clinical Immunology** 131(3): 404-409.
- Chen, R. F., W. T. Yeh, M. Y. Yang y K. D. Yang. (2001): A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infections. **FEMS Immunol Med Microbiol** 30(1): 1-7.
- Chen, Y., B. Perussia y K. S. Campbell. (2007): Prostaglandin D2 suppresses human NK cell function via signaling through D prostanoid receptor. **J Immunol** 179(5): 2766-73.

- Chen, Y. B., Y. Fannjiang y J. M. Hardwick. (2004) Cell Death in Viral Infections. In: R.A. Lockshin y Z. Zakeri (Eds), When Cells Die II: A Comprehensive Evaluation of Apoptosis and Programmed Cell Death, Wiley-Liss, New York, pp. 435-60.
- Chiewsilp, P., R. M. Scott y N. Bhamarapravati. (1981): Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg** 30:1100-13.
- Chua, J. J., R. Bhuvanankantham, V. T. Chow y M. L. Ng. (2005): Recombinant non-structural 1 (NS1) protein of dengue-2 virus interacts with human STAT3beta protein. **Virus Res** 112(1-2): 85-94.
- Darmon, A. J., D. W. Nicholson y R. C. Bleackley. (1995): Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. **Nature** 377(6548): 446-8.
- Davis, D. M. y M. L. Dustin. (2004): What is the importance of the immunological synapse? **Trends Immunol** 25:323-7.
- de Araujo, J. M., H. G. Schatzmayr, A. M. de Filippis, F. B. Dos Santos, M. A. Cardoso, C. Britto, J. M. Coelho y R. M. Nogueira. (2009): A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. **J Virol Methods** 155(1): 34-8.
- de Kruif, M. D., T. E. Setiati, A. T. Mairuhu, P. Koraka, H. A. Aberson, C. A. Spek, A. D. Osterhaus, P. H. Reitsma, D. P. Brandjes, A. Soemantri y E. C. van Gorp. (2008): Differential gene expression changes in children with severe dengue virus infections. **PLoS Negl Trop Dis** 2(4): e215.
- de Macedo, F. C., A. F. Nicol, L. D. Cooper, M. Yearsley, A. R. Pires y G. J. Nuovo. (2006): Histologic, viral, and molecular correlates of dengue fever infection of the liver using highly sensitive immunohistochemistry. **Diagn Mol Pathol** 15(4): 223-8.
- Dejnirattisai, W., T. Duangchinda, C. L. Lin, S. Vasanawathana, M. Jones, M. Jacobs, P. Malasit, X. N. Xu, G. Screaton y J. Mongkolsapaya. (2008): A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. **J Immunol** 181(9): 5865-74.
- Detrick, B., C. N. Nagineni y J. J. Hooks. (2008) Cytokines: Regulators of Immune Responses and Key Therapeutic Targets In: M.R.G.O.G.a.A.D. Donnenberg (Ed), Human Immunology, CRC Press, Taylor & Francis Group, pp. 495-516.
- Diallo, M., A. A. Sall, A. C. Moncayo, Y. Ba, Z. Fernandez, D. Ortiz, L. L. Coffey, C. Mathiot, R. B. Tesh y S. C. Weaver. (2005): Potential role of sylvatic and domestic African mosquito species in dengue emergence. **Am J Trop Med Hyg** 73(2): 445-9.
- Diamond, M. S., T. G. Roberts, D. Edgil, B. Lu, J. Ernst y E. Harris. (2000): Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. **J Virol** 74(11): 4957-66.
- Dinareello, C. A. (2000): Proinflammatory cytokines. **Chest** 118(2): 503-8.
- Domingo, C., F. de Ory, J. C. Sanz, N. Reyes, J. Gascon, O. Wichmann, S. Puente, M. Schunk, R. Lopez-Velez, J. Ruiz y A. Tenorio. (2009): Molecular and serologic markers of acute dengue infection in naive and flavivirus-vaccinated travelers. **Diagn Microbiol Infect Dis** 65(1): 42-8.
- Drechsler, Y., S. Chavan, D. Catalana, P. Mandrekar y G. Szabo. (2002): Fcγ<sub>2</sub>R cross-linking mediates NF-κB activation, reduced antigen presentation capacity, and decreased IL-12 production in monocytes without modulation of myeloid dendritic cell development. **J Leuk Biol** 72:657-67.
- Dung, N. T., H. T. Duyen, N. T. Thuy, T. V. Ngoc, N. V. Chau, T. T. Hien, S. L. Rowland-Jones, T. Dong, J. Farrar, B. Wills y C. P. Simmons. (2010): Timing of CD8+ T cell responses in relation to commencement of capillary leakage in children with dengue. **J Immunol** 184(12): 7281-7.
- Durbin, A. P. y S. S. Whitehead. (2010): Dengue vaccine candidates in development. **Curr Top Microbiol Immunol** 338:129-43.
- Ege, M. J., I. Herzum, G. Büchele, S. Krauss-Etschmann, R. P. Lauener, S. Bitter, M. Roponen, S. Remes, D. A. Vuitton, J. Riedler, B. Brunekreef, J. C. Dalphin, C. Braun-Fahrländer, J. Pekkanen, H. Renz y E.

- von Mutius. (2008): Specific IgE to allergens in cord blood is associated with maternal immunity to *Toxoplasma gondii* and rubella virus. **Allergy** 63:1505-11.
- Elghetany, M. T. y D. H. Walker. (1999): Hemostatic changes in Rocky Mountain spotted fever and Mediterranean spotted fever. **Am J Clin Pathol** 112(2): 159-168.
- Esler, D. (2009): Dengue - Clinical and public health ramifications. **Aust Fam Physician** 38(11): 876-9.
- Fadeel, B., A. Samuelsson, T. Hachiya, C. Brostrom y F. Chiodi. (1996): Elevated serum levels of soluble Fas/APO-1 in human immunodeficiency virus-infected individuals. **Blood** 88:4727.
- Falcon-Lezama, J. A., C. Ramos, J. Zuniga, L. Juarez-Palma, H. Rangel-Flores, A. R. Garcia-Trejo, V. Acunha-Alonzo, J. Granados y G. Vargas-Alarcon. (2009): HLA class I and II polymorphisms in Mexican Mestizo patients with dengue fever. **Acta Trop**.
- Falvo, J. V., A. V. Tsytsykova y A. E. Goldfeld. (2010): Transcriptional control of the TNF gene. **Curr Dir Autoimmun** 1127-60.
- Fernandez-Mestre, M. T., K. Gendzekhadze, P. Rivas-Vetencourt y Z. Layrisse. (2004): TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens** 64(4): 469-72.
- Figueiredo, M. A., L. C. Rodrigues, M. L. Barreto, J. W. Lima, M. C. Costa, V. Morato, R. Blanton, P. F. Vasconcelos, M. R. Nunes y M. G. Teixeira. (2010): Allergies and diabetes as risk factors for dengue hemorrhagic fever: results of a case control study. **PLoS Negl Trop Dis** 4(6): e699.
- Flauzino, R. F., R. Souza-Santos y R. M. Oliveira. (2009): [Dengue, geoprocessing, and socioeconomic and environmental indicators: a review]. **Rev Panam Salud Publica** 25(5): 456-61.
- Franco, L., A. Di Caro, F. Carletti, O. Vapalahti, C. Renaudat, H. Zeller y A. Tenorio. (2010): Recent expansion of dengue virus serotype 3 in West Africa. **Euro Surveill** 15 pii: 19490.
- Funahara, Y., K. Ogawa, N. Fujita y Y. Okuno. (1987): Three possible triggers to induce thrombocytopenia in dengue virus infection. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 18(3): 351-355.
- Gagnon, S. J., F. A. Ennis y A. L. Rothman. (1999): Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. **J Virol** 73(5): 3623-9.
- Gagnon, S. J., M. Mori, I. Kurane, S. Green, D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Suntayakorn, F. A. Ennis y A. L. Rothman. (2002): Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. **J Med Virol** 67(1): 41-6.
- Gao, J., G. Shan, B. Sun, P. J. Thompson y X. Gao. (2006): Association between polymorphism of tumour necrosis factor alpha-308 gene promoter and asthma: a meta-analysis. **Thorax** 61(6): 466-71.
- Gao, Q. J., D. W. Liu, S. Y. Zhang, M. Jia, L. M. Wang, L. H. Wu, S. Y. Wang y L. X. Tong. (2009): Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. **World J Gastroenterol**. 155610-9.
- Garcia-Rivera, E. J. y J. G. Rigau-Perez. (2003): Dengue severity in the elderly in Puerto Rico. **Rev Panam Salud Publica** 13(6): 362-8.
- Garcia, C. A., H. Wang, M. R. Benakanakere, E. Barrett, D. F. Kinane y M. Martin. (2009): c-jun controls the ability of IL-12 to induce IL-10 production from human memory CD4+ T cells. **J Immunol** 183(7): 4475-82.
- García, G., B. Sierra, A. B. Pérez, E. Aguirre, I. Rosado, N. González, A. Izquierdo, M. Pupo, D. Ruiz, D. Díaz, L. Sanchez, B. Marcheco, K. Hirayama y M. G. Guzmán. (2010): Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FcγRIIIa polymorphism. **Am J Trop Med Hyg** 00-000 en prensa.
- Gengozian, N. y D. T. Rice. (1982): Antibody-dependent cellular cytotoxicity with platelets as the target cell: potential application to the study of immune thrombocytopenia. **Clin Exp Immunol** 47(2): 431-436

- Gohara, S., S. Shichijo, N. Komatsu, S. Okuda, S. Yutani y K. Itoh. (2008): Detection of IgE antibody specific to a hepatitis C virus-derived peptide being recognized by cellular immunity in patients with HCV infection. **Viral Immunol** 21365-9.
- Goncalvez, A. P., R. E. Engle, M. St Claire, R. H. Purcell y C. J. Lai. (2007): Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(22): 9422-7.
- Gonzalez, D., O. E. Castro, G. Kouri, J. Perez, E. Martinez, S. Vazquez, D. Rosario, R. Cancio y M. G. Guzman. (2005): 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**.
- Green, S., I. Kurane, S. Pincus, E. Paoletti y F. A. Ennis. (1997): Recognition of dengue virus NS1-NS2a proteins by human CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte clones. **Virology** 234(2): 383-6.
- Green, S., S. Pichyangkul, D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Nimmannitya, A. Nisalak, I. Kurane, A. L. Rothman y F. A. Ennis. (1999a): Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis** 180(5): 1429-35.
- Green, S. y A. Rothman. (2006): Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Curr Opin Infect Dis** 19(5): 429-36.
- Green, S., D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, A. Nisalak, A. L. Rothman y F. A. Ennis. (1999b): Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. **J Med Virol** 59(3): 329-34.
- Gringhuis, S. I., J. den Dunnen, M. Litjens, B. van Het Hof, Y. van Kooyk y T. B. Geijtenbeek. (2007): C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. **Immunity** 26605-16.
- Gubler, D. (1997) Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: D. Gubler y G. Kuno (Eds), *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, CAB International, pp. 1-22.
- Gubler, D. (2005): The emergence of epidemic dengue fever and dengue hemorrhagic fever in the Americas: a case of failed public health policy. **Rev Panam Salud Publica** 17(4): 221-4.
- Gubler, D. J. (1998): Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev** 11(3): 480-96.
- Gubler, D. J. (2002): Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol** 10(2): 100-3.
- Gubler, D. J. (2004): The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** 27(5): 319-30.
- Gubler, D. J. (2006): Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Found Symp** 2773-16; discussion 16-22, 71-3, 251-3.
- Gubler, D. J. y M. Meltzer. (1999): Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Adv Virus Res** 5335-70.
- Guha-Sapir, D. y B. Schimmer. (2005): Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. **Emerg Themes Epidemiol** 2(1): 1.
- Guzman, M. G. (2005): Global voices of science. Deciphering dengue: the Cuban experience. **Science** 309(5740): 1495-7.
- Guzman, M. G., M. Alvarez, R. Rodriguez-Roche, L. Bernardo, T. Montes, S. Vazquez, L. Morier, A. Alvarez, E. A. Gould, G. Kouri y S. B. Halstead. (2007): Neutralizing antibodies after infection with dengue 1 virus. **Emerg Infect Dis** 13(2): 282-6.
- Guzman, M. G. y G. Kouri. (2003): Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **J Clin Virol** 27(1): 1-13.
- Guzman, M. G. y G. Kouri. (2004): Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int J Infect Dis** 8(2): 69-80.

- Guzman, M. G. y G. Kouri. (2008): Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 102(6): 522-3.
- Guzman, M. G., G. Kouri, M. Soler, J. Bravo, A. Rodriguez de La Vega, S. Vazquez y M. Mune. (1992): Dengue 2 virus enhancement in asthmatic and non asthmatic individual. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 87(4): 559-64.
- Guzman, M. G., G. Kouri, L. Valdes, J. Bravo, M. Alvarez, S. Vazques, I. Delgado y S. B. Halstead. (2000): Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. **Am J Epidemiol** 152(9): 793-9; discussion 804.
- Guzman, M. G., G. P. Kouri, J. Bravo, M. Soler, S. Vazquez y L. Morier. (1990): Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. **Am J Trop Med Hyg** 42(2): 179-84.
- Guzman, M. G., G. P. Kouri, J. Bravo, M. Soler, S. Vazquez, M. Santos, R. Villaescusa, P. Basanta, G. Indan y J. M. Ballester. (1984): Dengue haemorrhagic fever in Cuba. II. Clinical investigations. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 78(2): 239-41.
- Guzman, M. G., G. P. Kouri, S. Vazquez, D. Rosario, J. R. Bravo y L. Valdes. (1999): DHF Epidemics in Cuba, 1981 and 1997: Some interesting observations. **Dengue Bulletin**. WHO 23.
- Guzman, M. G., R. Rodriguez, L. Hermida, M. Alvarez, L. Lazo, M. Mune, D. Rosario, K. Valdes, S. Vazquez, R. Martinez, T. Serrano, J. Paez, R. Espinosa, T. Pumariega y G. Guillen. (2003): Induction of neutralizing antibodies and partial protection from viral challenge in Macaca fascicularis immunized with recombinant dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in Pichia pastoris. **Am J Trop Med Hyg** 69(2): 129-34.
- Gwinn, W., W. Sun, B. L. Innis, J. Caudill y A. D. King. (2003): Serotype-specific T(H)1 responses in recipients of two doses of candidate live-attenuated dengue virus vaccines. **Am J Trop Med Hyg** 69(6 Suppl): 39-47.
- Halstead, S. B. (1989): Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. **Rev Infect Dis** 11 Suppl 4S830-9.
- Halstead, S. B. (1990): Global epidemiology of dengue hemorrhagic fever. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 21(4): 636-41.
- Halstead, S. B. (2002): Dengue. **Curr Opin Infect Dis** 15(5): 471-6.
- Halstead, S. B. (2003): Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Adv Virus Res** 60421-67.
- Halstead, S. B. (2007): Dengue. **Lancet** 370(9599): 1644-52.
- Halstead, S. B. (2009): Antibodies determine virulence in dengue. **Ann N Y Acad Sci** 1171 Suppl 1E48-56.
- Halstead, S. B. y E. J. O'Rourke. (1977): Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **J Exp Med** 146(1): 201-17.
- Halstead, S. B., E. J. O'Rourke y A. C. Allison. (1977): Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. **J Exp Med** 146(1): 218-29.
- Hall, W. C., T. P. Crowell, D. M. Watts, V. L. Barros, H. Kruger, F. Pinheiro y C. J. Peters. (1991): Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis. **Am J Trop Med Hyg** 45(4): 408-17.
- Hamerman, J. A., K. Ogasawara y L. L. Lanier. (2005): NK cells in innate immunity. **Curr Opin Immunol** 17(1): 29-35.
- Harari, A., F. B. Enders, C. Cellera, P. A. Bart y G. Pantaleo. (2009): Distinct Profiles of Cytotoxic Granules in Memory CD8 T Cells Correlate with Function, Differentiation Stage, and Antigen Exposure. **Virol** 832862-71.
- Harris, E., K. L. Holden, D. Edgil, C. Polacek y K. Clyde. (2006): Molecular biology of flaviviruses. **Novartis Found Symp** 27723-39; discussion 40, 71-3, 251-3.

- Heibein, J. A., I. S. Goping, M. Barry, M. J. Pinkoski, G. C. Shore, D. R. Green y R. C. Bleackley. (2000): Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. **J Exp Med** 192(10): 1391-402.
- Heinz, F. X. y S. L. Allison. (2003): Flavivirus structure and membrane fusion. **Adv Virus Res** 59:63-97.
- Henchal, E. A., J. M. McCown, M. C. Seguin, M. K. Gentry y W. E. Brandt. (1983): Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. **Am J Trop Med Hyg** 32(1): 164-9.
- Hershkovitz, O., A. Zilka, A. Bar-Ilan, S. Abutbul, A. Davidson, M. Mazzon, B. M. Kümmerer, A. Monsoengo, M. Jacobs y A. Porgador. (2008): Dengue virus replicon expressing the nonstructural proteins suffices to enhance membrane expression of HLA class I and inhibit lysis by human NK cells. **J Virol** 82(15): 7666-7676.
- Ho, L. J., J. J. Wang, M. F. Shaio, C. L. Kao, D. M. Chang, S. W. Han y J. H. Lai. (2001): Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. **J Immunol** 166(3): 1499-506.
- Hoffmann, S. C., E. M. Stanley, E. D. Cox, B. S. DiMercurio, D. E. Koziol, D. M. Harlan, A. D. Kirk y P. J. Blair. (2002a): Ethnicity Greatly Influences Cytokine Gene Polymorphism Distribution. **Am J Transplant** 2:560-567.
- Hoffmann, T. K., G. Dworacki, T. Tsukihira, N. Meidenbauer, W. Gooding, J. T. Johnson y T. L. Whiteside. (2002b): Spontaneous Apoptosis of Circulating T Lymphocytes in Patients with Head and Neck Cancer and Its Clinical Importance. **Clin Cancer Res** 8:2553-2562.
- Holegaard, M. V. y J. L. Bidwell. (2006): Cytokines Gene Polymorphism in Human Disease: Online Database, Supplement 3. Genes and Immunity. .
- Holgate, S. T. (2008): Pathogenesis of asthma. **Clin Exp Allergy** 38:872-97.
- Holm, A. M., G. Tjønnfjord, A. Yndestad, K. Beiske, F. Müller, P. Aukrust y S. S. Frøland. (2006): Polyclonal expansion of large granular lymphocytes in common variable immunodeficiency - association with neutropenia. **Clin Exp Immunol** 144(3): 418-424.
- Hotta, N., T. Ichiyama, M. Shiraishi, T. Takekawa, T. Matsubara y S. Furukawa. (2007): Nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells in children with sepsis. . **Crit Care Med** 35:2395-401.
- Huang, H., D. D. Patel y K. G. Manton. (2005): The immune system in aging: roles of cytokines, T cells and NK cells. **Front Biosci** 10:192-215.
- Hung, S. L., P. L. Lee, H. W. Chen, L. K. Chen, C. L. Kao y C. C. King. (1999): Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. **Virology** 257(1): 156-67.
- Hutchinson, K. L. y P. E. Rollin. (2007): Cytokine and chemokine expression in humans infected with Sudan Ebola virus. **J Infect Dis** 196S357-63.
- Imani, F., D. Proud y D. E. Griffin. (1999): Measles virus infection synergizes with IL-4 in IgE class switching. **J Immunol** 162:1597-602.
- Imrie, A., J. Meeks, A. Gurary, M. Sukhbataar, P. Kitsutani, P. Effler y Z. Zhao. (2007): Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. **J Virol** 81(18): 10081-91.
- Jana, M., S. Dasgupta, U. Pal y K. Pahan. (2009): IL-12 p40 homodimer, the so-called biologically inactive molecule, induces nitric oxide synthase in microglia via IL-12R beta 1. **Glia** 57:1553-65.
- Jessie, K., M. Y. Fong, S. Devi, S. K. Lam y K. T. Wong. (2004): Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **J Infect Dis** 189(8): 1411-8.

- Jiang, B., L. Snipes-Magaldi, P. Dennehy, H. Keyserling, R. C. Holman, J. Bresee, J. Gentsch y R. I. Glass. (2003): Cytokines as mediators for or effectors against rotavirus disease in children. **Clin Diagn Lab Immunol** 10995-1001.
- Jones, M., A. Davidson, L. Hibbert, P. Gruenwald, J. Schlaak, S. Ball, G. R. Foster y M. Jacobs. (2005): Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. **J Virol** 79(9): 5414-20.
- Ju, S. T., K. Matsui y M. Ozdemirli. (1999): Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction. **Int Rev Immunol** 18(5-6): 485-513.
- Juarez, A. S., A. B. Quaresma, L. R. S. Vera, C. Barros, C. Pagliari, E. R. Fernandes, F. Guedes y C. Takakura. (2006): Revisiting the liver in human yellow fever: Virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and NK cells activity. **Virology** 345:22-30.
- Jung, Y. J., Y. J. Kim, L. H. Kim, S. O. Lee, B. L. Park, H. D. Shin y H. S. Lee. (2007): Putative association of Fas and FasL gene polymorphisms with clinical outcomes of hepatitis B virus infection. **Intervirology** 50(5): 369-376.
- Kabesch, M., M. Schedel, D. Carr, B. Woitsch, C. Fritsch, S. K. Weiland y E. von Mutius. (2006): IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. **J Allergy Clin Immunol** 117269-74.
- Kägi, D., B. Ledermann, K. Bürki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel y H. Hengartner. (1994): Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. **Nature** 369(6475): 31-37.
- Kalayanarooj, S. y S. Nimmanitya. (2005): Is dengue severity related to nutritional status? **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 36(2): 378-84.
- Kaser, A., B. Enrich, O. Ludwiczek, W. Vogel y H. Tilg. (1999): Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) enhances cytotoxicity in healthy volunteers and chronic hepatitis C infection mainly by the perforin pathway. **Clin Exp Immunol** 118(1): 71-77.
- Katze, M. G., J. L. Fomek, R. E. Palermo, K. A. Walters y M. J. Korth. (2008): Innate immune modulation by RNA viruses: emerging insights from functional genomics. **Nature** 8644-54.
- Khan, S. H., S. S. Park, I. A. Sirajuddin y M. H. Grayson. (2008): Respiratory virus and asthma: the role of immunoglobulin E. **Clin Ther** 301017-24.
- Killen, H. y M. A. O'Sullivan. (1993): Detection of dengue virus by in situ hybridization. **J Virol Methods** 41(2): 135-46.
- King, A. D., A. Nisalak, S. Kalayanarooj, K. S. Myint, K. Pattanapanyasat, S. Nimmanitya y B. L. Innis. (1999): B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 30(4): 718-28.
- Klingström, J., L. Gudmundsdóttir, B. Zuber, J. Hinkula, A. Mölmer, B. Wahren y E. Rollman. (2006): Elevated levels of serum perforin in chronic HIV-1 and acute SIV/SHIV infection. **AIDS** 20125-127.
- Knolle, P., E. Schmitt y S. Jin. (1999): Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. **Gastroenterology** 1161428-40.
- Koide, N., A. Morikawa, G. Tumurkhuu, J. Dagvadorj, F. Hassan, S. Islam, Y. Naiki, I. Mori, T. Yoshida y T. Yokochi. (2007): Lipopolysaccharide and interferon-gamma enhance Fas-mediated cell death in mouse vascular endothelial cells via augmentation of Fas expression. **Clin Exp Immunol** 150(3): 553-560.
- Komatsu, T., D. D. C. Ireland y C. S. Reiss. (1998): IL-12 and Viral Infections. **Cytokine & Growth Factor Reviews** 9277-285.

- Kouri, G., M. G. Guzman, L. Valdes, I. Carbonel, D. del Rosario, S. Vazquez, J. Laferte, J. Delgado y M. V. Cabrera. (1998): Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. **Emerg Infect Dis** 4(1): 89-92.
- Kouri, G. P., M. G. Guzman, J. R. Bravo y C. Triana. (1989): Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. **Bull World Health Organ** 67(4): 375-80.
- Koyama, S., K. J. Ishii, C. Coban y S. Akira. (2008): Innate immune response to viral infection. **Cytokine** 43(3): 336-41.
- Krabbe, K. S., M. Pedersen y H. Bruunsgaard. (2004): Inflammatory mediators in the elderly. **Exp Gerontol** 39:687-99.
- Krammer, P. H. (2000): CD95's deadly mission in the immune system. **Nature** 407(6805): 789-795.
- Krzewski, K. y J. L. Strominger. (2008): The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. **Curr Opin Cell Biol** 20:597-605.
- Kuo, C. H., D. I. Tai, C. S. Chang-Chien, C. K. Lan, S. S. Chiou y Y. F. Liaw. (1992): Liver biochemical tests and dengue fever. **Am J Trop Med Hyg** 47(3): 265-70.
- Kurane, I. (2007): Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** 30(5-6): 329-40.
- Kurane, I. y F. E. Ennis. (1992): Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Semin Immunol** 4(2): 121-7.
- Kurane, I., B. L. Innis, C. H. Hoke, Jr., K. H. Eckels, A. Meager, J. Janus y F. A. Ennis. (1995): T cell activation in vivo by dengue virus infection. **J Clin Lab Immunol** 46(1): 35-40.
- Kurane, I., B. L. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, A. Meager, J. Janus y F. A. Ennis. (1991): 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** 88(5): 1473-80.
- Kurane, I., B. L. Innis, A. Nisalak, C. Hoke, S. Nimmannitya, A. Meager y F. A. Ennis. (1989): Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gamma production. **J Clin Invest** 83(2): 506-13.
- Kurosu, T., P. Chaichana, M. Yamate, S. Anantapreecha y K. Ikuta. (2007): Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. **Biochem Biophys Res Commun** 362(4): 1051-6.
- Kuwano, K., T. Maeyama, I. Inoshima, K. Ninomiya, N. Hagimoto, M. Yoshimi, M. Fujita, N. Nakamura, K. Shirakawa y N. Hara. (2002): Increased circulating levels of soluble Fas ligand are correlated with disease activity in patients with fibrosing lung diseases. **Respirology** 7(1): 15-21.
- Kvale, E. O., Y. Fløisand, F. Lund-Johansen, H. Rollag, L. Farkas, S. Ghanekar, P. Brandtzaeg, F. L. Jahnsen y J. Olweus. (2007): Plasmacytoid DCs regulate recall responses by rapid induction of IL-10 in memory T cells. **Blood** 109(8): 3369-76.
- Kyle, J. L. y E. Harris. (2008): Global spread and persistence of dengue. **Annual Review of Microbiology** 62:71-92.
- La Russa, V. F. y B. L. Innis. (1995): Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. **Baillieres Clin Haematol** 8(1): 249-270.
- LaFleur, C., J. Granados, G. Vargas-Alarcon, J. Ruiz-Morales, C. Villarreal-Garza, L. Higuera, G. Hernandez-Pacheco, T. Cutino-Moguel, H. Rangel, R. Figueroa, M. Acosta, E. Lazcano y C. Ramos. (2002): HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. **Hum Immunol** 63(11): 1039-44.

- Lages, C. S., I. Suffia, P. A. Velilla, B. Huang, G. Warshaw, D. A. Hildeman, Y. Belkaid y C. Chougnet. (2008): Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. **J Immunol** 181:1835-48.
- Lan, N. T., M. Kikuchi, V. T. Huong, Q. Ha do, T. T. Thuy, V. D. Tham, H. M. Tuan, V. V. Tuong, C. T. Nga, T. Van Dat, T. Oyama, K. Morita, M. Yasunami y K. Hirayama. (2008): Protective and Enhancing HLA Alleles, HLA-DRB1\*0901 and HLA-A\*24, for Severe Forms of Dengue Virus Infection, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. **PLoS Negl Trop Dis** 2(10): e304.
- Lanciotti, R. S., C. H. Calisher, D. J. Gubler, G. J. Chang y A. V. Vorndam. (1992): Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 30(3): 545-51.
- Lanzavecchia, A. y F. Sallusto. (2005): Understanding the generation and function of memory T cell subsets. **Curr Opin Immunol** 17:326-32.
- Laoprasopwattana, K., D. H. Libraty, T. P. Endy, A. Nisalak, S. Chunsuttiwat, F. A. Ennis, A. L. Rothman y S. Green. (2007): Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. **J Infect Dis** 195(8): 1108-16.
- Laur, F., B. Murgue, X. Deparis, C. Roche, O. Cassar y E. Chungue. (1998): Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 92(6): 654-6.
- Lescar, J., D. Luo, T. Xu, A. Sampath, S. P. Lim, B. Canard y S. G. Vasudevan. (2008): Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. **Antiviral Res** 80(2): 94-101.
- Levy, A., N. Valero, L. M. Espina, G. Anez, J. Arias y J. Mosquera. (2010): Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 104(1): 16-23.
- Li, L., S. Liu, T. Zhang, W. Pan, X. Yang y X. Cao. (2008): Splenic Stromal Microenvironment Negatively Regulates Virus-Activated Plasmacytoid Dendritic Cells through TGF- $\beta$ 1. **J Immunol** 180:2951-6.
- Li, L. Y., X. Luo y X. Wang. (2001): Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. **Nature** 412(6842): 95-99.
- Li, M. O. y R. A. Flavell. (2008): TGF- $\beta$ : a master of all T cell trades. **Cell** 134:392-404.
- Liao, H., J. Xu y J. Huang. (2010): FasL/Fas Pathway Is Involved in Dengue Virus Induced Apoptosis of the Vascular Endothelial Cells. **J Med Virol** 82:1392-9.
- Libel, M. (2006a): Brote de dengue en Cuba, 2006. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas. **Habana: OPS**.
- Libel, M. (2006b): Brote de dengue en Cuba, 2006. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas. Havana, Cuba : **Organización Panamericana de la Salud** .
- Libraty, D. H., T. P. Endy, H. S. H. Houng, S. Green, S. Kalayanaroj, S. Suntayakorn, W. Chansiriwongs, D. W. Vaughn, A. Nisalak, F. A. Ennis y A. L. Rothman. (2002): Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **J Infect Dis** 185(9): 1213-21.
- Libraty, D. H., S. Pichyangkul, C. Ajariyakhajorn, T. P. Endy y F. A. Ennis. (2001): Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. **J Virol** 75(8): 3501-8.
- Lieberman, J. (2003a): The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. **Nat Rev Immunol** 3(5): 361-70.

- Lieberman, J. (2003b): The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. **Nat Rev Immunol** 3361-70.
- Limonta, D., V. Capo, G. Torres, A. B. Perez y M. G. Guzman. (2007): Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. **J Clin Virol** 40(1): 50-4.
- Limonta, D., D. Gonzalez, V. Capo, G. Torres, A. B. Perez, D. Rosario, R. Roche-Rodriguez, M. Alvarez y M. G. Guzman. (2009): Fatal severe dengue and cell death in sickle cell disease during the 2001-2002 Havana dengue epidemic. **Int J Infect Dis** 13(2): e77-8.
- Limonta, D., G. Torres, V. Capó y M. G. Guzmán. (2008): Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient. **Diabetes Vasc Dis Res** 5(3): 213-4.
- Lin, C. F., S. W. Wan, H. J. Cheng, H. Y. Lei y Y. S. Lin. (2006): Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. **Viral Immunol** 19(2): 127-32.
- Lin, Y. W., K. J. Wang, H. Y. Lei, Y. S. Lin, T. M. Yeh, H. S. Liu, C. C. Liu y S. H. Chen. (2002): Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. **J Virol** 76(23): 12242-9.
- Lindenbach, B. D. y C. M. Rice. (2003): Molecular biology of flaviviruses. **Adv Virus Res** 5923-61.
- Linkermann, A., J. Qian, M. Lettau, D. Kabelitz y O. Janssen. (2005): Considering Fas ligand as a target for therapy. **Expert Opin Ther Targets** 9(1): 119-134.
- Liu, B., A. M. Woltman, H. L. Janssen y A. Boonstra. (2009): Modulation of dendritic cell function by persistent viruses. **J Leukoc Biol** 85(2): 205-14.
- Liu, J. H., S. Wei, T. Lamy, P. K. Epling-Burnette, G. Starkebaum, J. Y. Djeu y T. P. Loughran. (2000): Chronic neutropenia mediated by fas ligand. **Blood** 95(10): 3219-3222.
- Loke, H., D. Bethell, C. X. Phuong, N. Day, N. White, J. Farrar y A. Hill. (2002): 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 Med Hyg** 67(1): 102-6.
- Loke, H., D. B. Bethell, C. X. Phuong, M. Dung, J. Schneider, N. J. White, N. P. Day, J. Farrar y A. V. Hill. (2001): Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? **J Infect Dis** 184(11): 1369-73.
- Lolekha, R., K. Chokephaibulkit, S. Yoksan, N. Vanprapar, W. Phongsamart y S. Chearksul. (2004): Diagnosis of dengue infection using various diagnostic tests in the early stage of illness. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 35(2): 391-395.
- Lorenzo, M. E., H. L. Ploegh y R. S. Tirabassi. (2001): Viral immune evasion strategies and the underlying cell biology. **Semin Immunol** 131-9.
- Luhn, K., C. P. Simmons, E. Moran, N. T. Dung, T. N. Chau, N. T. Quyen, T. T. Thao le, T. Van Ngoc, N. M. Dung, B. Wills, J. Farrar, A. J. McMichael, T. Dong y S. Rowland-Jones. (2007): Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. **J Exp Med** 204(5): 979-85.
- Llorent, L., Y. Richaud-Patin, N. Alcocer-Castillejos, R. Ruiz-Soto, M. Mercado, H. Orozco, A. Gamboa-Domínguez y J. Alcocer-Varela. (1996): Cytokine gene expression in cirrhotic and non-cirrhotic human liver. **J Hepatol** 24(5): 555-63.
- Mabalarajan, U., T. Kadiravan, S. K. Sharma, A. Banga y B. Ghosh. (2005): Th(2) immune response in patients with dengue during defervescence: preliminary evidence. **Am J Trop Med Hyg** 72(6): 783-5.
- Maher, S., D. Toomey, C. Condrón y D. Bouchier-Hayes. (2002): Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. **Immunol Cell Biol** 80(2): 131-7.

- Maizels, R. M. y M. Yazdanbakhsh. (2003): Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nat Rev Immunol** 3733-44.
- Malavige, G. N., S. Fernando, D. J. Fernando y S. L. Seneviratne. (2004): Dengue viral infections. **Postgrad Med J** 80(948): 588-601.
- Malmgaard, L., S. R. Paludan, S. C. Mogensen y S. Ellermann-Eriksen. (2000): Herpes simplex virus type 2 induces secretion of IL-12 by macrophages through a mechanism involving NF- $\kappa$ B. **Journal of General Virology** 813011-3020.
- Mangada, M. M., T. P. Endy, A. Nisalak, S. Chunsuttiwat, D. W. Vaughn, D. H. Libraty, S. Green, F. A. Ennis y A. L. Rothman. (2002): Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. **J Infect Dis** 185(12): 1697-703.
- Mangada, M. M. y A. L. Rothman. (2005): Altered cytokine responses of dengue-specific CD4<sup>+</sup> T cells to heterologous serotypes. **J Immunol** 175(4): 2676-83.
- Marchette, N. J. y S. B. Halstead. (1973): Survival of Dengue virus in post mortem samples of tissues from experimentally infected Rhesus monkeys. **Am J Trop Med Hyg** 22(2): 242-3.
- Marianneau, P., A. M. Steffan, C. Royer, M. T. Drouet, D. Jaeck, A. Kim y V. Deubel. (1999): Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. **J Virol** 73(6): 5201-6.
- Martina, B. E., P. Koraka y A. D. Osterhaus. (2009): Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clin Microbiol Rev** 22(4): 564-81.
- Martinez-Torres, E. (1995): [Dengue and hemorrhagic dengue: the clinical aspects]. **Salud Publica Mex** 37 SupplS29-44.
- Mathew, A., I. Kurane, S. Green, H. A. Stephens, D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Suntayakorn, D. Chandanayingyong, F. A. Ennis y A. L. Rothman. (1998): Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection. **J Virol** 72(5): 3999-4004.
- Mathew, A. y A. L. Rothman. (2008): Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunol Rev** 225300-13.
- Mattar, R., E. de Souza y S. Daher. (2006): Preterm delivery and cytokine gene polymorphisms. **J Reprod Med** 51(4): 317-20.
- McBride, W. J. y H. Bielefeldt Ohmann. (2000): Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes Infect** 2(9): 1041-50.
- McIlroy, D., L. Meyer, Y. Dudoit, A. Samri, J. F. Delfraissy, B. Autran, P. Debré y I. Theodorou. (2006): Polymorphism in the proximal promoter region of the perforin gene and its impact on the course of HIV infection. **Int J Immunogenet** 33(2): 73-79.
- McLeod, H. L. (2005): Pharmacogenetic analysis of clinically relevant genetic polymorphisms. **Clin Infect Dis** 41S449-52.
- Metkar, S. S., B. Wang, M. Aguilar-Santelises, S. M. Raja, L. Uhlin-Hansen, E. Podack, J. A. Trapani y C. J. Froelich. (2002): Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. **Immunity** 16(3): 417-28.
- Miagostovich, M. P., R. G. Ramos, A. F. Nicol, R. M. Nogueira, T. Cuzzi Maya, A. V. Oliveira, R. S. Marchevsky, R. P. Mesquita y H. G. Schatzmayr. (1997): Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin Neuropathol** 16(4): 204-8.
- Miguez-Burbano, M. J., C. A. Jaramillo, C. J. Palmer, G. Shor-Posner, L. S. Velasquez, H. Lai y M. K. Baum. (1999): Total immunoglobulin E levels and dengue infection on San Andres Island, Colombia. **Clin Diagn Lab Immunol** 6(4): 624-6.

- Miller, J. L., B. J. Dewet, L. Martinez-Pomares, C. M. Radcliffè, R. A. Dwek, P. M. Rudd y S. Gordon. (2008): The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. **PLoS Pathog** 4(2): e17.
- MINSAP-OPS, C. (2006): Brote de Dengue en Cuba, 2006. **OPS EEE Noticias: Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas**. 3(1): 1-2.
- Miyairi, I. y J. P. DeVincenzo. (2008): Human genetic factors and respiratory syncytial virus disease severity. **Clin Microbiol Rev** 21686-703.
- Mongkolsapaya, J., W. Dejnirattisai, X. N. Xu, S. Vasanawathana, N. Tangthawornchaikul, A. Chairunsri, S. Sawasdivom, T. Duangchinda, T. Dong, S. Rowland-Jones, P. T. Yenchitsomanus, A. McMichael, P. Malasit y G. Screaton. (2003): Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nat Med** 9(7): 921-7.
- Morens, D. M., S. B. Halstead, P. M. Repik, R. Putvatana y N. Raybourne. (1985): 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** 22(2): 250-4.
- Mustafa, A. S., E. A. Elbishbishi, R. Agarwal y U. C. Chaturvedi. (2001): Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunol Med Microbiol** 30(3): 229-33.
- Mustafa, T., S. J. Mogga, G. Sayoki, M. Mfinanga, O. Mørkve y L. Sviland. (2005): Significance of Fas and Fas ligand in tuberculous lymphadenitis. **Immunology** 114(2): 255-262.
- Myint, K. S., T. P. Endy, D. Mongkolsirichaikul, C. Manomuth, S. Kalayanarooj, D. W. Vaughn, A. Nisalak, S. Green, A. L. Rothman, F. A. Ennis y D. H. Libraty. (2006): Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. **J Infect Dis** 194(5): 600-607.
- Nagata, S. y P. Golstein. (1995a): The Fas death factor. **Science** 2671449.
- Nagata, S. y P. Golstein. (1995b): The Fas death factor. **Science** 267(5203): 1449-56.
- Naoumov, N. V. y S. Rossol. (2008): Studies of interleukin-12 in chronic hepatitis B virus infection. **J Viral Hepatitis** 4 87-91.
- Navarro-Sanchez, E., P. Despres y L. Cedillo-Barron. (2005): Innate immune responses to dengue virus. **Arch Med Res** 36(5): 425-35.
- Ngoc, P. L., D. R. Gold, A. O. Tzianabos, S. T. Weiss y J. C. Celedón. (2005): Cytokines, allergy, and asthma. **Curr Opin Allergy Clin Immunol** 161-6.
- Nguyen, T. H., H. Y. Lei, T. L. Nguyen, Y. S. Lin, K. J. Huang, B. L. Le, C. F. Lin, T. M. Yeh, Q. H. Do, T. Q. Vu, L. C. Chen, J. H. Huang, T. M. Lam, C. C. Liu y S. B. Halstead. (2004): Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. **J Infect Dis** 189(2): 221-32.
- Nilsson, C., A. K. Larsson Sigfrinius, S. M. Montgomery, E. Sverremark-Ekström, A. Linde, G. Lilja y M. T. Blomberg. (2009): Epstein-Barr virus and cytomegalovirus are differentially associated with numbers of cytokine-producing cells and early atopy. **Clin Exp Allergy** 39509-17.
- Nolan, D., S. Gaudieri y S. Mallal. (2006): Host genetics and viral infections: immunology taught by viruses, virology taught by the immune system. **Curr Opin Immunol** 18413-21.
- Okura, T., S. Watanabe, Y. Jiang, M. Nakamura, Y. Takata, Z. H. Yang, K. Kohara, Y. Kitami y K. Hiwada. (2002): Soluble Fas ligand and atherosclerosis in hypertensive patients. **J Hypertens** 20(5): 895-898.
- Oleksyk, T. K., S. Shrestha, A. L. Truelove, J. J. Goedert, S. M. Donfield, J. Phair, S. Mehta, S. J. O'Brien y M. W. Smith. (2009): Extended IL10 haplotypes and their association with HIV progression to AIDS. **Genes Immun** 10309-22.
- Ollier, W. E. R. (2004a): Cytokine genes and disease susceptibility. **Cytokine** 28174-8.
- Ollier, W. E. R. (2004b): Cytokine genes and disease susceptibility. **Cytokine** 28174-7.
- OMS. (2008) Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. , 59ª Asamblea General, [http://www.wma.net/es/30publications/10policias/b3/17c\\_es.pdf](http://www.wma.net/es/30publications/10policias/b3/17c_es.pdf), Seúl, Corea.

- Opal, S. M. y V. A. DePalo. (2000): Anti-inflammatory cytokines. **Chest** 117(4): 1162-72.
- Orilieri, E., G. Cappellano, R. Clementi, A. Cometa, M. Ferretti, E. Cerutti, F. Cadario, M. Martinetti, D. Larizza, V. Calcaterra, G. D'Annunzio, R. Lorini, F. Cerutti, G. Bruno, A. Chiocchetti y U. Dianzani. (2008): Variations of the perforin gene in patients with type 1 diabetes. **Diabetes** 57(4): 1078-1083.
- Pacsa, A. S., R. Agarwal, E. A. Elbishbishi, U. C. Chaturvedi, R. Nagar y A. S. Mustafa. (2000): Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunol Med Microbiol** 28(2): 151-5.
- Pacheco, A. G. y M. O. Moraes. (2009): Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. **Dis Markers** 27173-86.
- Pacheco, B., O. Suárez y D. González. (2009) Factores de riesgo asociados a la fiebre hemorrágica del dengue en adultos cubanos. Congreso 70 Aniv IPk VII Cong Cub de Microb y Parasitol.
- Palmer, D. R., P. Sun, C. Celluzzi, J. Bisbing, S. Pang, W. Sun, M. A. Marovich y T. Burgess. (2005): Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. **J Virol** 79(4): 2432-9.
- Pang, T., M. J. Cardosa y M. G. Guzman. (2007): Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunol Cell Biol** 85(1): 43-5.
- Panitsas, F. P., M. Theodoropoulou, A. Kouraklis, M. Karakantza, G. L. Theodorou, N. C. Zoumbos, A. Maniatis y A. Mouzaki. (2004): Adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the manifestation of a type-1 polarized immune response. **Blood** 1032645-7.
- Paradoa, M. L., Y. Trujillo y P. Basanta. (1987): Association of dengue hemorrhagic fever with the HLA system. **Haematologia** 2083-92.
- Paranjape, S. M. y E. Harris. (2009): Control of dengue virus translation and replication. **Curr Top Microbiol Immunol** 33815-34.
- Pavri, K., T. Swe, C. L. Ramamoorthy y V. P. Chodankar. (1979): Immunoglobulin E in dengue haemorrhagic fever (DHF) cases. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 73(4): 451-2.
- Pelaez, O., M. G. Guzman, G. Kouri, R. Perez, J. L. San Martin, S. Vazquez, D. Rosario, R. Mora, I. Quintana, J. Bisset, R. Cancio, A. M. Masa, O. Castro, D. Gonzalez, L. C. Avila, R. Rodriguez, M. Alvarez, J. L. Pelegrino, L. Bernardo y I. Prado. (2004): Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. **Emerg Infect Dis** 10(4): 719-22.
- Perera, R. y R. J. Kuhn. (2008): Structural proteomics of dengue virus. **Curr Opin Microbiol** 11(4): 369-77.
- Perianayagam, M. C., S. L. Murray, V. S. Balakrishnan, D. Guo, A. J. King, B. J. Pereira y B. L. Jaber. (2000): Serum soluble Fas (CD95) and Fas ligand profiles in chronic kidney failure. **J Lab Clin Med** 136(4): 320-327.
- Pipkin, M. E. y J. Lieberman. (2007): Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. **Curr Opin Immunol** 19(3): 301-8.
- Polizel, J. R., D. Bueno, J. E. Visentainer, A. M. Sell, S. D. Borelli, L. T. Tsuneto, M. M. Dalalio, M. T. Coimbra y R. A. Moliterno. (2004): Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 99(6): 559-62.
- Polumuri, S. K., V. Y. Toshchakov y S. N. Vogel. (2007): Role of phosphatidylinositol-3 kinase in transcriptional regulation of TLR-induced IL-12 and IL-10 by Fc gamma receptor ligation in murine macrophages. **J Immunol** 179236-46.
- Poulsen, L. K. y L. Hummelshoj. (2007): Triggers of IgE class switching and allergy development. **Ann Med** 39440-56.
- Preeyasombat, C., S. Treepongkaruna, A. Sriphrapadang y L. Choubtum. (1999): The role of prostacyclin (PGI2) and thromboxane A2 (TXA2) in pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF). **J Med Assoc Thai** 82 Suppl 1S16-21.

- Priyadarshini, D., R. R. Gadia, A. Tripathy, K. R. Gurukumar, A. Bhagat, S. Patwardhan, N. Mokashi, D. Vaidya, P. S. Shah y D. Cecilia. (2010): Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. **PLoS One** 5(1): e8709.
- Putintseva, E., G. Vega y L. Fernández. (1986): Alterations in thrombopoiesis in patients with thrombocytopenia produced by dengue hemorrhagic fever. **Nouv Rev Fr Hematol** 28(5): 269-273.
- Qin, H., M. W. Chan, S. Liyanarachchi, C. Balch, D. Potter, I. J. Souriraj, A. S. Cheng, F. J. Agosto-Perez, E. V. Nikonova, P. S. Yan, H. J. Lin, K. P. Nephew, J. H. Saltz, L. C. Showe, T. H. Huang y R. V. Davuluri. (2009 ): An integrative CHIP-chip and gene expression profiling to model SMAD regulatory modules. **BMC Syst Biol** 373-83.
- Rachman, A. y I. Rinaldi. (2006): Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. **Acta Med Indones** 38(2): 105-8.
- Rager, K. J., J. O. Langland, B. L. Jacobs, D. Proud, D. G. Marsh y F. Imani. (1998): Activation of anti-viral protein kinase (pkr) leads to IgE class switching in human B cells. **J Virol** 72(11): 71-9.
- Raja, S. M., S. S. Metkar y C. J. Froelich. (2003a): Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. **Curr Opin Immunol** 15(5): 28-32.
- Raja, S. M., S. S. Metkar y C. J. Froelich. (2003b): Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. **Curr Opin Immunol** 15(5): 28-32.
- Rajasingh, J., E. Bord, C. Luedemann, J. Asai, H. Hamada, T. Thome, G. Qin, D. Goukassian, Y. Zhu, D. W. Losordo y R. Kishore. (2006): IL-10-induced TNF-alpha mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression. **The FASEB Journal** 20(12): 4033-4043.
- Ramadori, G., F. Moriconi, I. Malik y J. Dudas. (2008): Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. **J Physiol Pharmacol** 11: 107-17.
- Rawlinson, S. M., M. J. Pryor, P. J. Wright y D. A. Jans. (2009): CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. **J Biol Chem** 284(12): 8111-8119.
- Reimerink, J., F. Stelma, B. Rockx, D. Brouwer, E. Stobberingh, R. van Ree, E. Dompeling, M. Mommers, C. Thijs y M. Koopmans. (2009): Early-life rotavirus and norovirus infections in relation to development of atopic manifestation in infants. **Clin Exp Allergy** 39: 254-60.
- Restrepo, B. N., D. M. Isaza, C. L. Salazar, R. Ramirez, M. Ospina y L. G. Alvarez. (2008a): Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. **Rev Soc Bras Med Trop** 41(1): 6-10.
- Restrepo, B. N., D. M. Isaza, C. L. Salazar, R. Ramirez, M. Ospina y L. G. Alvarez. (2008b): Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. **Rev Soc Bras Med Trop** 41(1): 6-10.
- Reyes-Del Valle, J., S. Chavez-Salinas, F. Medina y R. M. Del Angel. (2005): Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. **J Virol** 79(8): 4557-67.
- Rodriguez-Roche, R., M. Alvarez, M. G. Guzman, L. Morier y G. Kouri. (2000): Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. **J Clin Microbiol** 38(9): 3508-10.
- Rogers, N. J., I. M. Jackson, W. J. Jordan, G. Lombardi, A. Delikouras y R. I. Lechler. (2003): CD40 can costimulate human memory T cells and favors IL-10 secretion. **Eur J Immunol** 33(4): 1094-104.
- Romani, L., P. Puccetti y F. Bistoni. (1997a): Interleukin-12 in infectious diseases. **Clin Microbiol Rev** 10(4): 611-36.
- Romani, L., P. Puccetti y F. Bistoni. (1997b): Interleukin-12 in Infectious Diseases. **Clin Microbiol Rev** 10: 611-636.

- Rosario, D., M. Alvarez, J. Diaz, R. Contreras, R. Rodriguez, S. Vazquez y M. G. Guzman. (1998): [Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples]. **Rev Panam Salud Publica** 4(1): 1-5.
- Rothman, A. L. (2003): Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. **Adv Virus Res** 60:397-419.
- Rothman, A. L. (2009): T lymphocyte responses to heterologous secondary dengue virus infections. **Ann NY Acad Sci** 1171 Suppl 1E36-41.
- Rothman, A. L. (2010): Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol** 338:83-98.
- Sadon, N., A. Delers, R. G. Jarman, C. Klungthong, A. Nisalak, R. V. Gibbons y V. Vassilev. (2008): A new quantitative RT-PCR method for sensitive detection of dengue virus in serum samples. **J Virol Methods** 153(1): 1-6.
- Saelens, X., N. Festjens, L. Vande Walle, M. van Gurp, G. van Loo y P. Vandenabeele. (2004): Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene** 23(16): 2861-2874.
- Saghafian-Hedengren, S., Y. Sundström, E. Sohlberg, C. Nilsson, L. A., M. Troye-Blomberg, L. Berg y E. Sverremark-Ekström. (2009): Herpesvirus seropositivity in childhood associates with decreased monocyte-induced NK cell IFN-gamma production. **J Immunol** 182:2511-7.
- Saito, M., K. Oishi, S. Inoue, E. M. Dimaano, M. T. Alera, A. M. Robles, B. D. Estrella, Jr., A. Kumatori, K. Moji, M. T. Alonzo, C. C. Buerano, R. R. Matias, K. Morita, F. F. Natividad y T. Nagatake. (2004): Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. **Clin Exp Immunol** 138(2): 299-303.
- Sakuntabhai, A., C. Turbpaiboon, I. Casademont, A. Chuansumrit, T. Lowhnoo, A. Kajaste-Rudnitski, S. M. Kalayanarooj, K. Tangnaratchakit, N. Tangthawomchaikul, S. Vasanawathana, W. Chaiyaratana, P. T. Yenchitsomanus, P. Suriyaphol, P. Avirutnan, K. Chokephaibulkit, F. Matsuda, S. Yoksan, Y. Jacob, G. M. Lathrop, P. Malasit, P. Despres y C. Julier. (2005): A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nat Genet** 37(5): 507-13.
- Salgado, D. M., J. M. Eltit, K. Mansfield, C. Panqueba, D. Castro, M. R. Vega, K. Khaja, D. Schmidt, K. J. Martin, P. D. Allen, J. A. Rodriguez, J. H. Dinsmore, J. R. Lopez y I. Bosch. (2009): Heart and Skeletal Muscle Are Targets of Dengue Virus Infection. **Pediatr Infect Dis J**.
- Sánchez-Elsner, T., L. M. Botella, B. Velasco, A. Corbí, L. Attisano y C. Bernabéu. (2001): Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. **J Biol Chem** 276:38527-35.
- Sandberg, J. K., N. M. Fast y D. F. Nixon. (2001): Functional Heterogeneity of Cytokines and Cytolytic Effector Molecules in Human CD8+ T Lymphocytes. **J Immunol** 167:181-7.
- Sanjabi, S., L. A. Zenewicz, M. Kamanaka y R. A. Flavell. (2009): Anti- and Pro-inflammatory Roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. **Curr Opin Pharmacol** 9:447-453.
- Saraiva, M. y A. O'Garra. (2010): The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol** 10:170-81.
- Sattar, R., S. A. Ali y A. Abbasi. (2003): Bioinformatics of granzymes: sequence comparison and structural studies on granzyme family by homology modeling. **Biochem Biophys Res Commun** 308(4): 726-35.
- Screaton, G. y J. Mongkolsapaya. (2006): T cell responses and dengue haemorrhagic fever. **Novartis Found Symp** 277:164-71; discussion 171-6, 251-3.
- Scumpia, P. O. y L. L. Moldawer. (2005): Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis Syndromes. **Crit Care Med** 33S468-71.
- Scumpia, P. O. y L. L. Moldawer. (2006): Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis

- syndromes. **Crit Care Med** 33S468-71.
- Schexneider, K. I. y E. A. Reedy. (2005): Thrombocytopenia in dengue Fever. **Curr Hematol Rep** 4(2): 145-8.
- Seet, R. C. S., A. M. L. Quekb y E. C. H. Lima. (2007): Post-infectious fatigue syndrome in dengue infection **Journal of Clinical Virology** 38 1-6.
- Seneviratne, S. L., G. N. Malavige y H. J. de Silva. (2006): Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 100(7): 608-14.
- Settin, A., A. Ismail, M. A. El-Magd, R. El-Baz y A. Kazamel. (2009): Gene polymorphisms of TNF-alpha-308 (G/A), IL-10(-1082) (G/A), IL-6(-174) (G/C) and IL-1Ra (VNTR) in Egyptian cases with type 1 diabetes mellitus. **Autoimmunity** 42(1): 50-5.
- Sharp, T. W., M. R. Wallace, C. G. Hayes, J. L. Sanchez, R. F. DeFraités, R. R. Arthur, S. A. Thornton, R. A. Batchelor, P. J. Rozmajzl, R. K. Hanson y et al. (1995): Dengue fever in U.S. troops during Operation Restore Hope, Somalia, 1992-1993. **Am J Trop Med Hyg** 53(1): 89-94.
- Shekhar, C. (2007): Deadly dengue: new vaccines promise to tackle this escalating global menace. **Chem Biol** 14(8): 871-2.
- Shi, Y. J., Z. Y. Jiang y K. Zeng. (2006): [Effect of IL-6 and TNF-alpha on Dengue virus infection of human dendritic cells]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi** 22(4): 469-71.
- Sierra, B., P. A.B., G. Garcia, K. Schmolke, E. Aguirre, K. Vogt, M. Alvarez, H.-D. Volk y M. G. Guzman. (2005) 2nd Asian Regional Dengue Research Network Meeting. Immune response mediator gene expression in human PBMNC infected with dengue virus. .
- Sierra, B., P. A.B., G. Garcia, K. Schmolke, E. Aguirre, K. Vogt, M. Alvarez, H.-D. Volk y M. G. Guzman. (2008) Workshop Citotoxicity, Cell death and the Immune System. Role of the CTL markers in the immunity against dengue virus infection. Some findings from the exceptional epidemiological conditions of Cuba.
- Sierra, B., R. Alegre, A. B. Perez, G. Garcia, K. Stum-Ramirez, O. Obasanjo, E. Aguirre, M. Alvarez, R. Rodriguez-Roche, L. Valdes, P. Kanki y M. G. Guzman. (2007a): HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. **Hum Immunol** 68(6): 531-40.
- Sierra, B., G. Garcia, A. B. Perez, L. Morier, M. Alvarez, G. Kouri y M. G. Guzman. (2006): Ethnicity and difference in dengue virus-specific memory T cell responses in Cuban individuals. **Viral Immunol** 19(4): 662-8.
- Sierra, B., G. Kouri y M. G. Guzman. (2007b): Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. **Arch Virol** 152(3): 533-42.
- Simmons, C. P., T. N. Chau, T. T. Thuy, N. M. Tuan, D. M. Hoang, N. T. Thien, B. Lien le, N. T. Quy, N. T. Hieu, T. T. Hien, C. McElnea, P. Young, S. Whitehead, N. T. Hung y J. Farrar. (2007): Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. **J Infect Dis** 196(3): 416-24.
- Simmons, C. P. y J. Farrar. (2009): Changing patterns of dengue epidemiology and implications for clinical management and vaccines. **PLoS Med** 6(9): e1000129.
- Smed-Sørensen, A., K. Loré, L. Walther-Jallow, J. Andersson y A.-L. Spetz. (2004): HIV-1-infected dendritic cells up-regulate cell surface markers but fail to produce IL-12 p70 in response to CD40 ligand stimulation. **Blood** 1042810-2817.
- Smith-Norowitz, T. A., J. Josekutty, H. Lev-Tov, S. Kohlhoff, K. B. Norowitz, J. I. Silverberg, S. Chice, H. G. Durkin y M. H. Bluth. (2009 ): IgE anti-varicella zoster virus and other immune responses before, during, and after shingles. **Ann Clin Lab Sci** 39.
- Solís, R. L., H. D. Urquiza, J. L. Fernández Yero, F. Bencomo, E. Pérez y D. Fabrè. (1992) National Cuban Program for screening of predisposition to allergics disease with the use of SUMA Technology. In:

- W.J.a.J. R (Ed), Proceedings of the International Conference on Improving Birth Quality and Child Upbringing, Beijing International Academic Publishers, pp. 342-345.
- Sosman, J. A., A. Verma, S. Moss, P. Sorokin, M. Blend, B. Bradlow, N. Chachlani, D. Cutler, R. Sabo, M. Nelson, E. Bruno, D. Gustin, M. Viana y R. Hoffman. (2000): Interleukin 10-induced thrombocytopenia in normal healthy adult volunteers: evidence for decreased platelet production. **Br J Haematol** 111:104-11.
- Soundravally, R. y S. L. Hoti. (2008): Polymorphisms of the TAP 1 and 2 gene may influence clinical outcome of primary dengue viral infection. **Scand J Immunol** 67(6): 618-25.
- Soundravally, R., P. Sankar, S. L. Hoti, N. Selvaraj, Z. Bobby y M. G. Sridhar. (2008): Oxidative stress induced changes in plasma protein can be a predictor of imminent severe dengue infection. **Acta Trop** 106(3): 156-61.
- Souza, D. G., C. T. Fagundes, L. P. Sousa, F. A. Amaral, R. S. Souza, A. L. Souza, E. G. Kroon, D. Sachs, F. Q. Cunha, E. Bukin, A. Atrasheuskaya, G. Ignatyev y M. M. Teixeira. (2009): Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. **Proc Natl Acad Sci USA** 106(33): 14138-43.
- Spaeny-Dekking, E. H., W. L. Hanna, A. M. Wolbink, P. C. Wever, A. J. Kummer, A. J. Swaak, J. M. Middeldorp, H. G. Huisman, C. J. Froelich y C. E. Hack. (1998): Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. **J. Immunol** 160:3610-3616.
- Spaulding, A. C., I. Kurane, F. A. Ennis y A. L. Rothman. (1999): Analysis of murine CD8(+) T-cell clones specific for the Dengue virus NS3 protein: flavivirus cross-reactivity and influence of infecting serotype. **J Virol** 73(1): 398-403.
- Srikiatkachom, A. y S. Green. (2009): Markers of dengue disease severity. **Curr Top Microbiol Immunol** 338:67-82.
- Stephens, H. A., R. Klaythong, M. Sirikong, D. W. Vaughn, S. Green, S. Kalayanaroj, T. P. Endy, D. H. Libraty, A. Nisalak, B. L. Innis, A. L. Rothman, F. A. Ennis y D. Chandanayingyong. (2002): 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** 60(4): 309-18.
- Stoycheva, M. y M. Murdjeva. (2005): Serum levels of interferon-gamma, interleukin-12, tumour necrosis factor-alpha, and interleukin-10, and bacterial clearance in patients with gastroenteric Salmonella infection. **Scand J Infect Dis** 37:11-4.
- Stur, K., F. M. Karhofer y G. Stingl. (2007): Soluble FAS Ligand: A Discriminating Feature between Drug-Induced Skin Eruptions and Viral Exanthemas. **J Invest Dermatol** 127:802-807.
- Suárez-Santamaría, M., F. Santolaria, A. Pérez-Ramírez, M. R. Alemán-Valls, A. Martínez-Riera, E. González-Reimers, M. J. de la Vega y A. Milena. (2010): Prognostic value of inflammatory markers (notably cytokines and procalcitonin), nutritional assessment, and organ function in patients with sepsis. **Eur Cytokine Netw** 21(19-26).
- Suharti, C., E. C. M. van Gorp, T. E. Setiati, W. M. V. Dolmans, R. J. Djokomoeljanto, C. E. Hack, C. H. ten y J. W. M. van der Meer. (2002): The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. **Thromb Haemost** 87(1): 42-6.
- Sullivan, N. J. (2001): Antibody-mediated enhancement of viral disease. **Curr Top Microbiol Immunol** 260:145-69.
- Sun, P., C. M. Celluzzi, M. Marovich, H. Subramanian, M. Eller, S. Widjaja, D. Palmer, K. Porter, W. Sun y T. Burgess. (2006): CD40 ligand enhances dengue viral infection of dendritic cells: a possible mechanism for T cell-mediated immunopathology. **J Immunol** 177(9): 6497-503.

- Sutton, V. R., J. E. Davis, M. Cancilla, R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, K. Sedelies, K. A. Browne y J. A. Trapani. (2000): Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. **J Exp Med** 192(10): 1403-14.
- Takayama, E., Y. Koike, T. Ohkawa, T. Majima, M. Fukasawa y N. Shinomiya. (2003): Functional and V $\beta$  repertoire characterization of human CD8<sup>+</sup> T-cell subsets with natural killer cell markers, CD56<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> T cells, CD56<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T cells and CD56<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup> T cells **Immunology** 108211-9.
- Talavera, D., A. M. Castillo, M. C. Dominguez, A. E. Gutierrez y I. Meza. (2004): IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. **J Gen Virol** 85(Pt 7): 1801-13.
- Talwar, S., P. Munson, J. Barb, C. Fiuza, A. Cintron, C. Logun, M. Tropea, S. Khan, D. Reda, J. Shelhamer, R. Danner y A. Suffredini. (2006): Gene expression profiles of peripheral blood leukocytes after endotoxin challenge in humans. **Physiol Genomics** 25203-15.
- Tan, G. K. y S. Alonso. (2009): Pathogenesis and prevention of dengue virus infection: state-of-the-art. **Curr Opin Infect Dis** 22(3): 302-8.
- Tassaneeritthep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumpfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger y M. A. Marovich. (2003): DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **J Exp Med** 197(7): 823-9.
- Tay, J. C. y P. Tan. (2006): Finding intervention points in the pathogenesis of Dengue viral infection. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc** 15315-21.
- Taylor, A., J. Verhagen, K. Blaser, M. Akdis y C. Akdis. (2006): Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ : the role of T regulatory cells. **Immunology** 117:433-442.
- Teixeira, M. G. y M. L. Barreto. (2009): Diagnosis and management of dengue. **Bmj** 339b4338.
- Thisyakorn, U. y S. Nimmannitya. (1993): Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. **Clin Infect Dis** 16(2): 295-7.
- Thomas, L., O. Verlaeten, A. Cabie, S. Kaidomar, V. Moravie, J. Martial, F. Najjioullah, Y. Plumelle, C. Fonteau, P. Dussart y R. Cesaire. (2008): Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. **Am J Trop Med Hyg** 78(6): 990-8.
- Thomas, S., J. B. Redfern, B. A. Lidbury y S. Mahalingam. (2006): Antibody-dependent enhancement and vaccine development. **Expert Rev Vaccines** 5(4): 409-12.
- Tinsley, J. H., S. South, V. L. Chiasson y B. M. Mitchell. (2010): Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and blood pressure in hypertensive pregnant rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 298R713-9.
- Tomokuni, A., T. Otsuki, Y. Isozaki, S. Kita, H. Ueki, M. Kusaka, T. Kishimoto y A. Ueki. (1999): Serum levels of soluble Fas ligand in patients with silicosis. **Clin Exp Immunol** 118(3): 441-444.
- Turner, D. M., D. M. Williams, D. Sankaran, M. Lazarus, P. J. Sinnott y I. V. Hutchinson. (1997): An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet** 241-8.
- Ueno, H., E. Klechevsky, R. Morita, C. Aspor, T. Cao, T. Matsui, T. Di Pucchio, J. Connolly, J. F. Fay, V. Pascual, A. K. Palucha y J. Banchereau. (2007): Dendritic cell subsets in health and disease **Immunological Reviews** 219118-142.
- Umareddy, I., K. F. Tang, S. G. Vasudevan, S. Devi, M. L. Hibberd y F. Gu. (2008): Dengue virus regulates type I interferon signalling in a strain-dependent manner in human cell lines. **J Gen Virol** 89(Pt 12): 3052-62.
- Umetsu, D. T. y R. H. DeKruyff. (2006): The regulation of allergy and asthma. **Immunol Rev** 212238-55.

- van den Broek, M. E., D. Kagi, F. Ossendorp, R. Toes, S. Vamvakas, W. K. Lutz, C. J. Melief, R. M. Zinkernagel y H. Hengartner. (1996): Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. **J Exp Med** 184(5): 1781-90.
- van Deventer, S. J. (2000): Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. **Intensive Care Med** 26 Suppl 1S98-102.
- van Gurp, M., N. Festjens, G. van Loo, X. Saelens y P. Vandenabeele. (2003): Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. **Biochem Biophys Res Commun** 304(3): 487-497.
- Vaughan, K., J. Greenbaum, M. Blythe, B. Peters y A. Sette. (2010): Meta-analysis of all immune epitope data in the Flavivirus genus: inventory of current immune epitope data status in the context of virus immunity and immunopathology. **Viral Immunol** 23(3): 259-84.
- Vaughn, D. W., S. Green, S. Kalayanarooj, B. L. Innis, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, T. P. Endy, B. Raengsakulrach, A. L. Rothman, F. A. Ennis y A. Nisalak. (2000): Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J Infect Dis** 181(1): 2-9.
- Vazquez, S., J. R. Bravo, A. B. Perez y M. G. Guzman. (1997): [Inhibition ELISA. Its utility for classifying a case of dengue]. **Rev Cubana Med Trop** 49(2): 108-12.
- Vazquez, S., A. B. Perez, D. Ruiz, R. Rodriguez, M. Pupo, N. Calzada, L. Gonzalez, D. Gonzalez, O. Castro, T. Serrano y M. G. Guzman. (2005): Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. **J Clin Virol** 33(2): 132-7.
- Vazquez, S., E. Saenz, G. Huelva, A. Gonzalez, G. Kouri y M. Guzman. (1998): [Detection of IgM against the dengue++ virus in whole blood absorbed on filter paper]. **Rev Panam Salud Publica** 3(3): 174-8.
- Vazquez, S., O. Valdes, M. Pupo, I. Delgado, M. Alvarez, J. L. Pelegrino y M. G. Guzman. (2003): MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. **J Virol Methods** 110(2): 179-84.
- Vejbæsya, S., P. Luangtrakool, K. Luangtrakool, S. Kalayanarooj, D. W. Vaughn, T. P. Endy, M. P. Mammen, S. Green, D. H. Libraty, F. A. Ennis, A. L. Rothman y H. A. Stephens. (2009): TNF and LTA Gene, Allele, and Extended HLA Haplotype Associations with Severe Dengue Virus Infection in Ethnic Thais. **Journal of Infectious Diseases** 199(10): 1442-1448.
- Velazquez, P., T. Cameron, Y. Finjo, N. Nagarajan, M. Kronenberg y M. Dustin. (2008): The Activation by Innate Cytokines or Microbial Antigens Can Cause Arrest of Natural Killer T Cell Patrolling of Liver Sinusoids. **Journal of Immunology** 180: 2024-2028.
- Voskoboinik, I. y J. A. Trapani. (2006): Addressing the mysteries of perforin function. **Immunol Cell Biol** 84(1): 66-71.
- Wan-Uk, K., K. Seung-Ki, H. Kyung-Hee, Y. Seung-Ah, K. Jin-Sun, C. Jongseon y C. Chul-Soo. (2007): Soluble Fas ligand inhibits angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther** 9(2): 42.
- Wang, G. Q., E. Wieckowski, L. A. Goldstein, B. R. Gastman, A. Rabinovitz, A. Gambotto, S. Li, B. Fang, X. M. Yin y H. Rabinowich. (2001): Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. **J Exp Med** 194(9): 1325-37.
- Wang, L., R. F. Chen, J. W. Liu, H. R. Yu, H. C. Kuo y K. D. Yang. (2007): Implications of dynamic changes among tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), membrane TNF receptor, and soluble TNF receptor levels in regard to the severity of dengue infection. **Am J Trop Med Hyg** 77(2): 297-302.
- Wang, L. H., Y. H. Lin, J. Yang y W. Guo. (2009): Insufficient increment of CD4+CD25+ regulatory T cells after stimulation in vitro with allergen in allergic asthma. **Int Arch Allergy Immunol** 148:199-210.
- Wang, S. H., W. J. Syu, K. J. Huang, H. Y. Lei, C. W. Yao, C. C. King y S. T. Hu. (2002): Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. **J Gen Virol** 83(Pt 12): 3093-102.

- Wang, W. K., D. Y. Chao, C. L. Kao, H. C. Wu, Y. C. Liu, C. M. Li, S. C. Lin, S. T. Ho, J. H. Huang y C. C. King. (2003): High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **Virology** 305(2): 330-8.
- Ware, C. F. (2003): The TNF superfamily. **Cytokine Growth Factor Rev** 14(3-4): 181-184.
- Weinberg, C. R. y R. W. Morris. (2003): Testing for Hardy-Weinberg Disequilibrium Using a Genome Single-Nucleotide Polymorphism Scan Based on Cases Only. **Am J Epidemiol** 158401-5.
- WHO. (1997): Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. **WHO**, 2nd edition (Geneva.).
- WHO. (1997): Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. **WHO**, 2nd edition (Geneva.).
- Widlak, P., L. Y. Li, X. Wang y W. T. Garrard. (2001): Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. **J Biol Chem** 276(51): 48404-48409.
- Wiwanitkit, V. (2005): Immune complex: does it have a role in pathogenesis of renal failure in dengue infection? **Ren Fail** 27(6): 803-4.
- Wu, S. F., C. L. Liao, Y. L. Lin, C. T. Yeh, L. K. Chen, Y. F. Huang, H. Y. Chou, J. L. Huang, M. F. Shaio y H. K. Sytwu. (2003): Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. **Vaccine** 21(25-26): 3919-29.
- Wyllie, A. H. (2010): "Where, O Death, Is Thy Sting?" A Brief Review of Apoptosis Biology. **Mol Neurobiol** 424-9.
- Xu, H., B. Di, Y. X. Pan, L. W. Qiu, Y. D. Wang, W. Hao, L. J. He, K. Y. Yuen y X. Y. Che. (2006): Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **J Clin Microbiol** 44(8): 2872-8.
- Xu, Y. Q., Y. D. Gao, J. Yang y W. Guo. (2010): A defect of CD4+CD25+ regulatory T cells in inducing interleukin-10 production from CD4+ T cells under CD46 costimulation in asthma patients. **J Asthma** 47367-73.
- Yang, K. D., W. T. Yeh, M. Y. Yang, R. F. Chen y M. F. Shaio. (2001): Antibody-dependent enhancement of heterotypic dengue infections involved in suppression of IFN $\gamma$  production. **J Med Virol** 63(2): 150-7.
- Yauch, L. E., R. M. Zellweger, M. F. Kotturi, A. Qutubuddin, J. Sidney, B. Peters, T. R. Prestwood, A. Sette y S. Shresta. (2009): A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. **J Immunol** 182(8): 4865-73.
- Zaitso, M., K. Yamamoto, E. Ishii, T. Teramura, N. Nakadate, M. Sako, N. Sakata, H. Wakiguchi, M. Hirose, M. Imayoshi, Y. Ogata, S. Imashuku, Y. Hamasaki y M. Yasukawa. (2004): High frequency of QPY allele and linkage disequilibrium of granzyme-B in Epstein-Barr-virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Tissue Antigens** 64(5): 611-615.
- Zayas, A., M. Tabares y M. V. Cabrera. (2009) Características epidemiológicas, clínicas y de laboratorio en pacientes con formas graves de dengue. Hospital Juan Bruno Zayas Congreso 70 Aniversario IPK, VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología.
- Zhang, H., J. Park, J. Wu, X. Chen, S. Lee, J. Yang, K. C. Dellsperger y C. Zhang. (2009): Role of TNF- $\alpha$  in vascular dysfunction. **Clin Sci** 116219-230.
- Zuo, Z., O. W. Liew, G. Chen, P. C. Chong, S. H. Lee, K. Chen, H. Jiang, C. M. Pua y W. Zhu. (2009): Mechanism of NS2B-mediated activation of NS3pro in dengue virus: molecular dynamics simulations and bioassays. **Journal of Virology** 83(2): 1060-70.

## VIII. ANEXOS

### VIII.1. Tablas

Tabla 4. Frecuencias de variantes alélicas de los genes de TNF $\alpha$  (-308), IFN $\gamma$  (+874), IL-6 (+174), IL-10 (-1082/-819/-592) y TGF $\beta$ 1(c10/c25) en pacientes de FHD y controles poblacionales.

Gen (SNP)	Alelo	Grupos N (%)		Significación	
		FHD	Control	P	Pc
TNF $\alpha$ -308	A*	29(33.7)	21(12.6)	0.00006	0.0001
	G	57(66.3)	145(87.3)		
IFN $\gamma$ +874	T*	39(44.4)	64(34.8)	ns	-
	A	47(54.6)	120(65.2)		
IL6 +174	G*	61(71.0)	133(72.3)	ns	-
	C	25(29.0)	51(27.7)		
IL10 -1082	G*	23(26.7)	61(33.8)	ns	-
	A	63(73.2)	119(66.1)		
-819	C*	50(58.1)	112(62.2)	ns	-
	T	36(41.8)	68(37.7)		
-592	C*	50(58.1)	112(62.2)	ns	-
	A	36(41.8)	68(37.7)		
TGF $\beta$ 1 c10 c25	T*	57(66.3)	130(70.7)	ns	-
	C	29(33.7)	54(29.3)		
	G*	53(64.6)	152(82.6)	0.001	0.002
	C	29(35.4)	32(17.4)		

N: número de casos / ns: No significativo estadísticamente ( $p \geq 0.05$ )

Tabla 5. Frecuencias de variantes genotípicas de los genes de TNF $\alpha$  (-308), IFN $\gamma$  (+874), IL-6 (+174), IL-10 (-1082/-819/-592) y TGF $\beta$ 1(c10/c25) en pacientes de FHD y controles poblacionales.

Gen (SNP)	Genotipo	Grupos N (%)		Significación	
		FHD	Control	P	Pc
TNF $\alpha$ -308	AA <sup>H</sup>	9 (20,9)	14 (15,6)	ns	-
	AG <sup>H</sup>	11 (25,6)	7 (7,7)	0.005	0.01
	GG <sup>L</sup>	23 (53,5)	69 (76,6)	0.007	0.01
IFN $\gamma$ -874	TT <sup>H</sup>	13 (30,2)	18 (19,6)	ns	-
	AT	13 (30,2)	28 (30,4)	ns	-
	AA <sup>L</sup>	17 (39,5)	46 (50,0)	ns	-
IL-6 +174	GG <sup>H</sup>	25 (58,1)	54 (58,7)	ns	-
	CG <sup>H</sup>	11 (25,6)	25 (27,2)	ns	-
	CC <sup>L</sup>	7 (16,3)	13 (14,1)	ns	-
IL-10 -1082	AA <sup>L</sup>	22 (51,2)	34 (37,7)	ns	-
	AG	19 (44,2)	51 (56,6)	ns	-
	GG <sup>H</sup>	2 (4,7)	5 (5,5)	ns	-
-819	CC <sup>H</sup>	12 (27,9)	33 (36,3)	ns	-
	CT	26 (60,5)	46 (51,1)	ns	-
	TT <sup>L</sup>	5 (11,6)	11 (12,1)	ns	-
-592	CC <sup>H</sup>	12 (27,9)	33 (36,7)	ns	-
	AC	26 (60,5)	46 (51,1)	ns	-
	AA <sup>L</sup>	5 (11,6)	11 (12,2)	ns	-
TGF $\beta$ 1 c10	TT <sup>H</sup>	24 (55,8)	55 (59,8)	ns	-
	CT	9 (20,9)	20 (21,7)	ns	-
	CC <sup>L</sup>	10 (23,3)	17 (18,5)	ns	-
c25	GG <sup>H</sup>	24 (58,5)	74 (80,4)	0.008	0.01
	CG	5 (12,2)	4 (4,3)	ns	-
	CC <sup>L</sup>	12 (29,3)	14 (15,2)	ns	-

N: número de casos / ns: No significativo estadísticamente ( $p \geq 0.05$ )

Tabla 6. Frecuencias de variantes haplotípicas de los genes de TNF $\alpha$  (-308), IFN $\gamma$  (+874), IL-6 (+174), IL-10 (-1082/-819/-592) y TGF $\beta$ 1(c10/c25) en pacientes de FHD y controles poblacionales.

Gen (SNP)	Haplotipo	Grupos N (%)		Significación	
		FHD	Control	P	Pc
IL-10 -1082/-819/-592	GCC/GCC <sup>H</sup>	2(4.7)	5(5.6)	ns	-
	ATA/ATA <sup>L</sup>	5(11.6)	11(12.2)	ns	-
	ACC/ACC <sup>L</sup>	1(2.3)	6(6.7)	ns	-
	ACC/ATA <sup>L</sup>	16(37.2)	17(18.9)	0.02	0.03
	GCC/ACC	9(20.9)	22(24.4)	ns	-
	GCC/ATA	10(23.3)	29(32.2)	ns	-
TGF $\beta$ 1 c10/c25	TG/TG <sup>H</sup>	13(31.7)	44(47.8)	ns	-
	TG/CG <sup>H</sup>	6(14)	18(19.6)	ns	-
	CG/CG	5(11.6)	12(13.0)	ns	-
	CC/CC	3(7.0)	4(4.3)	ns	-
	CG/CC	2(4.7)	1(1.1)	ns	-
	TC/TC	5(12.2)	8(8.7)	ns	-
	TC/TG	3(7.3)	3(3.3)	ns	-
	TC/CC	3(7.3)	2(2.2)	ns	-

N: número de casos / ns: No significativo estadísticamente ( $p \geq 0.05$ )

Tabla 7. Combinaciones entre genes de citoquinas asociadas a riesgo individual de desarrollar FHD.

Combinaciones	FHD %	Ctrols %	P	Pc	OR	IC
↑ TNF IFN	34.9	10.9	0.001	0.002	4.393	1.77-10.89
↑TNF ↓IL10	48.8	19.6	0.000	0.001	3.924	1.78-8.64
↑IFN ↓IL10	76.7	42.4	0.000	0.000	4.485	1.97-10.17
↑TNF ↓TGF	20.9	6.5	0.013	0.029	3.794	1.25-11.47
↑IFN ↓TGF	18.6	5.4	0.016	0.035	3.977	1.21-12.99
↑TNF IFN ↓IL10	37.2	7.6	0.000	0.000	7.196	2.67-19.32
↑TNF IFN ↓IL10 TGF	9.3	1.1	0.019	0.062	9.333	1.01-86.20

↑ Variante génica asociada a aumento de la expresión del gen

↓ Variante génica asociada a disminución de la expresión del gen

Ctrols: Controles

## **VIII.2. Avales**



# INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Ministerio de Salud Pública

## Centro Auspiciado por la UNESCO Centro Colaborador de la OMS/OPS

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de Vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Viricas  
En Tuberculosis y Micobacterias



### COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL

#### PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**"Investigaciones virológicas y serológicas relacionadas con la epidemia cubana de virus Dengue ocurrida en el 2006"**

#### INVESTIGADOR PRINCIPAL

**Lic. Rosa Ramirez Bartutis**

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente proyecto de investigación por los integrantes de la Comisión de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

#### DICTÁMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki V, así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el proyecto aparece reflejado de forma clara la forma de protección de los derechos y beneficios de los sujetos participantes en la investigación.
3. Se aprueba el proyecto presentado

Dada, en el IPK, Ciudad de La Habana, a los 3 días del mes de junio del año 2008.

Dr. Eric Martínez Torres  
Presidente CEI-IPK

Lic. Iliana Valdés Hernández  
Secretaria

Lic. Ana Margarita Montalvo Alvarez

Lic. Caridad Planas Valdés

Dr. René Gato Armas



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
"PEDRO KOURI"**

Ministerio de Salud Pública

**Centro Colaborador de OMS**

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica y control biológico de vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Viricas  
En Tuberculosis y Micobacterias



**INSTITUTO  
Pedro Kouri**

**COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Polimorfismo de genes de citoquinas y dengue**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL**

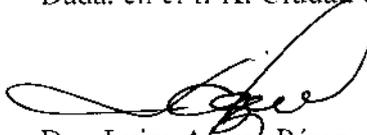
**Dra Ana Beatriz Pérez.**

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente proyecto de investigación por los integrantes de la Comisión de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

**DICTÁMEN**

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki V, así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el proyecto aparece reflejado de forma clara la forma de protección de los derechos y beneficios de los sujetos participantes en la investigación.
3. Fue reformulada satisfactoriamente la solicitud del consentimiento informado, habiéndose cumplimentado las sugerencias del Comité de Ética institucional.
4. Se aprueba el proyecto presentado

Dada, en el IPK, Ciudad de La Habana, a los 22 días del mes de enero del año 2008.

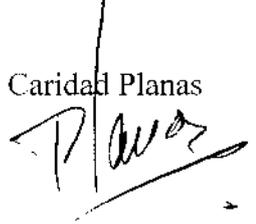
  
Dra. Luisa Armas Pérez

  
Dr. Carlos Fernández.

  
Dr. Flavio Pedroso.



  
Lic. Ileana Valdés

  
Lic. Caridad Planas



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
"PEDRO KOURI"**

Ministerio de Salud Pública

**Centro Colaborador de OMS**

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica y control biológico de vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Víricas  
En Tuberculosis y Micobacterias



**INSTITUTO  
Pedro Kouri**

**COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Papel de la respuesta de células T en la patogénesis de la Fiebre Hemorrágica Dengue**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL**

**Dra. Beatriz de la C. Sierra.**

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente proyecto de investigación, por los integrantes de la Comisión de Ética de la institución y siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

**DICTÁMEN**

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki V, así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el proyecto aparece reflejado de forma clara la forma de protección de los derechos y beneficios de los sujetos participantes en la investigación.
3. Fue reformulada satisfactoriamente la solicitud del consentimiento informado, habiéndose cumplimentado las sugerencias del Comité de Ética institucional.
4. Se aprueba el proyecto presentado

Dada, en el IPK, Ciudad de La Habana, a los 22 días del mes de enero del año 2008.

  
Dra. Luisa Armas Pérez

  
Dr. C. Carlos Fernández

  
Dr. Plácido Pedroso



  
Dr. C. Edilberto González

  
Lic. Caridad Planas

CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO

**"Papel de la respuesta de células T en la patogénesis de la Fiebre Hemorrágica por Dengue "**

Ud está siendo entrevistado para participar en un proyecto que estudia cuales factores intervienen en que los individuos que se exponen a la infección por dengue desarrollen las formas graves de la enfermedad. El conocimiento que aporta con su contribución es de notoria importancia para el desarrollo de un tratamiento eficaz que evite el Dengue hemorrágico y para el diseño de una vacuna contra el dengue.

El Departamento de Virología del IPK, quien centra este estudio, ha estado involucrado en múltiples investigaciones sobre el dengue y ha acumulado un gran prestigio en este campo.

Este estudio necesita de 20 ml de su sangre la cual será obtenida según los procedimientos usuales del hospital, y no afectará su salud. Esta se empleará solo para este estudio y la información obtenida será codificada y totalmente confidencial. Si usted decide no participar o abandonar el estudio esto no tendrá ningún efecto negativo para usted.

Si esta de acuerdo con participar firme por favor el presente documento,

Nombre del participante \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Firma del encuestador \_\_\_\_\_

Provincia \_\_\_\_\_, el día \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del 200 \_\_\_\_.

## **CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO**

### **“Polimorfismo de genes de citoquinas y dengue.”**

Ud está siendo entrevistado para participar en un proyecto que estudia cuales factores intervienen en que los individuos que se exponen a la infección por dengue desarrollen las formas graves de la enfermedad. El conocimiento que aporta con su contribución es de notoria importancia para el desarrollo de un tratamiento eficaz que evite el Dengue hemorrágico y para el diseño de una vacuna contra el dengue.

El Departamento de Virología del IPK, quien centra este estudio, ha estado involucrado en múltiples investigaciones sobre el dengue y ha acumulado un gran prestigio en este campo.

Este estudio necesita de 20 ml de su sangre la cual será obtenida según los procedimientos usuales del hospital, y no afectará su salud. Esta se empleará solo para este estudio y la información obtenida será codificada y totalmente confidencial. Si usted decide no participar o abandonar el estudio esto no tendrá ningún efecto negativo para usted.

Si esta de acuerdo con participar firme por favor el presente documento,

Nombre del participante \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Firma del encuestador \_\_\_\_\_

Provincia \_\_\_\_\_, el día \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del 200 \_\_\_\_.

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

“FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE DENGUE Y DENGUE HEMORRAGICO”

El que suscribe: \_\_\_\_\_

Conozco que:

El Dengue es una de las enfermedades infecciosas que ha incrementado su incidencia en las últimas décadas del presente milenio. El Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) es Centro de Referencia Nacional y Regional y ha estado desarrollando estudios de importancia científica y social sobre la enfermedad por virus dengue.

Conociendo todo lo anteriormente expuesto hago constar por este medio mi disposición y consentimiento informado para participar en el estudio

“FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE DENGUE Y DENGUE HEMORRAGICO”

Declaro que he sido informado del objetivo del estudio, y que participo en el mismo de forma totalmente voluntaria, y que puedo abandonar el estudio en el momento en que desee.

He sido informado que la muestra de sangre obtenida para el estudio no será empleada para realizar ningún otro estudio ni prueba que no sea la del presente proyecto.

Por todo lo anterior doy mi consentimiento para que se me realicen 3 extracciones de 8 ml de sangre durante mi ingreso y uno al mes de haber sufrido la enfermedad.

Para constancia de lo expuesto anteriormente firmo este documento en \_\_\_\_\_ provincia \_\_\_\_\_, el día \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del 200 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Firma.