

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"PEDRO KOURI"
DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA

Raza: Factor de riesgo para el desarrollo de la fiebre hemorrágica por dengue. Implicación de la respuesta inmune celular



TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS MÉDICAS

Autor: Dra. Beatriz de la C. Sierra Vázquez, MSc

Asesores: Prof. Sergio Arce Bustabad, DrCs
Dr. Roberto Lardoeyt, DrC
Prof. Maria G. Guzman, DrCs
Prof. Gustavo Kourí, DrCs

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"PEDRO KOURI"
DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA

**Raza: Factor de riesgo para el desarrollo
de la fiebre hemorrágica por dengue.
Implicación de la respuesta inmune celular**

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS MÉDICAS

Autor: Dra. Beatriz de la C. Sierra Vázquez, MSc

**Asesores: Prof. Sergio Arce Bustabad, DrCs
Dr. Roberto Lardoeyt, DrC
Prof. Maria G. Guzman, DrCs
Prof. Gustavo Kourí, DrCs**

Ciudad de la Habana
2010

Patria, Nueva York, 16 de abril de 1893

....El hombre no tiene ningún derecho especial porque pertenezca a una raza o a otra: díjase hombre, y ya se dicen todos los derechos. Todo lo que divide a los hombres, todo lo que especifica, aparta o acorrala es un pecado contra la humanidad. No hay en el negro culpa aborigen ni virus que lo inhabilite para desenvolver toda su alma de hombre.

Hombre es más que blanco, más que mulato, más que negro. Juntos trabajan, blancos y negros, por el cultivo de la mente, por la propagación de la virtud, por el triunfo del trabajo creador y de la caridad sublime.

*En Cuba no hay ni habrá nunca guerra de razas,
En Cuba hay suficiente grandeza en negros y blancos!*

José Martí

*A la memoria de mi abuela mima
A mis hijos Gabriela y Pablo*

LISTADO DE ABREVIATURAS

- AC:** Anticuerpos
- ADA:** Amplificación dependiente de anticuerpos
- ADN:** Ácido desoxiribonucleico
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ASB:** Albúmina de suero bovino
- BCA:** del inglés bicinchoninic acid .
- Bcl-2:** Célula B de linfoma, del inglés-*B cell*
- C (proteína):** Proteína estructural de la Cápside del virus dengue
- CD:** Grupo de diferenciación, del inglés Cluster of differentiation
- CMSP:** Células mononucleares de sangre periférica
- CMV:** Citomegalovirus
- CPM:** Conteos por minuto
- CPS:** Conteos por segundo
- CTL:** Linfocito T citotóxico, del inglés cytotoxic T lymphocyte
- DALY:** Ajuste de Años de Vida con Discapacidad, del inglés “Disability Adjusted Life Years”
- DC-SIGN:** ICAM 3 no integrina específica de células dendríticas, del inglés Dendritic Cell-specific ICAM-3 grabbing non integrin
- DO:** densidad óptica
- E (proteína):** Proteína estructural de la Envoltura del virus dengue
- EDTA:** Ácido etilendiamino tetraacético, del inglés ethylenediaminetetraacetic acid
- ELISA:** Ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida, (siglas 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/MHC: Sistema principal de Histocompatibilidad, (siglas del inglés Human Leucocyte Antigens/Major Histocompatibility Complex)

HPRT-1: del inglés hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1

HPV: Virus de papiloma humano, del inglés Human papiloma virus

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

IC: Inmunocomplejos

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

IFN α : Interferón alfa

IFN β : Interferón beta

IFN γ : Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IL-: Interleuquina

IPK: Instituto Pedro Kourí

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

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

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

MCP-1: Proteína quimo atrayente de monocitos 1, del inglés MCP-1 es la proteína quimoatrayerente de monocitos 1

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

NS (proteínas): Proteínas no estructurales del virus dengue

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Razón de productos cruzados, del inglés odds ratio

PBS: Tampón Fosfato salino, del inglés Phosphate Buffer Saline

PBS-T20: Tampón de fosfato salina-Tween20

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

PHA (Mitógeno): Fitohemaglutinina, del inglés Phytohemaglutinina

prM (proteína): Proteína estructural premembrana del virus dengue

QALY: Ajuste de Años con Calidad de Vida, del inglés “Quality Adjusted Life Years”

RAE: Riesgo atribuible de expuestos porcentual

RAP: Riesgo atribuible poblacional porcentual

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

SCD: Síndrome de choque por dengue

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SFBI: Suero fetal bovino inactivado

STF: Suero de ternera fetal

TGFB: Factor transformador de crecimiento, del inglés Transforming grow factor

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

TNE: Tris HCL, NaCL , EDTA

TNF α : 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 (célula): Células T reguladoras, del inglés T regulator cells

TT: Toxide tetánico

VD: Virus dengue

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

SÍNTESIS

La enfermedad por virus dengue es la más importante enfermedad viral transmitida por artrópodos. Es causada por uno de cuatro serotipos del virus y produce un espectro clínico que va desde formas asintomáticas, pasando por formas leves de fiebre clásica (Fiebre dengue: FD) hasta las formas más severas de Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD). El análisis de las epidemias cubanas de dengue ha permitido detectar varios factores de riesgo asociados a la susceptibilidad a la FHD/SCD, entre ellos, la raza. La FHD/SCD es una enfermedad inmunopatogénica, donde la respuesta inmune, y no el virus *per se*, es responsable del cuadro clínico de la enfermedad. En este documento se presentan nuevas evidencias a favor de la asociación de la respuesta inmune celular a la mayor susceptibilidad a desarrollar FHD/SCD observada en individuos blancos durante las epidemias de dengue en Cuba. Se verificó una respuesta inmune celular a virus dengue más intensa y con marcada reactividad cruzada en los individuos blancos, a predominio de mediadores inmunes pro-inflamatorios, contrastando con una mayor producción de mediadores regulatorios y citotóxicos en los individuos negros. Se detectó la asociación de varios alelos HLA clase I y Clase II con la susceptibilidad o protección a desarrollar FD y/o FHD. Estos resultados contribuyen a esclarecer el papel de la respuesta inmune celular en la patogénesis de la infección por dengue, y de la raza como factor de riesgo para el desarrollo de la FHD.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 ANTECEDENTES.....	1
I.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	5
I.3 OBJETIVOS	5
I.4 NOVEDAD CIENTÍFICA.....	5
I.5 VALOR PRÁCTICO	6
I.6 VALOR TEÓRICO.....	6
I.7 PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DONDE HAN SIDO PRESENTADOS LOS RESULTADOS DE LA TESIS.....	6
I.8 EVENTOS CIENTÍFICOS DONDE HAN SIDO EXPUESTOS LOS RESULTADOS DE LA TESIS.....	7
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
II.1. LA HISTORIA DEL DENGUE Y SU EPIDEMIOLOGÍA.....	9
II.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIRUS DEL DENGUE	10
II.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD	13
II.4 CÉLULAS DIANAS DE LA INFECCIÓN POR DENGUE	16
II.5 RESPUESTA INMUNE E INMUNOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.....	17
II.5.1 Respuesta inmune inata ó inespecífica.....	17
II.5.2 Respuesta inmune adquirida o específica	17
II.5.2.1 Respuesta inmune humoral.....	17
II.5.2.2 Respuesta inmune celular.....	19
II.6 PATOLOGÍA DE LA FHD/SCD.....	26
II.6.1 Amplificación dependiente de Anticuerpos o fenómeno ADA.....	26
II.6.2 Selección de mutantes de escape a la neutralización.....	27
II.6.3 Activación del Complemento.....	28
II.6.4 Respuesta de células T de memoria de reactividad cruzada y producción de citoquinas.....	28
II.6.5 Mimetismo Molecular.....	29
II.6.6 Virulencia Viral.....	30
II.6.7 Hipótesis Integral.....	31
II.7 FACTORES DE RIESGO INDIVIDUALES	32
II.7.1 Estado nutricional.....	32
II.7.2 Edad.....	32
II.7.4 Enfermedades crónicas.....	34
II.7.5 Factores Genéticos	34
II.7.5.1 HLA clase I.....	34
II.7.5.2 HLA clase II.....	35
II.7.5.3 HLA clase III.....	35
II.7.5.4 Factores genéticos no HLA.....	35
II.7.6 Raza	36
II.8 ORÍGENES DE LA POBLACIÓN CUBANA	38
II.9 ASPECTOS IDEOLÓGICOS Y FILOSÓFICOS RELACIONADOS CON RAZA.....	43
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	45
III.1 ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN Y BIOENSAYO PARA DETECCIÓN DE IL-2.....	45
III.1.1 Universo de estudio	45
III.1.2 Colección de la muestra.....	45
III.1.3 Detección de anticuerpos anti-dengue.....	45
III.1.4 Determinación de la especificidad de serotipo de los anticuerpos anti-dengue.....	46
III.1.5 Obtención del virus dengue empleado como antígeno.....	47
III.1.5.1 Cepas.....	47
III.1.5.2 Purificación de virus dengue a partir de cerebro de ratón.....	47
III.1.6 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).....	48
III.1.6.1 Ensayo de linfoproliferación	49

III.1.6.2 Obtención de sobrenadantes de CMSP para determinación de interleuquina 2.....	49
III.1.6.3 Detección de Interleuquina 2 por Bioensayo empleando la línea celular CTL-2.....	50
III.1.7 <i>Análisis Estadístico</i>	51
III.2 INDUCCIÓN DE MEDIADORES INMUNOLÓGICOS DE RESPUESTA CELULAR.....	51
III.2.1 <i>Universo de Estudio</i>	51
III.2.2 <i>Colección de la muestra</i>	51
III.2.3 <i>Detección de anticuerpos anti-dengue</i>	52
III.2.4 <i>Determinación de la especificidad de serotipo de los anticuerpos anti-dengue</i>	52
III.2.5 <i>Obtención del virus dengue empleado como antígeno</i>	52
III.2.5.1 <i>Cepas</i>	52
III.2.5.2 <i>Obtención de virus a partir de cultivo de células</i>	53
III.2.5.3 <i>Cuantificación de la carga viral</i>	53
III.2.6 <i>Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)</i>	53
III.2.7 <i>Estímulo de CMSP para análisis de la inducción de mediadores de respuesta inmune celular</i>	54
III.2.8 <i>Detección de la expresión de genes de mediadores de respuesta inmune celular</i>	54
III.2.8.1 <i>Aislamiento de ARN mensajero</i>	54
III.2.8.2 <i>Síntesis de ADN copia para la detección de expresión de genes de citoquinas</i>	55
III.2.8.3 <i>RCP en tiempo real (Taqman) para detección de genes de citoquinas</i>	55
III.2.9 <i>Análisis Estadísticos</i>	55
III.3 ASOCIACIÓN DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II CON LAS DIFERENTES FORMAS DE DENGUE.....	56
III.3.1 <i>Universo de Estudio</i>	56
III.3.2 <i>Colección de la muestra</i>	56
III.3.3 <i>Clasificación de los casos en primarios o secundarios</i>	56
III.3.4 <i>Obtención del ADN genómico</i>	56
III.3.5 <i>Tipificación de genes HLA clase I y II</i>	56
III.3.6 <i>Análisis estadísticos</i>	57
III.3.5.1 <i>Frecuencias de alelos HLA clase I A y B y HLA clase II en sujetos con antecedentes de enfermedad por dengue y controles</i>	57
III.3.5.2 <i>Comparación de frecuencias alélicas HLA clase I y II en individuos con antecedentes de enfermedad por dengue (FD ó FHD) y controles, y entre individuos con antecedentes de infección primaria o secundaria y controles</i>	57
III.3.5.3 <i>Medidas de magnitud de asociación e impacto potencial en los alelos estudiados con asociación estadísticamente significativa</i>	58
III.3.5.4 <i>Comparación de frecuencias alélicas HLA clase I y II en individuos con diferentes formas clínicas de infección por dengue (FD ó FHD) y entre individuos blancos y no blancos</i>	58
III.4 ESTUDIO ANTROPOMÉTRICO.....	58
III.4.1 <i>Universo de Estudio</i>	58
III.4.2 <i>Clasificación antropométrica</i>	58
III.4.3 <i>Análisis Estadístico</i>	59
III.5 APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DEL IPK Y OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	59
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
IV.1 ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN Y BIOENSAYO PARA DETECCIÓN DE IL-2.....	60
IV.2 INDUCCIÓN DE MEDIADORES INMUNOLÓGICOS QUE DEFINEN PATRÓN DE RESPUESTA CELULAR.....	63
IV.3. ASOCIACIÓN DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II CON FHD/SCD EN LOS DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS CUBANOS.....	77
IV.3.1 <i>Comparación de frecuencias alélicas HLA clase I y II en individuos con antecedentes de enfermedad por dengue (FD ó FHD) y controles, y entre individuos con antecedentes de infección primaria o secundaria y controles</i>	77
IV.3.2 <i>Comparación de frecuencias alélicas HLA clase I y II en individuos con diferentes formas clínicas de infección por dengue (FD ó FHD)</i>	80
IV.3.3 <i>Comparación de frecuencias alélicas HLA clase I y II en individuos blancos con diferentes formas clínicas de infección por dengue (FD ó FHD)</i>	81
IV.4. CLASIFICACIÓN ANTROPOMÉTRICA DE INDIVIDUOS CON ANTECEDENTES DE FD Y FHD/SCD.....	86
IV.5. DISCUSIÓN INTEGRADA.....	88
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	95

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES	96
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
CAPÍTULO VIII. ANEXOS.....	125
VIII.1 FIGURAS.....	125
VIII.2 TABLAS.....	140
VIII.3 CONSENTIMIENTO INFORMADO	153
VIII.4 PLANILLA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	154
VIII.5 CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN ANTROPOMÉTRICA SEGÚN GRUPO RACIAL. (MANUAL DE PRÁCTICAS DE ANTROPOLOGÍA FÍSICA, POPSPISIL, M.F, 1965.....	155

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

El dengue es hoy la más importante enfermedad viral transmitida por artrópodos en términos de morbilidad y mortalidad humana. La enfermedad está presente en un gran número de países de Asia, Centroamérica y Sudamérica y afecta del 40 al 50 % de la población susceptible (1, 2). Con un total de población de aproximadamente tres billones de personas viviendo en áreas endémicas, y con alrededor de 120 millones de viajeros a esas regiones cada año, una amplia sección de la población mundial está en riesgo de infectarse por dengue. Los elementos de cambio que han conducido a una situación de emergencia de la infección por dengue están relacionados al crecimiento sin precedentes de la población urbana, urbanización no planificada, escaso o inexistente suministro de agua, mala disposición de residuales sólidos, la expansión no controlada del vector del virus, el mosquito *Aedes aegypti*, el deterioro progresivo y creciente de los sistemas de salud y de los programas de control del vector, la introducción de manera frecuente del virus dengue por viajeros virémicos y la co-circulación de serotipos múltiples de dengue y de cepas de una posible mayor virulencia (3, 4).

La enfermedad por dengue es causada por uno de cuatro serotipos del virus del mismo nombre y produce en el hombre un espectro clínico que va desde las formas asintomáticas de infección, pasando por formas leves de fiebre clásica (Fiebre dengue: FD) hasta las formas más severas de Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD) FHD/SCD. La FHD se caracteriza por un aumento de la permeabilidad vascular, alteraciones en el número y función de los leucocitos, un aumento del hematocrito y trombocitopenia, y en algunos casos choque y la muerte (5). Estimados confiables sugieren que ocurren aproximadamente 100 millones de casos de FD anualmente (6), 500000 casos de FHD y decenas de miles de muertes (1, 2).

Aunque la circulación del virus dengue ha sido ampliamente documentada en la región de las Américas, en Cuba los reportes de síndromes clínicos por infección con virus dengue han sido esporádicos. En 1945 ocurrió un pequeño y limitado brote y en un estudio serológico nacional llevado a cabo en 1975 se

demonstró que sólo el 2.6 % de la población urbana cubana poseía anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el grupo de Arbovirus B (7).

En 1977 una gran epidemia de fiebre por dengue, de más medio millón de casos confirmados, azotó Cuba (8). Un estudio serológico desarrollado en 1978 mostró que el 44.5% de la población urbana cubana se había infectado con virus dengue tipo 1 y, consecuentemente, se encontraba en riesgo de sufrir una infección secundaria si un serotipo diferente se introducía en el país (9). 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 (7).

Dieciséis años más tarde, en 1997, vuelve a ocurrir una epidemia por dengue 2 en nuestro país, localizada 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 (10) Las cepas aisladas mostraron gran homología con VD 2 Jamaica y se relacionaron por análisis de la secuencia nucleotídica, con cepas del genotipo asiático (11).

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. 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 (12). 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). La epidemia de FHD ocurrida en Cuba en 1981 fue la primera reportada en América, antes de ésta solo se habían notificado casos sospechosos esporádicos (13) . Sin embargo cada año desde 1981, con excepción de 1983, se han notificado casos confirmados de FHD en países como: Puerto Rico, Venezuela, Nicaragua, Colombia, México y Brasil, entre otros (14). Los cuatros primeros ya se consideran endémicos, lo que evidencia el aumento de la incidencia de esta enfermedad y el peligro que esto representa a nivel mundial y especialmente en países tropicales como el nuestro.

Han sido varias las investigaciones que tratan de explicar la fisiopatología de la FHD, sin embargo, aún se desconoce con claridad por qué algunos individuos en circunstancias similares de infección padecen las formas asintomáticas o leves, mientras otros llegan a desarrollar las formas severas de la enfermedad y pueden morir. De gran importancia en este contexto resulta la hipótesis integral presentada por Kourí y colaboradores, la cual plantea que la presencia o ausencia de factores individuales en el contexto de los

factores epidemiológicos y virales hacen posible o no la evolución a un cuadro clínico de FHD/SCD (13, 15).

A partir del análisis de las epidemias cubanas de dengue se han descrito varios factores de riesgo individuales asociados con la FHD/SSD. Entre ellos se encuentran las enfermedades crónicas como la anemia de células falciformes, el asma bronquial y la diabetes mellitus. Otro de los factores de riesgo que resalta de forma particular es la raza. Existe un reporte médico, que data del año 1906, que describe una marcada resistencia al desarrollo de la forma grave de la enfermedad, FHD/SSD en individuos negros (16).

En cada una de las epidemias de FHD ocurridas en Cuba se notó de forma común por los clínicos y personal paramédico que la FHD/SSD "no era una enfermedad de negros", y lo que resulta más importante, una proporción significativamente mayor de personas blancas que negras desarrollaron las formas severas y fatales de la enfermedad por virus dengue (10, 12, 13, 17).

Interesante resulta también que existan escasos reportes de enfermedad grave por dengue en África, así como en los países caribeños de población negra, a pesar de haberse demostrado circulación del virus dengue en esas regiones.

Cuba posee una etno-génesis única, diferente al resto de los países de América. El etnocidio aborigen de que fue objeto originó que el fondo genético de la población cubana actual este conformado por la mezcla de la oleada migratoria Euroipoide, compuesta por los colonizadores españoles, y la negroide, dada por los individuos oriundos de África subsahariana que fueron traídos como esclavos; y posee, además, un nivel elevado de mezcla racial y mestizaje (18).

Nuestro país presenta, igualmente, una situación epidemiológica única en dengue. La erradicación de las epidemias ocurridas, gracias a la voluntad política y la cooperación de todas las organizaciones de masas, militares y el pueblo en general, ha permitido la no endemidad del dengue en Cuba, como han demostrado los subsecuentes estudios epidemiológicos, pese a estar rodeada de países endémicos y con co-circulación de varios serotipos (19-21).

Las características del sistema de salud cubano han facilitado un manejo multidisciplinario y centralizado de cada epidemia de dengue, existiendo criterios estandarizados para la clasificación clínica, la hospitalización y el manejo de los casos de dengue, y una valiosa información sobre los aspectos epidemiológicos, virológicos e inmunológicos relativos a cada epidemia ocurrida (2).

Todo esto hace que Cuba sea un lugar de valor excepcional para el estudio de los factores de riesgo individuales para el desarrollo de las formas graves de la enfermedad.

El dengue constituye sin duda una de las enfermedades más fascinantes desde el punto de vista de su inmunología. El estudio de los fenómenos inmunopatogénicos que se originan tras la infección por virus dengue es hoy en día uno de los más atractivos y controvertidos temas de investigación dentro de la inmunoinfectología (22). Desde finales de la década de los 80 un papel relevante en la patogénesis de la FHD/SCD ha sido atribuido a la respuesta inmune celular de memoria. La primoinfección por unos de los serotipos de virus dengue induce una respuesta inmune humoral y celular de memoria protectora de por vida contra ese serotipo, pero de pobre especificidad y afinidad para el resto de los serotipos. Las células T y B de memoria de menor afinidad son poco eficientes en la eliminación del virus, pero se activan preponderantemente durante una infección secundaria, fenómeno conocido como “Pecado original”. (23, 24). Estas células B de memoria de reactividad cruzada producen anticuerpos no neutralizantes, pero capaces de reconocer epítopes presentes en los nuevos virus y, al formar inmunocomplejos, facilitar su penetración en los monocitos/macrófagos, facilitando la diseminación de la infección (25). Las células T de memoria de reactividad cruzada, por su parte, se expanden y producen niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias sin una regulación adecuada (26-34). La liberación sistémica y no controlada de estas citoquinas pro-inflamatorias produce ruptura de las células endoteliales, alteración del sistema de la coagulación, extravasación de plasma, choque y manifestaciones hemorrágicas (35-37).

Considerando el importante papel atribuido a la respuesta inmune en el fenómeno inmunopatogénico de la FHD, resulta de extremo interés conocer si diferencias en los patrones individuales de esta respuesta tienen alguna correlación con las diferencias observadas entre los diferentes grupos étnicos en Cuba en cuanto a tendencia al desarrollo de las formas graves de enfermedad por dengue.

En el presente trabajo mostramos evidencias experimentales que vinculan la respuesta inmune celular con las diferencias étnicas observadas en el desarrollo de las formas clínicas severas por dengue en la población cubana, conceptualizando como raza al color de la piel.

Las observaciones epidemiológicas sobre la asociación de la Raza y la mayor o menor vulnerabilidad a la FHD/SCD han sido hechas por el color de la piel. Para confirmar esta asociación, evadiendo la subjetividad de la clasificación étnica de acuerdo al color de la piel, en el presente estudio realizamos una rigurosa clasificación antropométrica a individuos con antecedentes de diferentes formas clínicas de la enfermedad por dengue.

Los orígenes de la población cubana contemporánea, al cual los ancestros africanos hicieron un importante aporte, nos llevan a considerar a los genes polimórficos asociados a la respuesta inmune

dentro del grupo de genes comunes que la población cubana, caribeña y africana pudieran compartir, y que pudieran explicar, al menos parcialmente, la baja incidencia de FHD/SSD en la población negra de esos países. La presente investigación analiza la posible asociación de estos genes con las diferencias en la propensión a desarrollar las formas graves de la enfermedad por dengue en los diferentes grupos étnicos cubanos, una vez mas considerando la Raza o étnia como el color de la piel.

I.2 Hipótesis de Trabajo

La respuesta inmune celular y los genes HLA contribuyen a las diferencias en la incidencia de fiebre hemorrágica por dengue entre los individuos cubanos de diferentes grupos étnicos.

I.3 Objetivos

General:

Explorar el papel de la respuesta inmune celular y los genes HLA en la propensión de los individuos cubanos de diferente grupo étnico a desarrollar fiebre hemorrágica por dengue

Específicos:

1. Examinar si existen diferencias en la respuesta inmune celular de memoria a virus dengue entre individuos cubanos de diferentes grupos étnicos.
2. Definir si existe un patrón de respuesta inmune de memoria celular diferente a virus dengue entre individuos de los diferentes grupos étnicos en Cuba.
3. Explorar si los genes HLA clase I y clase II están asociados a protección o riesgo a la enfermedad por dengue en los diferentes grupos étnicos cubanos.
4. Conocer si la clasificación antropométrica apoya la observación epidemiológica de una predisposición de individuos de raza blanca a desarrollar fiebre hemorrágica por dengue.

I.4 Novedad científica

- **Los hallazgos encontrados constituyen un novedoso aporte al conocimiento mundial de la inmunopatología de la infección por dengue:**
 - Se describe por vez primera la diferencia en respuesta inmune celular a dengue entre individuos blancos y negros y se caracteriza que patrón de respuesta media esta diferencia
 - Se demuestra, bajo condiciones epidemiológicas excepcionales, la asociación de genes HLA con el desarrollo de la enfermedad por dengue

I.5 Valor práctico

- **Los resultados constituyen un aporte al sistema nacional de salud:**
- Los resultados obtenidos aportan valiosa información sobre los factores de riesgo para la aparición de la FHD en la población cubana.
- La información derivada de este trabajo permitirá al sistema nacional de salud disponer de nuevos elementos de utilidad para la prevención, ante una epidemia de dengue, de la aparición de la FHD en población susceptible.

I.6 Valor teórico

La investigación desarrollada tiene un gran valor teórico pues contribuye a conocer la asociación de la respuesta inmune celular con el riesgo de los individuos cubanos de diferente grupo étnico a desarrollar fiebre hemorrágica por dengue, y se sugieren los posibles efectores de la respuesta inmune celular y factores genéticos involucrados en este fenómeno. Además, este trabajo estuvo dirigido a una enfermedad que es hoy la más importante enfermedad viral transmitida por artrópodos en términos de morbilidad y mortalidad humana, que se considera una enfermedad re-emergente por su incremento dramático en los últimos años, y es responsable de aproximadamente 100 millones de casos anualmente.

Estos resultados han sido objeto de reconocimientos como son:

- Resultados Relevante a nivel de Centro del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (2006).
- Ponencia relevante en el XVIII Forum Municipal de Ciencia y Técnica (2007).

Parte de los estudios realizados conformaron una tesis de para optar por el grado de master en Ciencias

“Evaluación de la Respuesta Inmune celular de memoria serotipo específica y serotipo cruzada a virus dengue” Instituto Pedro Kourí, 1999.

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

- **Cytokine. Accepted July 2010.** MCP-1 and MIP-1 α expression in a model resembling early immune response to dengue. **Beatriz Sierra**, Ana B. Perez , Katrin Vogt , Gissell Garcia , Kathrin Schmolke , Eglys Aguirre , Mayling Alvarez , Hans-Dieter Volk , Maria G. Guzman.
- **Cellular Immunology .262 :134–140 ,2010.** Secondary heterologous dengue infection risk: Disequilibrium between immune regulation and inflammation? **Beatriz Sierra**, Ana B. Perez ,

Katrin Vogt , Gissel Garcia , Kathrin Schmolke , Eglys Aguirre, Mayling Alvarez , Florian Kern , Gustavo Kourí , Hans-Dieter Volk , María G. Guzman.

- **International Journal of infectious Diseases. 12:293,2008.** Racial Variation in the Cytokines Production During Dengue Infection. **Beatriz Sierra**, Ana B. Perez, Gissel García, Katrin Vogt, Kathrin Schmolke, Eglys Aguirre, Florian Kern, Mayling Alvarez, Hans-Dieter Volk, María.G. Guzman.
- **Human Immunology. 68(6):531-40, 2007.** 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. **Beatriz Sierra**, Roberto Alegre, Ana B Pérez, Gissel García, Katharina Sturn-Ramirez, Olugbenga Obasanjo, Eglys Aguirre, Mayling Alvarez, Rosmari Rodriguez-Roche, Luis Valdés, Phyllis Kanki, María G. Guzmán.
- **Viral Immunology.19(4):662-8, 2006.** Ethnicity and difference in dengue virus-specific memory T cell responses in Cuban individuals. **Beatriz Sierra**, Gissel García, Ana B Pérez, Luis Morier, Mayling Alvarez, Gustavo Kourí y Maria G. Guzmán.
- **Archives of Virology, 152(3):533-42, 2006.** RACE: A risk factor for Dengue hemorrhagic fever. **Beatriz Sierra**, Gustavo Kourí, María G. Guzmán.
- **International Journal of infectious Diseases, 6 (2):125-128. 2002.** Long term memory cellular immune response to dengue virus after natural primary infection. **Sierra Beatriz**, García Gissel, Pérez Ana B, Morier Luis, Rodriguez Rayner, Alvarez Mayling, Guzmán María G.

I.8 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis

- IV National Workshop of Immunology. Faculty of Medicine "Victoria de Giron". December, 1999.
- International Conference on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Chiang Mai, Thailand November 20-24, 2000.
- XVI Congreso LatinoAmericano de Microbiología (ALAM), VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, III Congreso cubano de Medicina Tropical, IPK, Habana, Cuba, Noviembre 2002.

- International dengue expert seminars. Dengue virus: Molecular Basis of Cell Entry and Pathogenesis. PDVI/OMS Viena, Austria. 2003.
- III Congreso Internacional sobre Dengue y Dengue Hemorrágico, Singapur, 2004.
- II Congreso Internacional de Dengue y Fiebre Amarilla, Palacio de las Convenciones, Cuba, 2004.
- Immunology Mundial Conference , Toronto, Canada, Marzo, 2004.
- 2nd Asian Regional Dengue Research Network Meeting, Singapur, 2005.
- 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brazil. August 21-25, 2007.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. La historia del dengue y su epidemiología

El dengue es una enfermedad infecciosa de origen viral que se transmite al hombre a través de un mosquito del género *Aedes*, provocando una enfermedad con un amplio espectro de formas clínicas que va desde la fiebre indiferenciada hasta las formas más graves con hemorragia y choque (38).

La primera descripción de una enfermedad compatible con dengue se publicó en la Enciclopedia China en el año 992 de nuestra era. Sin embargo, no fue hasta 1635 que en las Indias Francesas del Oeste se conoció un reporte similar, donde la enfermedad fue denominada “Coup de Barre” (39). En 1779, en Batavia, Indonesia se reportó una epidemia de casos febriles denominada “Knockelkoorts” (Fiebre de huesos) y en el mismo año en el Cairo, Egipto se le denominó “Mal de Genoux” (problemas de rodilla). En 1780 en Filadelfia, EUA se reportó la enfermedad febril como “Escarlatina reumática”.

En sus inicios, se consideró una enfermedad benigna de los visitantes a los trópicos (39). Las epidemias se producían a intervalos de 10-40 años, principalmente porque los virus y su vector transmisor sólo podían transportarse entre los centros de la población a través de la navegación (39).

Fueron varios los nombres asociados a esta enfermedad de acuerdo a la región geográfica (39). De esta forma se denominó “La Piadosa” en Cádiz, España (1784-86), “Dengue” en España (1809), Ki Dinga Pepo, Denga en Zanzibar, África del Este (1823), “Ephemeral fever” en Calcutta, la India (1824), “Dandy fever” Santo Tomas, Islas Virginiás (1827), “Dunga, Dengue” en Cuba, 1828, “Polka fever” en Brasil, (1845-49), “Three-day or Seven-day fever” en la India, 1909, “Ban-Sha” en Taiwán, 1916 y “Five-day fever” en Indonesia (1960s). A partir de la década de los años cincuenta se denominó FD a la forma clásica y FHD/SCD a la forma severa de la enfermedad (39).

Los estudios de la enfermedad comenzaron con la demostración por Graham en 1903 (40) de la capacidad de los mosquitos para transmitir el dengue. El virus dengue se aisló por primera vez en Hawái en 1944, al que se denominó dengue 1 y en el mismo año se aisló en Nueva Guinea otra cepa relacionada antigénicamente a la que se denominó dengue 2 (41, 42). En Manila, 1956 y 1960, se aislaron los serotipos 3 y 4 a partir de muestras clínicas de pacientes con un cuadro de dengue hemorrágico (43).

La re-emergencia del dengue como un problema crucial de salud a nivel mundial es actualmente un problema grave. Es conocido que el siglo 21 ha sido caracterizado como un período de globalización, migración en masa, urbanización, cambios climáticos y demográficos; factores todos que potencian la diseminación del dengue. El estilo de vida del principal vector de la enfermedad, el mosquito *Aedes aegypti*, se adapta idealmente a los enormes conglomerados urbanos que existen en Asia y América Latina. El cambio climático puede alterar la distribución geográfica del vector, permitiendo la entrada del dengue en nuevas áreas geográficas. Las migraciones humanas juegan un papel significativo en la epidemiología del dengue, ya que los movimientos hacia nuevos asentamientos pueden incrementar la exposición a múltiples serotipos del dengue, un factor importante de riesgo para el desarrollo de la enfermedad severa (44). Actualmente el dengue es endémico en todas las regiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) excepto en Europa (45).

II.2. Características Generales del Virus del dengue

Los virus del dengue pertenecen a la familia Flaviviridae, género *Flavivirus* el cual agrupa alrededor de 70 miembros. Existen cuatro serotipos (DEN-1, 2, 3, 4), para los cuales se ha descrito una homología de secuencia de un 70% aproximadamente (46).

Los flavivirus pueden replicarse en cultivos celulares de mamíferos, aves y artrópodos. Inicialmente ocurre la unión al receptor celular específico que sigue con la penetración mediante endocitosis y posteriormente el virión es atrapado en una vesícula donde la membrana es fusionada a pH ácido y la nucleocápside es liberada al citoplasma celular. La traducción primaria del ARN mensajero da como resultado una poliproteína que luego de varios clivajes y procesos post-traduccionales da lugar al virión y los componentes replicativos. La replicación del ARN comienza con la síntesis de una cadena negativa complementaria que es empleada como molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARN positivo que pueden ser usadas para la traducción de nuevas poliproteínas, síntesis de cadenas negativas o pueden ser encapsidadas para la formación de nuevos viriones. El ARN de los virus del dengue contiene un marco abierto de lectura para una polimerasa que esta insertada dentro de la membrana del retículo endoplasmático (47-50).

El ensamblaje de la nucleocápside a partir de la proteína C y el ARN, así como la adquisición de la envoltura, ocurren intracelularmente. Los viriones son llevados en vesículas de transporte que salen de la membrana del retículo endoplasmático 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. La liberación del virus puede ocurrir por fusión de las membranas de la vesícula exocítica con la membrana plasmática o por efecto citopático, a través de rupturas puntuales en la membrana que lo separan del espacio exterior (51).

Los viriones maduros son partículas esféricas de 40-60 nm de diámetro, que contienen un núcleo electrodenso de 30 nm de diámetro rodeado por una bicapa lipídica. La envoltura es de 10 nm de espesor y contiene dos proteínas que dan lugar a proyecciones localizadas en la superficie del virión de aproximadamente 7 nm de longitud (50). Esta bicapa lipídica se deriva de la membrana celular del hospedero. La nucleocápside icosaédrica contiene una molécula de ARN de simple cadena, con orientación positiva, de aproximadamente 11 kb de longitud y peso molecular de 4,2 kD (52).

La molécula de ARN (+) se comporta como ARN mensajero durante la síntesis de las proteínas virales. 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), no glicosilada, la cual se forma durante la maduración a partir del precursor denominado prM y la proteína de envoltura (E), glicosilada. Las proteínas no estructurales son codificadas por genes situados hacia el extremo 3' y se denominan NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (50)

En ambos extremos, 5' y 3' están presentes secuencias no codificantes (NCR) -del inglés noncoding regions-. Estas regiones contienen secuencias conservadas, que dirigen el proceso de amplificación, traducción y empaquetamiento del genoma (50).

La proteína C, es el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción. Su dominio carboxilo terminal, se plantea que actúa como transductor de señales a través de la membrana que media la inserción del precursor prM dentro del retículo endoplasmático rugoso (53).

La proteína prM de 26 kD es escindida proteolíticamente, 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 (50, 54).

La glicoproteína E forma parte de la envoltura viral. Tiene un peso molecular de 53-54 kD, constituye la principal proteína estructural de los flavivirus y la más conservada en este género (55). En la proteína E radican las principales funciones biológicas del virión tales como: inducción de anticuerpos neutralizantes, inmunoamplificadores e inhibidores de la hemaglutinación, tropismo tisular, maduración viral, enlace al receptor celular y fusión de membrana catalizada por ácidos, necesaria para la infección (56). En la misma se ha determinado la presencia de epítopes de células T, también de importancia en la inmunidad y la

patogenia de la enfermedad. Los determinantes antigénicos de la proteína E han mostrado especificidad de grupo, complejo y tipo, también de subcomplejo, genotipo, cepa y subcepa (57).

NS1 es una glicoproteína de 39-41 kD que existe asociada a la célula, en la superficie celular y en forma extracelular. Es capaz de inducir la formación de anticuerpos fijadores del complemento. La misma presenta dos sitios de glicosilación bien conservados (53).

La función de NS1 en la replicación viral no ha sido dilucidada, aunque se ha involucrado en la morfogénesis viral. Algunas mutaciones de esta proteína afectan la virulencia de la partícula viral. Se conoce que la célula infectada expresa la proteína en la superficie celular, siendo diana de la citólisis inmunológica, (57) tanto la realizada por células T citotóxicas, como la mediada por anticuerpos específicos contra ella que la hacen blanco de la acción del complemento o de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Por esta razón resulta interesante el uso potencial de la proteína NS1 en la protección del hombre contra la infección por los Flavivirus. Los estudios realizados por Libraty y colaboradores (58) muestran que es posible correlacionar los niveles elevados de NS1 circulante, encontrados en la fase temprana de la enfermedad con el desarrollo de la forma severa de la enfermedad (FHD).

NS2 está constituida por dos proteínas NS2A y NS2B. NS2A tiene un peso molecular de aproximadamente 22 kD, puede encontrarse atravesando la membrana y además ha sido localizada en posibles sitios de replicación del ARN. Esta proteína puede actuar en el reclutamiento de las copias de ARN por la replicasa unida a la membrana. La proteína NS2B está asociada a la membrana, tiene un peso molecular de 14 kD y presenta una región hidrofílica central conservada, que se encuentra flanqueada por segmentos hidrofóbicos. Forma un complejo con NS3 y es un cofactor requerido para la función de la serina proteasa de NS3. En el dominio central existe una región conservada constituida por 40 aminoácidos que es requerida para la actividad de la proteasa NS2B-NS3 (50, 59-61).

NS3 es la segunda proteína en tamaño del virus con un peso molecular de 70 kD y es altamente conservada entre los Flavivirus. Se piensa que es un componente de la maquinaria enzimática de replicación del ARN viral. La comparación de secuencias nucleotídicas y análisis bioquímicos sugieren que es trifuncional, con actividad de proteasa, helicasa y actividad de ARN trifosfatasa. Esta proteína se asocia a la membrana a través de su interacción con NS2B (62). Se ha demostrado que la misma es la fuente principal de epítopos de células T. El extremo N terminal de NS3 contiene el dominio catalítico de la proteasa NS2B-NS3, parecida a la proteasa serina de las subfamilias de la Tripsina. Se considera que

esta enzima participa como proteasa en el clivaje de NS2B, NS3, NS4A y NS5 y del extremo carboxilo de la proteína C (63, 64).

NS4 da origen a NS4A y NS4B, que son proteínas relativamente pequeñas (aproximadamente 16 y 27 kD respectivamente). Teniendo en cuenta la distribución de NS4A y su interacción con NS1, se plantea que NS4A participa en la replicación del ARN, quizás anclando componentes de la replicasa a la membrana celular. NS4B se localiza en sitios de replicación del ARN, pero también aparece dispersa en la membrana citoplasmática y en el núcleo. Esta proteína sufre modificaciones post-traduccionales que aún son desconocidas (50).

NS5 es la última proteína codificada en el largo marco abierto de lectura, tiene un peso molecular de 103 a 104 kD y es una de las más conservadas en los Flavivirus. Es una proteína básica y se cree funciona como ARN polimerasa ARN dependiente, lo que aunque no se ha verificado directamente, se fundamenta en la presencia de una región altamente conservada, característica de este tipo de enzima presente en los virus de ARN de cadena positiva. (50, 65, 66).

El dengue es una enfermedad de transmisión vectorial, siendo el *Aedes aegypti* el vector principal. Dicho mosquito es esencialmente doméstico, de aguas limpias, diurno y antropofílico. Luego de la ingestión de sangre infestada, el mosquito puede transmitir el agente después de un período de 8 a 12 días de incubación extrínseca. La transmisión puede ocurrir de forma mecánica cuando se interrumpe la alimentación y el mosquito se alimenta de inmediato de un hospedero susceptible cercano (67).

Los virus del dengue persisten en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión hombre-mosquito-hombre, aunque existe un ciclo selvático (68-70). El ciclo de transmisión selvático ha sido demostrado en Asia, principalmente entre especies de monos *Presbytis* y *Macaca* principalmente a través de mosquitos del género *Ochlerotatus*. También, ha sido demostrado en África, con los monos *Erythrocebus* patas y varios vectores selváticos incluyendo *Aedes taylori-furcifer*, *Aedes leuteocephalus* y *Aedes opok* (71).

II.3. Características clínicas de la enfermedad

El dengue se manifiesta como una enfermedad infecciosa aguda, caracterizada por un amplio espectro de manifestaciones clínicas que oscilan desde formas leves de fiebre indiferenciada hasta formas graves con hemorragia y choque (72, 73).

La OMS definió el cuadro clínico de dengue en fiebre dengue (FD) y 4 categorías para los distintos grados de fiebre hemorrágica por dengue (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 a un choque, denominado SCD (74, 75).

La FD se considera una enfermedad autolimitada y raramente fatal. La convalecencia puede prolongarse a varias semanas, asociándose a depresión y debilidad fundamentalmente en adultos, aunque no existen evidencias de secuelas permanentes posterior a la infección (76, 77). La FD se caracteriza por la presencia de fiebre alta de inicio abrupto, cefalea severa, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias, náuseas y erupción. Clínicamente la enfermedad se manifiesta después de un período de incubación que oscila entre tres y siete días, al cabo de los cuales comienzan a evidenciarse los primeros síntomas. La fiebre entre 38 y 39°C se mantiene de dos a siete días, desciende y reaparece. La erupción es variable y se presenta tempranamente en el 50 % de los pacientes, el enrojecimiento facial puede coincidir con la fiebre y desaparece generalmente entre el primero y el segundo día de instalado el signo. Una segunda erupción comienza entre el segundo y sexto día, variando de la forma máculo-papular a la escarlatiforme, distribuyéndose en el tronco, las extremidades y apareciendo en zonas en las que se alterna un patrón eritematoso con áreas de piel normal. Las pruebas de laboratorio muestran neutropenia con linfocitosis, en ocasiones linfocitos atípicos, las enzimas hepáticas pueden elevarse de forma ligera en algunos pacientes (5, 75).

Aunque las manifestaciones hemorrágicas no son frecuentes, puede observarse sangramiento gingival, hematuria indicando la afectación del sistema genito-urinario e hipermenorrea por daño del sistema ginecológico así como lesiones petequiales y purpúricas en la piel; la trombocitopenia también ha sido reportada en algunos casos (78).

En la FHD sin choque, las manifestaciones clínicas son semejantes a las de la FD. La epigastralgia, la sensibilidad en el reborde costal derecho y el dolor abdominal son comunes. La temperatura es alta del segundo al séptimo día y posteriormente baja a nivel normal o subnormal, en ocasiones sube a 40°C o más y puede acompañarse de convulsiones febriles. La manifestación hemorrágica más común es una prueba del torniquete positiva. Un paciente es clasificado como caso de FHD sí, además de fiebre y hemorragia, presenta trombocitopenia (conteo plaquetario menor de 100 000 plaquetas/mm³) y hemoconcentración (aumento del hematocrito en un 20 % ó más). Pueden observarse la presencia de ascitis y el derrame pleural, como signos de hemoconcentración (5, 75, 76, 79).

En muchos casos se observan hemorragias en los sitios de venipunción. En la etapa inicial podemos ver petequias finas diseminadas por las extremidades, las axilas, la cara y el paladar blando. Puede verse erupción maculopapular al principio y al final de la enfermedad. Puede existir hepatomegalia de dos a

cuatro centímetros, dolorosa a la palpación. La esplenomegalia es infrecuente en lactantes, pero a veces se observa un marcado aumento del bazo en la radiografía. Después de esta etapa viene la rápida recuperación que puede ser espontánea o seguida del tratamiento adecuado con fluidos (líquidos y electrolitos) (5, 45, 76, 80).

En la FHD/SCD se produce un deterioro súbito del paciente luego de una fiebre de corta duración, la temperatura desciende y más tarde entre el tercero y el séptimo día aparecen los signos indicadores de la insuficiencia del sistema circulatorio, constatándose frialdad de la piel y congestión, es frecuente la cianosis peri-labial y el pulso débil pero acelerado. Los pacientes aunque letárgicos se muestran inquietos. Con la entrada al estado de choque crítico, la tensión arterial desciende (20 mm Hg ó 2,7 kPa o inferior) la piel se nota fría y húmeda (81).

Los pacientes con FHD/SCD están en peligro de muerte si no se les administra de inmediato el tratamiento adecuado. La mayoría de los casos se mantienen conscientes casi hasta la etapa final. La duración del choque es corta, el paciente puede morir de 12 a 24 horas o recuperarse con rapidez después del tratamiento. El choque no corregido puede llevar a la acidosis metabólica, hemorragia grave del aparato digestivo o cualquier otro órgano con un pronóstico desfavorable. En estos pacientes puede aparecer encefalopatía por alteraciones metabólicas y electrolíticas (3, 5, 45, 76).

La clasificación original de la OMS del cuadro clínico del dengue se originó de las descripciones de casos pediátricos en el Sudeste Asiático en la década del 1970. Con la extensión de la enfermedad a otras áreas geográficas, variaciones de la descripción original del cuadro clínico del dengue se han reportado. Los principales problemas identificados en la clasificación de la OMS son la rigidez de la definición del cuadro de FHD, la baja sensibilidad y la suposición por algunos clínicos que fiebre dengue significa enfermedad leve (82-85). Una clasificación simplificada y revisada de los casos de dengue, dirigida a identificar y tratar rápida y adecuadamente las formas más severas y simplificar el reporte de los casos ha sido propuesta recientemente por la OMS y el Programa Especial para Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR) (UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 29 September- 1 October 200.) (86). Esta nueva clasificación basada en una revisión de los datos clínicos a partir de estudios realizados en 7 países del Sudeste Asiático, el Pacífico Occidental y Latino América esta ahora bajo validación en las regiones endémicas de dengue. Se ha aceptado hasta muy reciente que la convalecencia en la FHD con o sin choque suele ser corta, aún en casos de choque profundo. Una vez corregido éste, los pacientes se recuperan entre 48 a 72 horas. En la convalecencia es común la bradicardia o las arritmias sinusales y una característica erupción petequeial.

En la FHD, el rango de síntomas neurológicos va desde irritabilidad y depresión hasta encefalitis y muerte (87). La encefalopatía en la FHD puede resultar de la anoxia cerebral, edema, hemorragia intracraneal y oclusión de los vasos. Existe una controversia acerca de si los virus del dengue producen una enfermedad neurológica, como una complicación no específica o invaden directamente el cerebro de la misma forma que otros Flavivirus como la encefalitis Japonesa y la encefalitis de San Luis (88).

Sin embargo, recientes estudios sugieren que el dengue puede producir complicaciones a largo plazo. Durante la epidemia de dengue 3 ocurrida en Ciudad Habana durante el 2001-2002 algunos pacientes mostraron persistencia de varios síntomas de dengue aún 6 meses después de la enfermedad aguda. Astenia (27.6%), cefalea (14.8%), y artralgia (10.6%) fueron los síntomas mas frecuentes (89). Observaciones similares fueron notadas en Singapur, donde un Síndrome de Fatiga Post-dengue fue descrito durante la convalecencia tardía tras la enfermedad por dengue (90). Recientemente ha sido reportado un cuadro parecido en individuos cubanos 2 años después una enfermedad aguda por dengue 4, durante la epidemia ocurrida en Ciudad Habana durante el 2006. (García y cols. Comunicación personal), y aún 5 años después de una enfermedad aguda por dengue 2, ocurrida en Santiago de Cuba en 1997, algunos individuos referían sufrir artralgias, mialgias y astenia relacionadas con el dengue. (Sierra B. Resultados no publicados).

II.4 Células dianas de la Infección por Dengue

El progreso de la infección por dengue *in vivo* después de la picada del mosquito, a pesar de ser una cuestión fundamental, no es aún bien conocido. Se ha reportado que los monocitos, macrófagos y otras células del sistema retículo endotelial son las dianas fundamentales de la infección por dengue. Se ha reportado también que las células dendríticas conocidas como células de Langerhans, así como las células dendríticas dérmicas e intersticiales, son mas permisivas a la infección por dengue que los monocitos y macrófagos, por medio de de la molécula DC-SIGN como receptor para la entrada del virus dengue (91-95). Aunque se ha descrito que los fibroblastos y las células B pueden infectarse con virus dengue *in vitro* (96-98), no se conoce aún si estas células son capaces de infectarse *in vivo*. Se ha reportado que las células endoteliales y los hepatocitos fueron infectados con virus dengue *in vivo* en pacientes con FHD (99, 100). Células apoptóticas se encontraron también en otros tejidos como el cerebro, el intestino y el pulmón. Este mecanismo, conocido también como muerte celular programada, se ha implicado en la patogénesis de la FHD/SSD (101, 102).

II.5 Respuesta inmune e Inmunopatología de la enfermedad

II.5.1 Respuesta inmune innata ó inespecífica

La respuesta inmune innata, al parecer, tiene un importante papel protector durante la infección con VD (95). Uno de los componentes fundamentales de este tipo de respuesta son los INFs α , β y γ , pues in vitro, son capaces de inhibir la infección (103-105). Entre las fuentes principales de estos mediadores, se encuentran las células NK altamente productoras del IFN γ . Una actividad temprana de las células NK pudiera ser importante en la eliminación de la infección primaria por virus dengue (106). Sin embargo el mecanismo a través del cual pudieran actuar, no se ha definido aún. Durante la infección son reclutadas rápidamente en órganos y tejidos infectados, por factores quimioatrayentes producidos por las células infectadas y macrófagos residentes activados. Los macrófagos, además, constituyen una fuente principal de los INFs α/β los que, una vez en el sitio de la inflamación, inducen la proliferación de las células NK, la citólisis de células infectadas por virus mediada por dichas células asesinas y la secreción de quimoquinas (107). En el sitio de la infección además predominan las CD las cuales inducen también la activación de las células NK (108, 109).

Kurane y col (1986), reportaron que las células NK de sangre humana son citotóxicas contra células infectadas con virus dengue por citólisis directa y ADCC (del inglés Antibody Dependent Cytotoxic Cells) mediante la exocitosis dirigida de los gránulos que contienen granzimas, perforinas y proteoglicanos (110).

El aumento de las células NK activadas ha sido asociado al desarrollo de la FD, mientras que su disminución ha sido asociado con las formas severas de la enfermedad (111). Además, se ha demostrado que los macrófagos activados por INF- γ juegan un papel importante en la inhibición de la replicación del VD a través de la producción de óxido nítrico (112).

II.5.2 Respuesta inmune adquirida o específica

II.5.2.1 Respuesta inmune humoral

La información respecto a la adquisición de inmunidad después de una infección por VD es limitada. En humanos y monos infectados natural o experimentalmente con el virus se detecta una rápida y potente respuesta de anticuerpos. La presencia de anticuerpos neutralizantes por más de cuatro décadas después de un episodio infeccioso sugiere el desarrollo de inmunidad de por vida a VD (113).

Aparentemente, estos anticuerpos y otros efectores de la respuesta inmune al virus se asocian al desarrollo de inmunocompetencia. Esta, por otro lado, parece ser serotipo específica, pues los episodios clínicos por reinfección con virus del mismo tipo son poco frecuentes (42).

A pesar de la similitud antigénica entre los virus del complejo dengue, infecciones secuenciales por dos o más tipos del mismo pueden ocurrir. Cuando así sucede, la respuesta de anticuerpos a la infección secundaria es marcadamente diferente a la estimulada por la infección primaria (113). Esto puede tener dos consecuencias: el desarrollo de reinfecciones heterotípicas y la producción de fenómenos inmunopatogénicos en el curso de infecciones secundarias o la protección frente a la reinfección.

Experimentos de protección pasiva en ratones han evidenciado el efecto protector de la respuesta de anticuerpos (114). La conjugación de mecanismos de neutralización viral, activación del complemento y ADCC, son invocados en dicha respuesta.

Evidencias experimentales y epidemiológicas sustentan el efecto protector de la respuesta de anticuerpos neutralizantes. La capacidad neutralizante y protectora de los anticuerpos contra las proteínas E y prM ha sido demostrada en ratones empleando anticuerpos monoclonales (114-116).

En el hombre, datos epidemiológicos constituyen pruebas más convincentes de la protección mediada por anticuerpos. Se ha evidenciado que los anticuerpos maternos en los primeros 5-6 meses de vida protegen a los recién nacidos de la infección por VD (117). En la literatura revisada, no se encontraron referencias sobre la activación de la vía alternativa del sistema del complemento durante la infección por VD. La vía clásica de este sistema puede ser activada durante la infección primaria por este virus (118-120). En correspondencia con ello, moléculas de IgM específicas al virus han sido encontradas en esta fase de la infección (121).

Durante la infección secundaria, también ocurre activación de la vía clásica del complemento. Muy interesante es el hecho que las subclases IgG1 e IgG3, las más importantes activadoras del complemento durante una respuesta secundaria, son las subclases de IgG más producidas en los casos de individuos que desarrollan las formas más graves de la infección (122).

La acción de los anticuerpos promoviendo la citotoxicidad celular es otro mecanismo que propicia la eliminación de las células infectadas por virus. Algunas poblaciones celulares, en especial las células NK, son capaces de lisar células infectadas cuya superficie, cubierta con anticuerpos IgG, promueve la unión de la porción efectora de dichas moléculas (región Fc) a los receptores de baja afinidad (CD16) localizados en las células promotoras de la lisis, provocando, de esta forma, su activación y la ruptura de la célula diana (123).

Aunque estudios *in vitro* han evidenciado la lisis por ADCC de células monocitarias infectadas por VD, es muy poca la información sobre su repercusión en la protección *in vivo* (184, 198). En otras infecciones virales, en cambio, se ha visto que juega un importante papel protector. Estudios recientes muestran que, al parecer, la respuesta ADCC está involucrada en la protección frente a infecciones virales por VD (199, 200).

II.5.2.2 Respuesta inmune celular

El papel de los linfocitos T se ha demostrado ser importante en la respuesta inmune celular frente al virus dengue y definen en gran medida la evolución de la infección.

Siendo los linfocitos T CD4+ el centro de la respuesta inmune específica, éstos han sido intensamente estudiados en el caso de la infección por VD (34, 201). Tras la infección natural o inmunizaciones con vacunas vivas atenuadas, el análisis de las CMSP reveló la activación de clones de linfocitos T CD4+ y CD8+, los que, en su mayoría fueron serotipo específicos. En la inmunidad dependiente de estos clones, al igual que en la respuesta de anticuerpos, la infección secuencial conduce al desarrollo de respuestas de especificidad cruzada, capaces de reconocer otros serotipos del complejo dengue (124-126).

Se ha comprobado que la respuesta de las células T CD4+ y CD8+ se dirige contra múltiples proteínas virales (127-130), aunque la proteína NS3 parece ser particularmente inmunogénica para este tipo de respuesta (131). La interacción de las células T CD4+ y CD8+ con las células presentadoras de antígenos infectadas produce elevados niveles de INF- γ , TNF (factor de necrosis tumoral, del inglés -tumoral necrosis factor)- α , - β y MIP-1 β (proteína inflamatoria de macrófagos, del inglés- Macrophage inflammatory protein 1 alpha), mediadores eficientes de la lisis de las células infectadas *in vitro* (132, 133). Células T CD4+ citotóxicas y no citotóxicas (aparentemente solo productoras de mediadores solubles) han sido detectadas en sangre periférica de pacientes de dengue. La estimulación de clones de estas células serotipo específicos y de reacción cruzada también ha sido demostrada.

Mongkolsapaya y cols., (2003), demostraron la existencia de pocas células T CD8+ respondedoras al virus y, la mayoría de estas, altamente activadas que experimentaban apoptosis en pacientes con FHD y SCD (24). De esta manera se concluyó que, la infección severa está asociada con altos niveles de activación de células T, balanceados por apoptosis masiva y que esta activación retorna a niveles normales en la clarificación viral.

Estudios recientes realizados *ex vivo*, mostraron que en los días de la defervescencia, durante el curso de una infección aguda por VD, la apoptosis podría ser un potencial inmunomodulador en la respuesta

inmune adaptativa al virus. En este trabajo los niveles plasmáticos de FasL detectados y la proporción media de CMSP que presentaban apoptosis fueron mayores en niños que sufrían FHD que en aquellos que desarrollaron un cuadro de FD. Interesantemente, el hecho de que aproximadamente la mitad de dichas células apoptóticas fuesen linfocitos T CD8+ sugirió que la apoptosis mediada por Fas podría jugar un papel importante en la regulación de estos linfocitos T CD8+ (134).

II.5.2.3 Citoquinas de interés en la respuesta inmune a dengue

Citoquinas es un término 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 linfóide, 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 ARN mensajero (ARNm) y proteínas.

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.

A continuación se describen características de algunas citoquinas de interés en el contexto de este trabajo.

Quimoquinas: Las quimoquinas forman una familia de pequeñas proteínas con actividad quimioatrayente, que se clasifican en 4 grupos dependiendo de la presencia de determinados aminoácidos entre las dos primeras cisternas conservadas de su extremo N Terminal. Se unen a los receptores para quimoquinas C-C, que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Su unión induce una cascada de eventos intracelulares que rápidamente llevan a un amplio rango de funciones celulares incluyendo quimiotaxis, desgranulación, fagocitosis y síntesis de mediadores pro-inflamatorios (135), a

través de las cuales participan en una gran cantidad de eventos en el organismo tales como desarrollo de órganos linfocitarios, metástasis, cicatrización, angiogénesis, y en otros directamente relacionados con la respuesta inmune como diferenciación de las células T, reclutamiento de células, tráfico linfocitario e inflamación.

IL-8: Es una pequeña molécula con funciones quimiotácticas que contiene cuatro cisteínas características, con una organización CXC. Se secreta por una variedad de células, y tiene numerosos roles incluyendo el reclutamiento de eosinófilos, neutrófilos y células T a la superficie de del endotelio, y la inducción de expresión de moléculas de adhesión, lo cual conduce a la unión y extravasación de estas células y al aumento de la permeabilidad celular (383-385).

MCP-1: Es la proteína quimioatrayente de monocitos 1, es el prototipo de quimoquina C-C y exhibe la más potente actividad quimioatrayente para monocitos y linfocitos (374-376). Se expresa en una amplia variedad de células en respuesta a estímulos pro-inflamatorios, incluyendo TNF α , IL-1 α e IL-1 β , y a su vez induce a los monocitos y macrófagos a secretar TNF α , IL-1 β (136). Las células endoteliales son importantes fuentes de MCP-1, y pueden elevar significativamente los niveles de esta quimoquina durante las infecciones. La MCP-1 actúa de forma autocrina induciendo apertura de las uniones inter-endoteliales (137). La proteína C reactiva induce la liberación de MCP-1 por las células endoteliales (138). MCP-1 es crítica en dirigir la extravasación de CMSP hacia sitios de inflamación, infección y traumas (139). Existen reportes que refieren sobreexpresión de MCP-1 en monocitos y macrófagos en respuesta a la infección por dengue (140, 141), así como en células endoteliales (138, 142).

MIP-1 α : Es una quimoquina crucial en la quimioatracción de células T a los tejidos inflamados, y en la regulación del tránsito trans-endotelial de monocitos, células dendríticas y células NK (403, 415, 416). Tiene un papel también importante en la patogenia de muchas enfermedades con condiciones inflamatorias como las enterocolitis y la colitis ulcerativa, la artritis, la psoriasis, la formación de granulomas, la esclerosis múltiple, la sarcoidosis pulmonar y el asma (374, 380, 382, 383). En este sentido es quimioatrayente de forma particular para los basófilos en la respuesta a alérgenos, induciendo la liberación de histamina y el desarrollo de eosinofilia (418-420), y puede ser producida por líneas celulares de basófilos y eosinófilos, actuando sobre ellos de forma autocrina.

RANTES: Es una quimoquina inductora de activación de leucocitos y células NK, quimiotaxis, adhesión y migración transendotelial (143). Su secreción temprana forma un gradiente local y recluta varios subgrupos de leucocitos circulantes al sitio de infección, además de actuar sobre las células del endotelio, facilitando la expresión de moléculas de adhesión y por ende la diapedesis (144). RANTES se

une a varios receptores, CCR1, CCR3 y CCR5 entre ellos. Se ha demostrado que esta quimoquina atrae monocitos y linfocitos T vía CCR1, y eosinófilos y basófilos vía CCR3, y actúa sobre los linfocitos T también a través de CCR5, a través del cual recluta preferencialmente linfocitos con fenotipo de memoria, resultando entonces de importancia en las respuestas inmunes secundarias (145).

IFN γ : (interferon gamma), también llamado IFN tipo II o inmunoregulador, es secretado por las células CD8, CD4, TH1, y NK, que la producen solo si están activadas en respuesta a antígenos o en respuesta a IL-2 y su producción se inhibe por la IL-10, TGF β , IL-4 y glucocorticoides. (146, 147). Casi todos los tipos de células poseen receptor para IFN γ y responden a su unión a esta citoquina aumentando su expresión de MHC I (148). Por esto las células en la vecindad de un linfocito activado que libera IFN γ se tornan eficaces presentadora de antígenos endógenos y constituye un mejor blanco para los linfocitos CD8+. El IFN γ también aumenta la expresión de MHC II en las células presentadoras de antígenos especializadas, potenciando también la presentación a los linfocitos CD4+. También induce la expresión de MHC II “de novo” en células endoteliales, epiteliales, y del tejido conjuntivo, reclutándolas como células presentadoras de antígenos a linfocitos CD4 en sitios de reacción inmunitaria intensa (148, 149). Es un potente activador de macrófagos. Aumenta su actividad microbicida considerablemente, y le induce a liberar IL-1, IL-6, IL-8, y TNF α . También activa neutrófilos, células NK y células endoteliales vasculares (150). Estas últimas en su presencia se diferencian a vénulas endoteliales altas y se vuelven más adhesivas para neutrófilos y linfocitos (151). Esta citoquina también promueve la diferenciación de células B y CD8+ a efectoras activas, pero no su proliferación. Potencia la actividad TH1, y disminuye la producción de IL-4 por TH2, inhibe los efectos de la IL-4 sobre la célula B, evitando el cambio a IGE e induciendo IgG1 (152).

TNF α : Es una citoquina pro-inflamatoria multifuncional, aislado en 1984, y nombrado por su acción citotóxica sobre las células tumorales de ratón induciendo regresión del tumor. Es producida por monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos TH1 y otras. Esta citoquina interviene en la hematopoyesis y la morfogénesis, y está involucrada en enfermedades como la artritis reumatoide, la diabetes, el infarto del miocardio, el rechazo a injertos y el SIDA. Estimula al hígado a producir proteínas de fase aguda, e induce el catabolismo de músculos y grasa para la obtención de energía, y actúa a nivel del hipotálamo causando fiebre y somnolencia (153). En cantidades excesivas activa las vías de la coagulación y causa inflamación, siendo la causa principal de complicaciones sistémicas como la cascada que conduce al choque (154, 155).

El TNF α es la principal citoquina que regula la inmunidad innata y media la inflamación aguda. Actúa por medio de la activación del factor activador de la transcripción NKkappa.

Su acción sobre las células endoteliales resulta en la producción de selectinas y ligandos de las integrinas leucocitarias que median la diapédesis, y en la inducción de la producción de quimioquinas que intervienen en la quimiotaxis y reclutamiento de leucocitos. El TNF α activa neutrofilos y macrófagos, induce la producción de reactivos intermediarios del oxígeno y la secreción de IL-1 (156). Esta citoquina forma un lazo autoregulatorio con la IL-10, en el cual el TNF es un potente inductor de IL-10, y la IL-10 es una reguladora represora del TNF (157). Actúa sobre las células a través de varios receptores, promoviendo diferentes efectos. Su unión al TNFR1 promueve respuesta inmune sistémica e inflamación. Su unión al TNFR2, solo presente en tejido renal, induce daño tisular mediado por complemento. El TNFR3 es esencial para la inducción de interferones y de IL-10 (158).

TGF β : Es una molécula altamente conservada, que constituye una adaptación evolutiva para proteger al huésped de los eventos inflamatorios destructivos (159). Fue descubierto inicialmente como un factor de crecimiento de fibroblastos que promovía la reparación de heridas. Tiene también una actividad anti-proliferativa considerable y actúa como un regulador negativo de la inmunidad y la hematopoyesis (160). El TGF β se produce por muchos tipos celulares que incluyen macrófagos activados y linfocitos T. Los humanos expresan cuando menos 3 variantes de esta citoquina, llamados TGF beta 1, 2 y 3. Son productos de genes separados, pero todos ellos se enlazan por los mismos 5 tipos de receptores celulares superficiales de gran afinidad. Los receptores de tipo I son transmisores de señales intracelularmente, en tanto que la función de los receptores III, IV y V no es muy clara (161, 162). El TGF beta tiene efectos anti-linfoproliferativos en una amplia variedad de células que incluyen macrófagos, células endoteliales y linfocitos T y B. También suprime la producción de la mayor parte de las linfoquinas y monoquinas y reduce la expresión celular de las proteínas MHC II y de los receptores de IL-1. Bloquea también los efectos linfoproliferativos sobre linfocitos T y B, y activadores de células NK de la IL-2 y los de la IL-1 sobre los timocitos. Inhibe la generación de células T citotóxicas. Por tanto el TGF beta es singular en lo que se refiere a que puede actuar como un regulador de retroalimentación negativa que abate las reacciones mediadas inmunitariamente (159, 163).

Esta citoquina ha ganado gran interés en los últimos años tras saltar a la palestra científica el tema de las células T reguladoras (164). TGF β es producida por la subserie de células T reguladoras TR1, junto a la IL-10, y por las TH3. El TGF β mas la IL-2 inducen la expresión de novo de FoxP3 en linfocitos vírgenes, los cuales ganan así funciones regulatorias, transformándose en TR1-like, productoras de IL-10.

Sin embargo en unión a la IL-6 y ausencia de IL-2 induce la diferenciación a la TH17, las cuales tienen un papel importante en la autoinmunidad (165). El TGF tiene, por tanto, un papel dual en la inmunidad, que contribuye a la regulación de la tolerancia periférica (166). (Li y Cols. 2006) (Ming y Cols. 2007).

IL-10 : Se le considera como la reguladora por excelencia de la inmunidad a la infección. Es eminentemente anti-inflamatoria. Durante la infección ella inhibe la actividad de la mayoría de las células efectoras del sistema inmune (TH1, las NK, macrófagos, dendríticas), necesarias para la eliminación óptima de patógenos, pero también responsables de daño tisular inmunopatológico. Posee, por ende un rol de equilibrio entre el control de las infecciones y el control del sistema inmune. Sin embargo, el máximo control del patógeno no necesariamente implica minimizar el daño que la enfermedad que ocasiona produce en el organismo, ya que muchas de las complicaciones severas de las infecciones resultan de la excesiva activación del sistema inmune. Por ende, es esencial el papel de los componentes inmunoregulatorios del sistema inmune en limitar los perjuicios que este pudiera ocasionar (167, 168).

La IL-10 se describió inicialmente como un producto de células TH2 que inhibía la síntesis de citoquinas TH1. (Gazzinelli y Cols. 1999). Se sabe ahora que es producida por varios subtipos de linfocitos CD4+ y CD8+, por linfocitos B, macrófagos y células dendríticas(169).

Muchos de sus efectos anti-inflamatorios-reguladores se originan por su acción sobre los monocitos y macrófagos, donde inhibe la expresión de MHC II y de B7-1/B7-2, e inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 y TNF alfa. Sin embargo ella actúa además sobre las células dendríticas de forma autocrina, inhibiendo la producción de quimoquinas y su tráfico a los nodos linfáticos, llevando al fallo en el reclutamiento y activación de los linfocitos vírgenes a linfocitos TH1. Actúa también sobre los linfocitos CD4+ directamente, inhibiendo su proliferación y producción de IL-2, IFN γ , IL-4, IL5 y TNF α (170).

Existen numerosos estudios en una amplia variedad de patógenos, incluyendo nemátodos, protozoos, bacterias, hongos y virus como HIV, Hepatitis, HSV, LCMV y MCMV; sobre el papel de la IL-10 en las infecciones; que indican que la resolución de una infección requiere de una respuesta coordinada, en la cual los mecanismo inflamatorios iniciales eliminen al patógeno, y luego ocurra un inmediato control por la IL-10 para evitar los daños inmunopatológicos (170). Entonces, el momento en que se liberan, las cantidades relativas y la duración de la liberación de las citoquinas pro y anti inflamatorias son puntos críticos en el control justo de la infección sin daños colaterales (171).

La IL-10 también es importante en el contexto de las células T reguladoras. Es producida por la subserie de Treg TR1 , junto al TGF β , también por las “TR1-like”, las cuales se generan en periferia a partir de

linfocitos vírgenes, tras la inducción de IL-2 y TGF β . La IL-10 producida por las diferentes subseries de Treg es particularmente importante en la respuesta a antígenos en las interfases con el medio ambiente, como intestino, pulmones y piel (172).

FoxP3. FoxP3 es un miembro de la familia de factores de la transcripción Fork-head/winged-helix y regulador por excelencia del desarrollo de las Treg y sus funciones (173). Se identificó inicialmente como un gen defectuoso de la cepa de ratón Scurfy, la cual es mutante recesiva ligada al cromosoma X que es letal en machos hemicigóticos, que mueren 1 mes después de nacidos exhibiendo hiperactivación de las células T CD4⁺ y sobreproducción de citoquinas pro-inflamatorias (174, 175). Mutaciones del gen humano FoxP3 son la causa del síndrome IPEX en humanos (desequilibrio inmunológico, poliendocrinopatía, enteropatía, ligado al cromosoma X) (176). Las células T reguladoras naturales son un linaje celular caracterizado por la expresión de FoxP3. Numerosos experimentos han demostrado el rol de este gen regulador de la transcripción en el desarrollo y funciones de las células T reguladoras. (177). Conceptualmente las funciones de las células T reguladoras son el control dinámico de la autoreactividad fisiológica y de la respuesta excesiva a patógenos. Sus mecanismos de acción incluyen la supresión dependiente del contacto celular (Treg, Th y célula presentadora de antígeno); la inhibición de la producción de IL-2 a nivel de ARNm por las T auxiliaoras (la acción de FoxP3 esta principalmente mediada por la supresión de la producción de IL-2) y la competencia por la IL-2 entre las Tregs y las T auxiliaoras, ya que las Tregs consumen aceleradamente toda la IL-2 por su elevada expresión de CD25. La falta de IL-2 induce apoptosis por ausencia de citoquinas en las T auxiliaoras (178). Otros mecanismos propuestos para mediar la acción local de las Tregs son el condicionamiento negativo de las células presentadoras de antígeno, al reducir la expresión de CD80/CD86, mediada por CTL-4; expresión de variante de membrana de TGF β , lisis directa por granzima B, secreción de IL-35 y alteración del ambiente metabólico (Inducción de CAMP). Para la TR1 y las TH3 el mecanismo de acción es mediado por IL-10 y TGF β (179).

La perforina y la granzima son moléculas mediadoras de citotoxicidad producidas por células con capacidad citotóxica, tanto de la inmunidad innata, células NK, como de la inmunidad adaptativa, linfocitos T, mayormente CD8⁺ (180, 181). Las células NK poseen gránulos preformados durante su desarrollo y su respuesta efectora de liberación de los mismos es rápida, en respuesta al balance entre señales activadoras o inhibitorias. Los linfocitos requieren de activación que induzca la síntesis de los gránulos, por lo que su respuesta citolítica es más lenta (182-184) . La perforina es crítica para la citotoxicidad mediada por gránulos presentes en las células NK y los linfocitos citotóxicos (185, 186). La

perforina es activada por la escisión de la región C-terminal en un proceso que requiere un entorno ácido (187). La perforina liberada de los gránulos líticos se polimeriza en un proceso dependiente de calcio (188), y es capaz de formar poros en las membranas lipídicas, permitiendo 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 serglicina, dificultando su entrada al citosol a través del poro (189-191). Se ha visto sin embargo que la granzima B puede penetrar a las células por un mecanismo perforina independiente y solo ejercer sus efectos cuando la perforina es adicionada al medio (192, 193).

La granzima B es el miembro más estudiado de las familias de las granzimas, y es un potente activador de la apoptosis de forma tanto dependiente como independiente de las caspasas (194). Es una aspartasa, que escinde detrás de los residuos de ácido aspártico, aunque la hidrólisis es dependiente de la interacción con una secuencia óptima de sustratos (195).

FasL: Es uno de los llamados “receptores de muerte”, otro de los mecanismos citotóxicos utilizados por los linfocitos Tc (196-198). Estos receptores son activados por miembros de la superfamilia del TNF como el TNF α (TNFSF1A), FasL (TNFSF6) y TRAIL (TNFSF10) conduciendo a una cascada de eventos intracelulares (199). 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 (200).

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 (201).

II.6 Patología de la FHD/SCD

II.6.1 Amplificación dependiente de Anticuerpos o fenómeno ADA

Existen varias observaciones epidemiológicas de peso, provenientes de Tailandia y Myanmar (202-204) y Cuba (7, 205), que describen la aparición de casos de FHD en individuos con anticuerpos contra un serotipo diferente del causante de la enfermedad, lo sugiere una infección primaria heteróloga

precedente. Estas observaciones que sustentan la hipótesis de fenómeno ADA (amplificación dependiente de anticuerpos) la cual plantea que durante una infección secundaria con serotipo heterólogo se formarían inmunocomplejos (IC) cuyos anticuerpos serían menos eficientes en la neutralización de la partícula viral (206, 207). Estos IC, como regularmente ocurre en otras interacciones antígeno-anticuerpo, serían internalizados, por las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos), al interactuar con los receptores Fc- γ tipo I (CD64) y II (CD32) en ellas presentes. Se favorecería, de esta manera, la diseminación viral, ya que estos IC entran a las células hospederas más rápido que los viriones no cubiertos (25, 208). Otras células contribuirían a la extensión de la infección, entre ellas otros fagocitos, ampliamente distribuidos en los tejidos (25, 209). Finalmente, como consecuencia de la lisis por efecto citopático del virus, o por interacción de las células infectadas con mecanismos efectores del sistema inmune, factores solubles son liberados al medio extracelular, los cuales están implicados en el desencadenamiento de la forma grave de la enfermedad (210-213).

Los anticuerpos contra las proteínas E y prM han sido capaces de amplificar la infección por el VD in vitro de manera dependiente de la concentración y no del serotipo. Además, los anticuerpos contra la proteína prM pueden amplificar la infección por una vía independiente de los Fc. El mecanismo que media este proceso es la unión específica dual de los anticuerpos anti-prM a antígenos propios y a la superficie del virión (214).

II.6.2 Selección de mutantes de escape a la neutralización.

Se especula que, tras una infección primaria, el repertorio de anticuerpos neutralizantes generados es capaz de eliminar la infección causada por un serotipo viral diferente en un tiempo aproximado de tres meses antes que, en los individuos por segunda vez infectados, tenga lugar el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa específica contra el agente viral. Esto se explica porque, como consecuencia del proceso de maduración de la afinidad, los anticuerpos generados en la primoinfección son capaces de reconocer determinantes antigénicos mayoritarios comunes en la superficie de la partícula viral del serotipo 2. De esta forma son eliminadas, en su mayoría, las partículas virales durante la segunda infección y, en consecuencia, los individuos desarrollan un cuadro clínico benigno o, en muchos casos, asintomático. Sin embargo, en otros casos partículas virales escapan a la neutralización, pues en el proceso de síntesis de sus proteínas estructurales, no son expresados aquellos determinantes comunes al serotipo causal de la primoinfección. Cuando son transmitidas, y de forma mayoritaria se multiplican en otros individuos con igual historia primaria de infección y por tanto con igual repertorio de anticuerpos

neutralizantes, son capaces de desarrollar en éstos el cuadro más severo de la enfermedad. Los anticuerpos predominantes en dichos individuos son, por tanto, anticuerpos que al no poder neutralizar la infección, por medio de su porción Fc se unen a diferentes tipos celulares donde encuentran los receptores correspondientes y, de esta forma, se desarrolla el proceso de ADA (215).

II.6.3 Activación del Complemento

La activación del complemento también pudiera estar involucrada en la patogénesis de la filtración capilar en la FHD, siendo otra de las manifestaciones clínicas más importantes. La cascada del complemento podría ser activada por los complejos inmunes formados por los virus circulantes y los anticuerpos específicos contra estos, y de hecho se ha reportado que los niveles de C3a y C5a se correlacionaron con la severidad de la FHD, alcanzando el pico máximo en el momento de la defervescencia, cuando la extravasación de plasma resulta mas evidente (216). Se han descrito niveles elevados de NS1 y anticuerpos pre-existentes de reacción cruzada pueden también mediar la activación del complemento (217, 218), y los monocitos y las células endoteliales pueden activar tanto la vía clásica como la alternativa (155).

II.6.4 Respuesta de células T de memoria de reactividad cruzada y producción de citoquinas.

El estudio de la respuesta de células T al VD ha mostrado evidencias de la participación de éstas en la inducción del cuadro severo de la enfermedad (209). Varios estudios avalan la hipótesis sobre la activación de linfocitos T y la producción de citoquinas como factores importantes en la patogénesis de la FHD. Diferentes autores han encontrado altos niveles de $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ e $IL-2$ asociadas a cuadros de FHD (219), así como altos niveles de receptores CD8 y CD4 solubles y receptores de $IL-2$ en niños con FHD (219-221).

¿Cómo pueden relacionarse la reactividad cruzada, la acción citotóxica y la producción de citoquinas de las células T $CD4+$ para producir el fenómeno inmunopatológico? Después de la infección primaria, existen clones de memoria de linfocitos T $CD4+$ y T $CD8+$ cuyos niveles de activación se han visto aumentados en individuos con FHD durante el transcurso de la infección secundaria. Las células T $CD4+$ pueden inducir el fenómeno inmunopatológico a través de dos mecanismos: la citotoxicidad y/o la liberación de citoquinas. La activación del primero de ellos puede, a su vez, cursar dos caminos: la liberación de perforinas y granzimas de las células citotóxicas sobre la célula infectada o la interacción del FasL sobre la célula T con la molécula Fas sobre la célula blanco. Estudios *in vitro* muestran que, cuando

se activa la vía Fas/FasL, la lisis tiene lugar no solo sobre las células infectadas, sino también sobre las células vecinas que no han estado aún expuestas al virus y que, en sus membranas expresan la molécula de Fas, contribuyendo con la amplificación de la enfermedad. Algunas de las células de la respuesta inmune y las células endoteliales también pueden afectarse por este mecanismo. En este último caso ocurriría la extravasación de plasma y el choque, eventos que caracterizan a la FHD (133). En el segundo de los mecanismos, como consecuencia de la activación de los linfocitos de memoria T CD4+ con reactividad cruzada ante la infección con un serotipo viral heterólogo, secretan citoquinas como las ya mencionadas (IFN γ , TNF α y TNF β), las cuales han sido detectadas en altas concentraciones en el plasma de individuos con FHD (133). El IFN γ incrementa la expresión de receptores Fc γ en los monocitos, lo cual pudiera explicar el aumento de la infección de éstas células por los complejos virus-anticuerpos (222). El TNF α junto a otras citoquinas como la IL-6 y la IL-8, incrementan la permeabilidad de las células endoteliales e inducen la pérdida de plasma (218, 223, 224). Las IL-6 y 8 tienen un papel dual ya que actúa como molécula pro-inflamatoria y anti-inflamatoria e incrementa la permeabilidad de las células endoteliales. Niveles elevados de la misma son encontrados en los sueros de pacientes con FHD/SCD (131, 132).

Similar asociación con la severidad de la enfermedad ha sido mostrada para la expresión de marcadores de activación en las células T CD8+ y la expansión de poblaciones de estas células específicas a epítopes del VD. Las células T CD8+ específicas lisan otras células infectadas con el virus por mecanismos dependientes de perforinas causando la lisis de células circundantes no infectadas (24, 225).

Resumiendo, ante una infección secundaria heteróloga por dengue ocurre un incremento en el número de células infectadas por virus dengue debido al fenómeno ADA. Estas células se activan y liberan grandes cantidades de citoquinas y mediadores químicos, a la vez que presentan antígeno y estimulan a los linfocitos de memoria de reactividad cruzada CD4+ y CD8+. Estos linfocitos, en ausencia de una respuesta regulatoria de controls adecuada, producen también niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias. El efecto sinérgico entre citoquinas pro-inflamatorias y proteínas activadoras del complemento en las células endoteliales conllevan la pérdida de plasma y el choque (213).

II.6.5 Mimetismo Molecular

Otra hipótesis relaciona el fenómeno de reactividad cruzada entre proteínas del virus y aquellas pertenecientes a la cascada de la coagulación. Plantea la existencia de una homología estructural entre una secuencia conservada de la proteína E de los flavivirus y ciertas secuencias de factores de la cascada de la

coagulación, específicamente el plasminógeno y su activador, que pudieran estar vinculadas con la aparición del cuadro hemorrágico (226). Se ha podido constatar por análisis computarizado que existe una región de 20 residuos de aminoácidos de la proteína E del serotipo 4 del VD que tienen similitud con una familia de factores que incluyen al plasminógeno, primer mediador de la fibrinólisis, y otros como el factor X, protrombina y el activador del plasminógeno (227).

La actividad de la plasmina, forma activa del plasminógeno, está modulada fisiológicamente por un antagonista, α 2 antiplasmina, que se une a la serina del sitio activo en el complejo plasminógeno/plasmina. Se plantea que los anticuerpos producidos ante la infección por VD4, específicos a la proteína E, reconocen una secuencia similar en el plasminógeno, provocando un impedimento estérico que bloquea la unión del antagonista, lo cual constituye una hipótesis posible de la alteración hemostática en pacientes con anticuerpos de reactividad cruzada (228).

Una mayor destrucción de las plaquetas o una disminución en su producción pudieran ser la causa de la trombocitopenia. En este sentido, se ha detectado la presencia de complejos virus-anticuerpos en la superficie de las plaquetas de pacientes con FHD, lo que sugiere que la respuesta inmune desempeña algún papel en la destrucción de las plaquetas. En este sentido, se ha encontrado la presencia de anticuerpos IgM de reactividad cruzada contra las plaquetas en los sueros de pacientes con FHD que podrían causar lisis de estas y por tanto estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad (229).

II.6.6 Virulencia Viral

Otros autores han considerado que las formas graves de la enfermedad son el resultado de la infección por cepas muy virulentas de los virus del dengue (230, 231). Tales cepas podrían ser originadas en circunstancias de hiperendemicidad y circulación concomitante de múltiples serotipos virales y presentar mutaciones producto de sucesivas replicaciones en hospederos filogenéticamente tan distintos, como hombre y artrópodo. Según esta hipótesis no sería necesaria una infección previa para desarrollar FHD/SCD. En tal sentido existen ejemplos, aunque escasos, de epidemias severas ocurridas en poblaciones primo infectadas (230, 231). Ciertamente, existen algunas evidencias que apuntan hacia la existencia de cepas con mayor o menor potencial virulento. Un ejemplo es la cepa de DV2 (Genotipo Americano) que provocó la epidemia de Iquitos, Perú en 1995 en una población inmune a DV1 y no se reportó un solo caso de DHF (232, 233). Por el contrario la epidemia Cubana de 1981, provocada igualmente por una cepa de DV2, pero Genotipo Asiático, en el mismo contexto inmunológico (personas inmunes a DV1) ocasionó una epidemia extremadamente severa (13).

La virulencia de ciertas variantes virales puede estar ligada a determinantes genéticos. Una mutación en una región precisa del gen que codifica para la proteína E, asegura la atenuación o el incremento de la virulencia de una cepa dada, por lo que la aparición de cuadros clínicos graves se asocia con determinadas cepas virales o mutantes de estas.

Leitmeyer y colaboradores (234) encontraron diferencias estructurales entre cepas de DV2 de origen asiático y americano que pueden tener influencia sobre la virulencia y/o la patogenicidad de estas cepas. De acuerdo con las evidencias encontradas por estos autores (234), los determinantes principales de la severidad se encuentran en el aminoácido 390 de la proteína E que puede afectar la unión a la célula hospedera; los nucleótidos del 68 al 80 del lazo de la región 5' no codificadora, que podrían estar involucrados en la iniciación de la traducción; y en los primeros 300 nucleótidos de la región no codificadora 3', que pudieran participar en la regulación de la replicación viral.

De esta forma se postula que los virus del dengue del genotipo Americano podrían replicarse pobremente in vivo produciendo una enfermedad poco severa. Otros estudios apoyan esta hipótesis comprobando que un cambio en el aminoácido 390 de la proteína E afecta la neurovirulencia en ratones (235). Adicionalmente, Pryor y colaboradores (236) construyeron un dengue 2 recombinante con sustituciones en el residuo 390 de dicha proteína. La sustitución de N (genotipo Asiático) por D (genotipo Americano) resultó en una disminución en la habilidad para replicarse en monocitos humanos. Por otra parte, empleando un clon infeccioso de dengue, en el cual se sustituyó el aminoácido 390 se comprobó que dicho cambio tenía influencia sobre la replicación viral en monocitos humanos y células dendríticas (237). Otros estudios recientes sugieren que hay diferencias en la habilidad de algunas cepas virales para unirse e infectar células diana y en su capacidad para generar una mayor progenie viral in vitro (238). Por otra parte, una mayor carga viral en las etapas iniciales de la infección viene aparejado con las formas más severas de la enfermedad, lo que podría estar dado por factores virales (239). Por otra parte, determinadas secuencias de infección han sido correlacionadas con el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. La infección secuencial VD1-VD2 o VD1-VD3 ha sido asociada con epidemias de FHD (13, 240-243).

II.6.7 Hipótesis Integral

La hipótesis integral planteada por Kourí, es la hipótesis más completa pues plantea al dengue como un fenómenos inmunopatológico multifactorial donde deben ser integrados múltiples factores para su comprensión: los factores relacionados con el virus (serotipo y virulencia de la cepa), los factores epidemiológicos (vector e intervalo entre infecciones) y los factores de riesgos individuales, que incluyen,

además de la respuesta inmune, otros factores de gran importancia como la edad, el género, el estado nutricional, la presencia de enfermedades crónicas, y los factores genéticos, entre ellos la raza, los que, como consecuencia de su interacción, conllevan al desarrollo de la forma grave de esta enfermedad (5, 6).

II.7 Factores de riesgo individuales

Los factores de riesgo individuales tales como el sexo, la raza, la edad, estado nutricional, las enfermedades crónicas como asma, diabetes y anemia drepanocítica hacen la enfermedad más frecuente en ciertos grupos poblacionales (17, 244, 245). Adicionalmente, la pequeña proporción de personas que, tras una infección secundaria heterotípica, desarrollan la formas graves de la enfermedad (202), así como las diferencias en la incidencia de la FHD entre sujetos de diferentes grupos étnicos (10, 12, 17, 205, 242, 246-250) evidencian que la individualidad juega un papel en el mayor o menor riesgo a desarrollar FHD/SSD.

II.7.1 Estado nutricional

Se ha descrito que niños que padecen moderada malnutrición proteico energética no desarrollan FHD/SCD (251-253). Esta observación se ha explicado a partir de que la FHD una enfermedad inmunopatogénica, donde una respuesta inmune intensa y descontrolada es responsable de los síntomas y signos que se presentan. En estos niños ocurre una supresión de la respuesta inmune, tanto por el déficit de proteínas como de micronutrientes como la vitamina A, los retinoides y el hierro son esenciales para la respuesta inmunes (254-260). Los niños con severa malnutrición tienen un riesgo mayor al choque por dengue que los niños bien nutridos debido al menor volumen plasmático y de fluidos extracelulares (261), por lo que desarrollan choque mas rapidamente con una menor extravasación de plasma. Los niños obesos también un mayor riesgo de desarrollar choque y complicaciones inusuales al enfermar por dengue, ya que suelen necesitar un mayor volumen de fluidos intravenosos, y es difícil calcularlo, por lo que suelen complicarse por administración excesiva de fluidos. En estos pacientes se ha descrito mayor frecuencia de encefalopatías e infecciones asociadas. Los casos fatales tambien son mayores en pacientes malnutridos por exceso o por defecto que en niños con un estado nutricional adecuado (253).

II.7.2 Edad

La FHD se ha presentado principalmente como una enfermedad de la niñez en el sudeste Asiático (262). El compromiso de la respuesta inmune en los primeros años de vida por inmadurez funcional

del sistema inmune pudiera influir en este comportamiento, causando una respuesta no eficiente que propicie un cuadro inmunopatogénico (263, 264).

Las epidemias ocurridas en Cuba demostraron que la mayor incidencia de las formas graves de la enfermedad en niños se manifiesta sólo si todos los grupos de edad expuestos tienen iguales antecedentes de inmunidad a dengue. Durante la epidemia de dengue 2 ocurrida en 1981, donde casi un 50 % de la población poseía Acs al serotipo 1 tras la epidemia causada por este serotipo en 1977, fueron los niños el grupo etáreo más afectado por FHD/SCD. Sin embargo, durante la epidemia de 1997 por dengue 2, donde el factor de riesgo que implicaba la presencia de Acs anti dengue 1 adquiridos durante la epidemia de 1977 solo estaba presente en adultos, todos los casos que desarrollaron FHD/SCD se presentaron en este grupo (265).

En ancianos una mayor fragilidad capilar y tendencia al sangramiento pudiera hacerlos especialmente susceptibles a la FHD (266).

II.7.3 Género

Respecto a la distribución de la enfermedad por dengue por género, en la literatura se muestran resultados controvertidos. Los estudios sobre epidemias en Cuba refieren que el género femenino es más propenso a las formas graves de la enfermedad por dengue (12, 17, 265). Estudios más recientes en población Colombiana coinciden con esta observación (267).

Hay evidencias de que la respuesta inmune femenina es más competente que la masculina lo que puede resultar en una mayor producción de citoquinas (268). Desde los años 70, Halstead ya había planteado que la mayor afectación del género femenino se debía a una mejor capacidad de respuesta inmune ante el virus y por ende mayores posibilidades de complicaciones. Además el sistema de capilares en las mujeres es más propenso a aumentar la permeabilidad que el de los hombres (269, 270). Varios autores han descrito, por el contrario, una mayor incidencia de las formas clínicas más severas en el género masculino, sobre todo en países de Sudamérica y Sudeste Asiático (271-274). Ooi y colaboradores ha tratado de explicar este hecho argumentando que son muchos más los hombres que trabajan fuera de la casa, que las mujeres (275), sin embargo, estudios serológicos retrospectivos han mostrado una mayor seropositividad entre amas de casa, retirados y desempleados, lo cual se explica al ser, el vector, un mosquito doméstico (273).

Los factores que determinan una mayor incidencia de la enfermedad en uno u otro género aún requieren ser investigados.

II.7.4 Enfermedades crónicas

El asma bronquial, la anemia falciforme, y la Diabetes mellitus se han reconocido como factores de riesgo para la FHD en las epidemias cubanas causadas por dengue 2 y dengue 3 (17, 89, 250). Guzmán y cols. reportaron la habilidad aumentada de las CMSP de asmáticos para amplificar la infección por el virus dengue 2 en condiciones de ADA (en presencia de anticuerpos anti-dengue 1) al compararse con un grupo control (245).

La asociación entre Diabetes y la Sickleemia con el dengue hemorrágico ha sido explicada por Limonta y cols. a partir de las afectaciones vasculares que tienen de base los pacientes que padecen estas enfermedades crónicas, pudiendo condicionar una mayor propensión a las complicaciones en el curso de la infección por dengue (276, 277).

También fueron muy susceptibles a hemorragia pacientes con úlcera péptica y mujeres en período menstrual (13, 17, 89, 245, 276, 278-281).

II.7.5 Factores Genéticos

Los factores genéticos no han sido lo suficientemente estudiados en la infección por dengue. Sin embargo su papel en el desarrollo de las FHD puede ser inferida a partir de la pequeña proporción de personas inmunes a dengue que desarrollan FHD ante una infección secundaria heterotípica (214, 511), así como las diferencias entre grupos étnicos en el riesgo a desarrollar las formas graves de la enfermedad por dengue (17, 89, 282, 283).

II.7.5.1 HLA clase I

Existen varios reportes sobre la asociación de las diferentes variantes polimórficas de los genes HLA clase I con el riesgo o protección a desarrollar FHD. Chiewsilp y cols. fueron los primeros en describir asociación entre los genes HLA clase I y la severidad a la infección por dengue, al mostrar una asociación positiva para HLA-A2 y una negativa para HLA-B blanco (284). El segundo reporte provino del análisis de la epidemia cubana de FHD ocurrida en 1981, a partir de cuyo análisis Paradoa Pérez y cols. determinaron la frecuencia de antígenos HLA en 82 pacientes cubanos con FHD/SCD. Los antígenos HLA-A1, HLA-B blanco, HLA Cw1 y HLA-A29 mostraron una frecuencia significativamente mayor en el grupo de los pacientes, comparados con el grupo control (285). Un estudio subsiguiente realizado en población brasileña no reportó asociación de ninguno de los 55 alelos HLA clase I estudiados con susceptibilidad a FD.

Posteriormente un estudio caso-control de 263 pacientes tailandeses infectados con DV1, DV2, y DV3 o DV4, encontró asociación de HLA clase I con infección secundaria, pero no en primarios. HLA-A*0203 resultó asociado con FD, independiente del serotipo causante de la infección secundaria, y HLA-B*52 se asoció a FD en pacientes con infección secundaria por DV1 y DV2. Además, HLA-B*44, B*62, B*76 y B*77 resultaron ser protectores contra el desarrollo de enfermedad tras la infección secundaria. Los alelos A*0207 y HLA-B*51 mostraron asociación con FHD en pacientes con infección secundaria por dengue 1 y dengue 2. Todos los resultados confirman que los alelos HLA clase I están asociados con la severidad de la enfermedad por dengue (286).

II.7.5.2 HLA clase II

A diferencia de la asociación a las formas graves de la enfermedad descrita para los alelos HLA clase I, los alelos HLA clase II parecen estar asociados a protección. Estudios llevados a cabo en México en pacientes con infección por dengue mostraron que individuos homocigóticos para HLA-DBB1*04 eran 11.6 veces menos susceptibles a desarrollar FHD que las personas que no presentaban ese alelo. Estos datos sugieren que este alelo parece jugar un papel protector en población Mexicana (287). Loke y cols. no encontraron asociación del alelo HLA-DRB1 al desarrollo de FHD en población vietnamita (288). Otro estudio de 14 especificidades para el HLA-DR y 4 para HLA-DQ en población brasileña mostró una asociación positiva de HLA-DQ1 con el desarrollo de FD (289).

II.7.5.3 HLA clase III

Los genes en la región HLA clase III codifican para un número de proteínas incluyendo proteínas del complemento (C4A, C4B, C2 y Bf), TNF α y TNF β y proteínas de choque térmico (290). Loke y cols. estudiaron la posible asociación de polimorfismos en el gene codificador para TNF α al desarrollo de FHD en población vietnamita, no encontrando ninguna asociación (288). En contraste Fernández-Mestre y cols. estudiaron el polimorfismo de un único nucleótido de TNF α , IFN γ , IL-6, IL-10 e IL-10 en pacientes con infección por dengue y reportaron un predominio del alelo TNF-308A en pacientes con FHD (291).

II.7.5.4 Factores genéticos no HLA

Existen algunos estudios sobre la asociación entre la FHD y genes polimórficos no HLA. Loke y cols. encontraron un significativamente menor número de casos de FHD en personas homocigóticas para la variante arginina en la posición 131 del gen Fc γ RIIA (292).

Estos mismos autores describieron asociación de la variante timina en la posición 352 del receptor de vitamina D asociado a protección contra FHD, aunque los mecanismos exactos necesitan aun ser explorados (292).

La molécula DC-SIGN1, (del inglés Dendritic Cell-specific ICAM-3 grabbing non integrin), un receptor de unión a virus dengue, es esencial para la infección productiva de células dendríticas (293). Sakuntabhai y cols. han reportado una asociación entre el alelo G de la variante DCSIGN1-336 y protección contra FD en tres cohortes diferentes de población tailandesa (294).

La variante 308 A, del gen del TNF α se ha descrito asociado a la FHD en población venezolana (291).

La variante alélica 665 THR/ALA, del gen de la molécula TAP2, implícita en el procesamiento antigénico por vía endógena, se ha descrito asociada a la forma grave de enfermedad por dengue, FHD (295).

II.7.6 Raza

Tan tempranamente como en el 1906, el Dr. Agramontes, un reconocido clínico cubano, reportó que los individuos de color de piel negros tenían una marcada resistencia contra el desarrollo de enfermedad grave por dengue (16), sin embargo, no fue hasta la epidemia de dengue hemorrágico/síndrome de choque por dengue ocurrida en Cuba en 1981 que la raza fue reconocida por primera vez como un posible factor de riesgo para el desarrollo de las formas severas de la enfermedad por dengue (17, 205, 296). En esta epidemia, una proporción significativamente mayor de blancos desarrolló FHD/SSD (tabla 1). De 124 niños con un diagnóstico serológico confirmado, 86 % fueron blancos, 7% fueron mulatos y 7% fueron negros. De 104 adultos con FHD/SSD grado II y III, 81% fueron blancos, 13% fueron mulatos y 6% negros. El número de casos fatales también fue significativamente mayor en blancos que en negros. De 72% casos fatales en niños, 86% fueron blancos, 11% fueron mulatos y solo 3% negros. De 26 casos adultos 77% fueron blancos, 14% fueron mulatos y 9% negros. Al comparar estos datos con la composición racial de la población cubana en 1981 (66.1% blancos, 21.9% mulatos y 12% negros) observamos que la morbi-mortalidad en esta epidemia fue significativamente mayor en blancos que en negros. Por cada persona negra con FHD/SSD hubo 5.5 blancos y 1.8 mulatos, resultando en una incidencia de enfermedad severa por dengue en blancos significativamente mayor que en negros (13, 17). Los casos fatales tuvieron un comportamiento similar. De 72 casos fatales en niños el 86% fueron blancos, 11% mulatos y 3% negros. De los 26 fallecimientos en adultos el 77% fueron blancos, 14 % mulatos y 9% negros. Cuando se comparan estas cifras con la composición racial de la población cubana

en 1981 (66.1% blancos, 21.9% Mulatos y 12% negros) (297), se puede observar que los blancos están sobre-representados en términos de morbilidad y mortalidad comparados con los negros. Por cada persona de raza negra con FHD/SSD hubo 5.5 blancos y 1.8 mulatos, resultando en una significativamente mayor incidencia de enfermedad severa entre los blancos comparados con los negros (17).

La epidemia de dengue 2 ocurrida en el municipio de Santiago de Cuba en 1997 también mostró una mayor frecuencia de FHD en sujetos blancos que en negros. De 169 casos de FHD/SSD donde se precisa la raza, el 46,1% eran blancos, el 36,2% mestizos y sólo el 16% negros. Según estos datos la población blanca tiene una probabilidad 2,57 veces mayor que la población negra de padecer la forma severa de la enfermedad y 1,8 veces con respecto a la mestiza. Entre los fallecidos se observó un predominio de los mestizos (58,3%), seguido por los blancos (24,9, 29,8). Sólo hubo un fallecido de la raza negra (8,3%), el cual sufría de anemia de células falciformes. Al comparar la composición racial de la municipalidad de Santiago de Cuba con la morbilidad y la mortalidad por dengue, los negros constituyeron significativamente la minoría de los casos (10, 24,2, 25,0, 29,9).

En brote de dengue 3 ocurrido en el 2001 en Ciudad de la Habana se confirmaron 76 casos de FHD/SSD, siendo el 62% blancos, el 21% mulatos y el 17 % negros. De estos 76 casos 18 desarrollaron SSD, la forma clínica más severa, de ellos el 83% fueron blancos, 6 % mulatos, y 11% negros (12, 300). Resulta de interés que los 2 únicos casos fatales ocurridos en negros tenían historia de anemia de células falciformes y asma bronquial, respectivamente, ambas enfermedades crónicas asociadas a la forma severa de dengue. Esto coincide con observaciones similares hechas en las epidemias por dengue 2 ocurridas en 1997 y 1981.(81, 89, 249).

Un estudio de laboratorio complementó estas observaciones epidemiológicas sobre la relación de la morbilidad y mortalidad por FHD/SSD. Morier y colaboradores estudiaron la amplificación de la infección por virus dengue 2, dependiente de anticuerpos a dengue 1, en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de individuos cubanos de raza blanca de origen hispánico, y en individuos de raza negra. Los virus no se multiplicaron en los cultivos de CMSP de los sujetos de raza negra, ya fuera en presencia o ausencia de los anticuerpos, sin embargo, se observó una intensa replicación del virus en las células de los individuos de raza blanca en presencia de los anticuerpos a dengue 1. (301)

Estos resultados resultan de gran interés, a la luz de las observaciones epidemiológicas hechas en Cuba y Tailandia, así como otras evidencias experimentales que apoyan la amplificación de una infección

secundaria heterotípica por dengue por anticuerpos sub-neutralizantes generados tras una infección primaria (213, 302, 303).

Las observaciones epidemiológicas y de laboratorio sobre el papel de la raza en el desarrollo de la FHD/SSD resultan de gran interés, si consideramos que las diferencias observadas en el riesgo a la FHD entre los diferentes grupos raciales en Cuba coincide con los escasos reportes de FHD en África y el Caribe. Aunque el dengue ha sido documentado en 19 países africanos y el virus ha sido repetidamente aislado, existen solo reportes esporádicos de enfermedad por dengue, y casi en su totalidad en población no nativa (39, 68, 304-308). Durante la epidemia de dengue 2 ocurrida en Senegal en 1990, el cuadro de FHD fue observado solo en emigrantes franceses. Una observación similar fue hecha durante la epidemia de dengue 3 ocurrida en 1985 en Mozambique, donde los casos fatales fueron de origen asiático (309-311). Adicionalmente, los brotes de dengue que han ocurrido en la costa este de África desde Mozambique hasta Somalia y en las islas Seychelles han cursado con manifestaciones clínicas leves (312). La incidencia de FHD/SSD es también notablemente baja en países caribeños donde la población es mayoritariamente (283, 313). La ausencia de FHD a pesar de la transmisión hiperendémica de dengue en Haití contrasta con la alta incidencia de este cuadro en países del Sudeste Asiático. Los niveles promedio anuales de infección por dengue en Puerto Príncipe, Haití son un 30% mayor que los reportados en Yangon, Myanmar. Con los factores virales claramente presentes debía esperarse cientos de casos de FHD/SSD en Haití, sin embargo, ningún brote o casos esporádicos de FHD/SSD han sido reportados. En Myanmar, por el contrario el número de casos de FHD y de muertes por esta causa son elevados, a pesar de la menor circulación del virus (283).

II.8 Orígenes de la población cubana

Cuba se encontraba cercana a los cayos de la Florida y las Islas Bahamas al inicio del período Holoceno, en el que el nivel del mar era menor (314). Esto implica que la inmigración de los pobladores de la cultura Mississippi, cruzando el estrecho de la Florida era posible. De hecho, los primeros sitios arqueológicos in Cuba datan de 4000 años AC y se ha determinado pertenecen a las poblaciones Meso-Americanas de aborígenes Cazadores-Recolectores provenientes de la Península de Yucatán que pueden haber accedido a la isla por rutas que incluyen la Florida. Posteriormente, 2000 años AC, pobladores Recolectores-Agricultores primitivos provenientes del norte de Sudamérica invaden el Caribe, incluyendo Cuba. Estas 2 culturas aborígenes conviven por largo tiempo en la Isla hasta el arribo, 500 años AC, de otros pobladores de la cultura Arawak, provenientes de Sudamérica, del territorio que ahora ocupa Venezuela,

quienes introdujeron la cerámica y tecnologías avanzadas de agricultura y se diseminaron rápidamente por toda la isla (315). Cuando Colon arribó, en el 1492 DC, muchos clanes o tribus de compleja organización convivían en la isla agrupados de manera general por el padre Bartolomé de las Casas en Siboneyes pre-Agricultores y Taínos Agricultores, estos últimos hablantes del idioma Arawak. Otras tribus guerreras antropófagas vivían en las pequeñas Islas de las Antillas y eran consideradas como una amenaza por los otros grupos amerindios del Caribe (314). Los Siboneyes cubanos vivían mayormente en la parte occidental de la Isla y los Taínos se encontraban diseminados por toda la isla. A su llegada los españoles establecen las “encomiendas”, que eran pedazos de tierra y grupos de aborígenes que pertenecían a un propietario español, quienes empleaba los aborígenes como esclavos (316). Poco tiempo después los amerindios cubanos fueron desapareciendo por las condiciones de esclavitud, la guerra contra los españoles en condiciones muy desventajosas, y las enfermedades traídas por los españoles, principalmente viruela, sarampión, influenza y fiebre amarilla (315). Los reyes de España, presionados por el padre Bartolomé de las Casas, y temerosos por el decrecimiento de la población aborigen dictaron leyes en 1452 en orden de detener las catastróficas condiciones de vida de los amerindios, pero nunca fueron cumplidas por los españoles residentes en la isla (316). Desde el punto de vista étnico, el violento impacto de la conquista hispánica sobre la población amerindia insular, asentada durante milenios en este Archipiélago, redujo el monto global estimado de habitantes, desde unos 112000 en el momento de su encuentro con el Viejo Continente a sólo 3 900 en 1555; es decir, 3,48% de la población inicial, en menos de medio siglo. De modo que este componente étnico no desempeñó un papel demográfico significativo al quedar en sus inicios concentrado en los reductos de Guanabacoa, La Habana, y principalmente en Jiguaní, El Cobre y El Caney en las actuales provincias Gramma y Santiago de Cuba, respectivamente; o disperso en áreas de difícil acceso como la parte montañosa de Guantánamo, donde aún se encuentran descendientes cubanos de muy antiguos amerindios, ya mezclados con la población local. Sin embargo en varios archivos parroquiales aparecen registrados indios hasta muy entrado el siglo XIX --período en que la mayoría de los historiadores los dan por extinguidos--, sobre todo, los residentes en Jiguaní, Bayamo, El Caney, Baracoa y Holguín (321-323).

En relación con los componentes hispánicos de la población cubana en su sentido geográfico y meta-étnico, provienen de la España peninsular e insular y de los principales pueblos que la habitan. El español es el mayoritario y ocupa históricamente el área Norte, Centro y Sur, en las regiones de Asturias, Castilla (la Vieja y la Nueva), León, Extremadura, Aragón, Andalucía, Murcia, así como parte de Valencia y Navarra, con independencia de las particularidades regionales. El catalán habita el área nororiental, en las

regiones de Cataluña, la mayor parte de Valencia, las Islas Baleares y un grupo poco numeroso en Aragón. Los gallegos habitan el área Noroeste de España, en la región histórica de Galicia y otros grupos menos numerosos en las áreas vecinas de Asturias y León. Los vascos habitan en el Norte, en el área occidental de Los Pirineos, en el territorio de las actuales provincias vascongadas (Alava, Guipúzcoa y Vizcaya), así como la mayor parte de Navarra y parte del extremo Sur de Francia. Los canarios, cuya etnogénesis ha sido el resultado de complejos procesos migratorios, de múltiples influjos culturales del Norte de África y de Europa Mediterránea, habitan las siete islas mayores que se encuentran en la parte noroccidental del continente africano (Hierro, La Palma, Gomera, Tenerife, Gran Canaria, Fuerteventura y Lanzarote) (311-314).

El componente Africano de nuestros ancestros procede de grupos humanos procedentes del África occidental sud-sahariana durante la trata esclavista, pertenecientes a múltiples etnias, vinculadas en el habla con la familia Nigero-cordófana, que en Cuba son conocidas mediante diversas denominaciones metaétnicas (arará, carabalí, congo, gangá, lucumí, mandinga, mina y otras), relacionadas con topónimos e hidrónimos de sus lugares de asentamiento, captura, concentración y venta, que, a su vez, abarcan diversos etnónimos y denominaciones étnicas. Más de 9 millones de personas fueron traídas desde África para trabajar en las plantaciones de azúcar de la isla (317, 318).

En la formación de la etnia cubana, fueron importantes las migraciones del área sub-peninsular e insular de España (Andalucía e Islas Canarias principalmente), durante los siglos XVI al XVIII (319, 320), y las migraciones forzadas de la región occidental de África sub-sahariana (sobre todo, los pueblos bantú hablantes y, luego, los yoruba), cuya entrada masiva tiene su apogeo durante la primera mitad del siglo XIX, tras el cese “legal” de la trata esclavista (321). Ambos conglomerados multiétnicos, los de España (canarios, catalanes, españoles, gallegos y vascos, principalmente) y los de África occidental sub-sahariana (achanti, bacongo, bambará, fulbé, ibibio, ibo, malinqué, yoruba y muchos otros) se fusionaron tanto por separado (interhispánicos e interafricanos) como entre ambos (hispánicoafricanos), de manera que desde el siglo XVI se va formando una población endógena no dependiente sólo de la migración externa, sino de su propia capacidad reproductiva (322). Tanto los componentes español-canario como bacongo-ambundo/ibo-ibibio/wolof/achanti-fanti/ewe-fon desempeñaron un significativo papel primario en la formación de un sustrato genético y cultural no amerindio que asumió su desarrollo demográfico. La presencia posterior y masiva de gallegos, catalanes, yoruba, malinqué, entre otros, amplió el espectro hispánico y sub-sahariano de la población, ya existente en Cuba (323-325).

Debido al estallido revolucionario de Haití, desde el último decenio del siglo XVIII hasta los primeros

años del siglo XIX, se efectúa un importante flujo de inmigrantes franceses y franco-haitianos --población nacida en Haití, portadora de rasgos africanos y franceses transculturados en el nuevo contexto histórico-social--, quienes se asientan sobre todo hacia la parte sudoriental de la Isla (326, 327).

Desde mediados del siglo XIX, son incorporados al caleidoscopio étnico de la Isla diversos componentes asiáticos, procedentes en su mayoría del Sur de China y Filipinas, en calidad de contratados y, más tarde, varios miles de chinos, provenientes de California se asientan en áreas urbanas de la parte occidental de Cuba (328), aunque su contribución étnica es escasa, si se compara con la española y la africana.

El advenimiento del siglo XX, junto con la crisis económica y demográfica, generada por la guerra de 1895-1898, abre las puertas a la inmigración masiva, sobre todo, hispánica y antillana, en condiciones tan onerosas como el siglo pasado, especialmente, para los inmigrantes pobres que tratan de abrirse paso sólo con su mano de obra. Durante las tres primeras décadas del siglo XX, Cuba se convierte en centro receptor de una fuerte corriente migratoria (329). En el transcurso de esos años, arriban al país cerca de 1200000 inmigrantes, quienes influyen de forma decisiva en el crecimiento demográfico de la Isla que, arrasada por la guerra, tiene en 1899 sólo 1 572 797 habitantes. A partir de los años veinte, se acelera el proceso de deterioro y crisis de la economía cubana (330). Por primera vez, los componentes haitiano y jamaicano superan las cifras anuales de inmigrantes procedentes de otros países, pues su presencia deviene indispensable para una política económica destinada a depreciar los salarios y abaratar los costos de producción por esta vía (331). Desde 1926, comienza a disminuir de forma ostensible el monto de la inmigración. El deterioro de la economía, la disminución de la producción azucarera con la consecuente extensión del llamado “tiempo muerto” y el incremento del desempleo, conducen a que, en 1933, se decreta la repatriación forzosa de extranjeros por constituir una carga para el Estado cubano, medida que mucho afectó a los haitianos, obligados por la fuerza a regresar a su patria. Se cierran las puertas a una inmigración económica, favorecida y estimulada hasta aquel momento, pero ahora sin posibilidades de empleo en el país, inmerso en una grave crisis socioeconómica (332). Durante toda esta etapa, el componente hispánico mantiene un flujo constante y mayoritario, favorecido por diversos factores. La similitud de costumbres, lengua, educación y religión, la presencia en Cuba de una poderosa colonia española, con importantes relaciones económicas y políticas, más la dispersión a todo lo largo de la Isla, de familiares, amigos, conocidos o simples coterráneos, se conjugó con una legislación inmigratoria favorable (333). En importancia numérica le siguen los componentes haitiano y jamaicano. Su concentración en las regiones azucareras y cafetaleras de las antiguas provincias de Oriente y Camagüey, el

color negro de su piel, las diferencias de idioma y costumbres y las condiciones infrahumanas de vida a que son sometidos, da un nuevo sesgo a las características de esta inmigración en el siglo XX. Mas, durante estos 30 años de vida republicana, también arribaron al país otros componentes étnicos, que si bien no constituyeron una aporte étnico determinante, entraron en la cazuela del “ajíaco cubano” para agitarse, si empleamos el símil de Fernando Ortiz, para entremezclarse y disgregarse en un mismo bullir social (334, 335).

De una Europa convulsionada por la Primera Guerra Mundial y llena de temores e incertidumbres ante el triunfo de la Revolución de Octubre y la situación económica de la postguerra, llegan con mayor fuerza, a partir de esos años, núcleos importantes de ingleses, italianos, polacos, franceses, rusos y portugueses, sin que faltaran holandeses, lituanos, húngaros y rumanos, entre otros (336).

Del continente asiático, la inmigración china se mantiene, aunque no masiva, pues existen en ese período leyes que impiden su acceso, bajo el argumento racista y xenófobo de ser portadores de taras físicas y morales, intrínsecas a su raza. También en este período, arriban en cantidades sirios, turcos, japoneses, palestinos, hindúes y hasta filipinos (328, 337, 338).

A su vez, México y Puerto Rico proporcionan emigrantes latinoamericanos, sin que faltaran dominicanos y cantidades reducidas de inmigrantes procedentes de Centroamérica (339).

La inmigración desde los Estados Unidos también se mantiene, como una constante, favorecida por los mecanismos de dominación económica y política impuestos por ese país; mas, a diferencia de los restantes, se trata de una inmigración blanca, calificada, de tipo familiar, que permanece, en lo posible, como célula aislada del medio circundante (340, 341).

Desde el punto de vista racial, si bien la raza mongoloide, representada por los aborígenes indoamericanos, tendió a disminuir aceleradamente acorde a su desaparición física o su mezcla y asimilación por otras razas humanas, el tipo mediterráneo de la raza europeoide y la raza negroide subsahariano-occidental tendieron a crecer, no sólo respecto a cada una de ellas, sino a partir del relativo equilibrio en la composición de género en la mezcla de éstas; es decir, en la población mestiza, mulata (europeoide-negroide) u otra forma de mestizaje (europeoide-aborigen o negroide-aborigen), a pesar del racismo institucional y sociofamiliar existente en las relaciones humanas con un carácter público, ya que, de manera privada, las estadísticas y las actas parroquiales evidencian lo contrario (342).

En todos los grupos humanos de Cuba, se observan los matrimonios mixtos tanto desde el punto de vista étnico como racial. El encuentro en un nuevo medio tendió a romper la endogamia étnica de procedencia y condicionó la creación de nuevos matrimonios

exogámicos a la vez que diversos círculos endogámicos con carácter territorial, como una regularidad esencial de cualquier etnos desde su fase formativa (343). Si una población racialmente mulata fue el resultado evidente de los matrimonios mixtos hispánico-africanos, en el sentido más inmediato y superficial del mestizaje esto también sucede con la mezcla, intraeuropeide (españoles, canarios, franceses, italianos y otros), pero desde el punto de vista étnico(334).

La multirracialidad, inherente a la formación histórica del etnos nacional cubano, lejos de crear componentes étnicos desconectados, tendió a la formación sistémica de un conjunto concatenado de procesos étnicos unificadores de diferente alcance territorial y de variada duración cronológica (334, 335). Debido a este proceso histórico de más de medio milenio, el pueblo cubano, como sociedad contemporánea formada por más de once millones de personas, constituye una nación “uniétnica” y multirracial. Este hecho es poco común en la etnogénesis de muchos pueblos, lo que es necesario considerar y resaltar (344).

II.9 Aspectos ideológicos y filosóficos relacionados con Raza

Siempre que el concepto “raza humana” se encuentre implicado en un estudio, es necesario sentar posiciones ideológicas de principio. Ello se debe a que el objeto a conocer, el ser humano, es un fenómeno complejo en el cual coexisten factores biológicos, genéticos antropológicos, etc., íntimamente vinculados entre sí, y a otros elementos que distinguen radicalmente a la especie humana del resto del reino animal y que caracterizan la esencia del ser humano como “complejo de relaciones sociales” (345).

El mestizaje -junto a la influencia del trabajo y la vida social- se ha opuesto históricamente a la subdivisión de la especie humana, lo que ha permitido la conservación de su unidad como tal. En la especie humana, los factores sociales son quienes desempeñan un papel cada vez más importante en los procesos de diferenciación e integración racial, que como tendencias opuestas, unidas y en lucha, han caracterizado su desarrollo. La mezcla racial tiende a la obtención de nuevos equilibrios genéticos y, por tanto, a la homogeneidad sobre (346, 347).

Por esta razón cualquier estudio que aborde a las razas humanas debe adentrarse en el campo de las ciencias sociales, particularmente en la filosofía, única forma de abordar en su plenitud un problema como el de las razas humanas, que es al mismo tiempo científico-natural y social, ya que el enfoque y la solución que se ofrezca a un fenómeno tan complejo como el de las razas dependerá de la posición

filosófica del sujeto cognoscente (345, 348). **Partiendo de la concepción filosófica marxista-leninista, es importante asentar que como autores de este trabajo, consideramos que el hombre pertenece a una sola especie: Homo Sapiens, y su origen está determinado por el trabajo, la fabricación de instrumentos de producción, que le permiten no solo adaptarse a la naturaleza sino transformarla. Existen, sin duda, diferencias fenotípicas y genotípicas derivadas de los fenómenos de selección natural del entorno donde se han desarrollado los distintos grupos poblacionales, y sobre este precepto es que llevamos a cabo la presente tesis, pero conscientes que estas diferencias no implican en modo alguno la superioridad de ningún grupo poblacional sobre otro.**

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Ensayo de Linfoproliferación y Bioensayo para detección de IL-2

III.1.1 Universo de estudio

Este estudio se realizó en Ciudad de la Habana, en 1999. Se partió de una muestra inicial de 150 individuos, que referían no padecer síntomas ni signos de ninguna enfermedad, que residían en Ciudad de la Habana, y que consintieron en formar parte del estudio (Acápite III..5)

III.1.2 Colección de la muestra.

Se colectaron 2 muestras de cada individuo. Para la detección de anticuerpos anti-dengue y para la serotipificación por ensayo de neutralización se colectó sangre en papel de filtro por punción del pulpejo del dedo pulgar, previa asepsia de la zona.

Para la realización de los ensayos de Linfoproliferación y Bioensayo para la determinación de IL-2 se colectaron de 20 ml de sangre venosa periférica de los individuos participantes del estudio. Esta muestra se obtuvo por punción cubital del antebrazo por personal paramédico bien entrenado. Para la colección de la muestra se utilizó un tubo de extracción al vacío por individuo, con citrato de sodio como anti-coagulante. Cada una de las muestras se rotuló adecuadamente.

III.1.3 Detección de anticuerpos anti-dengue.

Para la detección de anticuerpos IgG se siguió la metodología del MEI desarrollada en el Laboratorio de Arbovirus del IPK (349, 350). Placas de poliestireno (Costar) fueron sensibilizadas con anticuerpos IgG humano anti-dengue a una concentración de 10ug/mL en solución carbonato-bicarbonato pH 9.5 e incubadas toda la noche a 4°C. Posteriormente se bloquearon con albúmina de suero bovino (ASB) al 1% añadiendo 150 uL por pozo. Después de 1 hora de incubación a 37°C, las placas fueron lavadas 3 veces con solución tampón de fosfato salina-Tween20 (PBS-T20) y posteriormente se añadieron 100uL por pozo de una dilución 1/50 en PBS-T20 de antígeno de dengue 2. La incubación se realizó a 37°C por 1h. Se lavó nuevamente y se adicionaron los sueros diluidos en PBS-T20 desde 1:20 hasta 1:10 240

(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 100uL del conjugado IgG humana anti-dengue peroxidasa diluido 1/7000 en PBS-T20, más suero de ternera fetal (STF) al 2%. Se realizó el último lavado, adicionando posteriormente el sustrato compuesto por 25mg de ortofenilendiamina (OPD) con 4 uL de peróxido de hidrógeno en 10 mL de solución tampón de fosfato citrato pH 5. La reacción se detuvo con 100 uL por pozo de ácido sulfúrico al 12.5%. La lectura de la densidad óptica (DO) se realizó a una longitud de onda 490 nm en un lector de ELISA tipo MRX Microplate Read. 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.1.4 Determinación de la especificidad de serotipo de los anticuerpos anti-dengue.

Para determinar la especificidad de serotipo de los anticuerpos antidengues de los individuos incluidos en los estudios se utilizó el método de neutralización por reducción del número de placas simplificado descrito por Morens y Halstead en 1985 para virus dengue en células BHK21 (351). Brevemente, los sueros a estudiar fueron inactivados inicialmente a 56°C por 30 min y tratados con cloroformo. Luego se preparó una dilución de los sueros a la dilución de 1/30, previamente establecida como óptima para determinar la especificidad de serotipo de los anticuerpos (205). Los controles positivo y negativo se utilizaron a la dilución 1/10. Las cepas virales utilizadas en el ensayo VD1 (Angola, siete pases en C6/36), VD2 (A15, con dos pases en ratón y dos en C6/36), VD3 (116/00, con seis pases en C6/36) y VD4 (Dominica, cinco pases en C6/36), fueron diluidas en medio de mantenimiento (Memgane suplementado con 2% de suero fetal bovino inactivado (SFBI) (Sigma, EUA) y antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomina 100 µg/mL, Sigma, EUA) a 40 ufp (unidades formadoras de placas) por cada 50 µL. Una vez preparadas las diluciones de las muestras, cada una se mezcló a razón de 100 µL volumen-volumen con la dilución de trabajo de cada cepa viral por separado. Posteriormente las mezclas fueron incubadas durante una hora a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Luego se inocularon por triplicado 50 µL de cada una de las mezclas virus-suero y de los controles en placas de 24 pozos

conteniendo 500 µL de suspensión de células BHK 21, clono 15, por pozo, a una concentración de 2×10^5 células/mL, en estado de semi-confluencia. Las placas se incubaron durante cuatro horas en atmósfera húmeda (5% de CO₂) y una vez finalizado el tiempo, le fueron añadidos 500 µL de medio de recubrimiento (Memgane 2X, SFBI 6%, L-glutamina 2 mM, carboximetilcelulosa 3 g/L, y antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomina 100 µg/mL)) a cada pozo, incubándose a 37°C por cinco días para VD2, seis días para VD4 y siete para los virus VD1 y VD3. Posteriormente a 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 Acetato de Sodio 13,6g). El valor porcentual de reducción del número de placas con respecto al control viral se calculó según la ecuación: % reducción = $[1 - (X_s/X_m)] * 100\%$, donde:

X_s = promedio del número de placas obtenidas por cada dilución del suero.

X_m = Promedio del número de placas obtenido para el control del virus.

Mediante la formula anterior, al suero, diluido 1/30, se le determino su valor porcentual de reducción del número de placas virales. Estos datos se llevaron a un papel semilogarítmico para determinar si el suero a esa dilución fija reduce en un 50% el número de placas virales con respecto al control viral. Esto permitió determinar la presencia de anticuerpos específicos para cada serotipo de virus dengue.

III.1.5 Obtención del virus dengue empleado como antígeno.

III.1.5.1 Cepas

En los ensayos de Linfoproliferación y Bioensayo para detección de IL-2 se emplearon cepas de virus dengue obtenidas a partir de cerebro de ratón lactante. Para la obtención de virus a partir de cerebro de ratón se emplearon cepas estándar Hawaii de dengue 1 (24 PR, Título: 2.6×10^6), NGC de dengue 2 (27 PR, Título: 2×10^6 UFP) H87 de dengue 3 (19 PR, Título: 1.86×10^6 UFP) y H241 (24 PR, Título: 1.6×10^6) de dengue 4.

III.1.5.2 Purificación de virus dengue a partir de cerebro de ratón.

Para la obtención de virus dengue a partir de cerebro de ratón se utilizaron las cepas de cada serotipo anteriormente mencionadas, mantenidas todas por pases en ratón lactante de 1 a 3 días de nacido por inoculación intracerebral de 0,02 ml de una suspensión 1: 10 de los cerebros en PBS con STF inactivado 0,5% y antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomina 100 µg/mL) (penicilina 100 UI/mL y estreptomina 100 µg/mL). Al observarse en los ratones inoculados signos de la encefalitis inducida por el virus se extrajeron los cerebros en condiciones asépticas por aspiración, manteniéndolos a 4° C y se

procedió a la purificación del virus por el método de la sacarosa-acetona (352). Para ello se preparó una suspensión al 4% en tampón TNE-Sacarosa (Tris HCL 10mM, NaCL 0.15M, EDTA 1mM, Sacarosa 8%, pH 8.5), se homogeneizó por agitación mecánica durante 5 minutos, a 4° C, utilizando un agitador para ruptura celular (B.Braun, Germany), y se aplicaron 5 ciclos de 5 minutos de sonicación cada uno, a 4° C, en desmembrador sónico (Soniprep MSE 150, UK). La suspensión homogeneizada se sometió a 2 centrifugaciones para eliminar detritus celulares, la primera durante 15 Min., 3500 rpm (GR4.11, Jouan, France), 4° C, y la segunda durante 45 Min., 15000 rpm (SCP70H, Hitachi KOKI Co. L.t.d, rotor P45AT-436), 4° C, colectándose en ambos casos el sobrenadante y desechándose el botón de células. A continuación el sobrenadante colectado se aplicó sobre un colchón de sacarosa al 30% y se centrifugó a 35000 rpm (Ultracentrifuga SCP70, Hitachi KOKI Co. L.t.d, rotor RP65-796) durante 2 horas. El botón obtenido se resuspendió en 1 ml de tampón TNE se aplicó nuevamente sobre gradiente continuo de sacarosa (20 - 60% p / v en tampón TNE y fue centrifugado a 28,000 rpm (Ultracentrifuga SCP70, Hitachi KOKI Co. L.t.d, rotor P28S2-869) por seis horas a 4° C, (172). Se colectó la banda visible y se inactivó a 56° C durante una hora. Se esterilizó por filtración (Tips filters 0.22 um, Costar) y se evaluó la pureza (353), la actividad antigénica (350), el título viral (351) y la concentración de proteínas por el método del Acido Bicinchonílico (BCA) (354). Se preparó antígeno control de cerebro de ratón no infectado siguiendo un procedimiento idéntico. El antígeno de virus dengue de los 4 serotipos y el control de cerebro no infectado fueron guardados a -80° C hasta el momento de su utilización.

III.1.6 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Para el aislamiento de las CMSP se extrajeron 20 ml de sangre venosa periférica de cada individuo involucrado en el estudio, y se añadió sobre tubos que contenían Heparina (15 U/ml) como anticoagulante. La sangre fue diluida 1/2 en solución Hank modificada (sin Ca²⁺ y Mg²⁺)(Sigma), y se procedió al aislamiento de células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque (Histopaque-1077, Sigma), 2500 rpm (GR4.11, Jouan, France), 25 ° C, durante 30 minutos. Se extrajo el anillo de células mononucleares y se lavaron estas por tres veces con solución Hank, 700 g (GR4.11, Jouan, France), 4° C, 10 minutos. Finalmente fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con L glutamina (1mM), Penicilina-Estreptomicina (100 UI/ml y 100 µg/ml) y 10 % de suero de ternera fetal; y por último contadas y llevadas a la

concentración requerida según el ensayo en que fueron utilizadas (ensayo de linfoproliferación u obtención de sobrenadantes para determinación de IL-2) (355).

III.1.6.1 Ensayo de linfoproliferación

Las CMSP individuos expuestos a dengue 1 en 1977 y dengue 2 en 1981, ajustadas a 1×10^6 células/ml en RPMI 1640 suplementado con L glutamina (1mM), Penicilina-Estreptomicina (100 UI/ml y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y 10 % de STF, se dispensaron en placas de 96 pocillos, fondo U (Costar) a razón 100 μl por pozo conteniendo 10^5 células. Posteriormente se añadieron los antígenos virales (DV1, DV2, DV3, DV4) obtenidos a partir de cerebro de ratón lactante a la concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y un control de cerebro de raton lactante no infectado, a esa misma concentración (mock), en 100 μl RPMI 1640 suplementado, quedando a la concentración deseada de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en los 200 μl finales. Se incluyeron en el ensayo como control positivo antígeno de toxoide tetánico (TT) a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, como control de mitógeno fitohemaglutinina, del inglés *Phytohemaglutinina* (PHA) a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y como control de la proliferación espontánea se emplearon 100 μl RPMI 1640 suplementado. Tanto los antígenos como el mitógeno se montaron por triplicado. Tras 6 días de cultivo a 37°C , 5% de CO_2 en atmósfera húmeda las células fueron pulsadas con 1 μCi por pozo de timidina tritiada (Amersham; 2 Ci/mmol = 74 GBq/mmol) por 6 horas. Posteriormente se cosecharon las células en un cosechador (Semiautomatic Cell Harvester, Skatron) sobre papel de fibra de vidrio (Polylabo) y se contaron las emisiones β en un contador de centelleo líquido (LKB 1214 wallac rack β). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Fueron calculadas la media y la desviación estándar de cada triplicado expresando los resultados en conteos por minuto (CPM) (356).

III.1.6.2 Obtención de sobrenadantes de CMSP para determinación de interleuquina 2

Las células ajustadas a 3×10^6 células/ml en RPMI 1640 suplementado (L glutamina (1mM), Penicilina-Estreptomicina (100 UI/ml y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 2 mercaptoethanol (5×10^{-5} M), piruvato de sodio (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 10 % de suero de ternera fetal) se dispensaron en crioviales (Costar) a razón de 500 μl por vial. En un volumen similar se añadieron los antígenos virales (DV1 y DV2) y los antígenos controles negativos obtenidos a partir de cerebro de ratón, a la concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, quedando a una dilución final de 20 $\mu\text{g}/\text{m}$. También se incluyeron en el ensayo controles de síntesis espontánea de interleuquina 2 (500 μl de RPMI 1640 suplementado). Las células se cultivaron a 37°C , 5 % de CO_2 , atmósfera húmeda por 72 horas, al cabo de las cuales los viales se centrifugaron a 700 g (GR4.11, Jouan, France), 4°C , por 5

minutos. A continuación se extrajeron 800 µl de sobrenadante de cada vial, el cual se guardó en alícuotas de 200 µl a -70 °C hasta la posterior determinación de IL-2 .

III.1.6.3 Detección de Interleuquina 2 por Bioensayo empleando la línea celular CTLL-2

III.1.6.3.1 Mantenimiento de la línea

La línea celular CTLL-2 (CILL2 ATCC TTB 214, 302 catalog Cell Lines and Hybridomas, 7th edition, 1992, edited by ATCC, Maryland) se mantiene en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con L glutamina (1mM), Penicilina-Estreptomicina (100 UI/ml y 100 µg/ml), 2 mercaptoethanol (5×10^{-5} M), piruvato de sodio (6 ug/L) ,10 % de suero de ternera fetal e Interleuquina 2 humana recombinante (20 UI/ml) (Invitrogen). Las células fueron pasadas cada tercer ó cuarto día, y al alcanzar una densidad de $1 \text{ a } 3 \times 10^5$ células/ml se establecieron nuevos cultivos dispensando 5×10^3 células viables /ml (357).

III.1.6.3.2 Bioensayo

Para su utilización en este ensayo las células de la línea celular CTLL-2 se colectaron tras alcanzar una densidad de 3×10^5 células/ml, se resuspendieron en medio RPMI suplementado (RPMI 1640 (Sigma) (L glutamina 1mM, Penicilina 100 UI/m l-Estreptomicina 100 µg/ml, 2 mercaptoethanol 5×10^{-5} M, piruvato de sodio 6 ug/L , STF 10 %) con IL-2 humana recombinante(20 UI/ml) (Invitrogen)) y se cultivaron por 24 horas, a 37°C, 5 % de CO₂, en atmósfera húmeda. Este paso permitió alcanzar una concentración de $3-4 \times 10^6$ células/ml con más de un 90 % de viabilidad. Posteriormente se lavaron por 2 veces en medio RPMI suplementado (L glutamina (1mM), Penicilina-Estreptomicina (100 UI/ml y 100 µg/ml), 2 mercaptoethanol (5×10^{-5} M), piruvato de sodio (6 ug/L) ,10 % de suero de ternera fetal) sin IL-2, a 700 g (GR4.11, Jouan, France), 25°C, 7 minutos, para eliminar cualquier resto de IL-2 remanente. Una vez lavadas se determinó su viabilidad por marcaje con colorante trypan blue (Gibco, Grand Island, NY) al 0.04 % en PBS (pH 7.4), aceptándose una viabilidad de un 90% ó mas. A continuación se llevaron a una concentración de 2×10^6 células/ ml en medio RPMI suplementado sin IL-2, y se dispensaron posteriormente a razón de 50 µl por pozo en placas de 96 pocillos, fondo en U (Costar). A continuación se adicionaron 50 µl de los sobrenadantes del cultivo de las CMSP estimuladas con los diferentes antígenos, el control de síntesis espontánea y una curva estándar de IL-2 recombinante

(357, 358). Las placas se cultivaron durante 48 horas a 37°C, 5 % de CO₂, atmósfera húmeda y se procedió entonces al pulso con timidina tritiada. Para ello se adicionó 1 µCi por pozo de timidina tritiada (Amersham; 2 Ci/mmol = 74 GBq/mmol) por 6 horas, tras lo cual se cosecharon las células en un cosechador (Semiautomatic Cell Harvester, Skatron) sobre papel de fibra de vidrio (Polylabo) y se contaron las emisiones β en un contador de centelleo líquido (LKB 1214 wallac rack β). Los resultados se extrapolaron respecto a los resultados obtenidos con la curva de IL-2 recombinante y se expresaron como ng/ml de IL-2.

III.1.7 Análisis Estadístico

Se determinó la distribución Gaussiana de los datos (conteos por minuto (CPM): incorporación de timidina tritiada ([³H] thymidine)) y de producción de IL-2 empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov de normalidad. La homogeneidad de varianza se determinó por la prueba de Bartlett. La comparación entre los grupos se hizo por T de Student (una cola). Los valores de p<0.05 se consideraron significativos. El riesgo de introducir un error en la estimación de la probabilidad (valor de la P) fue corregido por el método de disparidad de Bonferroni. Los valores de este valor de P corregida que permanecieron <0.05 fueron considerados significativos. Las congruencias entre experimentos se determinaron usando un coeficiente de variación, aceptándose un coeficiente de variación de un 15 %. Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa Graph Pad Prism para Windows.

III.2 Inducción de mediadores inmunológicos de respuesta celular

III.2.1 Universo de Estudio

Este estudio se realizó en Ciudad de la Habana, en el 2003. Se partió de una muestra inicial de 200 individuos, que referían no padecer síntomas ni signos de ninguna enfermedad, que residían en Ciudad de la Habana, y que consintieron en formar parte del estudio (Acápite III..5)

III.2.2 Colección de la muestra

Se colectaron 2 muestras de cada individuo. Para la detección de anticuerpos anti-dengue y para la serotipificación por ensayo de neutralización se colectó sangre en papel de filtro por punción del pulpejo del dedo pulgar, previa asepsia de la zona.

Para el aislamiento de células mononucleares periféricas y la obtención de suero autólogo para suplementar el medio RPMI de cultivo de las células mononucleares periféricas se colectaron 25 ml de sangre venosa periférica de los individuos participantes del estudio. Esta muestra se obtuvo por punción cubital del antebrazo por personal paramédico bien entrenado. De estos 25 ml de sangre, 20 ml se dispensaron en un tubo de extracción al vacío por individuo, con citrato de sodio como anticoagulante para el aislamiento de células mononucleares periféricas. Los restantes 5 ml se dispensaron en un tubo de extracción al vacío seco, para la obtención de suero autólogo para suplementar el medio RPMI de cultivo de las células mononucleares periféricas por individuo. Cada una de las muestras se rotuló adecuadamente.

III.2.3 Detección de anticuerpos anti-dengue

Para la detección de anticuerpos IgG se siguió la metodología de ELISA inhibición (MEI) desarrollada en el Laboratorio de Arbovirus del IPK (349, 350). Esta metodología ya fue descrita en la sección III.1.3.

III.2.4 Determinación de la especificidad de serotipo de los anticuerpos anti-dengue

Para determinar la especificidad de serotipo de la infección padecida por los individuos incluidos en los estudios se utilizó el método de neutralización por reducción del número de placas simplificado descrito por Morens y Halstead en 1985 para virus dengue en células BHK21 (351). Esta metodología ya fue descrita en la sección III.1.4.

III.2.5 Obtención del virus dengue empleado como antígeno

III.2.5.1 Cepas

Para la obtención de virus a partir de cultivo se emplearon las cepas 13 Perú de dengue 1 (aislada en Cuba a partir de una muestra de suero de un caso de FHD/SSD de la epidemia de 1990 de Perú, 5 pases en C6/36, Título: $3,2 \times 10^5$); la cepa A15 de dengue 2 (aislada en Cuba a partir de muestra de suero de paciente con FD en 1981, 3 pases en ratón lactante, 3 pases en C636, Título: $1,52 \times 10^4$ UFP); la cepa 3 116 de dengue (aislada en Cuba en el 2000, partir de un caso de FD, 2 pases C6/36, Título: $4,2 \times 10^4$ UFP).

III.2.5.2 Obtención de virus a partir de cultivo de células

Las cepas de los serotipos de virus dengue respectivamente fueron inoculadas en células de línea C6/36, de mosquito *aedes albopictus*, y cultivadas en medio MEM suplementado con aminoácidos no esenciales (1%), glutamina, 2 mM y suero fetal bovino inactivado (10%) hasta observar efecto citopático característico del virus. Las células se desprendieron y se procedió a centrifugarlas a 10,000 rpm (Ultracentrifuga SCP70, Hitachi KOKI Co. L.t.d., rotor P45AT-436) durante 30 minutos a 4° C. El sobrenadante se concentró con membranas Amicon Diaflo YM 10 (Amicon, Inc., Beverly, MA, USA). El material resultante fue centrifugado sobre gradiente continuo de sacarosa (20 - 60% p / v) en tampón TNE (Tris HCL 10mM, NaCL 0.15M, EDTA 1mM) a 28,000 rpm Ultracentrifuga SCP70, Hitachi KOKI Co. L.t.d ,rotor P28S2-869) seis horas a 4° C (359). Se colectó la banda visible y a partir de la misma se determinó la pureza del virus por el método de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (212). Se determinó también su comportamiento antigénico por western-blot (353) y el título viral (360). Se esterilizó por filtración (Tips filters 0.22 um, Costar) y se estimó la concentración de proteínas por el método del ácido bicinchonico, del inglés *bicinchoninic acid* (BCA) (361) . Se preparó un control negativo de antígeno de células no infectadas por idéntico procedimiento. Fueron guardados ambos antígenos (virus y control celular) a -70° C hasta el momento de su utilización.

III.2.5.2 Cuantificación de la carga viral.

La carga viral, en términos de unidades formadoras de placa (pfu) se determinó en los sobrenadantes de CMSP estimuladas con partículas infectivas de DV1, DV2 y DV3, empleando el método TaqMan de RCP en tiempo real, (LightCycler 1.5, Roche Applied Sciences). Para ellos se emplearon curvas estándar de DV1, DV2, siguiendo el protocolo de Laue y cols., 1999, con modificaciones de Orta y Cols. 2009. (362)

III.2.6 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Se extrajeron 20 ml de sangre venosa periférica a los individuos involucrados en el estudio, en presencia de citrato de sodio (1.29 mol/L) como anticoagulante. La sangre fue diluida 1:2 en solución de Hank modificada (sin Ca²⁺ y Mg²⁺)(Sigma) y se procedió al aislamiento de células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque (Histopaque-1077, Sigma), 2500 rpm (GR4.11, Jouan, France), 25 °C, durante 30 minutos . Se extrajo el anillo de células mononucleares y se lavaron tres veces con solución de Hank, 1800 rpm (GR4.11, Jouan, France), 4°C, 10 minutos. A continuación las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado (L glutamina

(1mM), Penicilina-Estreptomicina (100 UI/ml-100 µg/ml) con 5 % de suero autólogo, contadas y ajustadas a 2×10^6 células/ml (363).

III.2.7 Estimulo de CMSP para análisis de la inducción de mediadores de respuesta inmune celular

Las células mononucleares de individuos expuestos a dengue 1 en 1977, dengue 2 en 1981 y dengue 3 en el 2001, se ajustaron a 2×10^6 células/ml en RPMI 1640 suplementado (L glutamina (1mM), Penicilina-Estreptomicina (100 UI/ml y 100 µg/ml), 2 mercaptoethanol (5×10^{-5} M), piruvato de sodio (6 µg/L)). Al medio se le añadió también 5 % de suero autólogo, a fin de simular *ex vivo* las condiciones de ADA *in vivo*. A continuación se dispensaron en crioviales (Costar), a razón de 500 µl por vial. En un volumen similar se añadieron los antígenos virales (DV1, DV2 y DV3), a una multiplicidad de 0.01 pfu (1 ufp por cada 100 células mononucleares), la fitohemaglutinina (del inglés *Phytohemaglutinina* (PHA)) empleada como control de activación inespecífica, a 5 ug/ml, y el “Mock” (sobrenadante de las células C636 no infectadas). A fin de comprobar si la inducción de los mediadores estudiados era un efecto directo de la replicación viral las CMSP de los individuos no inmunes fueron también cultivadas en presencia de sobrenadante infectivo de C636 inactivado por luz ultravioleta. Las células se cultivaron a 37°C, 5 % de CO₂, atmósfera húmeda por 24 horas, al cabo de las cuales se obtuvo el botón de células a partir de las cuales se aisló el ARN mensajero.

III.2.8 Detección de la expresión de genes de mediadores de respuesta inmune celular

III.2.8.1 Aislamiento de ARN mensajero

Para la extracción de ARN de las CMSP estimuladas por 24 horas con los antígenos de dengue 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 dispuso 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 dispuso 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 eluyó el ARN en agua libre de ARNasas. Finalmente el ARN purificado se evaluó por medio del bio-analizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), comprobándose su adecuada pureza y concentración.

III.2.8.2 Síntesis de ADN copia para la detección de expresión de genes de citoquinas

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 (Life Technologies, Rockville, MD, USA).

III.2.8.3 RCP en tiempo real (Taqman) para detección de genes de citoquinas

La expresión de los genes de las citoquinas se determinó por RCP en tiempo real por medio de un sistema de detección ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que usa 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 RCP de Applied Biosystem, 3ul de oligonucleotidos y 0.5 ul de sonda, más 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 s y 60 °C 1 min. Cada muestra fue analizada por triplicado para la expresión de FoxP3, FasLigand, Perforina, GranzimaB, IFN γ , TGF β , IL-10, IL-8, RANTES, MIP-1 α , MCP-1 y TNF α , 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, expresándose los resultados en picogramos de ARN m.

III.2.9 Análisis Estadísticos

Se determinó si las variables estudiadas seguían una distribución Gaussiana empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov de normalidad. La comparación de la expresión de genes entre las diferentes condiciones experimentales estudiadas se realizó por el método no paramétrico de Mann Whitney, estimando como significativo un valor de $p < 0.05$. Los datos fueron procesados con el Statistical Package for the Social Science, SPSS 11.5 para Windows.

III.3 Asociación de genes HLA clase I y clase II con las diferentes formas de dengue.

III.3.1 Universo de Estudio

Este estudio incluyó 120 individuos de Santiago de Cuba, involucrados en el estudio en el 2002. El estudio incluyó como controles 189 individuos sanos, no emparentados (ni entre ellos ni con los casos) pareados étnica y geográficamente.

III.3.2 Colección de la muestra

Para este ensayo se colectaron 20 ml de sangre venosa periférica de los individuos participantes del estudio. Esta muestra se obtuvo por punción cubital del antebrazo por personal paramédico bien entrenado. Para la colección de la muestra se utilizó un tubo de extracción al vacío por individuo, con citrato de sodio como anticoagulante. Cada una de las muestras se rotuló adecuadamente

III.3.3 Clasificación de los casos en primarios o secundarios

Para determinar el número de infecciones por dengue padecida por los individuos incluidos en el estudio (primario: 1 sola infección, secundario: 2 infecciones) se utilizó el método de neutralización por reducción del número de placas simplificado descrito por Morens y Halstead en 1985 para virus dengue en células BHK21 (351). Esta metodología ya fue descrita en la sección III.1.4.

III.3.4 Obtención del ADN genómico

El ADN genómico fue extraído del plasma utilizando un estuche comercial de extracción de ADN (QIAmp DNA Blood mini kit, QIAGEN, Santa Clarita, CA, USA). Este sistema se basa en el empleo de centrifugación al vacío de columnas, las cuales poseen una membrana de sílica-gel a la cual se adsorbe el ADN. Para ello a 20 µL de Proteinasa K se adicionaron 200 µL 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:

III.3.5 Tipificación de genes HLA clase I y II

Un estuche comercial de RCP de baja resolución de cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP) fue usado para tipificar los alelos HLA A, B y C (Micro SSP HLA DNA Typing Trays (cat. Num. LSSP1L; One Lambda, Canoga Park, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones de los productores y en concordancia con las guías establecidas por el Comité de Aseguramiento de la Calidad y los Estándar de la Sociedad Americana de Histocompatibilidad e Inmunogenética (364). Este estuche incluye los cebadores pre-optimizados para la amplificación de alelos HLA y de la β globina (empleada como control interno) adsorbidos al fondo de cada pozo de placas de 96 pocillos. Se procedió según las instrucciones del fabricante. Se preparó la mezcla de reacción para la RCP según orienta el fabricante del estuche con 9 μ l de D-Mix (Mezcla dNTP y tampón) y 0,05 μ l de Taq polimerasa (Qiagen GMBH, Wiesbaden, Nordenstat, Germany). Se adicionó 1 μ l de ADN más 9 μ l de la mezcla por pozo de la placa de 96 pocillos y se colocaron los tubos en el termociclador (Eppendorf). Los parámetros de los ciclos en el termociclador fueron los siguientes: 1 ciclo de 96 °C x 130 s y 63 °C x 60 s, 9 ciclos de 96 °C x 10 s y 63 °C x 60 s, 20 ciclos de de 96 °C x 10 s, 59 °C x 50 s y 72 °C x 30 s.

El producto de la RCP fue corrido en una electroforesis de ADN en gel de agarosa al 2% en tampón Tris Borato EDTA y Bromuro de Etidio (0,5 μ g/ml) po 15min a 140 V. 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.

III.3.6 Análisis estadísticos.

III.3.5.1 Frecuencias de alelos HLA clase I A y B y HLA clase II en sujetos con antecedentes de enfermedad por dengue y controles

Las frecuencias de los alelos HLA fueron calculadas por la prueba de máxima probabilidad usando el programa Arlequín (365).

III.3.5.2 Comparación de frecuencias alélicas HLA clase I y II en individuos con antecedentes de enfermedad por dengue (FD ó FHD) y controles, y entre individuos con antecedentes de infección primaria o secundaria y controles

La comparación entre los grupos de pacientes y controles se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado (X^2) de Mantel-Haenszel y el riesgo de error por estimación de la probabilidad (valor de P) fue corregida por el método de disparidad de Bonferroni, obteniéndose un valor fortalecido de P corregido (P_c). Se consideró estadísticamente significativa un valor de P

<0.05. Fue calculado el Odd ratio (OR) como estimado del riesgo, e intervalos de confianza en el nivel de 95% .

III.3.5.3 Medidas de magnitud de asociación e impacto potencial en los alelos estudiados con asociación estadísticamente significativa

Una vez que se probó la significación estadística en las pruebas realizadas, se analizaron las medidas de impacto potencial como son el Riesgo atribuible de expuestos porcentual (RAE%), y el riesgo atribuible poblacional porcentual (RAP%).

III.3.5.4. Comparación de frecuencias alélicas HLA clase I y II en individuos con diferentes formas clínicas de infección por dengue (FD ó FHD) y entre individuos blancos y no blancos.

La comparación entre individuos con antecedentes de FD y con antecedentes de FHD 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 (P_c). Se consideró estadísticamente significativa un valor de P <0.05. Fue calculado el Odd ratio (OR) como estimado del riesgo, e intervalos de confianza en el nivel de 95%.

III.4 Estudio antropométrico.

III.4.1 Universo de Estudio

En este estudio se incluyó un grupo de 120 individuos con antecedentes de infección clínica por dengue durante la epidemia ocurrida en 1997 por dengue 2 en Santiago de Cuba, inicialmente clasificados de acuerdo al color de la piel en 70 blancos, 32 negros y 18 mestizos

III.4.2 Clasificación antropométrica

Los 120 individuos incluidos en el estudio fueron clasificados antropométricamente de acuerdo a la metodología de Pospisil (366), siguiendo las modificaciones para la población cubana propuestas por el profesor Manuel Rivero de la Calle (367). (Ver Anexo). Las mediciones fueron hechas por la técnico en antropometría Iraida Wong (Instituto de Nutrición, Ciudad Habana) entrenada personalmente por el

profesor Manuel Rivero de la Calle. Todas las mediciones se realizaron empleando equipamiento evaluado y equilibrado previamente.

Las mediciones realizadas fueron:

Características Faciales: Longitud y amplitud del tabique nasal, ancho y protuberancia de la nariz, longitud de la columela, ángulo naso-labial y naso- frontal.

Características del cabello: Grosor, y grado de ensortijamiento en la raíz.

Características craneales: Forma del cráneo, apariencia del occipucio y de la mandíbula.

Forma corporal: Estructura del esqueleto: estatura, longitud de tronco y extremidades (proporción), curvatura del sacro. Distribución de tejido muscular y adiposo: índice de masa corporal, grosor del pliegue de tejido adiposo (subcutáneo), circunferencia de cintura y de cadera.

Otras: Color de la piel, ojos y cabellos.

III.4.3 Análisis Estadístico

Se realizó un estudio de comparación de los grupos clasificados antropométricamente empleando para ello la dícima de independencia X^2 de Pearson y el X^2 Corregido de Yate según correspondiera, para un nivel de significación $\alpha (= 0.05)$, mediante el uso del paquete estadístico Statistical Package for the Social Science, SPSS 11.5 para Windows.

III.5 Aprobación del comité de Ética del IPK y obtención del consentimiento informado

Todos los estudios incluidos en esta tesis se han concebido de acuerdo a lo establecido en la Declaración de Helsinki y las las Guías Éticas Internacionales para estudios biomédicos en sujetos humanos: CIOMS, a fin de preservar la dignidad, los derechos, la seguridad y la salud de los participantes en esta investigación. Por lo anterior cada uno de ellos cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Instituto “Pedro Kour?”. Cumpliendo con uno de los principales requisitos establecidos en las mencionadas guías Internacionales, se anexa el Consentimiento Informado llenado por los participantes previo a la realización de cada uno de los estudios (anexo 1), que garantiza que los participantes en el estudio han sido informados debidamente acerca de los fundamentos y razones que justifican este estudio, cuya finalidad, es, de hecho, prevenir y evitar el desarrollo de estas manifestaciones severas de la enfermedad, que son causa directa de la muerte por infección por Dengue. Tras conocer de su asentimiento en participar se solicitó la firma del consentimiento informado y se colectaron los datos de los individuos utilizando un cuestionario diseñado con ese fin (anexo 2).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Ensayo de Linfoproliferación y Bioensayo para detección de IL-2

Como muestra de estudio se incluyeron 80 individuos de Ciudad Habana, de ellos 26 mujeres y 54 hombres, edad de 20 a 60 años, edad media de 35.8. Todos los individuos poseían títulos de anticuerpos anti-dengue mayores de 1/40. De acuerdo a la serotipificación de sus anticuerpos a dengue fueron clasificados en 40 sujetos dengue 1 inmunes: 18 blancos y 20 negros, y 40 sujetos dengue 2 inmunes: 20 blancos y 22 negros. Como controles se incluyeron en el estudio 20 individuos de Ciudad Habana, 1999, no inmunes a dengue, 8 mujeres y 12 hombres, edades de 20 a 60 años, media de 33.4.

La respuesta inmune celular de memoria a virus dengue, evaluada a través de los ensayos de linfoproliferación y de producción de IL-2, mostró diferencias de acuerdo al grupo étnico de los sujetos involucrados en el estudio. La figura 1a muestra la respuesta linfoproliferativa de los individuos blancos y negros con antecedentes de infección por dengue 1. Una elevada respuesta de los individuos blancos se observa claramente al compararla con la de los negros. Esta diferencia resultó significativa tras estratificar la respuesta a los diferentes antígenos virales (Figura 1). La respuesta linfoproliferativa de los individuos inmunes a dengue 2 se muestra en la figura 1b. También en este caso la respuesta de los individuos blancos a los 4 serotipos se muestra significativamente mayor al ser comparada con los negros. En contraste, ambos grupos responden similarmente al mock (cerebro de ratón lactante no infectado), al medio de cultivo y el antígeno de toxoide tetánico. (figuras 1 a y b). La figura 2 muestra que no existen tamos diferencias en la respuesta de los individuos blancos y negros (tanto inmunes a dengue 1 como a dengue 2) a la PHA.

La figura 3 muestra las concentraciones de IL-2 en el sobrenadante de las CMSP determinadas por bioensayo con células CTLL2. Los individuos blancos inmunes a dengue 1 mostraron una mayor producción de IL-2 con una marcada reactividad cruzada a los antígenos heterólogos de dengue en respuesta a la estimulación con dengue 1 y dengue 2, mientras que los sujetos negros inmunes a dengue 1, por el contrario, mostraron niveles menores de IL-2 en respuesta a la estimulación con virus dengue, y su

patrón de respuesta fue predominantemente serotipo específico. Los inmunes a dengue 2 tuvieron un comportamiento similar. No se observó respuesta linfoproliferativa ni de producción de IL-2 en las CMSP de individuos no inmunes a dengue (resultados no mostrados).

Desde finales de la década de los 80 un papel relevante en la patogénesis de la FHD/SCD ha sido atribuido a la respuesta inmune celular (184, 198, 372). La respuesta inmune de memoria humoral y celular que se genera tras una infección por un serotipo determinado de dengue, aunque garantiza protección de por vida contra ese serotipo, parece implicar una diseminación de la infección por cualquiera de los otros serotipos, fenómeno conocido por inmuno-amplificación (209, 368). En el caso de la respuesta inmune humoral, los anticuerpos de reactividad cruzada no neutralizan al virus, pero se unen a él y forman inmunocomplejos que se unen por la región Fc a los receptores Fc presentes en las células dianas de la infección por dengue. La activación de los linfocitos CD4 y CD8 de memoria serotipo crosreactivos resulta en la producción de elevados niveles de citoquinas, como el IFN γ , la IL-2, el TNF α (356). El primer reporte sobre la posible participación de la respuesta inmune celular en la patogénesis de la FHD fue realizado por Kurane y cols. en 1989, al detectar respuesta de memoria de linfocitos T serotipo específica y serotipo cruzada 6 meses después de una infección (124). Estos estudios se realizaron en áreas de alta prevalencia, donde las re-infecciones ocurren con frecuencia.

La población en Cuba sufrió dos grandes epidemias debido a D1 (1977) y D2 (1981) sin existir reportes de otras epidemias hasta el 2003, con excepción del pequeño brote ocurrido en Santiago de Cuba en 1997 (10). Después de la epidemia de 1981 se estableció un sistema de vigilancia que demostró que en el período de 1982-1996 no se produjo circulación de virus dengue en el país, al no encontrarse anticuerpos IgG anti-flavivirus en el suero de niños nacidos después del 1982 (205). Esta situación ofreció la posibilidad de explorar la respuesta de células T de memoria a largo plazo a virus dengue tras una infección primaria natural, demostrándose por primera vez la existencia de respuesta de células T de memoria que exhiben respuesta proliferativa de reactividad cruzada entre serotipos de virus dengue más de 20 años después de una infección primaria.

El análisis de esta respuesta de memoria de acuerdo al grupo étnico de los individuos mostró diferencias en la proliferación de los linfocitos T de memoria CD4⁺ específicos a virus dengue y en la producción de IL-2 entre individuos inmunes a dengue pertenecientes a diferentes grupos étnicos cubanos. Los individuos de raza blanca mostraron una respuesta inmune celular (linfoproliferación y producción de IL-2) significativamente mayor, con una mayor reactividad cruzada a los antígenos heterólogos de dengue, comparados con los de raza negra.

Este resultado reviste extremo interés, por cuanto correlaciona la respuesta inmune celular de memoria con la infección secundaria heterotípica como factor de riesgo para el desarrollo de la fiebre hemorrágica por dengue, y la mayor vulnerabilidad de los individuos de raza blanca a desarrollar este cuadro grave.

La infección secundaria heteróloga como factor importante de riesgo para el desarrollo de las formas graves de la enfermedad por dengue, es una hipótesis a la que las observaciones empírico-epidemiológicas provenientes de Cuba y Tailandia le han otorgado mucha fuerza. También se ha demostrado que los individuos expuestos a un serotipo particular de dengue un largo tiempo antes de una infección secundaria heterotípica tienen un riesgo elevado de desarrollar las formas graves de la enfermedad por dengue (2, 369).

Los resultados de este estudio son también consistentes con el papel que se le ha atribuido a la respuesta inmune celular en la patogénesis de la FHD. Se ha planteado que, ante una infección secundaria heterotípica, ocurre la reactivación de clones de células T de memoria de reactividad cruzada generadas durante la primo-infección, que reconocen los epítopes del serotipo de virus dengue que infecta por segunda vez con baja afinidad y avidéz. Esto conlleva la deficiente eliminación de las células infectadas y a una activación exagerada y no controlada de los linfocitos T de memoria CD4 + y CD8+ (48, 229, 309, 375, 376). 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 subóptima.

Esta cascada de producción de elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias y mediadores vaso activos en un corto periodo de tiempo induce ruptura de las células endoteliales vasculares, alteración del sistema de hemo-coagulación, y en consecuencia, extravasación de plasma, choque y manifestaciones hemorrágicas. La marcada proliferación y reactividad cruzada de los linfocitos CD4 y la mayor producción de IL-2 observada en los individuos blancos pudiera estar involucrada en la mayor incidencia de FHD en sujetos blancos en las epidemias cubanas de FHD. Futuras investigaciones que aborden el estudio de estos mecanismos efectores de la respuesta inmune celular, en la infección aguda podría corroborar estas inferencias.

Los resultados obtenidos concuerdan con las observaciones epidemiológicas sobre las diferencias en la propensión a la FHD observada entre los grupos étnicos cubanos y con la baja incidencia de FHD reportada en la población negra de África y del Caribe (305, 360-362).

La población actual cubana se originó de la mezcla de 2 grupos étnicos bien definidos, los colonizadores españoles y los esclavos africanos, ya que la población nativa, los aborígenes cubanos, fue prácticamente exterminada (370, 371).

Considerando los orígenes de nuestra población, pudiera hipotetizarse que la población cubana negra, la población negra del Caribe, y la africana deben compartir algún tipo de resistencia ante las formas graves de la enfermedad por dengue. Esta hipótesis estaría apoyada por la demostrada resistencia de los individuos de raza negra a la fiebre amarilla, la cual es producida por un virus perteneciente a la misma familia del virus dengue, Flaviviridae, lo cuál implica similitud en sus características estructurales y por ende pudieran compartir alguna especificidad para las moléculas de reconocimiento y procesamiento del sistema inmune (296).

IV.2 Inducción de mediadores inmunológicos que definen patrón de respuesta celular

Este estudio se llevó a cabo en el 2003. Se incluyeron 27 individuos de Ciudad Habana, de ellos 16 mujeres y 21 hombres, edad de 20 a 60 años, edad media de 33.3. Todos los individuos poseían títulos de anticuerpos anti-dengue mayores de 1/40. De acuerdo a la serotipificación de sus anticuerpos a dengue fueron clasificados en 10 inmunes a dengue 1, 10 inmunes a dengue 2 y 7 inmunes a dengue 3. De acuerdo al color de la piel se clasificaron en 14 blancos, 13 negros y 8 mestizos. Como controles se incluyeron en el estudio 10 individuos de Ciudad Habana, 2003, 4 mujeres y 6 hombres, edades de 20 a 60 años, media de 33.4, sanos, no inmunes a dengue.

La infección secundaria heteróloga se considera un factor importante de riesgo para el desarrollo de las formas graves de la enfermedad por dengue. También se ha demostrado que los individuos expuestos a un serotipo particular de dengue un largo tiempo antes de una infección secundaria heterotípica tienen un riesgo elevado de desarrollar las formas graves de la enfermedad por dengue (2, 204).

El modelo de infección *ex vivo* de CMSP de individuos expuestos a dengue 1 en 1977, dengue 2 en 1981 y dengue 3 en el 2001, suplementando con sueros de los propios individuos, simula esa situación de riesgo *in vivo*, y arrojó resultados muy sugestivos, que muestran diferentes patrones de expresión de la respuesta inmune celular de memoria acuerdo al grupo étnico de los individuos.

Para demostrar que en las condiciones experimentales de este estudio realmente ocurre la infección, y no únicamente la estimulación antigénica o del inmunocomplejo como evento inductor de la expresión de genes de las moléculas estudiadas se comparó la expresión de 2 de los mediadores estudiados, MIP-1 α e IFN γ , por las CMSP de los individuos controles no inmunes a dengue, ante el virus infectivo, ante el mock (sobrenadante de células C636 no infectadas) y ante el sobrenadante de células C636 infectadas inactivado con luz ultravioleta (UV). Como se observa en la tabla 1 se obtuvo una expresión significativa

de ambos mediadores tras la estimulación con el virus infectivo comparado con el sobrendante infectivo inactivado por UV y el mock. (Tabla 1). También con el propósito de proporcionar evidencia de la existencia de replicación viral en las CMSP tras 24 h de estimulación con el sobrenadante de células C636 infectadas con dengue se determinó la carga viral en el sobrendante de las CMSP. La tabla 2 muestra los valores de carga viral de los individuos no inmunes y de los inmunes a dengue 1, 2 y 3 en respuesta a la estimulación con DV1, DV2 y DV3.

De manera general, los individuos inmunes a dengue mostraron una expresión significativamente mayor de los mediadores estudiados que los no inmunes (resultados no mostrados), lo cuál implica que la memoria inmunológica esta implicada en los resultados encontrados. Los individuos blancos mostraron una mayor expresión de quimoquinas proinflamatorias, entre ellas MIP-1alfa, MCP-1, e IL-8, y citoquinas proinflamatorias como IFN γ , TNF α y Fas ligando, sobretodo a expensas de la estimulación heterotípica, particularmente en las secuencias DV1-DV2, DV1-DV3 (inmunes a dengue 1 en respuesta a dengue 2 y dengue 3), DV2-DV3 (inmunes a dengue 2 en respuesta a dengue 3) y DV3-DV2 (inmunes a dengue 3 en respuesta a dengue 2). (Figuras 4, 5,6, 8,9, 15). En los sujetos negros se observó un predominio de la quimoquina RANTES y de los mediadores regulatorios TGF β 1, IL-10, y FoxP3 además de mediadores citolíticos como granzima B y perforina. (Figuras 7, 10, 11, 13, 14). TGF β 1, IL-10, y FoxP3 mostraron una respuesta mas elevada en la estimulación homotípica comparada con la heterotípica. Los mediadores citotoxicos mostraron una significativa diferencia dependiendo del background inmune de los sujetos, siendo mayor la expresión en los individuos inmunes a dengue 3.

La figura 4 muestra la expresión de la quimoquina IL-8. La figura 4 a representa la expresión individuos blancos y negros de esta quimoquina en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con los diferentes serotipos de virus dengue. En ambos grupos se obtuvo una expresión significativamente mayor a los antígenos virales, comparado al mock ($p < 0,05$). También en ambos grupos la expresión de esta quimoquina fue significativamente mayor ante la estimulación heteróloga con DV2 y DV3 ($p < 0,05$). Este resultado reviste interés, si consideramos que es la infección secundaria heterotípica un factor de riesgo comprobado para el desarrollo de la FHD. La acotación del análisis a los resultados de la estimulación heterotípica entre blancos y negros nos permite observar que las diferencias en la expresión de IL-8 entre ambos grupos resultan significativas ($p < 0,05$)(Figura 4b).

Existen varios autores que reportan niveles elevados de esta quimoquina asociados a las formas clínicas más severas de la enfermedad por dengue, considerándose incluso por algunos como un marcador de severidad y mal pronóstico (242, 386-389). Un grupo numeroso de trabajos se refieren a la producción

de IL-8 por diferentes tipos de células tras la infección por dengue, como monocitos y macrófagos (40, 367-369), hepatocitos (372), células epiteliales (26), neutrófilos, sobre los cuales ejerce una particular quimioatracción, además de inducir su degranulación y la liberación de elastasa (373). En las células endoteliales la IL-8 puede actuar de forma autocrina e inducir reorganización del esqueleto celular, apertura de las uniones inter-endoteliales, y aumento de la permeabilidad así como expresión de moléculas de adhesión por su posible correlación directa con la extravasación de plasma (26, 142, 218, 223, 374, 375). Los efectos de esta quimoquina sobre el endotelio propiciando la extravasación de plasma pudieran estar relacionados con la mayor propensión de los individuos blancos a la FHD. Esto podría ser congruente con la observación de una expresión significativamente mayor en los individuos blancos comparados con los negros.

En la figura 5 se presenta la expresión de la quimoquina MCP-1. Como observamos en la figura 5 a la respuesta ante los virus fue significativamente mayor que ante el sobrenadante no infeccioso ($p < 0,05$). Al igual que en el caso de IL-8, la mayor expresión es a expensas de la estimulación heteróloga con DV2 y DV3 ($p < 0,05$). La figura 5b nos muestra los resultados de la estimulación heterotípica entre blancos y negros, siendo significativamente mayor la expresión de esta quimoquina en blancos ($p < 0,05$). La MCP-1 es producida por las células endoteliales en respuesta a la infección por dengue, y actúa de forma autocrina sobre las propias células endoteliales induciendo expresión de moléculas de adhesión como la ICAM-1 y la adhesión de CMSP (142), así como ruptura de las uniones inter-endoteliales y aumento de la permeabilidad vascular (376). Esta observación está en concordancia con los trabajos que le atribuyen un posible papel a esta quimoquina en la patogénesis de la infección por dengue, al reportar niveles elevados de MCP-1 en el suero de pacientes con SCD. Avirutnan y cols. fueron los primeros en observar una sobre-expresión de MCP-1 en suero de pacientes con SCD (218). Más recientemente, Ying Ray Lee y cols. también reportaron niveles elevados de MCP-1 en plasma de pacientes con FHD (377). Los resultados de este trabajo muestran una mayor expresión de MCP-1 en los sujetos blancos, que resulta significativa. Este resultado pudiera indicar que esta quimoquina podría estar involucrada en la mayor propensión de los sujetos blancos a desarrollar FHD.

Interesantemente, la sobre-expresión de MCP-1 mantenida ha sido reportada en enfermedades crónicas como la Diabetes y la Aterosclerosis (405-407) con la consiguiente afectación crónica de la permeabilidad vascular. La inducción de apertura de las uniones inter-endoteliales por la infección por dengue podría agravar la afectación de la permeabilidad vascular pre-existente en estos casos, lo cual propiciaría un mayor riesgo para el desarrollo de las formas graves de la enfermedad, y podría influir con

la mayor predisposición de los pacientes con antecedentes de diabetes a desarrollar FHD/SCD (7, 17, 265).

En el modelo utilizado, MIP-1 α presentó una expresión significativamente mayor en sujetos blancos que la observada en negros (figura 6 a, 6b). Una vez más se observa un predominio de la expresión de la quimoquina en la estimulación heteróloga con los serotipos de virus dengue 2 y 3 ($p < 0,05$). La figura 6b nos muestra la comparación de la expresión de MIP-1 α en la estimulación heteróloga entre blancos y negros, resultando significativamente mayor la expresión de los sujetos blancos. ($p < 0,05$).

Se ha planteado que esta quimoquina puede ser producida por monocitos infectados por dengue, atrayendo a otras CMSP al sitio de infección. Esto implica una intensa activación de las células T y la liberación de citoquinas proinflamatorias lo cual puede contribuir al cuadro inmunopatogénico (387). Adicionalmente, el hecho que atraiga gran cantidad de células dianas de la infección por dengue al sitio de infección puede proporcionarle a la progenie viral infectiva células cercanas susceptibles de ser infectadas, y favorecer de esta forma la diseminación viral (378). Trabajos pioneros sobre esta quimoquina y la enfermedad por dengue realizados por D'Murgue y Cols. en 1998 ya mostraban a esta quimoquina involucrada en la inhibición de los progenitores hematopoyéticos inducida por la infección por dengue (379). También se ha asociado a la fiebre elevada que se observa tras la infección por dengue (388). Por otra parte Spain Santana y cols. demostraron la expresión de MIP-1 alfa en pacientes con infección demostrada por virus dengue tanto con FD como FHD (380). Todo lo anterior apoya los resultados de una mayor expresión de esta quimoquina en los sujetos blancos, mas propensos al cuadro grave de la enfermedad.

El análisis de la quimoquina RANTES también muestra una respuesta significativamente más elevada ante los antígenos de virus dengue comparados con el mock ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre la estimulación homóloga y heteróloga. Contrario a lo observado con otras quimoquinas, los resultados en relación con RANTES muestran una expresión significativamente mayor en negros respecto a la expresión en blancos, tal como se observa en las figuras 7 a y 7 b. ($p < 0,05$). Varios son los estudios que han sugerido un posible papel para la quimoquina RANTES en los mecanismos patogénicos de la infección por dengue. La producción de esta quimoquina se ha observado en células basófilos y mastocitos infectados por dengue y hepatocitos humanos (381, 382). Avirutnan y colaboradores han reportado inducción de regulación transcripcional RANTES en células endoteliales infectadas por dengue (218).

Los resultados obtenidos sobre RANTES también concuerdan con un estudio en pacientes con enfermedad aguda por dengue, en el cual este mediador mostró diferencias entre pacientes de FHD y FD, siendo menores en los casos de FHD (32). Esta β -quimoquina se une a varios receptores incluyendo el CCR3 (381). Resulta también interesante que es producida por células T CD8+ tras la estimulación específica con el antígeno, y que CCR3 es expresada en los linfocitos CD4+ y CD8+ (383). Aunque varias citoquinas que se unen a CCR3 potencian la actividad citotóxica, RANTES parece ser el estímulo biológico más relevante (384). La elevada expresión de RANTES encontrada en la respuesta de los sujetos negros pudiera estar en relación con la actividad citolítica antiviral de este mediador, que explicaría la menor tendencia al desarrollo de FHD descrita para este grupo étnico.

En este estudio los individuos blancos mostraron una expresión mayor de IFN γ en comparación con los individuos negros (Figura 8). La figura 8 a representa la expresión de IFN γ en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homóloga y heteróloga con los diferentes serotipos de virus dengue. La estimulación heteróloga con dengue 2 y dengue 3 en los sujetos inmunes a dengue 1, con dengue 3 en los inmunes a dengue 2, y con dengue 2 en los inmunes a dengue 3 resultaron significativas ($p < 0,05$). El hecho de ser la infección secundaria heterotípica uno de los factores de mayor riesgo para la FHD, y que el serotipo 2 y el 3 sean más patogénicos que el serotipo 1 le otorgan importancia a este resultado. La acotación del análisis a la estimulación heterotípica entre blancos y negros mostró la significación de la mayor expresión de esta citoquina en blancos ($p < 0,05$). (Figura 8b).

El IFN γ es una de las citoquinas más estudiadas en el contexto de la patogénesis de la infección por dengue. Existen numerosos reportes por Kurane y cols., quienes fueron los pioneros del estudio de la respuesta inmune celular en dengue, sobre el papel del IFN γ en la patogénesis de la infección por dengue (32, 34, 238, 426, 435). Un primer acercamiento demostró la producción de IFN γ por las células mononucleares de sangre venosa periférica infectados “ex vivo” con virus dengue, corroborándose este hallazgo posteriormente por otros autores (356, 385-389). Más adelante se evidenció que las células dendríticas constituyen las primeras dianas de la infección por dengue, y que el IFN γ induce la producción de IL-12 por las células dendríticas, citoquina inductora de una respuesta de tipo TH1, lo cual propicia, a su vez, la producción de más IFN (439). En esta misma línea de investigación se postuló que un incremento en la liberación de IFN γ resulta en un incremento en el número de monocitos infectados por dengue a través del mecanismo de ADA, al inducir un aumento de expresión del receptor Fc en estas células, y permitir la unión de los inmuno-complejos no neutralizantes (222). En trabajos subsiguientes se demostró que la infección primaria por virus dengue induce una respuesta de memoria

de linfocitos CD4+, que ante una infección secundaria heterotípica se activan, proliferan y producen IFN γ , y poseen además actividad citolítica contra células autólogas infectadas con serotipos heterólogos (356, 368). Además se generan también linfocitos CD8+ de memoria de reactividad cruzada que son capaces de lisar células autólogas infectadas con serotipos heterólogos, estando su función modulada por el IFN γ (232, 400). Mangada y Cols. demostraron en el 2004 que células T de memoria de voluntarios inmunizados con una vacuna monovalente atenuada de dengue se estimulaban con virus dengue de forma serotipo específica y serotipo cruzada, produciendo niveles significativos de este mediador (390) y que los linfocitos CD4+ producían más IFN γ y al ser estimulados con péptidos de serotipos heterólogos (31). En este sentido también se reportó que los linfocitos CD4+ de pacientes convalecientes y los linfocitos CD8+ de memoria al ser estimulados de forma heteróloga producen IFN γ (442, 443).

El papel de esta citoquina “in vivo” fue corroborada al demostrarse que existe una hiperactivación de los linfocitos CD4+ durante la infección aguda por dengue, los cuales producen grandes cantidades de IFN γ e IL-2, siendo sus niveles de activación mayores en pacientes con FHD que en pacientes con FD (28, 389, 391-395). Un estudio muy particular fue el realizado por Mangada y Cols. donde se correlacionaron los niveles de IFN γ y TNF α producidos por CMSP de niños Tailandeses al ser estimulados con virus dengue con el mayor riesgo de desarrollar las formas clínicas graves de la enfermedad (396). Recientemente se identificó a esta citoquina como un fuerte predictor de severidad y de mal pronóstico, lo que confirma su papel inmunopatogénico en el transcurso de la infección por dengue (397).

Todas estas evidencias demuestran del papel patogénico del IFN γ en la FHD. La mayor expresión IFN γ observada en este estudio en los individuos blancos, ante la infección secundaria heterotípica pudiera estar en relación con la mayor tendencia de este grupo étnico a la FHD.

El análisis de la expresión de TNF α realizada mostró niveles mayores de esta molécula en sujetos blancos que en negros (Figura 9). En la figura 9a apreciamos una mayor expresión de TNF α ante la estimulación heteróloga con dengue 2 y dengue 3 ($p < 0,05$), y en la figura 9b observamos la significativamente mayor expresión de esta citoquina en blancos ($p < 0,05$).

Un amplio grupo de investigadores ha tratado de identificar las células productoras y dianas de TNF α en la infección por dengue. Anderson y Cols. demostraron que el TNF α producido por los monocitos tras la infección por dengue modula la función endotelial (398). La infección de los monocitos por dengue ha sido también reportada por Espina y Cols. (399). Ho y Cols., por su parte, demostraron que la infección de las células dendríticas por dengue induce su producción de TNF α (400). El TNF α inducido por la infección por dengue actúa, además, directamente sobre las células endoteliales, aumentando su

permeabilidad, y potenciando el estallido respiratorio (468, 469). Mangada y Rothman reportaron la producción de $\text{TNF } \alpha$, junto a $\text{IFN}\gamma$, por linfocitos CD4^+ , tras la estimulación con péptidos heterólogos, resultado confirmado posteriormente por Imrie y Cols (31, 401). Kurane en el 2007 aborda en detalle el papel de esta citoquina en la patogénesis de la infección por dengue, atribuyéndole un rol protagónico, al involucrarse directamente en la extravasación de plasma, el choque y las manifestaciones hemorrágicas (402).

Vitarana y Cols. fueron los primeros en reportar niveles elevados de $\text{TNF } \alpha$ en pacientes con FHD, y sugerir que este podría ser responsable del choque, trombocitopenia y trastornos de la coagulación (403). En ese mismo año Yadau y Cols. también reportan niveles elevados de este mediador en pacientes con las formas mas severas de la enfermedad por dengue (404), resultados que son corroborados posteriormente por varios autores (27, 394, 405-408).

Niveles elevados no solo de $\text{TNF}\alpha$, sino también de su receptor TNFR80kds se han reportado en niños con FHD (244). En este sentido también apuntan los reportes de Hober y Cols., demostrando niveles elevados de $\text{TNF}\alpha$ y de receptor soluble TNFRp75 en suero, plasma y cultivos de sangre total de pacientes con dengue (239, 460, 461), de Fernández-Mestre y Cols. y de Azeredo y Cols., quien además de encontrar $\text{TNF}\alpha$ y su receptor TNFRp75 elevados en pacientes de dengue comparado con controles, demostró una correlación entre este marcador y las manifestaciones hemorrágicas (291, 409). Un estudio más reciente relacionado con los receptores de TNF reportaron bajos niveles de TNFR1 concomitando con niveles elevados de $\text{TNF}\alpha$ soluble en plasma de pacientes con FHD (410). Cardier y Cols., por su parte, detectaron que el TNF presente en suero de pacientes con infección aguda inducía apoptosis de las células endoteliales microvasculares (102). La correlación de los niveles de esta citoquina con el numero de exposiciones al virus encontró niveles significativamente mayores de $\text{TNF } \alpha$ en pacientes con infección secundaria, y en fase tardía de la enfermedad (28). Este marcador ha sido evaluado, además, como un predictor de severidad, asociándose significativamente a trombocitopenia (397). Los resultados sobre de esta citoquina coinciden con lo reportado en la literatura, puesto que los niveles de expresión elevados observados en individuos blancos apuntan hacia el papel patógeno de la misma en la infección por dengue.

$\text{TGF}\beta$ e IL-10 mostraron un patrón opuesto a las citoquinas pro-inflamatorias, al ser su expresión mayor en los individuos negros con respecto a los blancos (Figuras 10 y 11).

La figura 10 a exhibe la expresión de $\text{TGF } \beta$ en CMSP de individuos inmunes a dengue 1, inmunes a dengue 2 e inmunes a dengue 3 blancos y negros al ser infectadas por 24 h con VD1, 2 y 3. Se puede

observar que en cada caso es significativamente mayor la expresión ante la estimulación homóloga que ante la estimulación heteróloga ($p < 0,05$). La figura 10 b permite comparar directamente la respuesta ante la estimulación heterotípica entre blancos y negros, observándose una expresión significativamente mayor en los individuos negros comparados con los blancos ($p < 0,05$).

El papel del TGF β en la patogénesis de la infección por dengue se comenzó a estudiar en 1998, cuando ya se describieron niveles elevados de esta citoquina en plasma de niños con FHD (406). Un año después Aggarwal y Cols. realizaron un detallado estudio sobre el rol de esta citoquina en dengue, al estudiar la expresión de genes de TGF β en *SM* y sus concentraciones en suero, en pacientes con enfermedad por dengue con diferentes grados de severidad, comparados con controles (411). Estos autores no encontraron ni ARNm ni proteínas de TGF β en los controles, y si en el 96 % de los pacientes estudiados, mostrándose los niveles mas elevados en pacientes con FHD, por lo que le atribuyen un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Chaturvedi y Cols. también relacionan el TGF β a la patogénesis de la enfermedad, al asociarlo a una respuesta TH2 actuando de forma sinérgica con la IL-10, y antagónica con la IL-12, y asociado a las formas graves de la enfermedad (412). En el 2006 se retoma el estudio de este mediador, reportándose niveles significativamente elevados en pacientes de dengue comparados con controles, junto a IL-18 e ICAM-1 (111). Otra interesante aproximación al papel de esta citoquina proviene del estudio de Tay y Cols., quienes estudiaron la fuerza de la influencia de diferentes citoquinas, entre ellas el TGF β , en el desarrollo de las formas graves de la enfermedad, empleando un modelo estocástico de inducción de probabilidades, que permitiera definir puntos de intervención que pudieran prevenir el desarrollo de FHD, y el TGF β resultó una de las citoquinas identificadas (413).

Se puede observar en la figura 11 a la expresión de IL-10 ante el reto homólogo y heterólogo de CMSP de individuos inmunes a dengue 1, 2 y 3. Similarmente a lo ocurrido para el TGF β la expresión de IL-10 es mayor ante el reto homólogo en ambos grupos ($p < 0,05$), y también mayor en los sujetos negros que en los blancos, como se aprecia en la figura 11b ($p < 0,05$).

Existen múltiples trabajos que abordan el papel de la IL-10 en la infección por dengue. Entre las células identificadas como productoras de IL-10 tras la infección por dengue se encuentran las dendríticas (414). Varios autores han correlacionado esta citoquina con las diferentes formas del cuadro clínico del dengue, asociándola con las formas más severas de esta enfermedad (489-491), y particularmente con signos de alarma como la trombocitopenia (421, 454). Otros reportes de interés en este sentido provienen del análisis de la asociación de esta citoquina con el cuadro clínico, pero en el contexto del número de exposiciones al virus, considerando la infección secundaria como factor de riesgo demostrado para el

desarrollo de las formas graves de la enfermedad. Así, Pérez y Cols. en el 2004 reportan niveles significativamente elevados de IL-10 en pacientes de dengue comparados con controles, siendo mayores en los casos con FHD, lo cual se mantiene significativo en pacientes con infección secundaria, los cuales muestran niveles consistentemente altos (32). Ese mismo año Nguyen y Cols. correlacionan diferentes patrones de citoquinas pro y anti inflamatorias con la infección primaria o secundaria, atribuyéndole a la IL-10 un rol en la patogénesis de la infección secundaria por dengue en niños (415). Estos resultados fueron corroborados recientemente al reportarse asociación de la infección secundaria por dengue 2 con niveles aumentados de IL-10 y de esta con plaquetas disminuidas y una mayor predisposición a la tendencia a la hemorragia y a desarrollar FHD (494, 495).

Otro grupo de trabajos sobre esta citoquina en la infección por dengue fueron realizados por Chaturvedi y Cols., en los que se ubica a la IL-10 entre las citoquinas tipo TH2, asociándolas a un cuadro clínico severo (387, 412). En este sentido también apuntan las conclusiones de Yang y Cols., quienes plantean que un desequilibrio entre el patrón TH1 y TH2, con predominio de este último es responsable de la immunoamplificación heterológica (416). Otro reporte que correlaciona la IL-10 con la con la immunoamplificación proviene de Chareonsirithigul y Cols., quienes reportan que la diseminación de la infección por el fenómeno de ADA induce la producción de mediadores anti-inflamatorios como la IL-10 (417).

Si bien tanto la IL-10 como el TGF β han sido asociadas al cuadro severo de la enfermedad por dengue, y por ende se les ha atribuido un papel inmunopatogénico, está bien documentada el papel anti-inflamatorio e inmunoregulador de ambos mediadores en las infecciones. Los resultados obtenidos muestran niveles significativamente altos de expresión de TGF β 1 e-**IL** en los individuos negros comparados con los blancos, lo cual podría estar en aparente contradicción con lo reportado en la literatura sobre dengue, si consideramos la menor predisposición observada en este grupo étnico cubano a desarrollar el cuadro grave de la enfermedad por dengue. Sin embargo los resultados obtenidos si estan en concordancia con el papel de ampliamente descrito en la literatura para ambos mediadores en el control y regulación de la respuesta inflamatoria (159, 163, 170, 171, 418).

Constituye un hecho bien establecido en la literatura la adquisición de inmunidad protectora serotipo específica tras una infección primaria por dengue. Si, como ha sido repetidamente reportado, una respuesta inmune inflamatoria esta involucrada en el fenómeno inmunopatogénico, resulta lógico pensar que un “status inmune protector”, en dengue, esté asociado a un entorno anti-inflamatorio. Estos resultados pueden ser aparentemente contradictorios con los varios reportes que relacionan la IL-10 y el

TGF β 1 con el cuadro de FHD/SSD (32, 387, 393, 412, 419); sin embargo, como citoquinas regulatorias anti-inflamatoria, las altas concentraciones de mediadores liberados a nivel sistémico durante el cuadro clínico severo podrían estar induciendo su producción como mecanismo de control regulatorio, y es por esto que se detectan niveles elevados asociados al cuadro clínico severo.

Los resultados obtenidos con el factor de la transcripción FoxP3, Fork head box P3, con niveles de expresión significativamente más elevados en individuos negros comparados con los blancos, apoyan esta hipótesis ($p < 0,05$) (Figura 12 b). Aunque no resultan significativas, también se observan (Figura 12 a) diferencias en la expresión de FoxP3 entre la infección homóloga y heteróloga. FoxP3 es un factor de transcripción que caracteriza a las células T reguladoras naturales, y su papel como gen regulador de la transcripción en el desarrollo y funciones de las células T reguladoras ha sido demostrado. (177). Existe solo un trabajo sobre células T reguladoras y dengue, en pacientes con infección aguda por dengue con diferentes grados de severidad (37), donde la relación células Treg/Tefectora se mostró significativamente incrementada en los casos leves comparados con los graves, por lo que se puede concluir que una frecuencia equilibrada de Treg con respecto a T efectoras puede asociarse con un cuadro clínico leve. Los resultados aquí obtenidos muestran una expresión significativamente mayor de TGF β , IL-10 y FoxP3 en los individuos negros comparados con los blancos. Esto podría estar indicando un predominio de un patrón regulatorio asociado al color negro de la piel, lo cual pudiera parcialmente explicar la menor propensión mostrada por este grupo étnico a desarrollar las formas más severas de la enfermedad por dengue.

En relación con los mediadores citotóxicos, la expresión de Perforina fue más alta en los sujetos negros y que en los blancos, siendo significativa esta diferencia ($p < 0,05$). (Figura 13 b). La Granzima B también se mostró mas elevada en negros que en blancos ($p < 0,05$) (Figura 14 b). Resulta también de interés que la expresión de ambos mediadores es significativamente mayor en los individuos inmunes a dengue 3 (infección secundaria de CMSP 3 años después de la infección primaria) que la de los inmunes a dengue 1 y dengue 2 (infección secundaria 20 años después de la infección primaria) ($p < 0,05$). Esto podría indicar que el tiempo de la memoria inmunológica a dengue es importante en la expresión de esta molécula. (Figura 13 a y 14 a).

Existen pocos estudios sobre granzima B y perforina en la infección por dengue. En 1989 Kurane y cols. demostraron que tras una infección primaria por dengue los clones de linfocitos CD4+ y CD8+ de memoria se activaban y mostraban actividad citotóxica en respuesta a virus dengue (356). Gagnon y cols. reportaron en 1999 actividad citotóxica de los linfocitos CD4 en dengue específica a la proteína de la

cápsida, y que podía ocurrir por mecanismos secretorios o de membrana dependiendo del tipo de la célula diana (133). A pesar de la importancia de la respuesta CTL en la respuesta inmune antiviral esta ha sido asociada con la patogenicidad en la enfermedad por dengue, ya que la activación parcial de algunas células T de reactividad cruzada entre serotipos, las cuales carecen de la afinidad suficiente para producir un efecto antiviral óptimo, pudiera potenciar la diseminación de viriones infectivos (133, 209, 420-424). Recientes estudios sobre el papel de estos mediadores “in vivo” encontraron una asociación de los niveles séricos de granzima B y perforina con los niveles de proteína NS1 soluble, lo cual apoya que este mecanismo podría estar asociado a la diseminación viral. (Perez y Cols. 2009, comunicación personal).

Los resultados del presente estudio, sin embargo, muestran altos niveles de estos mediadores citotóxicos en los individuos de color negro, comparado con los blancos (Figuras 13 y 14). La respuesta CTL es un importante mediador de la eliminación viral, sin inducción de excesiva respuesta inflamatoria. Particularmente los niveles de avidéz funcional han sido mostrados como un determinante importante de protección en la infección por dengue “in vivo” (425). Por todo lo anterior la mayor respuesta de mediadores citotóxicos secretorios observada en los individuos negros puede estar asociada a la menor vulnerabilidad a las formas graves de la enfermedad por dengues observadas en este grupo étnico.

Otro mecanismo inmune efector citotóxico de importancia en las infecciones virales es la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), donde las células efectoras son mayormente las NK, y que combina la potente acción citolítica de estas con la especificidad de los anticuerpos IgG contra los antígenos de dengue presentes en las células dianas de esta infección viral. La ADCC juega un importante papel en el control de diferentes enfermedades virales. En VIH se ha demostrado el papel de este mecanismo efector “in vitro” contra las proteínas de envoltura del virus, mediado por suero y células efectoras de individuos infectados por VIH. Varios estudios han demostrado que los títulos de anticuerpos mediadores de ADCC decrecen a medida que la infección progresa a SIDA(426-428). También se ha reportado asociación de menores títulos de anticuerpos mediadores de ADCC con el desarrollo de hepatitis en individuos infectados con virus de la hepatitis C (429). En dengue se ha reportado la asociación del ADCC a protección en etapas tempranas de la infección (430, 431). La fuerte respuesta de granzima/perforina observada en la respuesta de los individuos de color negro puede también estar asociada a una respuesta protectora temprana de ADCC.

El análisis de la molécula citotóxica Fas ligando mostró, contrario a lo observado con la perforina y la granzima, una expresión mayor en los individuos blancos que en los negros que se acercó a la significación ($p=0.053$) (Figura 15b). Estudios realizados sobre la patogénesis de la hepatitis C, un virus

que comparte la familia *flaviviridae* con el dengue, que existen diferencias en la respuesta citotóxica mediada por Fas ligando y la mediada por la perforina y la granzima. Esta última parece estar involucrada en la destrucción de las células infectadas, por lo que constituye un mecanismo recontrol y recuperación. El Fas ligando, por el contrario, parece mediar la eliminación de las células T activadas, afectando la respuesta antiviral y favoreciendo la patogénesis (432).

En concordancia con esto, la expresión de Fas ligando de acuerdo a la inmunidad precedente de los sujetos blancos y negros involucrados en el estudio, y al serotipo de virus dengue utilizado en la infección secundaria, se comporta como la de los otros mediadores pro-inflamatorios (Figura 15 a), obteniéndose la mayor expresión en respuesta a la estimulación heterotípica.

El FasL es uno de los llamados “receptores de muerte”, el cual al unirse las moléculas. Estos receptores son activados por miembros de la superfamilia del TNF inducen una cascada de eventos intracelulares que llevan a la muerte celular, proceso conocido como apoptosis. (196-198). La infección por dengue puede disparar o modular la apoptosis en una variedad de células “in vitro”, como células de Kupfer, de hepatoma humano, como los hepatocitos, la epidermis y dendríticas humanas (218, 433, 434). También ha sido descrita “in vivo”, en análisis histopatológicos de hígado, cerebro, intestino y tejido pulmonar, describiéndose también en estos últimos dos tejidos apoptosis en las células endoteliales de la microvasculatura (100) (435).

La apoptosis ha sido también explorada durante la infección aguda por dengue. Mynt y Cols. describieron que los niveles de apoptosis de las CMSP se correlacionaban con la severidad del cuadro clínico, y que los niveles plasmáticos de CD95 fueron mayores en niños con FHD comparados con los que tienen FD (134). Courageot y Cols. también correlacionaron la apoptosis con la patogénesis de la FHD/SCD (101). Un estudio muy reciente de Pérez y Cols. encontró niveles elevados de Fas ligando asociados a la presencia de signos de alarma y con la leucopenia durante la infección clínica secundaria por dengue 4. (Perez y Cols. 2009, comunicación personal). Los niveles elevados de Fas ligando encontrados en este estudio, en los individuos de raza blanca, coinciden con lo reportado en la literatura, si consideramos el papel que parece jugar la apoptosis en la patogénesis de la FHD.

De manera general, los individuos inmunes a dengue mostraron una expresión significativamente mayor de los mediadores estudiados que los no inmunes (resultados no mostrados), lo cuál implica que la memoria inmunológica esta implicada en los resultados encontrados. Los individuos blancos mostraron una mayor expresión de quimoquinas proinflamatorias, entre ellas MIP-1alfa, MCP-1, e IL-8, y citoquinas proinflamatorias como IFN γ , TNF α y Fas ligando, sobretudo a expensas de la estimulación heterotípica,

particularmente en las secuencias DV1-DV2, DV1-DV3 (inmunes a dengue 1 en respuesta a dengue 2 y dengue 3), DV2-DV3 (inmunes a dengue 2 en respuesta a dengue 3) y DV3-DV2 (inmunes a dengue 3 en respuesta a dengue 2). En los sujetos negros se observó un predominio de la quimoquina RANTES y de los mediadores regulatorios TGF β 1, IL-10, y FoxP3 además de mediadores citolíticos como granzima B y perforina. TGF β 1, IL-10, y FoxP3 mostraron una respuesta mas elevada en la estimulación homotípica comparada con la heterotípica. Los mediadores citotóxicos mostraron una significativa diferencia dependiendo del background inmune de los sujetos, siendo mayor la expresión en los individuos inmunes a dengue 3, en quienes la infección secundaria ocurrió solo 3 años después de la primoinfección, que en los inmunes a dengue 1 y 2, con antecedentes de una infección previa 20 años antes de la infección secundaria *ex vivo* de sus CMSP. Este resultado resulta de gran interés si consideramos que, la severidad de la infección por dengue parece aumentar a medida que aumenta el tiempo transcurrido después de la infección primaria. La comparación de las epidemias ocurridas en Cuba en 1981 y 1997, ambas debido a la infección secundaria por dengue 2 en individuos con una infección previa por dengue 1, mostró que la ocurrida en 1997, 20 años después de la epidemia por dengue 1 (1977) fue mucho mas severa, en términos de morbilidad y mortalidad, que la ocurrida solo 4 años después, en 1981, como indica el hecho de una proporción de casos fatales fue 5 veces mayor en 1997 con respecto al número de casos que en 1981 (436). La respuesta inmune celular de memoria pudiera estar involucrada en esta severidad relacionada al tiempo. El tiempo podría invertir el balance en favor de una respuesta inmune patológica vs. una protectora, a medida que la afinidad y la avidéz de los clones de linfocitos T citotóxicos disminuya, así como la los clones específicos de células CD4.

Las epidemias de dengue ocurridas en Cuba han demostrado que la infección secundaria heterotípica constituye un fuerte factor de riesgo para el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. En cada una de ellas se demostró en los casos graves la existencia previa de memoria inmunológica a un serotipo diferente del causante de esa epidemia, producto de una infección anterior. La infección secundaria heteróloga activa esta respuesta inmune heterotípica, produce la activación de las células T, y consecuentemente la producción de IFN- γ , que aumenta la expresión de receptores Fc La mayor expresión de receptores Fc facilita la entrada de inmucocomplejos de partículas virales infectivas y anticuerpos no neutralizantes, propiciando la diseminación de la infección. El TNF- α y el IFN- γ activan otras células de la cascada inmune, tambien productoras de citoquinas pro-inflamatorias, aminas vasoactivas y anafilotoxinas. Esta tormenta de citoquinas, en un corto período de tiempo, produce ruptura de las células vasculares endoteliales, alteración del sistema de coagulación, extravasación de

plasma y manifestaciones hemorrágicas (291). La mayor respuesta pro-inflamatoria observada en la estimulación serotipocruzada en individuos de raza blanca pudiera estar relacionada con la cascada de eventos generados “in vivo” debido al exceso de respuesta inflamatoria, en ausencia de una respuesta regulatoria, la cual contribuye a múltiples aspectos de la patogénesis de la FHD.

En la presente investigación se observa una mayor expresión de estos mediadores en la respuesta homóloga. Esto concuerda con las observaciones epidemiológicas sobre el desarrollo de inmunidad protectora de por vida al serotipo primo infectante. También se observa una expresión significativamente mayor de estos mediadores en el grupo étnico menos proclive al desarrollo de FHD ante una infección secundaría heterotípica. Sus acciones regulatorias son probablemente cruciales en el control de la respuesta inflamatoria sistémica inducida durante el cuadro de FHD/SSD, y por ende de los dañinos fenómenos patogénicos asociados con la misma. Su efecto regulatorio e inmunosupresor puede estar relacionado con la recuperación de la mayoría de los pacientes que sufren el cuadro severo de la infección por dengue, si consideramos que, a pesar de la elevada morbilidad de la infección por dengue, se reporta niveles bajos de letalidad (0.5%-3.5%) (437).

Varios son los estudios que han proporcionado evidencias que la infección por dengue resulta en la inducción de una sobre-expresión de citoquinas pro-inflamatorias, y una sobre-activación del sistema inmune, correlacionándose el grado de activación con la severidad de la enfermedad (420, 438, 439). Los niveles elevados de citoquinas proinflamatorias inducen las actividades regulatorias del TGF β 1 y la IL-10, en un intento por controlar este fenómeno inmunopatogénico. Una adecuada respuesta inmune depende de un balance entre citoquinas pro-inflamatorias y regulatorias. IFN- γ /TNF- α son mediadores críticos en la inflamación, tanto en enfermedades infecciosas como no infecciosas, estando controladas por las citoquinas antiinflamatorias como las TGF- β y la IL-10 (440). El equilibrio entre estas 2 ramas de la inmunidad mediada por células es vital para lograr una respuesta efectiva y balanceada. Una respuesta inflamatoria TH1 intensa (IFN- γ /TNF- α), sin un adecuado control regulatorio (TGF- β /IL-10) pudiera explicar la mayor propensión de los individuos de color blanco a desarrollar las formas clínicas severas de la enfermedad por dengue.

Una adecuada respuesta inmune depende de un balance entre citoquinas pro-inflamatorias y regulatorias. IFN- γ /TNF- α son mediadores críticos en la inflamación, tanto en enfermedades infecciosas como no infecciosas, estando controladas por las citoquinas antiinflamatorias como las TGF- β y la IL-10 (440). El equilibrio entre estas 2 ramas de la inmunidad mediada por células es vital para lograr una respuesta efectiva y balanceada. Una respuesta inflamatoria TH1 intensa (IFN- γ /TNF- α), sin un adecuado control

regulatorio (TGF- β /IL-10) pudiera explicar la mayor tendencia de los individuos de color blanco a desarrollar las formas clínicas severas de la enfermedad por dengue.

IV.3. Asociación de genes HLA clase I y clase II con FHD/SCD en los diferentes grupos étnicos cubanos

Este estudio incluyó 120 individuos de Santiago de Cuba, 69 mujeres y 51 hombres, edades de 19 a 72 años, media de 40.1, 73 con antecedentes de fiebre dengue y 47 con antecedentes de fiebre hemorrágica por dengue durante la epidemia de dengue 2 ocurrida en 1997 en Santiago de Cuba, y clasificados de acuerdo al color de la piel en 70 blancos, 32 negros y 18 mestizos. El estudio incluyó como controles 189 individuos sanos, no emparentados, pareados étnica y geográficamente

IV.3.I Comparación de frecuencias alélicas HLA clase I y II en individuos con antecedentes de enfermedad por dengue (FD ó FHD) y controles, y entre individuos con antecedentes de infección primaria o secundaria y controles

La Tabla 3 muestra las frecuencias de los alelos HLA clase I A, B y C de los 120 individuos con antecedentes de FD y FHD durante la epidemia por dengue 2 ocurrida en Santiago de Cuba incluidos en el estudio. Los alelos HLA clase II DRB1 solo se pudieron realizar en 85 individuos y los HLA clase II DQB1 en 77 individuos. La Tabla 4 muestra las frecuencias de los alelos HLA clase I y clase II en los controles pareados étnica y geográficamente.

Al comparar las frecuencias de los alelos HLA-A entre los los individuos con antecedentes de FD y FHD con los controles se observó una frecuencia significativamente mayor para el alelo HLA 31 en los casos (X^2 : 25.62, $P=0.000001$, $P_c=0.000004$, $OR:13.39$, IC (95%): 3.63-53.75) (Tabla 5). El análisis de la homocigosidad para este alelo mostró que este rasgo esta significativamente asociado al riesgo de desarrollar enfermedad por dengue (X^2 : 12.98, $p=0.0003$, $p_c=0.0005$, $OR=3.84$ IC 95%:(1.67-9.12)

Existen reportes acerca de la asociación de este alelo a la enfermedad por otras infecciones virales como el VIH y CMV (440). También se ha asociado a virus de Epstein Barr, y Hepatitis viral aguda causada por virus de Hepatitis B y C (441). Esto podría indicar que este alelo condiciona un reconocimiento antigénico en el contexto de las moléculas HLA clase 1 que conlleva una respuesta citotóxica de linfocitos CD8 deficiente contra las células infectadas por estos virus, y por ende una mayor propensión al desarrollo de la enfermedad.

Las frecuencias de los alelos HLA-B coincidieron entre casos y controles con la excepción de HLA-B*15, el cual resultó significativamente mayor en los casos con antecedentes de enfermedad por dengue (X^2 :

16.28, $P=0.00005$, $P_c=0.0002$, $OR:4.46$, $IC (95\%): 1.96-10.29$) (Tabla 5). El análisis de la expresión homocigótica para B*15 mostró que el riesgo de enfermar por dengue aumenta considerablemente con la doble expresión de este alelo ($X^2: 45.49$, $P=0.0000000$, $P_c=0.0000000$ $OR=26.26$ $IC 95\%: (6.25-156.41)$). Existen pocos trabajos en la literatura sobre asociación de este alelo a enfermedades infecciosas virales. Uno de ellos refiere una frecuencia significativamente elevada entre individuos hindúes infectados por Hepatitis C comparados con controles étnicamente pareados (442). Esto resulta de interés si consideramos que tanto el dengue como la hepatitis C pertenecen a la misma familia, *flaviviridae*, por lo que comparten similitud antigénica. El reconocimiento de epitopes antigénicos similares por la molécula HLA codificada por genes del grupo alélico B*15 puede condicionar una respuesta CTL insuficiente que redunde en una mayor propensión a las infecciones por flavivirus. Los alelos B*62, B*76, and B*77, relacionados con B*15, se han descrito como asociados a protección contra el desarrollo de enfermedad por dengue en población Tailandesa (286). Estos resultados difieren de los encontrados en población cubana, en los que este alotipo se asocia a riesgo para desarrollar la enfermedad, sin embargo, la población cubana difiere grandemente en cuanto a su background genético de la población tailandesa, lo cual podría explicar las diferencias. HLA B*15 es la denominación de un extenso grupo de alelos polimorficos estrechamente relacionados, que se encuentran en diferentes combinaciones y frecuencias en todas las poblaciones (443).

Resulta de gran interés que este alotipo se ha reportado asociado a la diabetes insulina dependiente (444, 445), si consideramos que en las epidemias cubanas de dengue hemorrágico se ha observado una mayor predisposición de los individuos que padecían diabetes a desarrollar las formas severas de la enfermedad (13, 17, 276, 446).

Tanto en el grupo de controles como en el de los individuos con historia de enfermedad por dengue predominaron los mismos alelos HLA-C.

El análisis de las 13 diferentes frecuencias DRB1 entre casos y controles mostró coincidencia en los alelos excepto para DRB1*07, el cual fue significativamente mas frecuente en el grupo de los controles ($X^2=18.25$, $P= 0,00003$). (Tabla 5).

Resultó interesante el hecho que, al clasificar los casos en primarios y secundarios y comparar las frecuencias de cada grupo con los controles resultó también ser significativamente menos frecuente en el grupo de casos con infección secundaria el alelo DRB1*04 comparado con los controles, asociándose a protección a desarrollar enfermedad por dengue en este grupo. (Tabla 6).

En este estudio los alotipos HLA clase II DRB1 se mostraron asociados a protección contra el desarrollo de enfermedad sintomática en individuos inmunes a dengue, mientras que los de clase I se asociaron con riesgo. Esto es consistente con lo reportado por otros autores en población asiática que encontraron el polimorfismo de HLA clase I significativamente asociado con predisposición a FHD, a diferencia del HLA-DRB1 (292).

Son varios los trabajos que consideran a los alelos HLA clase II del locus DRB1*04 como alelos “Amerindios”, de grupos étnicos Meso-Amerindios y Amerindios Sur-Americanos (447-452). Recientemente fueron descritos 6 alelos del locus DRB1 en población cubana (453) que solo habían sido descritos previamente en grupos étnicos Amerindios Sur-Americanos y Meso-Americanos, y que incluyen a varios alelos del grupo del DRB1*04 (454, 455).

El municipio de Santiago de Cuba es el lugar donde la población aborígen persistió por más tiempo en Cuba (456), y aún en el presente se pueden apreciar rasgos amerindios fenotípicos característicos que los diferencia de la población del resto del país. La identificación de un alelo DRB1 asociado a protección ante la enfermedad por dengue en esta población pudiera ser explicada por la presencia de estos genes amerindios. Estos resultados concuerdan con la asociación del alelo DRB1*04 como un alelo de protección al desarrollo de FHD en población mexicana (287). Este alelo es también uno de los más frecuentes en mestizos mexicanos y población amerindia de México (457).

En este contexto resulta de gran interés la marcada severidad de las epidemias de dengue ocurridas en Cuba en 1981 y 1997 cuando se comparan con las ocurridas en otros países de la región de las Américas, con la misma secuencialidad y el mismo serotipo, y aún por cepas genéticamente relacionadas (436, 458). La mayor presencia de genes amerindios en estas poblaciones, que no sufrieron etnocidio aborígen, probablemente les esté confiriendo protección contra el desarrollo de las formas graves de la enfermedad por dengue.

Las frecuencias de HLA DQB1 no se pudieron realizar en los controles, por lo que no fue posible realizar la comparación.

La tabla 7 muestra las medidas de impacto potencial, como son el Riesgo atribuible (RA), el Riesgo atribuible de expuestos porcentual (RAE%), y el riesgo atribuible poblacional porcentual (RAP%).

El riesgo atribuible refleja el riesgo de presentar la infección clínica exclusivamente debido a la presencia del alelo analizado. El RAE% refleja el porcentaje de los infectados con el alelo, que enfermaron en gran medida por la presencia del alelo. Por último el RAP% muestra que porcentaje de todos los casos con la enfermedad se deben a la presencia del alelo.

IV.3.2 Comparación de frecuencias alélicas HLA clase I y II en individuos con diferentes formas clínicas de infección por dengue (FD ó FHD).

Las Tablas 8 y 9 muestran las frecuencias de los alelos HLA clase I de los individuos con antecedentes de FD y FHD, respectivamente. Al analizar la diferencia de proporciones en las frecuencias génicas de los alotipos del sistema HLA clase I en individuos con diferentes formas clínicas de infección por dengue, la frecuencia génica de HLA A*36 resultó significativamente mayor en casos de FHD que FD ($X^2= 5.18$, $P = 0.02$, $P_c=0.03$, $OR= 0.12$, $IC\ 95\%=0.01 - 0.22$), mientras que una frecuencia incrementada de HLA A*74 se encontró en casos FD comparados a los FHD ($X^2= 4.25$, $P = 0.03$, $P_c=NS$, $OR= 1.41$, $IC\ 95\%=2.05 - 2.73$) (Tabla 10). Al analizar las diferencias en las frecuencias génicas de los alelos del locus C, la frecuencia de CW*16 ($X^2= 5.25$, $P = 0.02$, $OR= 0.35$, $IC\ 95\%=0.04 - 0.65$) y CW*18 ($X^2= 3.08$, $P = 0.04$, $P_c=NS$, $OR= 0.36$, $IC\ 95\%=0.04 - 0.52$), resultó significativamente mayor en casos de FHD que FD (Tabla 10).

No se observaron diferencias significativas entre los individuos con antecedentes de FHD y los que tenían antecedentes de FD durante al epidemia de Santiago de Cuba de 1997 para los alelos HLA clase I B, HLA clase II DRB1 y DQB1. (Tabla 10).

HLA A*36 es considerado un alelo caucásico, predominante en población española (459). La asociación de HLA A*36 con la FHD pudiera estar relacionado con la presencia de estos genes heredados de nuestros ancestros europoides. Esto tiene sentido, si consideramos que ni el virus dengue ni su vector han circulado en Europa, por lo que no ocurrió un mecanismo de selección natural a través del tiempo que permitiera seleccionar a la población mas resistente, hecho que si ocurrió en otras regiones donde el virus ha circulado durante siglos como África y América (69, 460).

CW*16, por su parte, se ha asociado a alta carga viral por VIH (461). Otros reportes sobre este alelo lo relacionan con la enfermedad de Behcet's en población portuguesa (462), y leucemia linfocítica crónica en población española (463). Resulta de interés que CW*16 sea uno de los alelos mas compartidos entre Africanos y Europeos (464). Este alelo podría estar asociado al desarrollo de las formas graves de la enfermedad por dengue tanto en blancos como en los casos de los individuos cubanos negros que desarrollan este cuadro. CW*18 se ha reportado asociado a enfermedades autoinmunes como la esclerodermia (465), y es alelo de alta frecuencia en población mongoloide (466). Resulta de interés que a pesar de la baja frecuencia de genes mongoloides en el componente genético de nuestra población (453), en nuestro trabajo estos están asociados a la infección severa por dengue.

Existen escasos reportes sobre asociaciones del alelo A*74 con enfermedades en humanos. Se ha demostrado que confiere protección contra el desarrollo de neoplasia cervicales asociadas a la infección por virus de papiloma en población holandesa (467).

IV.3.3 Comparación de frecuencias alélicas HLA clase I y II en individuos blancos con diferentes formas clínicas de infección por dengue (FD ó FHD).

La tabla 11 muestra las frecuencias génicas de los alotipos del sistema HLA clase I (A, B, C), y HLA clase II (DRB1, y DQB1) en individuos cubanos blancos con historia de enfermedad por dengue. La tabla 12 muestra estos mismos datos, en individuos negros, y en la tabla 13 podemos observar las frecuencias genicas de los sujetos considerados como mestizos o mulatos, de acuerdo al color de la piel.

Considerando que los individuos blancos son precisamente el grupo de mayor riesgo para desarrollo de FHD en población cubana en el presente trabajo se analizó que alelos resultaron mas frecuentes en el grupo de sujetos blancos que desarrollaron enfermedad por dengue, y cuales mostraron mayor frecuencia en aquellos sujetos blancos que desarrollaron FHD.

Tal como se observa en la Tabla 14, tres de los alelos HLA clase I, A*02 ($X^2=5.69$, $P=0.017$, $OR=2.17$), B*44 ($X^2=7.56$, $P=0.006$, $OR=4.23$) y CW*14 ($X^2=5.05$, $P=0.024$, $OR=7.6$) mostraron una frecuencia estadísticamente mayor en los individuos blancos que desarrollaron enfermedad por dengue que en aquellos no blancos, comportándose como alelos de riesgos. Dos alelos HLA clase I, B*53 ($X^2=7.03$, $P=0.08$, $OR=0.19$), B*44 ($X^2=4.40$, $P=0.036$, $OR=0.14$) se observaron en mayor frecuencia en los individuos no blancos con antecedentes de cuadro clínico por dengue, asociándose a protección para el desarrollo de la enfermedad.

El análisis respecto al desarrollo de la FHD mostró un solo alelo asociado a riesgo para el desarrollo del cuadro grave, HLA clase I A*02 ($X^2=6.03$, 7.56 , $P=0.014$, $P_c=0.0266^*$, $OR=3.72$) mayor en los individuos blancos que desarrollaron enfermedad por dengue que en aquellos no blancos. Un solo alelo HLA clase II, DQB1*06 ($X^2=10.60$, $P=0.0041$, $P_c=0.0011$, $OR=0.11$), se observó en mayor frecuencia en los individuos no blancos que sufrieron fiebre hemorrágica por dengue, asociándose a protección para el desarrollo de la enfermedad (Tabla 15).

B*53 se ha asociado a progresión lenta a SIDA en individuos portadores de VIH, argumentándose que pudiera estar implicado en una respuesta CTL efectiva contra la replicación del virus (468). Bansal y colaboradores confirman su papel en como mediador de respuesta CTL potente a VIH, lo cual se asocia a disminución de la carga viral (469). B*53 también se asocia a protección contra la infección por VIH en

parejas discordantes (470). Muy interesante resulta el hecho que este alelo es considerado un alelo negroide, característico de poblaciones Africanas (453). El hecho que esté asociado a protección al desarrollo de la enfermedad por dengue en población blanca cubana podría sugerir que los genes heredados de nuestros ancestros negroides confieran protección ante el desarrollo de las formas graves de la enfermedad. Los niveles elevados de transmisión de virus dengue en África por siglos (460, 471) probablemente condicionaron la exposición al mismo de múltiples generaciones de africanos, seleccionándose por selección natural los mas resistentes, entre los cuales se encontraban los esclavos africanos traídos a nuestro país, y que constituyen nuestros ancestros. B*08 es también un alotipo asociado a respuesta CTL a infecciones virales. Se ha reportado su correlación con una respuesta CTL efectiva a virus sincitial respiratorio en población sudafricana (472), a virus influenza en población nórdica (473), a VIH en población norteamericana (474) y a hepatitis C en población germana, donde se asocia a una clarificación espontánea del virus (475).

El alelo B*44 se ha identificado como la diana fundamental de células aloreactivas en transplante de medula ósea no compatible (476), y se ha asociado también con enfermedades inflamatorias del intestino y de las articulaciones de naturaleza autoinmune (477). Existen también reportes que lo vinculan con enfermedades de naturaleza viral, como la neoplasia cervical por infección con HPV 16, reportándose que la presencia de este alelo condiciona un riesgo 5 veces mayor de desarrollar esta patología (478). Se ha referido también su asociación con infección crónica por el virus de la hepatitis B, y con la no respuesta a la vacunación con hepatitis B (479). Un reporte interesante es el de Fanning y Cols., quienes relacionan al B*44 con la persistencia de hepatitis C en población blanca irlandesa (480).

Se han descrito asociaciones de CW*14 con el desarrollo de pénfigo paraneoplásico en población China (481). También se ha asociado a la infección por VIH en población China, siendo aún mas fuerte la asociación entre los haplotipos CW*14-B*51 y CW*14-A*31 (482). Esto resulta de gran interés, ya que A*31 resultó asociado significativamente a la mayor vulnerabilidad a enfermar por dengue en población cubana, y es posible que la co-expresión de ambos alelos pueda potenciar la predisposición a la enfermedad por dengue.

De interés resulta también el hecho que CW*14 es un alelo altamente expresado en población China (481), y en población Hindú (466). Los alelos HLA de origen mongoloide se expresan con baja frecuencia en la población cubana (453), y resulta de interés el hecho de que resulte asociado a las formas graves de la enfermedad. De hecho existen reportes sobre la alta morbilidad y mortalidad a la infección por dengue en países asiáticos (283), los cuales contrastan con la baja incidencia en población negra. La ausencia de

FHD a pesar de la transmisión hiperendémica de dengue en Haití contrasta con la alta incidencia de este cuadro en países del Sudeste Asiático. Los niveles promedio anuales de infección por dengue en Puerto Príncipe, Haití han sido estimados ser un 30% mayores que los reportados en Yangon, Myanmar, donde los casos de FHD y de muertes por esta causa son elevados. Con los factores virales claramente presentes debían esperarse cientos de casos de FHD/SSD en Haití, sin embargo, ningún brote de FHD/SSD ni ningún caso esporádico de dengue ha sido reportado (283).

Resulta de interés que el alelo A*02 resultó también ser el único asociado a riesgo para desarrollar FHD en población blanca. (Tabla 15). A*02 es un alelo diverso y común en la mayoría de las poblaciones. (483, 484) (485). Sus formas polimórficas están asociadas a diferentes patrones de respuesta T CD8+, lo cual modifica la respuesta inmune ante diferentes enfermedades virales y tumorales (486). A*02 se ha asociado al desarrollo de Linfoma Hodking en individuos con infección por Epstein Barr virus (487), y al desarrollo de mielopatías asociadas a HTLV-1 (488). También se ha reportado asociación de este alelo a artritis juvenil idiopática (489), y a artritis reumatoide severa (490).

La modulación de la respuesta inmune por la expresión de las diferentes formas polimórficas de HLA A*02 parece estar dada por unión diferenciada a diferentes residuos aminoacídicos en la posición 99, localizada centralmente en el piso del bolsillo de la molécula HLA, y que resulta crítica para la formación de los dominios A,B,D y E de unión al péptido (491).

Una de sus formas polimórficas, A0207, donde se sustituye un residuo de tirosina por uno de cisteína en la posición 99, condiciona que se afecte la unión y presentación de péptidos derivados de 3 distintos virus, HTLV-1, CMV e Influenza M1 (492).

La asociación del alelo HLA clase I A*02 con la FHD tras una infección secundaria por dengue 2 fue reportada por Stephen y Cols. en población Tailandesa (286). Esto apoya los resultados del presente estudio, donde también exploramos la predisposición a desarrollar FHD tras una infección secundaria por dengue 2. Además, el hecho de que A*02 es un alelo ampliamente representado en todas las poblaciones en general, considerado por tanto un alelo ancestral originario nos permite comparar y validar los resultados obtenidos entre ambas poblaciones, a pesar de las marcadas diferencias en background genético.

HLA DQB1*06 resultó el único alelo asociado a protección a desarrollar FHD en blancos.

Esta molécula HLA también posee un residuo crítico en la unión al péptido en la posición 57 de la cadena HLA DQ beta. Las diferencias en la unión del péptido están influenciadas directamente por la existencia de una variante alélica dada. Si la variante alélica condiciona que en esa posición existan

aminoácidos básicos esta unirá preferentemente aminoácidos cargados negativamente. La unión de aminoácidos aromáticos o aminoácidos con carga negativa dependerá del tipo de forma polimórfica y modificará la respuesta inmune. En relación a la infección por VIH, la presencia de un ácido aspártico en la posición HLA DQ beta 57 de este alelo se asocia a no progresores a SIDA de más de 14 años en individuos seropositivos a VIH (493, 494).

El alelo DQB1*06 es un alelo predominante en población africana. El alto grado de mezcla racial y mestizaje de nuestra población hace que pueda estar presente en individuos fenotípicamente blancos, y probablemente esté entre los genes protectores que eviten el desarrollo de FHD en individuos blancos expuestos a una infección secundaria heterotípica.

Los resultados de los estudios de la respuesta inmune celular a dengue en los diferentes grupos étnicos cubano mostraron diferencias significativas entre individuos blancos y negros, lo cual sugería que los genes que codifican para las moléculas efectoras del sistema inmune involucradas en este fenómeno, altamente polimórficos, pudieran estar expresando de forma diferenciada en los diferentes grupos étnicos cubanos, modificando los eventos de la respuesta inmune efectora a virus dengue.

Los factores genéticos no han sido lo suficientemente estudiados en la infección por dengue. Sin embargo su papel en el desarrollo de las FHD puede ser inferida a partir de la pequeña proporción de personas inmunes a dengue que desarrollan FHD ante una infección secundaria heterotípica (214, 511), así como las diferencias étnicas en la vulnerabilidad a la FHD (17, 89, 282, 283). Los estudios publicados hasta el momento han sugerido asociaciones de variantes polimórficas de los genes del receptor FC γ , del receptor de la vitamina A, de la lectina de unión a manosa y del TNF alfa y de HLA clase I y II, (284-288, 292).

El alto grado de polimorfismo observado en los genes del complejo principal de histocompatibilidad (del Inglés MHC, Major Histocompatibility Complex, también conocido como HLA, Human Leucocyte Antigens), al compararse con otras regiones del genoma humano es evidencia de la marcada presión selectiva que un agente infeccioso puede ser. La región MHC codifica varias proteínas involucradas en la respuesta inmune, incluyendo el complemento y el TNF α . El complejo MHC propiamente determina el reconocimiento por los linfocitos T, evento que tiene un papel central en la generación y regulación de la respuesta inmune, y determina la individualidad de la misma (495). La variación del sistema MHC se ha asociado a diversas enfermedades virales, incluyendo la progresión lenta a paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en el caso del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y la resistencia a ser portador de hepatitis B (496, 497).

En contraste con otros países, caracterizados por la co-circulación de varios serotipos, Cuba representa un escenario excepcional para realizar estudios genéticos de resistencia/riesgo a FHD, al contar con marcadores serológicos y clínicos bien conocidos, en una población con una historia única de epidemias por dengue (498, 499)

De manera particular cada brote de dengue en Cuba ha permitido la identificación de los determinantes asociados con una infección particular de dengue, dado que la población ha estado expuesta a idénticas exposiciones previas a virus dengue en cada brote (2).

Además, en Cuba existe población negra y blanca, y diferentes grados de mezcla racial, lo cual facilita la identificación de genes potenciales de resistencia y riesgo (334).

Por todo lo anterior se estudió el polimorfismo de genes HLA A, B clase I y HLA DRB1 clase II, en individuos cubanos con antecedentes de de FD o FHD en el curso de infecciones primarias y secundarias por dengue 2, en el curso del el brote ocurrido en 1977 en Santiago de Cuba, pertenecientes a diferentes grupos étnicos cubanos.

La epidemia ocurrida en Santiago de Cuba en 1997 fue excepcionalmente bien estudiada y caracterizada. La experiencia acumulada de doctores y científicos cubanos y el conocimiento internacional sobre dengue acumulado en las décadas precedentes permitieron un estudio mucho más profundo y comprensivo de esta epidemia, con una clasificación y manejo mucho más certero que en las epidemias cubanas de dengue precedentes (265, 298, 500, 501).

Los datos aquí presentados, corroborando estudios anteriores, muestran que ciertas moléculas HLA están asociadas con riesgo de desarrollar enfermedad durante la infección por dengue en población cubana. También muestran que hay alelos descritos en la literatura como frecuentes en población caucasoides, negroides o amerindias asociados con el cuadro clínico de FD o de FHD en población cubana.

El análisis de las distancias genéticas entre la población cubana y otras poblaciones del mundo, desde el punto de análisis de los genes HLA, ha revelado que estamos mucho más cercanos genéticamente a poblaciones europeas y mediterráneas, como la Española, la Vasca y la Francesa (453), mas distantes de los Africanos y aún mucho mas de los Amerindios.

Resulta interesante que sean precisamente los genes heredados de estos ancestros parecen estar asociados a protección contra el desarrollo de la FHD. Las pésimas condiciones de vida a las que fueron expuestos los esclavos africanos probablemente influyeron en su menor aporte a nuestra dotación genética actual. El carácter multigénico de las características fenotípicas como el color de la piel (453, 502) puede explicar las diferencias entre el fenotipo de nuestra población mestiza y negra, y el europeo.

A pesar de estar bien fundamentado en la literatura que la frecuencia determinados alelos HLA caracterizan a determinadas poblaciones (503), se requieren estudios de genes marcadores de ancestralidad, con la inclusión de un mayor número de individuos para corroborar los resultados aquí mostrados.

La asociación de genes polimórficos con la enfermedad por dengue debe estimular nuevas investigaciones sobre el desarrollo de nuevas drogas y vacunas y enfatiza la necesidad de seguir explorando las determinantes genéticas de la patogénesis de las enfermedades infecciosas.

IV.4. Clasificación antropométrica de Individuos con antecedentes de FD y FHD/SCD

Las observaciones epidemiológicas sobre la asociación de raza y la mayor o menor riesgo a FHD/SCD han sido hechas por el color de la piel. Para confirmar esta asociación, evadiendo la subjetividad de la clasificación racial de acuerdo al color de la piel, en este trabajo realizamos la clasificación antropométrica a individuos con antecedentes de diferentes formas clínicas de la enfermedad por dengue. Los resultados reflejan el alto grado de mezcla racial y mestizaje de la población cubana (Tabla 16).

Solo 21 de los 70 individuos inicialmente clasificados como “blancos” de acuerdo a su color de piel fueron re-clasificados como Blancos/Europoides. Ninguno de los 32 individuos previamente clasificados como “negros” resultaron reclasificados como Negros/Negroides. En consecuencia, la cifra de 18 individuos inicialmente clasificados como Mulatos o Mestizos individuos ascendió a 99, los cuales se sub-clasificaron de acuerdo al predominio de características raciales particulares. En 64 de los individuos mestizos sub-clasificados no se observó predominio de rasgos característicos de un grupo étnico determinado. En 21 individuos prevalecieron rasgos europoides, por lo que se subclasificaron como mestizos europoides, y 13 individuos mostraron predominio de características negroides, resultando clasificados como mestizos negroides.

Los resultados aquí presentados están en concordancia con los mostrados por el Censo poblacional realizado en Cuba en el 2001 (Figura 17), el más cercano al momento de la epidemia de dengue 2 en 1997.

Los datos reunidos por este Censo sobre color de la piel muestran que, en la provincia de Santiago de Cuba, el porcentaje de individuos por color de la piel muestra un comportamiento diferente a la mayoría de las provincias restantes. En ellas se observa una mayoría de individuos de color de piel blanco, con respecto a los negros y mulatos. En Santiago de Cuba, por el contrario, hay un predominio de mestizos o mulatos, comparado con los blancos y los negros.

Los resultados de este Censo, de los cuales es reflejo el estudio antropométrico realizado, revelan que Santiago de Cuba reúne, desde el punto de vista étnico/poblacional, características excepcionales. En él están presentes los rasgos fenotípicos y genotípicos amerindios en mayor medida que en el resto de la isla. Existen archivos parroquiales en que aparecen registrados indios hasta muy entrado el siglo XIX (período en que la mayoría de los historiadores los dan por extinguidos), en los municipios de Jiguaní, Bayamo, Baracoa y Holguín, pero sobre todo en El Caney, donde la población aborigen remanente fue concentrada a finales del siglo XIX en de Santiago de Cuba, donde se mezcló con población negra y española inmigrante, además con la población criolla incipiente, producto de mezclas anteriores (321-323).

El análisis de la correlación del cuadro clínico presentado por los individuos con la clasificación de acuerdo al color de la piel mostró que del total de los 47 individuos que desarrollaron FHD el 72 % son blancos, el 11% mulatos o mestizos y solo el 17 % negros, observándose una mayor incidencia del cuadro severo por dengue en los individuos blancos respecto a los individuos negros y mulatos. (Tabla 16). Al comparar estos datos con la composición racial de la población de Santiago de Cuba en 1997 (28.70 % blancos, 54.20 % mulatos y 17.10 % negros) observamos que la incidencia de FHD fueron significativamente mayor en blancos que en mestizos ($X^2: 13.45$, $p=0.0002$, $pc=0.0004$, OR: 3.159, IC (95%): 1.69-5.87) y significativamente mayor en blancos que en negros ($X^2: 6.17$, $p=0.013$, $pc=0.023$, OR : 2.98, IC (95%): 1.23-7.2). También resultan significativamente mayor el porcentaje de sujetos blancos entre los casos de FHD, al compararse con los negros y mestizos juntos (no blancos) ($X^2:14.91$, $p=0.0001$, $pc=0.0002$, OR: 3.11, IC (95%): 1.73-5.59).

El análisis con respecto a los resultados de la clasificación antropométrica arrojó que, nuevamente, la prevalencia de las características antropométricas negroides se asoció a una menor incidencia de FHD (2%), mientras que los individuos con un predominio de rasgos Caucasoides mostraron una mayor incidencia de FHD (30%). (Tabla16). En este caso, sin embargo, no es posible comparar los porcentajes de cada grupo y subgrupo clasificados antropométricamente de casos con FHD contra las proporciones de estos grupos en la población, puesto que la población de Santiago de Cuba no está clasificada antropométricamente, y, por la complejidad de este proceder, no se realizó la clasificación antropométrica de un grupo control geográficamente pareado. Sin embargo, de acuerdo a los datos obtenidos, los sujetos clasificados como europoides tienen una probabilidad 15 veces mayor que los individuos clasificados como mestizos negroides ($p<0,01$) de padecer la forma severa de la enfermedad y los clasificados como

mestizos europoides una probabilidad 11,5 veces mayor con respecto a la mestiza europide ($p < 0,01$) de sufrir FHD.

IV.5. Discusión integrada

En el presente trabajo abordamos el estudio de la raza como factor de riesgo para la enfermedad por dengue, asumiendo como raza al color de la piel. Algunos autores plantean que el concepto de raza carece de significado biológico en la especie humana (504), y existen elementos de la antropología étnica que sirven de fundamento para estos planteamientos. Uno de ellos afirma que la especie humana tiene un centro de origen geográfico único que abarca ciertas zonas de Asia Continental, del sur de Europa, y el Norte de África (unidad de origen), a partir de las cuales se extendió por toda Europa, África, Asia, y de última, a América. Este concepto, sin embargo admite que las diferentes condiciones naturales que caracterizan a estas regiones del planeta determinaron la subdivisión en las 3 grupos fundamentales: europoide, negroide-australoides y mongoloide.

Otra afirmación en este sentido plantea que las diferencias físicas tienen un carácter relativo, y son más marcadas entre individuos extremos de una misma raza que entre razas diferentes. Existen también zonas de transición y de mezcla racial donde las características étnicas diferenciales se encuentran entremezcladas, unidas en proporción diferentes, por ejemplo el pueblo de Etiopía muestra rasgos de la raza europoide y de la negroide-australoides, y esto es, como otros ejemplos que pudieran señalarse, prueba de que, aun en sus sitios originarios, los límites entre las diferentes razas no están bien definidos ni son muy nítidos, sino más bien representan un entrecruzamiento (overlapping) de las características consideradas como promedio para las diferentes razas (505).

Es cierto que la discriminación racial trata de encontrar sustentación en supuestas diferencias biológicas, genéticas, psíquicas y sociales entre las diferentes razas humanas, por lo que reviste primordial importancia que los estudios sobre las razas, en los diferentes dominios de la ciencia, se fundamenten, independientemente de sus objetivos particulares, en la unidad de la especie humana.

Sin embargo, dentro de la especie humana se distinguen subdivisiones como resultado de la combinación de rasgos físicos que resultan de la interrelación de las fuerzas que intervienen en la evolución, la selección natural, la deriva genética y el intercambio de genes (506-508), que para nada implican superioridad o inferioridad de un grupo con respecto a otro dentro de la especie. Es a este supuesto que nos acogemos en este trabajo, tomándonos la licencia de considerar “raza o grupo étnico” como el color de la piel, pero asumiendo que esta división se realiza basándose en características físicas accesorias que no afectan la

esencia biológica, psíquica, ni el rasgo esencial que distingue al ser humano del resto del reino animal como “complejo de relaciones sociales”.

En los resultados del presente trabajo el análisis de la respuesta de memoria de acuerdo al grupo étnico de los individuos mostró diferencias en la proliferación de los linfocitos T de memoria CD4+ específicos a virus dengue y en la producción de IL-2 entre individuos inmunes a dengue pertenecientes a diferentes grupos étnicos cubanos. Los individuos de raza blanca mostraron una respuesta inmune celular mucho más intensa, con una mayor crossreactividad a los antígenos heterólogos de dengue comparados con los de raza negra. Este resultado reviste extremo interés, por cuanto correlaciona la respuesta inmune celular de memoria con la infección secundaria heterotípica como factor de riesgo para el desarrollo de la fiebre hemorrágica por dengue, y la mayor propensión de los individuos de raza blanca a desarrollar este cuadro grave. Para corroborar este resultado se decidió profundizar en el estudio de la respuesta inmune celular, evaluando un grupo importante de marcadores que revisten importancia en la patogénesis de la enfermedad, abarcando un notable grupo de mediadores de respuesta inmune celular, que incluye factores de la transcripción, marcadores de activación y citoquinas y quimoquinas con diferentes funciones efectoras. Para esto analizamos la expresión de los genes de estos mediadores en el curso de las 24 horas de infección secundaria heterotípica “ex vivo” con virus dengue 1-3, de células mononucleares periféricas de individuos con diferentes antecedentes de exposición a infección por dengue pertenecientes a diferentes grupos étnicos cubanos.

Los resultados del estudio de los patrones de respuesta inmune celular a dengue en los diferentes grupos étnicos cubano mostraron diferencias significativas entre individuos blancos y negros, lo cual sugería que los genes que codifican para las moléculas efectoras del sistema inmune involucradas en este fenómeno, altamente polimórficos, pudieran estar expresando de forma diferenciada en los diferentes grupos étnicos cubanos, modificando los eventos de la respuesta inmune efectora a virus dengue. En contraste con otros países, caracterizados por la co-circulación de varios serotipos, Cuba representa un escenario excepcional para realizar estudios genéticos de resistencia/riesgo a FHD, al contar con marcadores serológicos y clínicos bien conocidos, en una población con una historia única de epidemias por dengue (506, 507)

De manera particular cada brote de dengue en Cuba ha permitido la identificación de los determinantes asociados con una infección particular de dengue, dado que la población ha estado expuesta a idénticas exposiciones previas a virus dengue en cada brote (2). Además, en Cuba existe población negra y blanca, y

diferentes grados de mezcla racial, lo cual facilita la identificación de genes potenciales de resistencia y vulnerabilidad o riesgo (341).

Por todo lo anterior se estudió el polimorfismo de genes HLA A, B clase I y HLA DRB1 clase II, en individuos cubanos con antecedentes de de FD o FHD en el curso de infecciones primarias y secundarias por dengue 2, en el curso del el brote ocurrido en 1977 en Santiago de Cuba, pertenecientes a diferentes grupos étnicos cubanos. En el presente estudio se observó que alelos HLA clase I se asocian al riesgo a enfermar por dengue y al desarrollo del cuadro grave, FHD, observación que se mantiene cuando el estudio se circunscribe a los sujetos de color de piel blanco.

Han sido varias las investigaciones que tratan de explicar la fisiopatología de la FHD, sin embargo, aún se desconoce con claridad por qué algunos individuos en circunstancias similares de infección padecen las formas asintomáticas o leves, mientras otros llegan a desarrollar las formas severas de la enfermedad y pueden morir.

De gran importancia en este contexto resulta la hipótesis integral presentada por Kourí y cols, la cual plantea que la presencia o ausencia de factores individuales en el contexto de los factores epidemiológicos y virales hacen posible o no la evolución a un cuadro clínico de FHD/SCD.

Existen varios factores de riesgo individuales cuya asociación a la FHD/SSD ha sido reportada a partir del análisis de las epidemias cubanas de dengue. Entre ellos se encuentran las enfermedades crónicas como anemia de células falciformes, asma y diabetes, las cuales se han presentado en las epidemias cubanas en una alta frecuencia de casos FHD/SSD. Sin embargo, uno de los factores que resalta de forma particular es la raza, ya que durante las epidemias de dengue hemorrágico ocurridas en Cuba se ha observado que una proporción significativamente mayor de personas blancas que negras desarrollan las formas severas y fatales de la enfermedad por dengue.

Cuba posee, por otra parte, una etno-génesis única, diferente al resto de los países de América. La población cubana se originó de dos grupos raciales bien definidos, los colonizadores Europeos, que comenzaron a arribar a Cuba en 1492, y los esclavos Africanos, cuyos comienzos de arribo a la isla datan del siglo XVI (509, 510). Los primeros habitantes de Cuba, los aborígenes Arawak, son oriundos de la cuenca del Orinoco, y alcanzaron la isla alrededor del siglo V (D.C.), estableciéndose en el archipiélago por todo un milenio. La población Arawak, sin embargo, fue casi totalmente exterminada durante la conquista española, con un estimado de disminución del número de habitantes de 112,000 en 1510, a 3,900 en 1555. Como consecuencia, el componente racial mongoloide, representado por la población amerindia no tuvo un aporte demográfico significativo en la formación de la población cubana actual

(511, 512). Nuestros ancestros negroides descienden de más de 800, 000 esclavos traídos desde África, principalmente África Subsahariana, introducidos en el país en los siglos XVIII y XIX (D.C.) (513).

Los ancestros Europoides de la población cubana provienen de la península Ibérica, incluyendo Portugal y las islas Canarias, cuyos orígenes son, a su vez, una mezcla de españoles y población rural Guanche, con un fuerte componente árabe (514). En 1870 ocurrió una inmigración masiva desde España, conocida como la “ la ola peninsular blanca”, la cuál reforzó los rasgos genéticos europoides en la población cubana.

El etnocidio aborigen de que fue objeto originó que el background genético de la población cubana actual este conformado por la mezcla de la oleada migratoria Europeoide, compuesta por los colonizadores españoles, y la negroide, dada por los individuos oriundos de África sub-sahariana que fueron traídos como esclavos; y posee, además, un nivel elevado de mezcla racial y mestizaje (513). El alto grado de mestizaje de la población cubana comienza desde el momento mismo de la conquista, en 1492, con la mezcla entre colonizadores españoles y aborígenes. Posteriormente, tras el arribo de los esclavos africanos ocurrió la mezcla de los aborígenes que quedaban, los españoles, y sus descendientes indo-europoides, fruto de su mezcla previa con la población aborigen cubana; con los negros (513).

Sin embargo, a pesar del elevado grado de mestizaje de nuestra población en las epidemias de dengue hemorrágico ocurridas en Cuba se ha observado que una proporción significativamente mayor de personas de blancas que negras desarrollan las formas severas y fatales de la enfermedad por dengue.

Los organismos vivientes están continuamente interactuando con el medio ambiente y respondiendo a sus cambios. Por ello son capaces de alterar sus patrones y frecuencias relativas de expresión de genes por medios de mutaciones en respuestas a las diferentes señales evolutivas como pueden ser migraciones, epidemias, cambios climáticos, ecológicos y planetarios. Esto implica la selección de aquellos descendientes que expresan cambios genotípicos y fenotípicos que permiten la adaptación a los cambios que condiciona la supervivencia en las nuevas condiciones (515).

Darwin llamó Selección Natural al fenómeno mediante el que se produce la conservación de las características que favorecen la supervivencia de una especie y la destrucción de las que son perjudiciales. Y esto es un hecho. En todo ecosistema se establecen luchas por la supervivencia, de manera que al final siempre consiguen reproducirse los individuos que poseen algún elemento que los favorece y que, en definitiva, son naturalmente seleccionados. Algunos de estos elementos diferenciales entre individuos se producen de manera aleatoria entre los descendientes de un organismo y llegan a ser heredables. Este es el

caso de las mutaciones, que constituyen así una importante fuente de variabilidad y que, a la larga, contribuyen a que ocurran cambios evolutivos en las especies (516, 517).

Un cambio evolutivo es un proceso temporal derivado del éxito reproductivo diferencial de los individuos y su fenotipo heredado, que altera el genotipo correspondiente entre las distintas generaciones (518). La evolución es por tanto algo inevitable en poblaciones de entidades que exhiben variaciones heredables en el fenotipo que afectan la reproducción (518).

El fenotipo es la expresión de muchos genes diferentes y es el producto de las interacciones del genotipo con el ambiente. Por fenotipo no solo debemos entender la apariencia externa de un individuo, también su metabolismo, su respuesta inmunológica, ect. Por ejemplo la capacidad de que una enzima actúe a una determinada temperatura o que se responda individualmente al enfrentamiento a determinado microorganismo son características fenotípicas sobre las que actúa la selección natural.

Por todo lo anterior los grupos humanos que difieren entre si por sus rasgos físicos muestran también diferencias en términos de sus frecuencias génicas.

El estudio de los factores del huésped y la contribución de su individualidad genética a la evolución de los agentes infecciosos constituyen aspectos fundamentales en el entendimiento de la patogénesis de las enfermedades infecciosas. Los estudios de gemelos idénticos adoptados, y los estudios caso-control han indicado una base genética para las diferencias individuales en las manifestaciones clínicas ante una enfermedad infecciosa. El rango de fenotipos clínicos asociados a enfermedades infecciosas, y estudios de gemelos han contribuido a la visión de que las enfermedades infecciosas pueden actuar como una fuerte influencia selectiva moldeando la evolución humana y la estructura genética de la población (268, 269).

De hecho, un acercamiento al examen de los posibles efectos de los agentes infecciosos sobre los genes del hospedero es buscar las diferencias en la prevalencia o severidad de la enfermedad en diferentes grupos poblacionales (inter-étnicas) que han sido expuestos al mismo agente infeccioso en diferentes momentos de su evolución (519), como es el caso de las poblaciones Africanas y Europeas, desarrolladas en ambientes geográficos y climatológicos totalmente distintos, expuestas por ende a un diferente entorno biológico y microbiológico, que condiciona diferentes fuerzas de selección natural.

El dengue es un ejemplo de este tipo de enfermedad, al cual se le atribuye un origen africano, basado en observaciones claves en este sentido como la identificación de ciclos de transmisión selvática en Asia y África occidental que involucran monos y la ubicación de cepas selváticas ,específicamente de dengue 2 y dengue 4, en la base de árboles construidos con aislamientos provenientes de humanos (71). Hacia el origen africano del dengue también apunta el hecho de que muchos de los flavivirus transmitidos por

mosquitos, que revelan la mayor divergencia, circulan exclusivamente en África y con frecuencia infectan primates, lo que sugiere que este grupo tuvo su origen en África. (520) Unido a esto, también se plantea que el *Aedes aegypti* tuvo su origen en África. (521). De gran interés resulta también la estimación del paso de transferencia zoonótica del dengue de los primates al hombre, puesto que el desarrollo de resistencia ante un agente infeccioso requiere de miles de años. Twiddy y cols. estiman la edad del Ancestro Reciente Mas Común (del inglés MRCA, Most Common Recent Ancestor) en dengue en 1115 años. En genética el MRCA de cualquier grupo de organismos se define como el individuo más reciente del cual todos los organismos de ese grupo descienden. Existe evidencia epidemiológica que sustenta esta estimación, y es la descripción de una enfermedad clínica y epidemiológicamente compatible con dengue en una antigua enciclopedia publicada por primera vez en los años 265-420 D.C., editada en el 610 D.C. y finalmente en el 992 D.C., durante la dinastía Northern Sung. Esto no permite fijar la fecha exacta de la descripción, pero la sitúa no después del 992 (39).

Las diferencias observadas en la severidad de la enfermedad por dengue entre los diferentes grupos raciales es un ejemplo de la continua interacción de los organismos vivientes con su entorno, alterando sus patrones de expresión de genes en respuesta a las señales del entorno, estando las enfermedades infecciosas entre las más importantes.

Esta puede ser una de las explicaciones de las diferencias observadas para las diferencias en la severidad de la enfermedad por dengue entre individuos pertenecientes a diferentes grupos étnicos, donde los genes reguladores de la severidad de la enfermedad por dengue pudieran estar desigualmente distribuidos entre estos grupos.

Un gen debe ser propuesto como candidato responsable de las diferencias inter-étnicas en la prevalencia o severidad de una enfermedad entre los diferentes grupos poblacionales, solo si existe información biológica que sugiera que el producto que codifica puede influir en la patogénesis de esa enfermedad (270). Este es precisamente el caso los genes de respuesta inmune en la FHD, donde se ha demostrado el papel central de los mecanismos inmunológicos en la patogénesis de la FHD, particularmente en la activación de los linfocitos T y la producción de citoquinas (32, 176, 177). Todo lo anterior avala que los genes de la respuesta inmune sean considerados entre aquellos que regulan que la severidad de la enfermedad por dengue y que pueden estar desigualmente distribuidos en individuos cubanos blancos y negros, aún más cuando el reconocimiento de antígenos por los linfocitos T es central en la generación y regulación de la respuesta inmune y determinan la individualidad de esta respuesta.

Durante una infección secundaria tanto la respuesta celular como la humoral específica a dengue pueden conferir protección o estar involucradas en el evento patogénico. En individuos genéticamente resistentes, pudiera inducirse una respuesta inmune intensa pero regulada, que ayude a clarificar la infección antes que los síntomas clínicos aparezcan. La presencia de genes asociados a riesgo pudiera inducir, por su parte, una respuesta inmune excesivamente vigorosa, que, sin una regulación adecuada, sea responsable de los cuadros clínicos severos por dengue.

La infección por dengue es todavía responsable de un alto grado de morbilidad y mortalidad, a pesar de las investigaciones sobre nuevas tecnologías para el control del mosquito, estrategias de prevención, desarrollo de vacunas y tácticas de control de emergencias. Una mejor comprensión de los mecanismos de la enfermedad que resultan de la compleja interacción entre el hospedero humano y el virus, ambos poseedores de una alta variabilidad genética, ofrecerá nuevas oportunidades para las intervenciones terapéuticas y preventivas.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- 1- Los individuos blancos presentan una respuesta celular más intensa y de más reactividad cruzada entre serptipos de virus dengue que los negros.

- 2- Existe mayor expresión de mediadores inmunes pro-inflamatorios tras la infección secundaria heteróloga en los individuos blancos, en contraste con la mayor producción de mediadores reguladores y citotóxicos en los individuos negros.

- 3- El alelo HLA Clase I A*02 está asociado a la propensión a fiebre hemorrágica por dengue, mientras que el alelo HLA clase II DQB1*06 está asociado a la protección, en individuos cubanos blancos.

- 4- Los alelos HLA clase I A*31, B*15, A*36, CW*16 y CW*18 están asociados a la predisposición a la enfermedad por dengue, mientras que los alelos HLA clase II DRB1*04, DRB1*07 resultaron asociados a protección ante la enfermedad por dengue en población Cubana.

- 5- Los individuos Europoides y Mestizo-Europeoide desarrollan mas fiebre hemorrágica por dengue, lo cual apoya la observación empírico-epidemiológica de una mayor susceptibilidad de individuos blancos a desarrollar FHD/SCD.

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES

- 1- Investigar la expresión de genes y la producción de mediadores inmunes importantes en la patogénesis durante la infección aguda por dengue, en pacientes FD y FHD de diferentes grupos étnicos.

- 2- Corroborar genéticamente, a través del estudio de los Marcadores Genéticos de Ancestralidad, la asociación de la raza Europeoide con el dengue severo.

- 3- Confirmar la asociación de los alelos HLA clase I y Clase II estudiados con la vulnerabilidad a la enfermedad por dengue en individuos de diferentes grupos étnicos mediante estudios de alta resolución y estudios de haplotipos y genotipos.

- 4- Evaluar la asociación de las variantes polimórficas de los mediadores de respuesta inmune celular predominantes en uno u otro grupo étnico con el riesgo ó la protección a desarrollar las formas graves de la enfermedad.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guzman M, Kouri G, Diaz M, Llop A, Vazquez S, Gonzalez D, et al. Dengue, one of the great emerging health challenges of the 21st century. *Expert Rev Vaccines*. 2004 Oct;3(5):511-20.
2. Guzman MG. Global voices of science. Deciphering dengue: the Cuban experience. *Science*. 2005 Sep 2;309(5740):1495-7.
3. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol*. 2003 May;27(1):1-13.
4. Guzman Tirado MG, Kouri Flores G, Bravo Gonzalez JR. [Emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. Reemergence of dengue]. *Rev Cubana Med Trop*. 1999 Jan-Apr;51(1):5-13.
5. WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. WHO, Geneva. 1997.
6. Guzmán MG, Peláez O, Kourí G, Quintana I, Vázquez S, Pentón M, et al. Final characterization of and lessons learned from the dengue 3 epidemic in Cuba, 2001-2002. *Rev Panam Salud Publica*. 2006;19(4):282-9.
7. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ*. 1989;67(4):375-80.
8. Mas P. Dengue fever in Cuba in 1977:some laboratory aspects. PAHO Scientific Publication. 1979;375:40-3.
9. Cantelar de Francisco N, Fernandez A, Albert Molina L, Perez Balbis E. [Survey of dengue in Cuba. 1978-1979]. *Rev Cubana Med Trop*. 1981 Jan-Apr;33(1):72-8.
10. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(1):89-92.
11. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Rosario D, Halstead S, Kouri G, et al. Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of E gene sequence in isolates obtained at different times during the epidemic. *Arch Virol*. 2004 Dec 3;In press.
12. Pelaez O, Guzman MG, Kouri G, Perez R, San Martin JL, Vazquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis*. 2004 Apr;10(4):719-22.
13. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(5):821-3.
14. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*. 1997;50(3-4):161-9.
15. Guzman MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(6):522-3.
16. Agramonte A. Notas clínicas sobre una epidemia reciente de dengue. *Revista de Medicina y Cirugía de la Habana, Cuba*. 1906.;January;222-6.

17. Bravo JR, Guzman MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):816-20.
18. Guerra R. *Manual de Historia de Cuba desde su Descubrimiento.* Colección Histórica, Editorial Nacional de Cuba. 1964;C. Habana.
19. Guzman MG, Alvarez A, Vazquez S, Alvarez A, Rosario D, Pelaez O, et al. Epidemiological studies on dengue 3 in playa municipality, Havana, Cuba, 2001-2002. *J Epidemiol Community Health.* 2009;Submitted
20. Bravo JR GM, Kouri G. Encuesta seroepidemiológica retrospectiva a virus dengue en el municipio Cerro: metodología. *Rev Cubana Med Trop.* 1985;37(3):259-68.
21. Guzman MG, Kouri GP, Vazquez S, Rosario D, Bravo JR, Valdez L. DHF Epidemics in Cuba, 1981 and 1997: Some interesting observations. *Dengue Bulletin.* 1999; 23
22. Fink J, Gu, F., Vasudevan S.G. Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Reviews in Medical Virology.* 2006;16:263-75.
23. Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 1983 Jan;32(1):154-6.
24. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003 Jul;9(7):921-7.
25. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis.* 1989 May-Jun;11 Suppl 4:S830-9.
26. Bosch I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke RV, et al. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J Virol.* 2002 Jun;76(11):5588-97.
27. Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignacio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, et al. 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.* 2001 Feb;96(2):229-32.
28. Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma; in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res.* 2006 Jan;123(1):25-30.
29. Chen LC LH, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, Lin YS, Wang ST, Shyu HW, Yeh TM. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 2006 Jan;74(1):142-7.
30. Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiao AL, et al. Expression of Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecules during Endothelial Cell Activation Induced by Antibodies against Dengue Virus Nonstructural Protein 1. *J Immunol.* 2005 Jan 1;174(1):395-403.
31. Mangada MM, Rothman AL. Altered Cytokine Responses of Dengue-Specific CD4+ T Cells to Heterologous Serotypes. *J Immunol.* 2005 Aug 15;175(4):2676-83.
32. Perez AB, Garcia G, Sierra B, Alvarez M, Vazquez S, Cabrera MV, et al. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J Med Virol.* 2004 Jun;73(2):230-4.
33. Simmons CP, Dong T, Chau NV, Dung NT, Chau TN, Thao le TT, et al. Early T-cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. *J Virol.* 2005 May;79(9):5665-75.

34. Screaton G, Mongkolsapaya J. T cell responses and dengue haemorrhagic fever. *Novartis Found Symp.* 2006;277:164-71; discussion 71-6, 251-3.
35. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 2004 Apr;113(7):946-51.
36. Rothman AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res.* 2003;60:397-419.
37. Lühn K, Simmons CP, Moran E, Dung NT, Chau TN, Quyen NT, et al. Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. *J Exp Med.* 2007 May 14;204(5):979-85.
38. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Jul;11(3):480-96.
39. Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler D, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*: CAB International; 1997. p. 1-22.
40. Graham H. The dengue. A study of its pathology and mode of propagation. *J Trop Med.* 1903;6:209.
41. Sabin AB. The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriol Rev.* 1950 Sep;14(3):225-32.
42. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952 Jan;1(1):30-50.
43. Hammon WM, Rudnick A, Sather G, Rogers KD, Morse LJ. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. *Trans Assoc Am Physicians.* 1960;73:140-55.
44. Guzman MG, Sierra B, Kouri G, Farrar J, Simmons C. Host and virus determinants of susceptibility and dengue disease severity". *Frontiers in Dengue Research: HanleyWeaver Guz KH;* 2008. p. 79-101.
45. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet.* 1998 Sep 19;352(9132):971-7.
46. Arias CF, Preugschat F, Strauss JH. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology.* 1993;193(2):888-99.
47. Roehrig JT, Johnson AJ, Hunt AR, Bolin RA, Chu MC. Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology.* 1990;177(2):668-75.
48. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol.* 1990;44:649-88.
49. Heinz FX, Auer G, Stiasny K, Holzmann H, Mandl C, Guirakhoo F, et al. The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. *Arch Virol Suppl.* 1994;9:339-48.
50. Condit RC. Principles of Virology. In: Knippe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Fourth edition ed. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
51. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: Fields BN, editor. *Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996. p. 961-1034.
52. Rice CM. Overview of flavivirus molecular biology and future vaccine development via recombinant DNA. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1990;21(4):670-7.
53. Murray JM, Aaskov JG, Wright PJ. Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J Gen Virol.* 1993;74(Pt 2):175-82.
54. Vazquez S, Guzman MG, Guillen G, China G, Perez AB, Pupo M, et al. Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine.* 2002 Mar 15;20(13-14):1823-30.
55. Rice CM. *Flaviviridae*. The Viruses and Their Replication. In: Fields BM, editor. *Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996. p. 931-60.

56. Despres P, Frenkiel MP, Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology*. 1993 Sep;196(1):209-19.
57. Young PR. Antigenic analysis of dengue virus using monoclonal antibodies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1990;21(4):646-51.
58. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2002 Oct 15;186(8):1165-8.
59. Shafee N, AbuBakar S. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. *J Gen Virol*. 2003 Aug;84(Pt 8):2191-5.
60. Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing. *J Virol*. 1999;73(10):8083-94.
61. Wu CF, Wang SH, Sun CM, Hu ST, Syu WJ. Activation of dengue protease autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *J Virol Methods*. 2003 Dec;114(1):45-54.
62. Wengler G. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology*. 1993;197(1):265-73.
63. Preugschat F, Strauss JH. Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology*. 1991;185(2):689-97.
64. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol*. 1991;65(5):2467-75.
65. Brooks AJ, Johansson M, John AV, Xu Y, Jans DA, Vasudevan SG. The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin beta 1 and importin alpha/beta-recognized nuclear localization signals. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):36399-407.
66. Johansson M, Brooks AJ, Jans DA, Vasudevan SG. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J Gen Virol*. 2001 Apr;82(Pt 4):735-45.
67. Gubler DJ, Clark GG. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;50(6 Suppl):50-60.
68. McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect*. 2000 Jul;2(9):1041-50.
69. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*. 2003 May;3(1):19-28.
70. Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2000 Jan-Mar;16(1):205-11.
71. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*. 2000;74(7):3227-34.
72. Kautner I, Robinson MJ, Kuhnle U. Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *J Pediatr*. 1997 Oct;131(4):516-24.
73. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *Bmj*. 2002 Jun 29;324(7353):1563-6.
74. WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. WHO, 1997;2nd edition(Geneva).
75. Nimmannitya S. Dengue and Dengue Haemorrhagic fever. In: Cook GC, editor. *Manson's Tropical Diseases*. 20th ed. London: Saunders WB; 1998.
76. PAHO. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Scientific publication no.548. Washington: PAHO. 1994.

77. Martínez-Torres E. [Dengue and hemorrhagic dengue: the clinical aspects]. *Salud Publica Mex.* 1995;37 Suppl:S29-44.
78. Harris E, Videz E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Jul-Aug;63(1-2):5-11.
79. Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 2000 Jun;13(2):261-76.
80. Rigau-Perez JG. Clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990-1991. *Puerto Rico Association of Epidemiologists. Rev Panam Salud Publica.* 1997 May;1(5):381-8.
81. Diaz A, Kouri G, Guzman MG, Lobaina L, Bravo J, Ruiz A, et al. Description of the clinical picture of dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) in adults. *Bull Pan Am Health Organ.* 1988;22(2):133-44.
82. Rigau-Perez JG, Laufer MK. Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: diagnosis and clinical alarm signals. *Clin Infect Dis.* 2006 May 1;42(9):1241-6.
83. Kroeger A, Nathan MB. Dengue: setting the global research agenda. *Lancet.* 2006;368(9554):2193-5.
84. Balasubramanian S, Janakiraman L, Kumar SS, Muralinath S, Shivbalan S. A reappraisal of the criteria to diagnose plasma leakage in Dengue Hemorrhagic Fever. *Indian Pediatr.* 2006 Apr;43(4):334-9.
85. Phoung CX NN, Kneen R, Pham TTT, CHU VT, Nguyen TTN, Tran TT, Tom S, Kasia S, Bridget W, and the DONG NAI Study group. . Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the world health organization classification system helpful? *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(4):459.
86. UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (ITDR) G, WHO Headquarters Expert meeting on dengue classification and case management 29 September- 1 October 2008.
87. Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B, et al. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet.* 2000 Mar 25;355(9209):1053-9.
88. Pancharoen C, Thisyakom U. Neurological manifestations in dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2001 Jun;32(2):341-5.
89. Gonzalez D, Castro OE, Kouri G, Perez J, Martinez E, Vazquez S, et al. Classical dengue hemorrhagic fever resulting from two dengue infections spaced 20 years or more apart: Havana, Dengue 3 epidemic, 2001-2002. *Int J Infect Dis.* 2005 Jul 13.
90. Seet RC, Quek AM, Lim EC. Symptoms and risk factors of ocular complications following dengue infection. *J Clin Virol.* 2007 Feb;38(2):101-5.
91. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 2000 Jul;6(7):816-20.
92. Wu SJ, Grouard Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 2000;6(7):816-20.
93. Diamond MS, Shrestha B, Mehlhop E, Sitati E, Engle M. Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunol.* 2003;16(3):259-78.
94. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, et al. DC-SIGN-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem.* 2005 Apr 26.

95. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res.* 2005 Sep-Oct;36(5):425-35.
96. King AD, Nisalak A, Kalayanrooj S, Myint KS, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S, et al. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1999 Dec;30(4):718-28.
97. Lin YL, Liu CC, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, Chen RM, et al. Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. *J Med Virol.* 2000 Apr;60(4):425-31.
98. Kurane I, Janus J, Ennis FA. Dengue virus infection of human skin fibroblasts in vitro production of IFN-beta, IL-6 and GM-CSF. *Arch Virol.* 1992;124(1-2):21-30.
99. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis.* 2004 Apr 15;189(8):1411-8.
100. Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch.* 2001 Feb;438(2):107-15.
101. Courageot MP, Catteau A, Despres P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Adv Virus Res.* 2003;60:157-86.
102. Cardier JE, Marino E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. 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.* 2005 Jun 21;30(6):359-65.
103. Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol.* 2000 Jun;74(11):4957-66.
104. Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, Lin YL, et al. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol.* 2005 Jun 15;174(12):8163-72.
105. Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol.* 2004 Mar;78(6):2701-10.
106. Shresta S, Kyle JL, Robert Beatty P, Harris E. Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology.* 2004 Feb 20;319(2):262-73.
107. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol Rev* 2002;71:173-83.
108. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med.* 2002;195:343-51.
109. Bottino C, Moretta L, Pende D, Vitale M, Moretta A. Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells. *Mol Immunol.* 2004;41:569-75.
110. Kurane I, Hebblewaite D, Ennis FA. Characterization with monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. *Immunology.* 1986 Jul;58(3):429-36.
111. Azeredo EL, Zagne SM, Alvarenga AR, Nogueira RM, Kubelka CF, de Oliveira-Pinto LM. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Jun;101(4):437-49.
112. Charnsilpa W, Takhampunya R, Endy TP, Mammen MP, Jr., Libraty DH, Ubol S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. *J Med Virol.* 2005 Sep;77(1):89-95.

113. Innis B. Antibody responses to dengue virus infection. In: Gubler D, Kuno G, editors. Dengue and dengue haemorrhagic fever. New York: CAB International; 1997. p. 221- 43.
114. Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger JJ. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J Gen Virol.* 1988;69(Pt 8):2101-7.
115. Kaufman BM, Summers PL, Dubois DR, Eckels KH. Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1987 Mar;36(2):427-34.
116. Kaufman BM, Summers PL, Dubois DR, Cohen WH, Gentry MK, Timchak RL, et al. Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41(5):576-80.
117. Halstead SB, Scanlon JE, Umpaivit P, Udomsakdi S. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. *Am J Trop Med Hyg.* 1969 Nov;18(6):997-1021.
118. Scott RM, Nimmannitya S, Bancroft WH, Mansuwan P. Shock syndrome in primary dengue infections. *Am J Trop Med Hyg.* 1976 Nov;25(6):866-74.
119. Russell PK, Intavivat A, Kanchanapilant S. Anti-dengue immunoglobulins and serum beta 1 c-a globulin levels in dengue shock syndrome. *J Immunol.* 1969 Feb;102(2):412-20.
120. Kuberski T, Rosen L, Reed D, Mataika J. Clinical and laboratory observations on patients with primary and secondary dengue type 1 infections with hemorrhagic manifestations in Fiji. *Am J Trop Med Hyg.* 1977 Jul;26(4):775-83.
121. Davis AC, Shulman MJ. IgM -molecular requirement for its assembly and function. *Imunology Today.* 1989;10:118-28.
122. Jefferis R, Kumararatne DS. Selective IgG subclass deficiency. *Clinical and Experimental Immunology.* 1990;81:357-67.
123. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Antibodies and Antigens. In: Schmitt W, editor. *Cellular and Molecular Immunology.* 3ra ed; 1997. p. 38-68.
124. Kurane I, Meager A, Ennis FA. Dengue virus-specific human T cell clones. Serotype crossreactive proliferation, interferon gamma production, and cytotoxic activity. *J Exp Med.* 1989 Sep 1;170(3):763-75.
125. Green S, Kurane I, Edelman R, Tacket CO, Eckels KH, Vaughn DW, et al. Dengue virus-specific human CD4+ T-lymphocyte responses in a recipient of an experimental live-attenuated dengue virus type 1 vaccine: bulk culture proliferation, clonal analysis, and precursor frequency determination. *J Virol.* 1993 Oct;67(10):5962-7.
126. Livingston PG, Kurane I, Dai LC, Okamoto Y, Lai CJ, Men R, et al. Dengue virus-specific, HLA-B35-restricted, human CD8+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones. Recognition of NS3 amino acids 500 to 508 by CTL clones of two different serotype specificities. *J Immunol.* 1995;154(3):1287-95.
127. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol.* 1987;68(Pt 3):853-7.
128. Parrish CR, Woo WS, Wright PJ. Expression of the NS1 gene of dengue virus type 2 using vaccinia virus. Dimerisation of the NS1 glycoprotein. *Arch Virol.* 1991;117(3-4):279-86.
129. Wang S, He R, Anderson R. PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J Virol.* 1999 Mar;73(3):2547-51.

130. Mazumder R, Hu ZZ, Vinayaka CR, Sagripanti JL, Frost SD, Kosakovsky Pond SL, et al. Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. *Virus Genes*. 2007 Oct;35(2):175-86.
131. Lobigs M, Arthur CE, Mullbacher A, Blanden RV. The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology*. 1994;202(1):195-201.
132. Zivny J, Kurane I, Leporati AM, Ibe M, Takiguchi M, Zeng LL, et al. A single nine-amino acid peptide induces virus-specific, CD8+ human cytotoxic T lymphocyte clones of heterogeneous serotype specificities. *J Exp Med*. 1995;182(3):853-63.
133. Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol*. 1999 May;73(5):3623-9.
134. Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanaroj S, Vaughn DW, et al. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *J Infect Dis*. 2006 Sep 1;194(5):600-7.
135. Salazar-Mather TP, Hokeness KL. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;303:29-46.
136. Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 1990;11:97-101.
137. Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV. Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. *J Cell Sci*. 2003;116:4615-28.
138. Yamada M, Kim S, Egashira K, Takeya M, Ikeda T, Mimura O, et al. Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1996-2001.
139. Fahey TJ, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, et al. Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol* 1992;148 2764-9.
140. Chen YC, Wang SY. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J Virol*. 2002 Oct;76(19):9877-87.
141. Moreno-Altamirano MM, Romano M, Legorreta-Herrera M, Sanchez-Garcia FJ, Colston MJ. Gene expression in human macrophages infected with dengue virus serotype-2. *Scand J Immunol*. 2004 Dec;60(6):631-8.
142. Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiau AL, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol*. 2005;174(1):395-403.
143. Christine A. King RA, and Jean S. Marshall. Dengue Virus Selectively Induces Human Mast Cell Chemokine Production. *Journal of Virology*. 2002; Vol. 76(16): 8408-19.
144. Furie M, Randolph GJ. Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol*. 1995;146:1287-301.
145. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 1990;347:669-71.
146. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:571-611.
147. Billiau A, Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(2):97-113.

148. Hobart M, Ramassar V, Goes N, Urmson J, Halloran PF. IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes in vivo. *J Immunol.* 1997;158(9):4260-9.
149. Seliger B, Ruiz-Cabello F, Garrido F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res.* 2008;101:249-76.
150. Von Herrath M CB, Oldstone M. Low affinity lymphocytes require IFN-gamma to clear an acute viral infection. *Virology.* 1997;229:349-.
151. Eales LJ. The adaptive immune response In: Ltd JWS, editor. *Immunology for Life Scientists.* Guildford, UK; 2003
152. Oppenheim JJ, Ruscetti FW. Citocinas. In: Stites D.P. TAI, Parslow T.G, editor. *Inmunología Básica y Clínica.* DF, Mexico: Ed. El Manual Moderno; 1998. p. 165-92.
153. Vassali P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:411-52.
154. Dinarello CA. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. In: Rietschel ET, Wagner TH, editors. *Pathology of the Septic Shock,* Heidelberg, Germany: Springer-Verlag 1996. p. 134-65.
155. Egle A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today* 1997;18:487.
156. Aggarwal BB. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-B. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(Suppl. 1):i6.
157. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:745-56.
158. Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Takada Y, Aggarwal BB. Redox regulation of apoptosis by members of the TNF superfamily. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:482-96.
159. Taylor AW. Review of the activation of TGF-beta in immunity *J Leukoc Biol.* 2009;85(1):29-33.
160. Ebert EC. Inhibitory effects of transforming growth factor-beta (TGF-beta) on certain functions of intraepithelial lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(3):415-20.
161. Pennison M, Pasche B. Targeting transforming growth factor- β signaling. *Curr Opin Oncol* 2007;19(6):579-85.
162. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91.
163. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. . *Annu Rev Immunol.* 1998;16:137-61.
164. Yisong YW, Flavell RA. Regulatory T Cells, Transforming Growth Factor- β , and Immune Suppression. *Proc Am Thorac Soc.* 2007;4(3):271-6.
165. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T Cell-Produced Transforming Growth Factor-b1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity* 2007;26:579-91.
166. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VFI, Berneman ZN. Regulatory T Cells and Human Disease. *Clin Dev Immunol.* 2007;2007:89195.
167. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:929-79.
168. Mege JL, Meghari S, Honstette A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases *Lancet Infect Dis* 2006;6(557-69).
169. Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 2002;23:89-96.
170. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008;180(9):5771-7.

171. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004;114:1372-78.
172. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* 2008;28:546-58.
173. Khattry R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003;4:337-42.
174. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007;8(2):191-7.
175. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001;27:68-73.
176. Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol Rev* 2005;203:156-64.
177. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-61.
178. Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P, Howlett S, Hunter K, Garner VE, et al. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nat Genet.* 2007;39:329-37.
179. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133:775-87.
180. Raja SM, Metkar SS, Froelich CJ. Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. *Curr Opin Immunol.* 2003 Oct;15(5):528-32.
181. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003 May;3(5):361-70.
182. Davis DM, Dustin ML. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.* 2004 25(6):323-7.
183. Vyas YM, Maniar H, Dupont B. Cutting Edge: differential segregation of the SRC homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 within the early NK cell immune synapse distinguishes noncytolytic from cytolytic interactions. *J Immunol.* 2002;168;3150-4.
184. Krzewski K, Strominger JL. The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(5):597-605.
185. van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 1996 Nov 1;184(5):1781-90.
186. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature.* 1994;369(6475):31-7.
187. Uellner R, Zvelebil MJ, Hopkins J, Jones J, MacDougall LK, Morgan BP, et al. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J.* 1997;16(24):7287-96.
188. Young JD, Hengartner H, Podack ER, Cohn ZA. Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell.* 1986;44(6):849-59.
189. Metkar SS, Wang B, Aguilar-Santelises M, Raja SM, Uhlin-Hansen L, Podack E, et al. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity.* 2002 Mar;16(3):417-28.

190. Galvin JP, Spaeny-Dekking LH, Wang B, Seth P, Hack CE, Froelich CJ. Apoptosis induced by granzyme B-glycosaminoglycan complexes: implications for granule-mediated apoptosis in vivo. *J Immunol.* 1999 May 1;162(9):5345-50.
191. Raja SM, Wang B, Dantuluri M, Desai UR, Demeler B, Spiegel K, et al. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20;277(51):49523-30.
192. Shi L, Mai S, Israels S, Browne K, Trapani JA, Greenberg AH. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J Exp Med.* 1997 Mar 3;185(5):855-66.
193. Froelich CJ, Orth K, Turbov J, Seth P, Gottlieb R, Babior B, et al. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem.* 1996 Nov 15;271(46):29073-9.
194. Brown GR, McGuire MJ, Thiele DL. Dipeptidyl peptidase I is enriched in granules of in vitro and in vivo-activated cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1993 Jun 1;150(11):4733-42.
195. Sattar R, Ali SA, Abbasi A. Bioinformatics of granzymes: sequence comparison and structural studies on granzyme family by homology modeling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Sep 5;308(4):726-35.
196. Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 1994;265(5171):528-30.
197. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature.* 1994;370(6491):650-2.
198. Ju ST, Cui H, Panka DJ, Ettinger R, Marshak-Rothstein A. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(10):4185-9.
199. Ware CF. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(3-4):181-4.
200. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(5):488-96.
201. Chen YB, Fanjiang Y, Hardwick JM. Cell Death in Viral Infections. In: Lockshin RA, Zakeri Z, editors. *When Cells Die II: A Comprehensive Evaluation of Apoptosis and Programmed Cell Death.* New York: Wiley-Liss; 2004. p. 435-60.
202. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38(1):172-80.
203. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol.* 1984;120(5):653-69.
204. Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, et al. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56(5):566-72.
205. Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 1990 Feb;42(2):179-84.
206. Halstead SB. Immune enhancement of viral infection. *Prog Allergy.* 1982;31:301-64.
207. Morens DM, Halstead SB. Measurement of antibody-dependent infection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. *J Gen Virol.* 1990;71(Pt 12):2909-14.
208. Morens DM. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis.* 1994 Sep;19(3):500-12.

209. Kurane I, Ennis FE. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol.* 1992 Apr;4(2):121-7.
210. Halstead SB, Simasthien P. Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale J Biol Med.* 1970 Apr;42(5):276-92.
211. Bhakdi S, Kazatchkine MD. Pathogenesis of dengue: an alternative hypothesis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1990 Dec;21(4):652-7.
212. Churdboonchart V, Bhamarapravati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 May;44(5):481-93.
213. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology.* 1999 Apr 25;257(1):1-6.
214. Huang KJ, Yang YC, Lin YS, Huang JH, Liu HS, Yeh TM, et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):2825-32.
215. Guzman MG, Kouri G, Halstead SB. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? *Lancet.* 2000 May 27;355(9218):1902-3.
216. Malasit P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1987 Sep;18(3):316-20.
217. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: a Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. *J Infect Dis.* 2006 Apr 15;193(8):1078-88.
218. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol.* 1998;161(11):6338-46.
219. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest.* 1991 Nov;88(5):1473-80.
220. Hober D, Delannoy AS, Benyoucef S, De Groot D, Wattré P. High levels of sTNFR p75 and TNF alpha in dengue-infected patients. *Microbiol Immunol.* 1996;40(8):569-73.
221. Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, Day NP, Pham TP, Buurman WA, et al. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 1998 Mar;177(3):778-82.
222. Kontny U, Kurane I, Ennis FA. Gamma interferon augments Fc gamma receptor-mediated dengue virus infection of human monocytic cells. *J Virol.* 1988 Nov;62(11):3928-33.
223. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Jul-Aug;63(1-2):71-5.
224. Pacsa AS, Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000 Jun;28(2):151-5.
225. Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanaraj S, Nimmannitya S, Nisalak A, et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 1999 Nov;180(5):1429-35.
226. Huang YH, Chang BI, Lei HY, Liu HS, Liu CC, Wu HL, et al. Antibodies against dengue virus E protein peptide bind to human plasminogen and inhibit plasmin activity. *Clin Exp Immunol.* 1997 Oct;110(1):35-40.

227. Markoff LJ, Innis BL, Houghten R, Henchal LS. Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *Journal Of Infectious Diseases*. 1991;164(2):294-301.
228. Chungue E, Poli L, Roche C, Gestas P, Glaziou P, Markoff LJ. Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. *J Infect Dis*. 1994 Nov;170(5):1304-7.
229. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol*. 2001 Feb;63(2):143-9.
230. Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1977 May;26(3):337-43.
231. Rosen L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. *S Afr Med J*. 1986 Oct 11;Suppl:40-2.
232. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever [see comments]. *Lancet*. 1999;354(9188):1431-4.
233. Kochel TJ, Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinoza A, Felices V, et al. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 2002 Jul 27;360(9329):310-2.
234. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*. 1999 Jun;73(6):4738-47.
235. Sanchez IJ, Ruiz BH. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol*. 1996 Oct;77 (Pt 10):2541-5.
236. Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(5):427-34.
237. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol*. 2003 Apr;77(7):3929-38.
238. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol*. 2000 Sep;74(17):7814-23.
239. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000 Jan;181(1):2-9.
240. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*. 1994 Jan;75 (Pt 1):65-75.
241. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997 Apr 14;230(2):244-51.
242. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol*. 2000 Nov 1;152(9):793-9.
243. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Dec;75(6):1113-7.
244. Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol*. 2005 Mar 2;2(1):1.

245. Guzman MG, Kouri G, Soler M, Bravo J, Rodriguez de La Vega A, Vazquez S, et al. Dengue 2 virus enhancement in asthmatic and non asthmatic individual. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992 Oct-Dec;87(4):559-64.
246. Sierra B GG, Perez AB, Morier L, Alvarez L, Kouri G, Guzman MG. Ethnicity and Difference in Dengue Virus-Specific Memory T Cell Responses in Cuban Individuals. *Viral Immunol.* 2006;19(4):662-8.
247. Sierra B KG, Guzman MG. Race: A risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Archives of Virology.* 2006;152(3):533-42.
248. Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Calunga M, Soler M, Vazquez S, et al. Dengue haemorrhagic fever in Cuba. I. Serological confirmation of clinical diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984;78(2):235-8.
249. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Valdes L, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis.* 1999 Spring;3(3):130-5.
250. Valdes L, Guzman MG, Kouri G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, et al. La epidemiologia del dengue y del dengue hemorragico en Santiago de Cuba, 1997. [Epidemiology of dengue and hemorrhagic dengue in Santiago, Cuba 1997]. *Rev Panam Salud Publica.* 1999;6(1):16-25.
251. Thisyakorn U, Nimmannitya S. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis.* 1993 Feb;16(2):295-7.
252. Gubler D. The emergence of epidemic dengue fever and dengue hemorrhagic fever in the Americas: a case of failed public health policy. *Rev Panam Salud Publica.* 2005 Apr;17(4):221-4.
253. Kalayanaroj S, Nimmannitya S. Is dengue severity related to nutritional status? *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005 Mar;36(2):378-84.
254. Chiu HJ, Fischman DA, Hammerling U. Vitamin A depletion causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and PARP-1-dependent energy deprivation. *FASEB J.* 2008;22(11):3878-87.
255. Srinivas A, Dias BF. Antioxidants in HIV positive children. *Indian J Pediatr.* 2008;75(4):347-50.
256. Semba RD. Vitamin A and immunity to viral, bacterial and protozoan infections. *Proc Nutr Soc.* 1999;58(3):719-27.
257. Mehta S, Fawzi W. Effects of vitamins, including vitamin A, on HIV/AIDS patients. *Vitam Horm.* 2007(75):355-83.
258. Butensky James E, Harmatz P, Lee M, Kennedy C, Petru A, Wara D, et al. Altered iron metabolism in children with human immunodeficiency virus disease. *Pediatr Hematol Oncol.* 2009;26(2):69-84.
259. Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(6):1119-28.
260. Beck MA, Handy J, Levander OA. Host nutritional status: the neglected virulence factor. *Trends Microbiol.* 2004;12(9):417-23.
261. Greenbaum LA. Composition of body fluid. In: Behrman RE KR, Jenson HB, editor. *Nelson textbook of pediatrics: Philadelphia:Saunders; 2003.* p. 191-3.
262. Halstead SB. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. *World Health Stat Q.* 1992;45(2-3):292-8.
263. Stiehm ER. *Immunologic Disorders in Infants and Children.* 4th ed Saunders. 1996.
264. Askin DF, Young S. The thymus gland. *Neonatal Netw.* 2001;20:7-13.
265. Guzman MG, Kouri, G.P., Vazquez S., Rosario, D., Bravo, J.R., and Valdez L. DHF Epidemics in Cuba, 1981 and 1997: Some interesting observations. *Dengue Bulletin.* 1999;WHO 23.

266. Garcia-Rivera EJ, Rigau-Perez JG. Dengue severity in the elderly in Puerto Rico. *Rev Panam Salud Publica*. 2003 Jun;13(6):362-8.
267. Salgado DM, Rodríguez JA, Garzón M, Cifuentes J, Ibarra M, Vega MR, et al. Caracterización Clínica y Epidemiológica de Dengue Hemorrágico en Neiva, Colombia, 2004. *Rev Salud Pub (Bogotá)*. 2007;9(1):53-63.
268. Angele MK, Frantz MC, Chaudry IH. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006;61(5):479-88.
269. Brown E, Wasson V. Capillary fragility in girls. *The Journal of Pediatrics*. 1999;30(4):455-8.
270. Brown E. Diseases associated with low capillary resistance *American Heart Journal*. 1997;34(2):241-8.
271. Ong DQ, Sitaram N, Rajakulendran M, Koh GC, Seow AL, Ong ES, et al. Knowledge and practice of household mosquito breeding control measures between a dengue hotspot and non-hotspot in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*. 2010;39(2):146-9.
272. Hino P, dos Santos CC, dos Santos MO, da Cunha TN, dos Santos CB. Temporal evolution of dengue fever in Ribeirão Preto, São Paulo State, 1994-2003. *Cien Saude Colet*. 2010;15(1):233-8.
273. Yew YW, Ye T, Ang LW, Ng LC, Yap G, James L, et al. Seroepidemiology of dengue virus infection among adults in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*. 2009;38(8):667-75.
274. Günther J, Ramírez-Palacio LR, Pérez-Ishiwara DG, Salas-Benito JS. Distribution of dengue cases in the state of Oaxaca, Mexico, during the period 2004-2006. *J Clin Virol*. 2009;45(3):218-22.
275. Ooi EE. Changing Pattern of Dengue Transmission in Singapore. *Dengue Bull*. 2001;25:40-4.
276. Limonta D, Torres G, Capó V, Guzmán MG. Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient. *Diabetes Vasc Dis Res*. 2008;5(3):213-4.
277. Limonta D, Gonzalez D, Capó V, Torres G, Pérez AB, Rosario D, et al. Fatal dengue severe and cell death in sickle cell diseases during the 2001-2002 Havana Dengue Epidemic. *Int J Infect Dis*. 2009;13(2):e77-8.
278. Lee MS, Hwang KP, Chen TC, Lu PL, Chen TP. Clinical characteristics of dengue and dengue hemorrhagic fever in a medical center of southern Taiwan during the 2002 epidemic. *J Microbiol Immunol Infect*. 2006 Apr;39(2):121-9.
279. Teruel-Lopez E. [Dengue. A review]. *Invest Clin*. 1991;32(4):201-17.
280. Cunha RV, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Barbosa AM, Paiva FG, Miranda RM, et al. Dengue epidemic in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, in 1997. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999 May-Jun;93(3):247-9.
281. Orozco Hechavarria N, Diaz Portuondo IM, Abad Canete U, Martinez Delgado Y. [Incidence of dengue in children and adolescents]. *Rev Cubana Med Trop*. 2001 Jan-Apr;53(1):16-9.
282. Sierra B, Kouri G, Guzman MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol*. 2007;152(3):533-42.
283. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(3):180-3.
284. Chiewsilp P, Scott RM, Bhamarapavati N. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1981 Sep;30(5):1100-5.
285. Paradoa Perez ML, Trujillo Y, Basanta P. Association of dengue hemorrhagic fever with the HLA system. *Haematologia (Budap)*. 1987;20(2):83-7.
286. Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens*. 2002 Oct;60(4):309-18.

287. LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales J, Villarreal-Garza C, Higuera L, et al. 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.* 2002 Nov;63(11):1039-44.
288. Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, Schneider J, White NJ, et al. Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis.* 2001 Dec 1;184(11):1369-73.
289. Polizel JR, Bueno D, Visentainer JE, Sell AM, Borelli SD, Tsuneto LT, et al. Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004 Oct;99(6):559-62.
290. Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet.* 2001;2(12):967-77.
291. Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens.* 2004 Oct;64(4):469-72.
292. Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jul;67(1):102-6.
293. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 2003 Jul;4(7):723-8.
294. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet.* 2005 May;37(5):507-13.
295. Soundravally R, Hoti SL. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. *Hum Immunol.* 2007 Dec;68(12):973-9.
296. Rothman AL. Viral pathogenesis of dengue infections. In: Gubler DJ, Kuno, G., editor. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.* 1st ed. New York: CAB international press; 1997. p. 245-71.
297. Censo PyV. Oficina Nacional de Estadística Poblacional Cuba. http://www.cubagobcu/otras_info/censo/index.htm. 2002.
298. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol.* 2000 Nov 1;152(9):793-9; discussion 804.
299. Guzmán M G KG, Vazquez S, Rosario D, Bravo JR, Valdéz L. DHF Epidemics in Cuba, 1981 and 1997: Some interesting observations. *Bull World Health Organ.* 1999;23: 39-43:39-43.
300. Gonzalez D, Martinez R, Castro O, Serrano T, Portela D, Vazquez S, et al. Evaluation of Some Clinical, Humoral and Imagenological Parameters in Patients of Dengue Haemorrhagic Fever Six Months after Acute Illness. *Dengue Bulletin.* 2005;29: in press.
301. Morier L, Kouri G, Guzman G, Soler M. Antibody-dependent enhancement of dengue 2 virus in people of white descent in Cuba. *Lancet.* 1987 May 2;1(8540):1028-9.
302. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):476-81.
303. Kurane I, Takasaki T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. *Rev Med Virol.* 2001 Sep-Oct;11(5):301-11.
304. Gubler DJ, Meltzer M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv Virus Res.* 1999;53:35-70.

305. Roche J C, Cordellier E., Hervy J.P. , Digoutte J.P., Monteny N. Isolement de 96 souches de virus dengue a partir de moustiques captures en Cote D'Ivoire et Haute-Volta. *Ann Virol (Ins Pasteur)*. 1983;134E: 233-44.
306. Sharp T.W. WMR, Hayes C.G., Sanchez J.L., DeFraités R.F., Arthur R.R., Thornton S.A., Batchelor R.A., Rozmajzl P.J., Hanson R.K., Wu S.J., Iriye C., Burans J.P. Dengue fever in U.S. troops during Operation Restore Hope, Somalia, 1992-1993. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53(1):89-94.
307. WHO. Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. WHO Regional Publication, SEARO. 1999; No. 29: New Delhi, India.
308. Zeller HG. [Dengue, arbovirus and migrations in the Indian Ocean]. *Bull Soc Pathol Exot*. 1998;91(1):56-60.
309. Gubler DJ, Sather GE, Kuno G, Cabral JR. Dengue 3 virus transmission in Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 1986;35(6):1280-4.
310. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis*. 2003 Jul;9(7):800-9.
311. Saluzzo JF, Cornet M, Adam C, Eyraud M, Digoutte JP. [Dengue 2 in eastern Senegal: serologic survey in simian and human populations. 1974-85]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1986;79(3):313-22.
312. Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore*. 1998 Mar;27(2):227-34.
313. Benenson AS. *Control of Communicable Diseases in Man*. edition t, editor. Baltimore, MD: American Public Health Association; 1990.
314. Moure RD, de la Calle MR. *Art and Archaeologic of pre-Columbian Cuba*. University of Pittsburgh. 1996;Pittsburgh, USA.
315. Wilson SM. *The Indigenous People of the Caribbean*. University Press of Florida, Gainesville, USA. 1997.
316. Salzano FM, Bartolini MC. *The Evolution and Genetics of Latin American Populations*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 2002.
317. Franco JL. *La diáspora Africana en el Nuevo Mundo*. Editorial Ciencias Sociales. 1978;La Habana.
318. *La presencia Negra en el Nuevo Mundo*. Revista Casa de las Americas. 1986;Mayo.
319. *Presencia Canaria en tres archivos parroquiales de la Ciudad de la Habana durante el período colonial y su incidencia cultural*. CIDMUC, La Habana. . Coloquio de Historia Canario-Americana, 1988, . 1991;Tomo1, Las Palmas.
320. *Presencia Canaria en la Habana durante la etapa colonial*. Anales del Caribe. 1996;No 10, La Habana.
321. *El monto de la inmigración forzada en el siglo XIX*. Editorial Ciencias Sociales, La Habana. 1979.
322. *Cuántos africanos fueron traídos a Cuba?* Editorial Ciencias Sociales, La Habana. 1977.
323. *Guanche J. Procesos Etnoculturales de Cuba*. Editorial Ciencias Sociales. 1985;La Habana.
324. *Componentes Africanos en el Etnos Cubano*. Editorial Ciencias Sociales. 1985;La Habana.
325. *Hernández-Castellón R. La Revolución Demográfica en Cuba*. Editorial Ciencias Sociales, La Habana. 1988.
326. *Principales tendencias en el poblamiento Caribeño de Cuba*. Revista Universidad de la Habana, La Habana. 1990;Mayo-Agosto(238).
327. *Guanamacá: Una comunidad Haitiana*. Revista Etnología y Folklore, Academia de Ciencias de Cuba. (1).
328. *Chuffat Latour A. Apunte Histórico de los chinos en Cuba*. Editorial Molina, La Habana. 1927.

329. Pérez de la Riva J, Morejón Seijós B. Población de Cuba: La guerra de Independencia y la Inmigración del siglo XX. Demografía Histórica. Revista de la Biblioteca Nacional José Martí. 1971;Año 65, Mayo-Junio (2).
330. Trelles CdM. El progreso (1902-1906) y el retroceso (1906-1922) de la República de Cuba. Conferencia leída en el Instituto de Matanzas, 4 de Abril, Matanzas. 1923.
331. Cuba y la migración antillana, 1900-1931. La República Neocolonial Anuario de Estudios Cubanos. 1979;Tomo II, Editorial de Ciencias Sociales, La Habana.
332. Le Riverend J. Historia Económica de Cuba. Editora Universitaria, La Habana. 1967.
333. García Alvarez A. La gran burguesía Comercial en Cuba, 1899-1920. Editorial Ciencias Sociales, La Habana. 1990.
334. Ortiz F. Los factores humanos de la cubanidad. La Habana, Imp Molina 1940.
335. Ortiz F. Contrapunteo cubano del tabaco y el azúcar (advertencia de sus contrastes agrarios, económicos, históricos y sociales, su etnografía y su transculturación. Pról de Herminio Portell Vilá La Habana, Jesús Montero, 1940 (Biblioteca de historia, filosofía y sociología, 8. 1940.
336. Malo de Molina y de Huelves G. Las viviendas de los anglosajones, germanos y nórdicos de Camagüey y Las Tunas. Estudios Etnológicos Editorial Academia La Habana. 1991.
337. Los chinos en la nación cubana. Revista Revolución y Cultura. 1988;La Habana, Julio.
338. Presencia de los Inmigrantes chinos en la Ciudad de la Habana y surgimiento de sus asociaciones tradicionales. Actas del I Simposio "Extremo Oriente Ibérico", Madrid. 1988.
339. Soriano F. La migración puertorriqueña en Cuba:1898-1915. Aproximación a un fenómeno económico-político. Folleto. s/f.
340. Presencia Norteamericana en el área nororiental de Cuba. Etnicidad y Cultura Ediciones Holguín. 1991.
341. Apuntes para el estudio de la política inmigratoria durante la ocupación militar norteamericana. Anuario de Etnología Centro de Arqueología y Etnología Editorial Academia, La Habana.
342. Fernández R. Contribución al estudio etnográfico de la Inmigración hispánica en Cuba. Los libros bautismales de "Blancos" o "Españoles" de los archivos parroquiales de: San Isidoro de Holguín (1734-1890), Holguín; El Buen Pastor Jesús del Monte (1689-1898), La Habana; La Catedral de la Habana (1590-1898), La Habana; San José de Bahía Honda (1822-1895), Pinar del Rio. 1988.
343. Los recursos humanos de Cuba al comenzar el siglo: Inmigración, economía y nacionalidad (1899-1906). La Republica Neocolonial, Anuario de Estudios Cubanos, Editorial Ciencias Sociales, La Habana. 1975;Tomo I.
344. Ortiz F. El engaño de las razas. La Habana, Editorial Páginas 1946
345. Arce Bustabad S. Compatibilidad HLA y Raza. Su influencia en la evolución clínica del trasplante renal de cadaver en Cuba [Premio Anual del Ministerio de Salud Pública de Cuba al mejor Trabajo Científico de 1978]. La Habana: Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas, Ministerio de Salud Pública de Cuba; 1979.
346. Bhopal RDL. White, European, Western, Caucasian, or what? Inappropriate labeling in research on race, ethnicity, and health. Am J Public Health. 1998;88(1303-7).
347. Wolpoff M, Caspari R. Race and human evolution. New York: Simon and Schuster; 1997.
348. Arce Bustabad S, Martínez A, Ustariz C, Alfonso JP, García A, Mena L, et al. Compatibilidad HLA y Raza. Su influencia en la Evolución Clínica del Trasplante Renal de Cadaver en Cuba. Actualidad en Nefrología, La Habana CNICM Serie: Información Temática 1980;4(1):3-80.
349. Vazquez S, Bravo JR, Perez AB, Guzman MG. Inhibition ELISA. Its utility for classifying a case of dengue. Rev Cubana Med Trop. 1997;49:108-12.

350. Vazquez Ramudo S, Fernandez Llanes R. [Use of an inhibition method of ELISA in the serologic diagnosis of dengue. Preliminary report]. *Rev Cubana Med Trop*. 1989 Jan-Apr;41(1):18-26.
351. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol*. 1985;22:250-4.
352. Clarke D, Casals J. Techniques for hemagglutination inhibition with arthropodborne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-73.
353. Towbin H, Staehelin, T., Golden, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:4350-4.
354. Krieg RC, Dong Y, Schwamborn K, Knuechel R. Protein quantification and its tolerance for difference interfering reagents using the BCA method with regard to 2D SDS PAGE. *J Biochem Biophys Methods*. 2005;65(1):13-9.
355. Boyam A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21((suppl)):77-89.
356. Kurane I, Innis BL, Nisalak A, Hoke C, Nimmannitya S, Meager A, et al. Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gamma production. *J Clin Invest*. 1989 Feb;83(2):506-13.
357. Assays for Interleukines and other related factors. In: *Lymphocytes , a practical approach*. GGB EK, editor.; 1987.
358. García G, Sierra B, Morier L, Guzmán M, Alvarez M, Pérez AB, et al. Interleukin (IL-2) Levels in Past Dengue Infection *Dengue Bulletin*. 2001;25.
359. Gould EA, Cregg JCS. Growth, Titration and Purification of alphaviruses. A practical approach in *Virology*, . 1991;Chapter 3:68-72.
360. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol*. 1985 Aug;22(2):250-4.
361. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Erratum in: *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279. 1985;150:76-85.
362. Laue T, Emmerich P, Schmitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. *J Clin Microbiol*. 1999;37(8):2543-7.
363. Kanof ME, Smith PD, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*. 2001;May(Chapter 7:Unit 7.1).
364. *Standards for Histocompatibility Testing*. (1998).
365. Schneider S, Roessli D, Excofier L. Arlequin: a software for population genetics data analysis. Ver 2.000 ed. Geneva Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva; 2000.
366. Pospisil MF. *Manual de prácticas de antropología física*. Editorial Nacional de Cuba: Ciudad de La Habana, Cuba. 1965:163-73.
367. Rivero de la Calle M. *Antropología de la Población Adulta Cubana*. Editorial Científico Técnica: Ciudad de La Habana, Cuba. 1984:28-32.
368. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Rothman AL, Livingston PG, et al. Human immune responses to dengue viruses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1990 Dec;21(4):658-62.
369. Guzman MG, Garcia G, Kouri G. [Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities]. *Rev Panam Salud Publica*. 2006 Mar;19(3):204-15.

370. Guerra R. Manual de Historia de Cuba desde su Descubrimiento. . Colección Histórica, Editorial Nacional de Cuba, C Habana., 1964.
371. Ulloa J. Archaeology and Rescue of the Aboriginal Presence in Cuba and the Caribbean. KACIKE: The Journal of Caribbean Amerindian History and Anthropology [On-line Journal], . 2002;Special Issue, Lynne Guitar, Ed. Available at: <http://www.kacike.org/UlloaEnglish.html>
372. Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR. Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. J Med Virol. 2007 Mar;79(3):300-7.
373. Juffrie M, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. Am J Trop Med Hyg. 2001 Jul;65(1):70-5.
374. Talavera D, Castillo AM, Domínguez MC, Gutiérrez AE, Meza I. 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. 2004;85((Pt 7)):1801-13.
375. Huerta-Zepeda A, Cabello-Gutiérrez C, Cime-Castillo J, Monroy-Martínez V, Manjarrez-Zavala ME, Gutiérrez-Rodríguez M, et al. Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection. Thromb Haemost. 2008 May;99(5):936-43.
376. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. J Gen Virol 2006;87:3623-30.
377. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. J Gen Virol. 2006 Dec;87(Pt 12):3623-30.
378. Kurane I, Mady BJ, Ennis FA. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. Rev Med Virol. 1991;1:211-21.
379. Murgue B, Cassar O, Deparis X, Guigon M, Chungue E. Implication of macrophage inflammatory protein-1alpha in the inhibition of human haematopoietic progenitor growth by dengue virus. J Gen Virol. 1998 Aug;79 (Pt 8):1889-93.
380. Spain Santana TA, Marglin S, Ennis FA, Rothman AL. MIP-1 alpha and MIP-1 beta induction by dengue virus. J Med Virol. 2001;65(2):324-30.
381. King CA, Anderson R, Marshall JS. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. J Virol. 2002 Aug;76(16):8408-19.
382. Lin YL, Liu CC, Chuang JI, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, et al. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. Virology. 2000 Oct 10;276(1):114-26.
383. Scala E, G. D'Offizi, R. Rosso, O. Turriziani, R. Ferrara, A.M. Mazzone, G. Antonelli, F. Aiuti, and R. Paganelli. C-C chemokines, IL-16, and soluble antiviral factor activity are increased in cloned T cells from subjects with long-term nonprogressive HIV infection. J Immunol. 1997.;158:4485-92.
384. Hadida F, Vicillard V, Autran B, Lewis IC, Baggiolini M, Debré P. HIV-specific T Cell Cytotoxicity Mediated by RANTES Via the Chemokine Receptor CCR3. J Exp Med. 1998;188(3): 609-14.
385. Kurane I, Meager A, Ennis FA. Induction of interferon alpha and gamma from human lymphocytes by dengue virus-infected cells. J Gen Virol. 1986 Aug;67 (Pt 8):1653-61.
386. Yang KD, Wang CL, Shaio MF. Production of cytokines and platelet activating factor in secondary dengue virus infections. J Infect Dis. 1995 Aug;172(2):604-5.

387. Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R, Raghupathy R, Nagar R, Tandon R, et al. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol.* 1999 Nov;59(3):335-40.
388. Reis SR, Sampaio AL, Henriques MG, Gandini M, Azeredo EL, Kubelka CF. An in vitro model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Dec;102(8):983-90.
389. Dejnirattisai W, Duangchinda T, Lin CL, Vasanaawathana S, Jones M, Jacobs M, et al. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *J Immunol.* 2008;181(9):5865-74.
390. Mangada MM, Ennis FA, Rothman AL. Quantitation of dengue virus specific CD4+ T cells by intracellular cytokine staining. *J Immunol Methods.* 2004 Jan;284(1-2):89-97.
391. Chen HC, Lai SY, Sung JM, Lee SH, Lin YC, Wang WK, et al. Lymphocyte activation and hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus. *J Med Virol.* 2004 Jul;73(3):419-31.
392. Kurane I, Innis BL, Hoke CH, Jr, Eckels KH, Meager A, Janus J, et al. T cell activation in vivo by dengue virus infection. *J Clin Lab Immunol.* 1995;46(1):35-40.
393. Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology.* 2001;204(4):494-507.
394. Gagnon SJ, Mori M, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. *J Med Virol.* 2002 May;67(1):41-6.
395. Restrepo BN, Ramirez RE, Arboleda M, Alvarez G, Ospina M, Diaz FJ. Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(5):673-7.
396. Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, et al. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis.* 2002 Jun 15;185(12):1697-703.
397. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008;8(86).
398. Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz AC. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol.* 1997 Jun;71(6):4226-32.
399. Espina LM, Valero NJ, Hernandez JM, Mosquera JA. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Jan;68(1):48-53.
400. Ho LJ, Wang JJ, Shiao MF, Kao CL, Chang DM, Han SW, et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol.* 2001 Feb 1;166(3):1499-506.
401. Imrie A, Meeks J, Gurary A, Sukhbataar M, Kitsutani P, Effler P, et al. Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. *J Virol.* 2007 Sep;81(18):10081-91.
402. Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007 Sep;30(5-6):329-40.
403. Vitarana T, de Silva H, Withana N, Gunasekera C. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med J.* 1991 Jun;36(2):63-5.

404. Yadav M, Kamath KR, Iyngkaran N, Sinniah M. Dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome: are they tumour necrosis factor-mediated disorders? *FEMS Microbiol Immunol*. 1991 Dec;4(1):45-9.
405. Kuno G, Bailey RE. Cytokine responses to dengue infection among Puerto Rican patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994 Apr-Jun;89(2):179-82.
406. Laur F, Murgue B, Deparis X, Roche C, Cassar O, Chungue E. 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*. 1998 Nov-Dec;92(6):654-6.
407. Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost*. 2002 Jan;87(1):42-6.
408. Avila-Aguero ML, Avila-Aguero CR, Um SI, Soriano-Fallas A, Canas-Coto A, Yan SB. Systemic host inflammatory and coagulation response in the Dengue virus primo-infection. *Cytokine*. 2004 Sep 21;27(6):173-9.
409. Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology*. 2001;204(4):494-507.
410. Wang L, Chen RF, Liu JW, Yu HR, Kuo HC, Yang KD. 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*. 2007 77(2):297-302.
411. Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. *Int J Exp Pathol*. 1999;80(3):143-9.
412. Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000 Jul;28(3):183-8.
413. Tay JC, Tan P. Finding intervention points in the pathogenesis of Dengue viral infection. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006;1:5315-21.
414. Palmer DR, Sun P, Celluzzi C, Bisbing J, Pang S, Sun W, et al. Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *J Virol*. 2005;79(4):2432-9.
415. Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis*. 2004 Jan 15;189(2):221-32.
416. Yang KD, Yeh WT, Yang MY, Chen RF, Shiao MF. Antibody-dependent enhancement of heterotypic dengue infections involved in suppression of IFN-gamma production. *J Med Virol*. 2001 Feb;63(2):150-7.
417. Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol*. 2007;88(Pt 2):365-75.
418. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(5):1108-11.
419. Chaturvedi UC. The curse of dengue. *Indian J Med Res*. 2006 Nov;124(5):467-70.
420. Kurane I, Rothman AL, Livingston PG, Green S, Gagnon SJ, Janus J, et al. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol Suppl*. 1994;9:59-64.
421. Kurane I, Ennis FA. Cytotoxic T lymphocytes in dengue virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;189:93-108.
422. Kurane I, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue virus infection. In: Gubler D, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York, N.Y: CAB International; 1997. p. 273-90.

423. Bukowski JF, Kurane I, Lai CJ, Bray M, Falgout B, Ennis FA. Dengue virus-specific cross-reactive CD8⁺ human cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 1989;63(12):5086-91.
424. Zivny J, DeFronzo M, Jarry W, Jameson J, Cruz J, Ennis FA, et al. Partial agonist effect influences the CTL response to a heterologous dengue virus serotype. *J Immunol.* 1999 Sep 1;163(5):2754-60.
425. Snyder JT A-MM, Berzofskyl JA, Belyakov IM. Molecular mechanisms and biological significance of CTL avidity. *Curr HIV Res.* 2003 Jul;1(3):287-94.
426. Menezes AAJ. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *The FASEB Journal.* 1996; 10:258-66.
427. V. R. Gomez-Roman LJP, D. Venzon, D. Liewehr, K. Aldrich, R. Florese, and M. Robert-Guroff. Vaccine-Elicited Antibodies Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Correlated with Significantly Reduced Acute Viremia in Rhesus Macaques Challenged with SIVmac251. *J Immunol.* 2005 February 15, 2005;174(4):2185 - 9.
428. R. A. Subbramanian JX, E. Toma, R. Morisset, E. A. Cohen, J. Menezes, and A. Ahmad. Comparison of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific Infection-Enhancing and -Inhibiting Antibodies in AIDS Patients. *J Clin Microbiol.* 2002 June 1;40(6):2141 - 6.
429. Alvarez AAaF. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J Leukoc Biol.* 2004 October 1, 2004;76(4):743 - 59.
430. Kurane I, Hebblewaite D, Brandt WE, Ennis FA. Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol.* 1984 Oct;52(1):223-30.
431. Garcia G, Arango M, Perez AB, Fonte L, Sierra B, Rodriguez-Roche R, et al. Antibodies from patients with dengue viral infection mediate cellular cytotoxicity. *J Clin Virol.* 2006 Sep;37(1):53-7.
432. Kaser A, Enrich B, Ludwiczek O, Vogel W, Tilg H. Interferon-alpha (IFN- α) enhances cytotoxicity in healthy volunteers and chronic hepatitis C infection mainly by the perforin pathway. *Clin Exp Immunol ;* . 1999;118:71-7.
433. Marianneau P, Cardona A, Edelman L, Deubel V, Despres P. Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *J Virol.* 1997 Apr;71(4):3244-9.
434. Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Jaeck D, Kim A, et al. Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. *J Virol.* 1999 Jun;73(6):5201-6.
435. Limonta D, Capo V, Torres G, Perez AB, Guzman MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol.* 2007 Sep;40(1):50-4.
436. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica.* 2002 Apr;11(4):223-7.
437. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 2002 Feb;10(2):100-3.
438. Rothman AL. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;338:83-98.
439. Rothman AL. T lymphocyte responses to heterologous secondary dengue virus infections. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1171 (Suppl 1):E36-41.

440. Veronese Rodrigues ML, de Castro Figueiredo JF, Deghaide NH, Romao E, Vieira de Souza N, Donadi EA. Frequency of HLA class 1 and 2 alleles in Brazilian patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis. *Acta Ophthalmol Scand.* 2003;81 (5):514-6.
441. Missale G, Redeker A, Person J, Fowler P, Guilhot S, Schlicht HJ, et al. HLA-A31- and HLA-Aw68-restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis. *J Exp Med.* 1993;177(3):751-62.
442. Tripathy AS, Shankarkumar U, Chadha MS, Ghosh K, Arankalle VA. Association of HLA alleles with hepatitis C infection in Maharashtra, western India. 2009;130(November):550-5.
443. Yang G, Deng YJ, Qin H, Zhu BF, Chen F, Shen CM, et al. HLA-B*15 subtypes distribution in Han population in Beijing, China, as compared with those of other populations. *Int J Immunogenet.* 2010 37(3):205-12.
444. Saxena S, Dash SC, Guleria S, Mittal R, Agarwal SK, Tiwari C, et al. Post transplant diabetes mellitus in live related renal allograft recipients: a single centre experience. *J Assoc Physicians India.* 1996(44):472.
445. Winkler CL, Tucker JM, Hauth JC, Goldenberg RL, Acton RT, Barger BO, et al. Histocompatibility antigen subtypes in black women with class A1 or class GB diabetes mellitus. *Am J Perinatol.* 1991;8:106.
446. Guzman MG, Kouri G, Vazquez S, Rosario D, Bravo JR, Valdez L. DHF Epidemics in Cuba, 1981 and 1997: Some interesting observations. *Dengue BulletinWHO.* 1999.;23.
447. Petzl-Erler ML, Gorodezky C, Layrisse Z. Anthropology report for the Latin-American region: Amerindian and admixture populations. In: Charron D, editor. *Genetic Diversity of HLA Functional and Medical Implications.* Paris, France: EDK; 1997. p. 337-45.
448. Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcon G, Granados J, Gomez-Casado E, Longas J, Gonzales-Hevilla M, et al. HLA genes in Mexican Mazatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens.* 2000;56:405-16.
449. Vargas-Alarcon G, Hernandez-Pacheco G, Moscoso J, Perez-Hernandez N, Murguía LE, Moreno A, et al. HLA genes in Mexican Teeneks: HLA genetic relationship with other worldwide populations. *Mol Immunol.* 2006; 43:790-9.
450. Garcia-Ortiz JE, Sandoval-Ramirez, L., Rangel-Villalobos, H., Maldonado-, Torres H, Cox, S., Garcia-Sepulveda, C.A., Figuera, L.E., Marsh, S.G., Little AM, Madrigal, J.A., Moscoso, J., Arnaiz-Villena, A., Arguello, J.R. High-resolution molecular characterization of the HLA class I and class II in the Tarahumara Amerindian population. *Tissue Antigens.* 2006;68: 135-46.
451. Martinez-Laso J, Siles, N., Moscoso, J., Zamora, J., Serrano-Vela, J.I., Ira-, Cachafeiro J, Castro, M.J., Serrano-Rios, M., Arnaiz-Villena, A. Origin of Bolivian Quechua Amerindians: their relationship with other American Indians and Asians according to HLA genes. *Eur J Med Genet.* 2006;49:169-85.
452. Moscoso J, Seclen, S., Serrano-Vela, J.I., Villena, A., Martinez-Laso, J., Zamora J, Moreno, A., Ira-Cachafeiro, J., Arnaiz-Villena, A. HLA genes in Lamas Peruvian-Amazonian Amerindians. *Mol Immunol.* 2006;43:1881-9.
453. Alegre R, Moscoso J, Martinez-Laso J, Martin-Villa M, Suarez J, Moreno A, et al. HLA genes in Cubans and the detection of Amerindian alleles. *Mol Immunol.* 2007;44 (9):2426-35.
454. Layrisse Z, Matos M, Montagnani S, Herrera F. The novel HLADRB1*0807 allele is present in a Carib Amerindian population: the Yuupa. *Tissue Antigens.* 1997;49:427-8.
455. Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcon G, Granados J, Gomez-Casado E, Longas J, Gonzales-Hevilla M, et al. HLA genes in Mexican Mazatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians *Tissue Antigens.* 2000;56:405-16.
456. Guanache J. *Procesos Etno-Culturales de Cuba.* La Habana, Editorial de Letras Cubanas. 1983.

457. Arnaiz-Villena A, Vargas Alarcon, G., Granados, F., Gomez, C., Longas, J., Gonzalez, H., Zuñiga, J., Salgado, N., Hernandez-Pacheco, G., Martinez-Laso, J. HLA genes in Mexican Mazatecos, the peopling of the Americas and the uniqueness of the Amerindians. *Tissue Antigens*. 2002;56:40.
458. WHO/PAHO. DengueNet implementation in the Americas. Report of a WHO/PAHO/CDC Meeting, 9-11 July. WHO/CDS/CSR/GAR/20038. San Juan Puerto Rico; 2002.
459. Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso, J., Gomez-Casado, E., Diaz-Campos, N., Santos P, Martinho, A., Breda-Coimbra, H. Relatedness among Basques, Portuguese, Spaniards, and Algerians studied by HLA allelic frequencies and haplotypes. *Immunogenetics*. 1997;47:37-43.
460. Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol*. 2003 Jan;20(1):122-9.
461. Tang J, Tang S, Lobashevsky E, Myracle AD, Fideli U, Aldrovandi G, et al. Favorable and unfavorable HLA class I alleles and haplotypes in Zambians predominantly infected with clade C human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2002;76(16):8276-84.
462. Bettencourt A, Pereira C, Carvalho L, Carvalho C, Patto JV, Bastos M, et al. New insights of HLA class I association to Behçet's disease in Portuguese patients. *Tissue Antigens*. 2008;72(4):379-82.
463. Montes-Ares O, Moya-Quiles MR, Montes-Casado M, Guerra-Pérez N, Campillo JA, González C, et al. Human leucocyte antigen-C in B chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2006;135(4):517-9.
464. Sanchez-Mazas A, Steiner QG, Grundschober C, Tiercy JM. The molecular determination of HLA-Cw alleles in the Mandenka (West Africa) reveals a close genetic relationship between Africans and Europeans. *Tissue Antigens*. 2000;56(4):303-12.
465. Aslanian FM, Marques MT, Matos HJ, Pontes LF, Porto LC, Azevedo LM, et al. HLA markers in familial Lichen sclerosus. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2006;4(10):842-7.
466. Shankarkumar U, Ghosh K, Mohanty D. Molecular diversity of HLA-Cw alleles in the Maratha community of Mumbai, Maharashtra, western India. *Int J Immunogenet*. 2005;32(4):223-7.
467. Koopman LA, Mulder A, Corver WE, Anholts JD, Giphart MJ, Claas FH, et al. HLA class I phenotype and genotype alterations in cervical carcinomas and derivative cell lines. *Tissue Antigens*. 1998;51(6):623-36.
468. Diouf K, Sarr AD, Eisen G, Popper S, Mboup S, Kanki P. Associations between MHC class I and susceptibility to HIV-2 disease progression. *J Hum Virol*. 2002;5(1):1-7.
469. Bansal A, Yue L, Conway J, Yusim K, Tang J, Kappes J, et al. Immunological control of chronic HIV-1 infection: HLA-mediated immune function and viral evolution in adolescents. *AIDS*. 2007;21(18):2387-97.
470. Tang J, Shao W, Yoo YJ, Brill I, Mulenga J, Allen S, et al. Human leukocyte antigen class I genotypes in relation to heterosexual HIV type 1 transmission within discordant couples. *J Immunol*. 2008 181(4):2626-35.
471. Twiddy SS, Woelk CH, Holmes EC. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *J Gen Virol*. 2002 Jul;83(Pt 7):1679-89.
472. Venter M, Rock M, Puren AJ, Tiemessen CT, Crowe JEJ. Respiratory syncytial virus nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell epitopes in a South African population of diverse HLA types are conserved in circulating field strains. *J Virol*. 2003;77(13):7319-29.
473. Rimmelzwaan GF, Boon AC, Voeten JT, Berkhoff EG, Fouchier RA, Osterhaus AD. Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res*. 2004;103(1-2):97-100.

474. Meyer-Olson D, Brady KW, Bartman MT, O'Sullivan KM, Simons BC, Conrad JA, et al. Fluctuations of functionally distinct CD8⁺ T-cell clonotypes demonstrate flexibility of the HIV-specific TCR repertoire. *Blood*. 2006;107(6):2373-83
475. Salloum S, Oniangue-Ndza C, Neumann-Haefelin C, Hudson L, Giugliano S, aus dem Siepen M, et al. Escape from HLA-B*08-restricted CD8⁺ T cells by hepatitis C virus is associated with fitness costs. *J Virol*. 2008;82(23):11803-12. .
476. Wölfel C, Lennerz V, Lindemann E, Hess G, Derigs HG, Huber C, et al. Dissection and molecular analysis of alloreactive CD8⁺ T cell responses in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(6):849-57.
477. Orchard TR, Thiyagaraja S, Welsh KI, Wordsworth BP, Hill Gaston JS, Jewell DP. Clinical phenotype is related to HLA genotype in the peripheral arthropathies of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000;118(2):274-8.
478. Zehbe I, Mytilineos J, Wikström I, Henriksen R, Edler L, Tommasino M. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women. *Hum Immunol*. 2003;64(5):538-42.
479. Thio CL, Thomas DL, Karacki P, Gao X, Marti D, Kaslow RA, et al. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol*. 2003;77(22):12083-7.
480. Fanning LJ, Kenny-Walsh E, Shanahan F. Persistence of hepatitis C virus in a white population: associations with human leukocyte antigen class 1. *Hum Immunol*. 2004;65:745.
481. Liu Q, Bu DF, Li D, Zhu XJ. Genotyping of HLA-I and HLA-II alleles in Chinese patients with paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol*. 2008;158(3):587-91.
482. Li S, Jiao H, Yu X, Strong AJ, Shao Y, Sun Y, et al. Human leukocyte antigen class I and class II allele frequencies and HIV-1 infection associations in a Chinese cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;44(2):121-31.
483. Nei M. Genetic distances between populations. *Am Nat*. 1972;106:283.
484. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci*. 1973;70:3321-3.
485. Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, et al. Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol*. 2000;61(10):1048-52.
486. Tussey LG, Matsui M, Rowland-Jones S, Warburton R, Frelinger JA, McMichael A. Analysis of mutant HLA-A2 molecules. Differential effects on peptide binding and CTL recognition. *J Immunol* 1994;152:1213–21.
487. Bryden H, MacKenzie J, Andrew L, Alexander FE, Angus B, Krajewski AS, et al. Determination of HLA-A*02 antigen status in Hodgkin's disease and analysis of an HLA-A*02-restricted epitope of the Epstein-Barr virus LMP-2 protein. *Int J Cancer*. 1997;72(4):614-8.
488. Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3848-53.
489. Smerdel A, Lie BA, Ploski R, Koeleman BP, Førre Ø, Thorsby E, et al. A gene in the telomeric HLA complex distinct from HLA-A is involved in predisposition to juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(6):1614-9.
490. Barnetche T, Constantin A, Gourraud PA, Abbal M, Garnier JG, Cantagrel A, et al. Microsatellite typing of the human leukocyte antigen region: analytical approach and contribution to rheumatoid arthritis immunogenetic studies. *Tissue Antigens*. 2006;68 (5):390-8.

491. Krausa P, Browning MJ. HLA-A2 polymorphism and immune functions. *Eur J Immunogenet* 1996;23:261-74.
492. Utz U, Koenig S, Coligan JE, Biddison WE. Presentation of three different viral peptides, HTLV-1 Tax, HCMV gB, and influenza virus M1, is determined by common structural feature of the HLA-A2.1 molecule. *J Immunol* 1992;149:214-21.
493. Vyakarnam A, Sidebottom D, Murad S, Underhill JA, Easterbrook PJ, Dalglish AG, et al. Possession of human leucocyte antigen DQ6 alleles and the rate of CD4 T-cell decline in human immunodeficiency virus-1 infection. *Immunology*. 2004;112(1):136-42.
494. Ettinger RA, Papadopoulos GK, Moustakas AK, Nepom GT, Kwok WW. Allelic variation in key peptide-binding pockets discriminates between closely related diabetes-protective and diabetes-susceptible HLA-DQB1*06 alleles. *J Immunol*. 2006;176 (3):1988-98.
495. Klein J, Sato A. The HLA system *The New England Journal of Medicine*. 2000;343(10):702-9.
496. Carrington M. HLA and HIV-1: Heterozygote advantage and B*35-CW*04 disadvantage. *Science*. 1999;283:1748-52.
497. Thursz MR. Heterozygote advantage for HLA class II type in hepatitis B virus infection. *Nat Genet*. 1997;17:11-2.
498. Arias J. Dengue in Cuba. *Rev Panam Salud Publica*. 2002 Apr;11(4):221-2.
499. Green MM. Fighting dengue in Cuba. *Science*. 1997 Aug 1;277(5326):623.
500. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Vald s L, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis*. 1999 Spring;3(3):130-5.
501. Valdes L, Guzman MG, Kouri G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, et al. Epidemiology of dengue and hemorrhagic dengue in Santiago, Cuba 1997. *Rev Panam Salud Publica*. 1999 Jul;6(1):16-25.
502. Molmar S. *Human Variation*. ed. f, editor. New Jersey, USA: Prentice Hall, Upper Saddle River; 1998.
503. Imanishi T, Akaza, T., Kimura, A., Tokunaga, K., Gojobori, T. . Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. . In: Tsuji K, Aizawa, M, Sasazuki, T. , editor. *HLA 1991*. Oxford, UK: Oxford University Press; 1992. p. 1065-220.
504. Krieger N. Refiguring "race": epidemiology, racialized biology, and biological expressions of race relations. *Int J Health Serv*. 2000;30:211-6.
505. Cavalli-Sforza LL, Bodmer, W.F. *Human Evolution*. In: Cavalli-Sforza LL and Bodmer WF (Eds) *The Genetics of Human Population* Dover Publications, Inc:Mineola, New York. 1999:11.1-.
506. Cavalli-Sforza LL, Bodmer W.F. *Quantitative Characters, Polygenic Inheritance and Enviromental Factors*. In: Cavalli-Sforza LL and WF Bodmer (Eds) *The Genetics of Human Population* Dover Publications, Inc:Mineola, New York. 1999a:pp.9.1-9.14.
507. Cavalli-Sforza L.L. B, W.F. *Genetic Demography and Natural Selection*. In: Cavalli-Sforza LL and Bodmer WF (Eds) *The Genetics of Human Population* Dover Publications, Inc:Mineola, New York. 1999b:pp.6.1-6.9.
508. Wolpoff M, Caspari R. *Race and human evolution*. Simon and Schuster: New York. 1997.
509. Wright IA. . *The Early History of Cuba 1492-1586*. The Macmillan Company: New York. 1916.
510. *Cubanos*. CdED. *La Población de Cuba*. Editorial Ciencias Sociales: La Habana, Cuba. (1976).
511. Bruck S. *España en La Población del Mundo*. Prontuario Etnodemográfico. Editorial de Ciencias: Moscú. 1981.
512. Ulloa J. *Archaeology and Rescue of the Aboriginal Presence in Cuba and the Caribbean*. KACIKE: *The Journal of Caribbean Amerindian History and Anthropology* [On-line Journal], Special Issue, Lynne Guitar, Ed. 2002; Available at: <http://www.kacike.org/UlloaEnglish.html>.

513. Guerra R. Manual de Historia de Cuba desde su Descubrimiento. Colección Histórica, Editorial Nacional de Cuba: La Habana, Cuba. 1964.
514. Rivero de la Calle M. Antropología de la Población Adulta Cubana. Editorial Científico Técnica, Ciudad de La Habana. 1984;44.
515. Lewontin RC. The apportionment of human diversity. In: Gates EN, editor. The Concept of "Race" in Natural and Social Science. New York: Garland Publishing Inc; 1997. p. 7-24.
516. Darwin C. Origin of Species. 6, editor. New York: The Modern Library; 1872.
517. Darwin C. On the Origin of Species. 1991 MEL, editor. London: Murray; 1859.
518. De Filippis VR. Virus Evolution. In: Howley PM, editor. Fields Virology. Fourth ed. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams& Wilkins; 2001.
519. Modiano. D. Different response to Plasmodium falciparum malaria in West African sympatric ethnic groups. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:13206-11.
520. Gaunt MW, Sall AA, Lamballerie X, Falconar AK, Dzhivanian TI, Gould EA. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. J Gen Virol. 2001;82(Pt 8):1867-76.
521. Gaunt MW, Sall AA, de Lamballerie X, Falconar AKI, Dzhivanian TI, Gould EA. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. J Gen Virol. 2001;82:1867-76.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

VIII. 1 Figuras

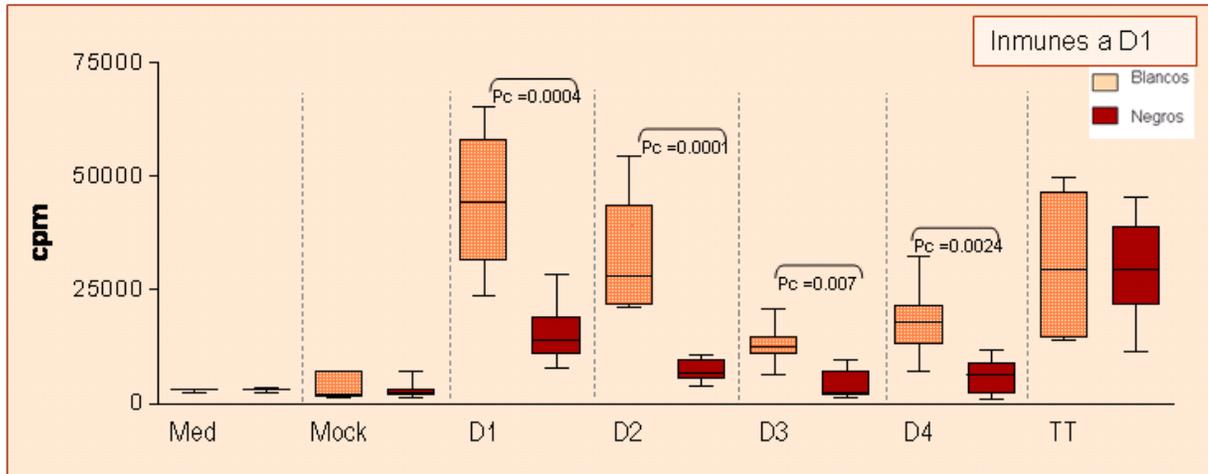


Figura 1a. Respuesta linfoproliferativa homologa y heterologa a virus dengue de individuos negros y blancos inmunes a dengue 1.

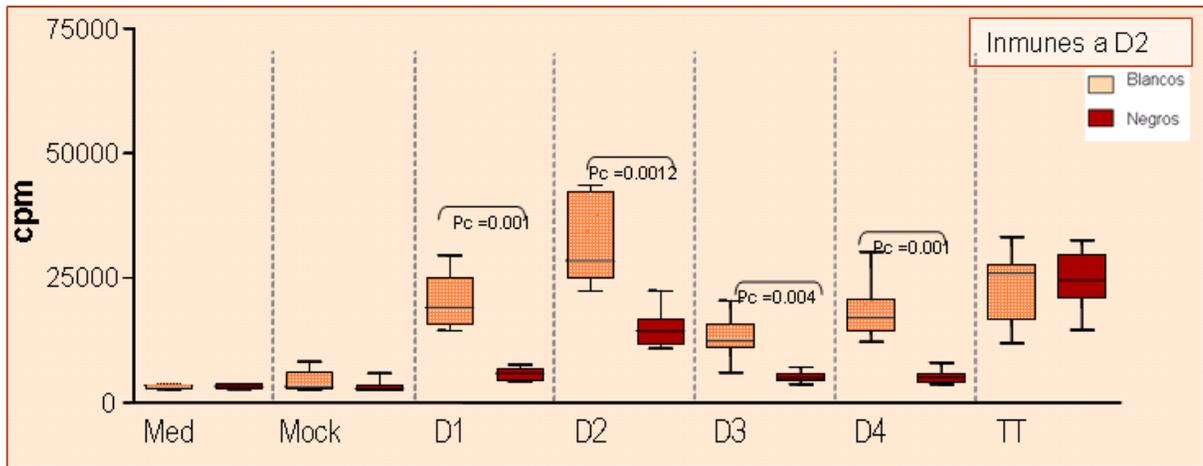


Figura 1b. Respuesta linfoproliferativa homologa y heterologa a virus dengue de individuos negros y blancos inmunes a dengue 2.

Leyenda: Muestra: 40 sujetos dengue 1 inmunes: 18 blancos y 20 negros, y 40 sujetos dengue 2 inmunes: 20 blancos y 22 negros. cpm: Conteos por minuto. Med: Medio RPMI 1640. Mock: Antígenos preparado en idénticas condiciones a partir de cerebro de ratón no infectado. D1: dengue 1, D2: dengue 2, D3: dengue 3, D4: dengue 4. TT: toxoide tetánico. Cada diagrama de caja muestra los datos estadísticos acerca de los diferentes estímulos linfoproliferativos empleados. La línea horizontal en la caja muestra la mediana de las muestras, los bordes superior e inferior de la caja señalan el primer y tercer cuartil. El área dentro de la caja abarca el 50% de los valores. Las líneas superior e inferior por fuera de la caja muestran los valores máximo y mínimos.

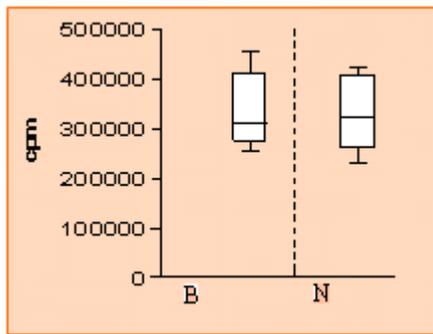
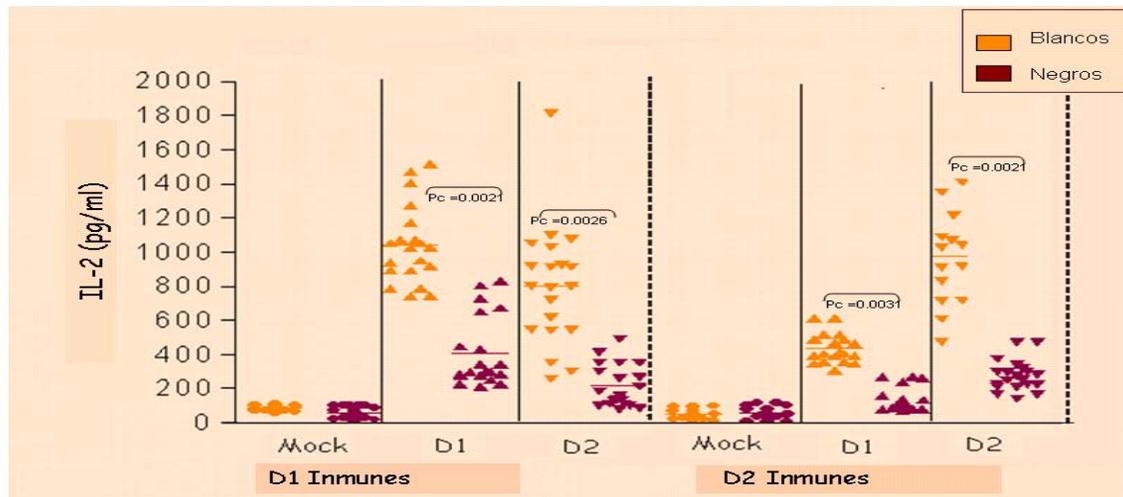


Figura 2: Promedio de CPM de blancos y negros en respuesta a la PHA

Leyenda: cpm: Conteos por minuto, B: Blancos, N: Negros. Cada diagrama de caja muestra los datos estadísticos acerca de la estimulación con PHA en individuos blancos y negros. La explicación de los mismos se muestra en la figura 1.

Figura 3. Promedio de los niveles de IL-2 en sobrenadantes de cultivo de individuos negros y blancos inmunes a dengue.



Leyenda:

Promedio de los niveles de IL-2 en el sobrenadante de las células mononucleares periféricas de individuos inmunes a dengue. D1: individuos inmunes a dengue 1, D2: individuos inmunes a dengue 2, Mock: sobrenadante de células mononucleares periféricas no infectadas por dengue. La línea horizontal representa la media. Se muestran la dispersión de los valores.

Figura 4. Expresión de IL-8.

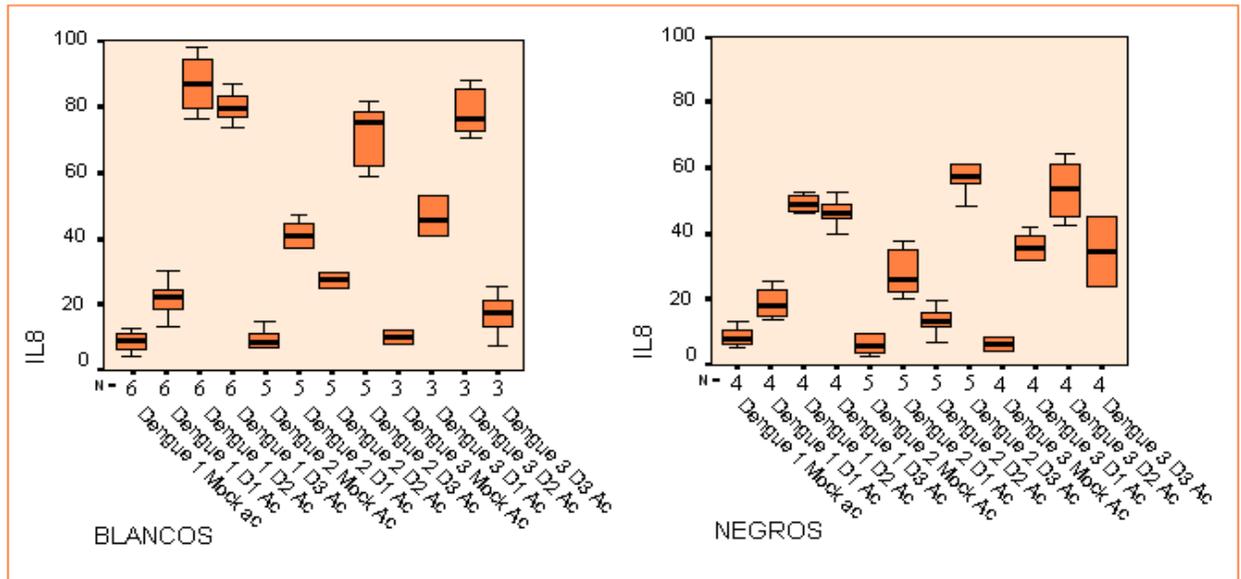


Figura 4 a. Expresión de IL-8 en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con virus dengue.

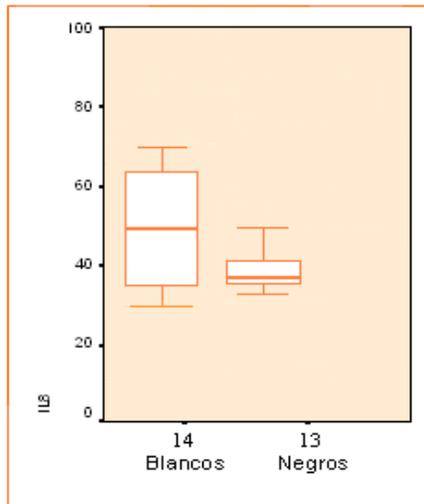


Figura 4 b. Expresión de IL-8 en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación heterotípica con virus dengue.

Leyenda: Los datos se muestran como Diagramas de Cajas. La línea horizontal en la caja muestra la mediana de los cpm, los bordes superior e inferior de las cajas señalan el primer y tercer cuartil. El área dentro de la caja abarca el 50 % de los valores. Las líneas superior e inferior por fuera de la caja muestran los valores máximos y mínimos. La expresión específica se calculó con relación a la expresión de HPRT-1 por el método delta/delta Ct, recomendado por ABI, expresándose los resultados en picogramos de ARN m.

Figura 5. Expresión de MCP.

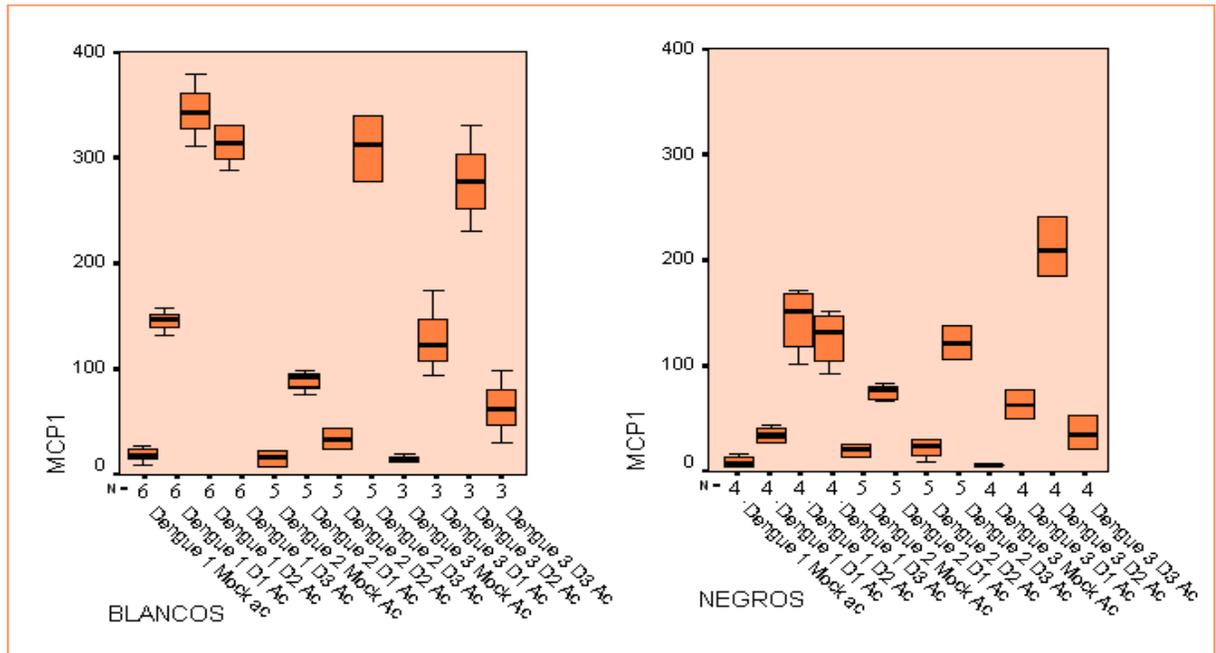


Figura 5 a. Expresión de MCP-1 en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con virus dengue.

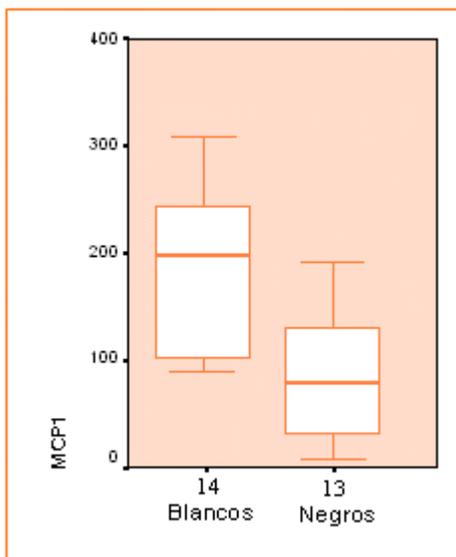


Figura 5 b. Expresión de MCP-1 en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación heterotípica con virus dengue.

Leyenda: Se muestra en la figura 4.

Figura 6. Expresión de MIP-1 α .

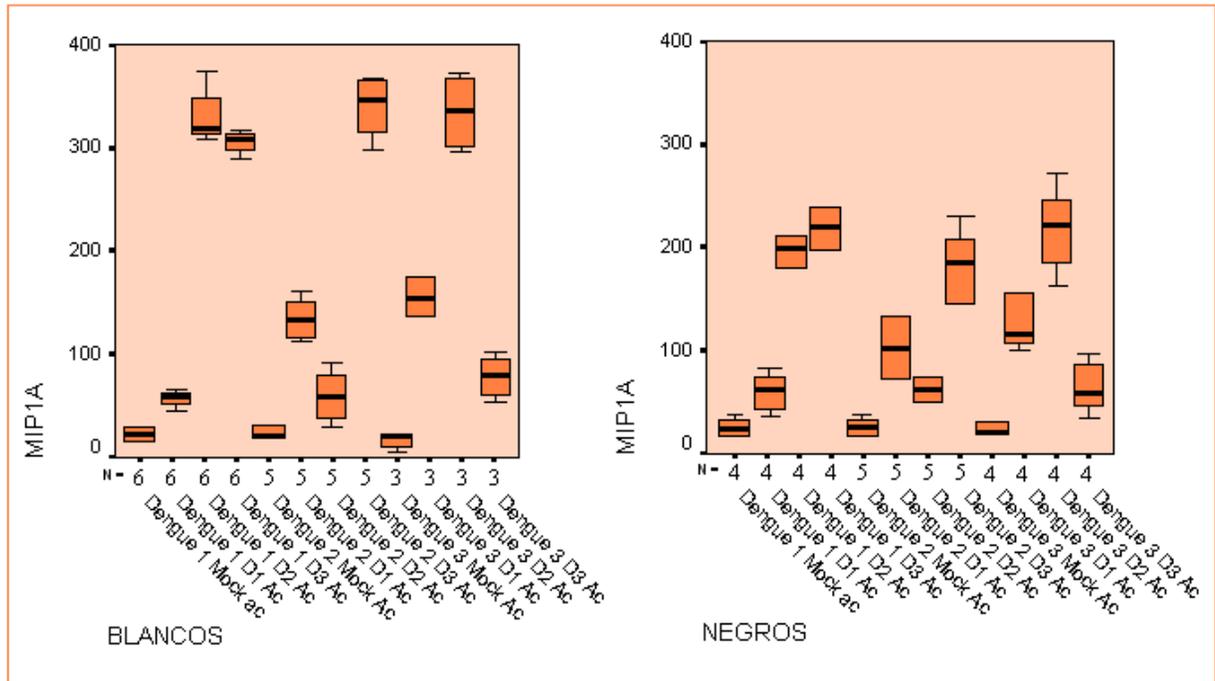


Figura 6 a. Expresión de MIP-1 α en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con virus dengue.

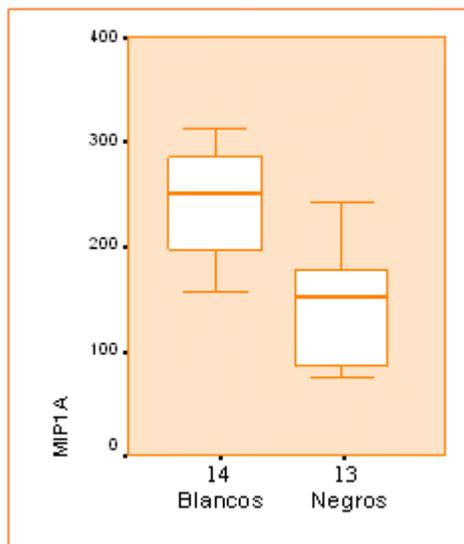


Figura 6 b. Expresión de MIP-1 α en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación heterotípica con virus dengue.

Leyenda: Se muestra en la figura 4.

Figura 7. Expresión de RANTES.

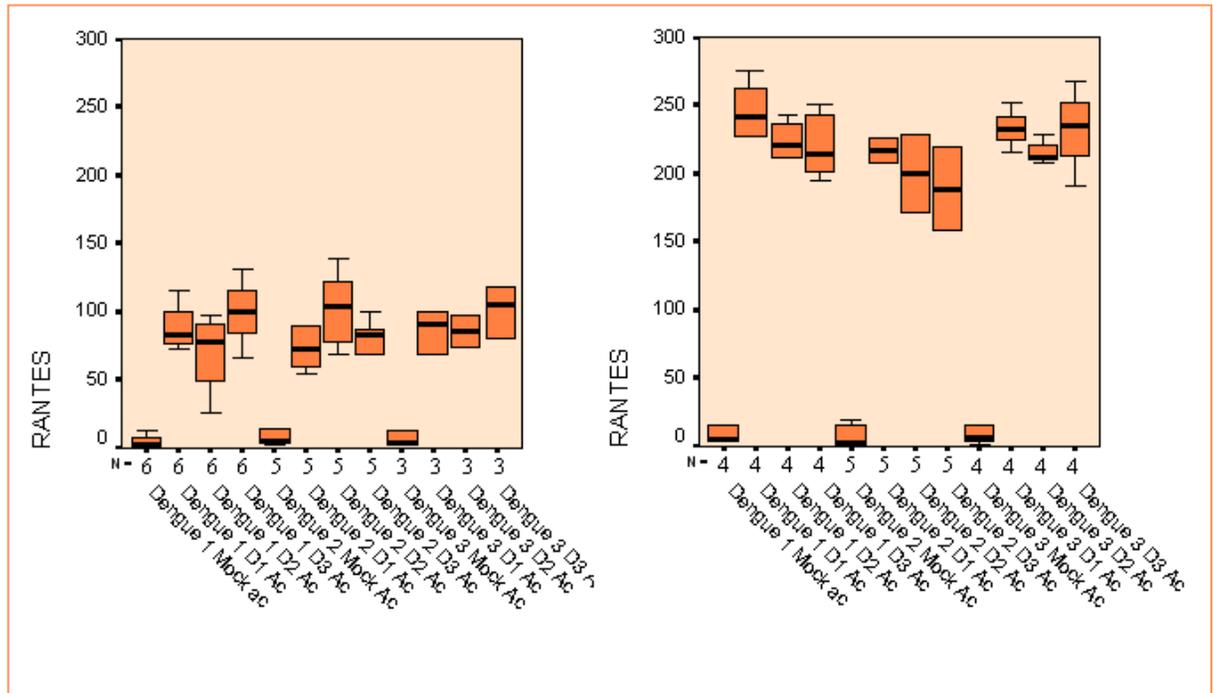


Figura 7 a. Expresión de RANTES en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con virus dengue.

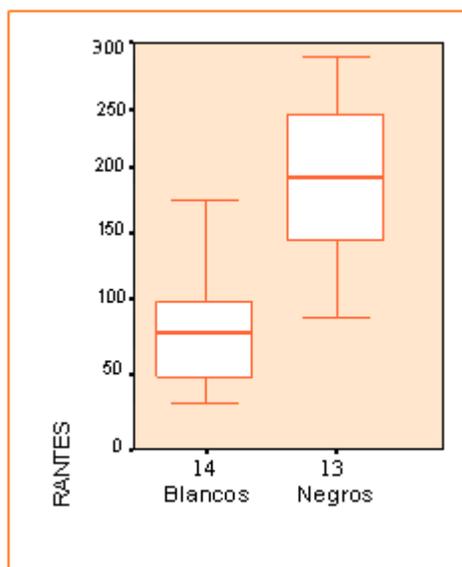


Figura 7 b. Expresión de RANTES en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación heterotípica con virus dengue.

Leyenda: Se muestra en la figura 4.

Figura 8. Expresión de IFN γ .

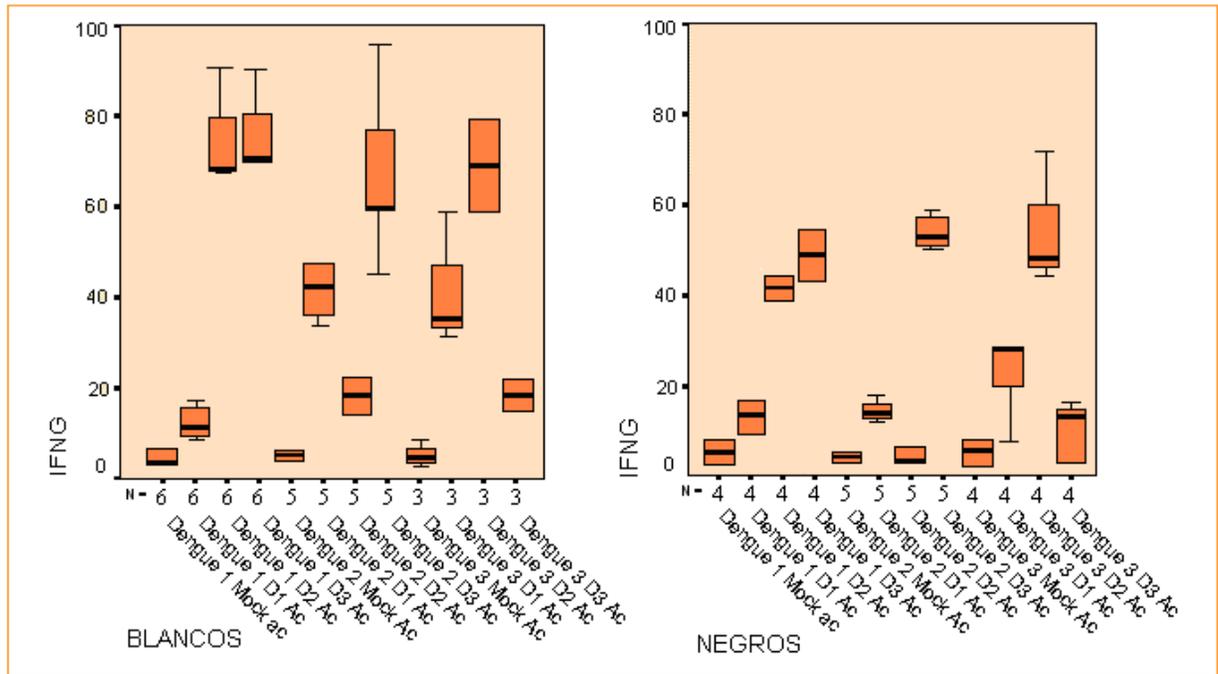


Figura 8 a. Expresión de IFN γ en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con virus dengue.

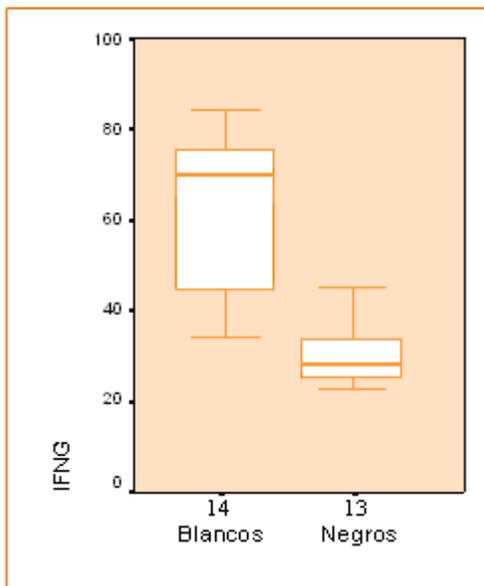


Figura 8 b. Expresión de IFN γ en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación heterotípica con virus dengue.

Legenda: Se muestra en la figura 5.

Figura 9. Expresión de TNF α .

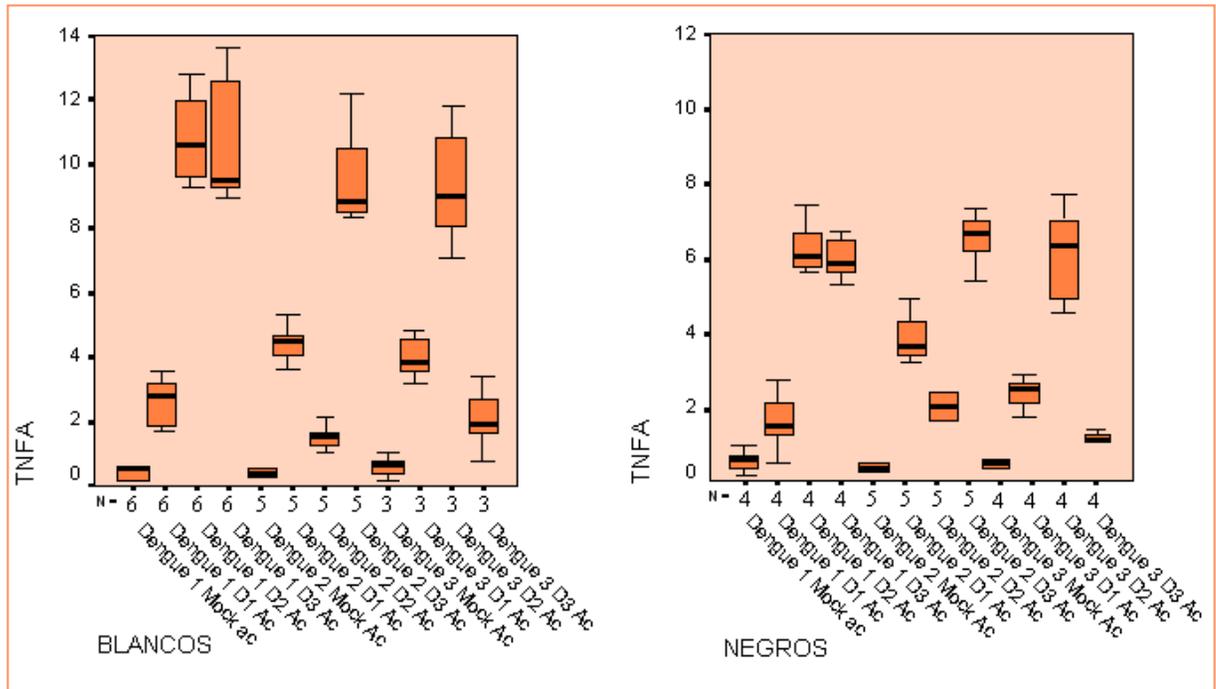


Figura 9 a. Expresión de TNF α en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con virus dengue.

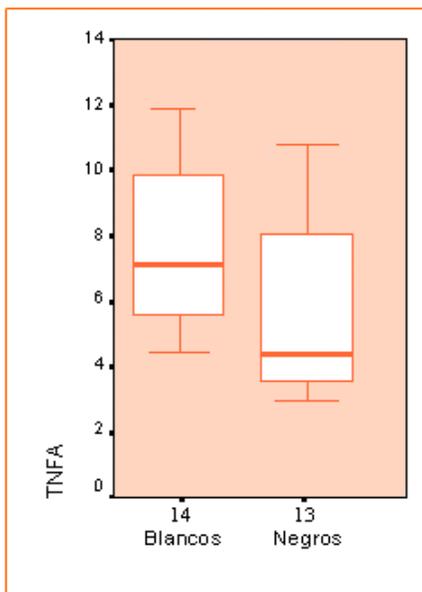


Figura 9 b. Expresión de TNF α en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación heterotípica con virus dengue.

Leyenda: Se muestra en figura 4.

Figura 10. Expresión de TGF β .

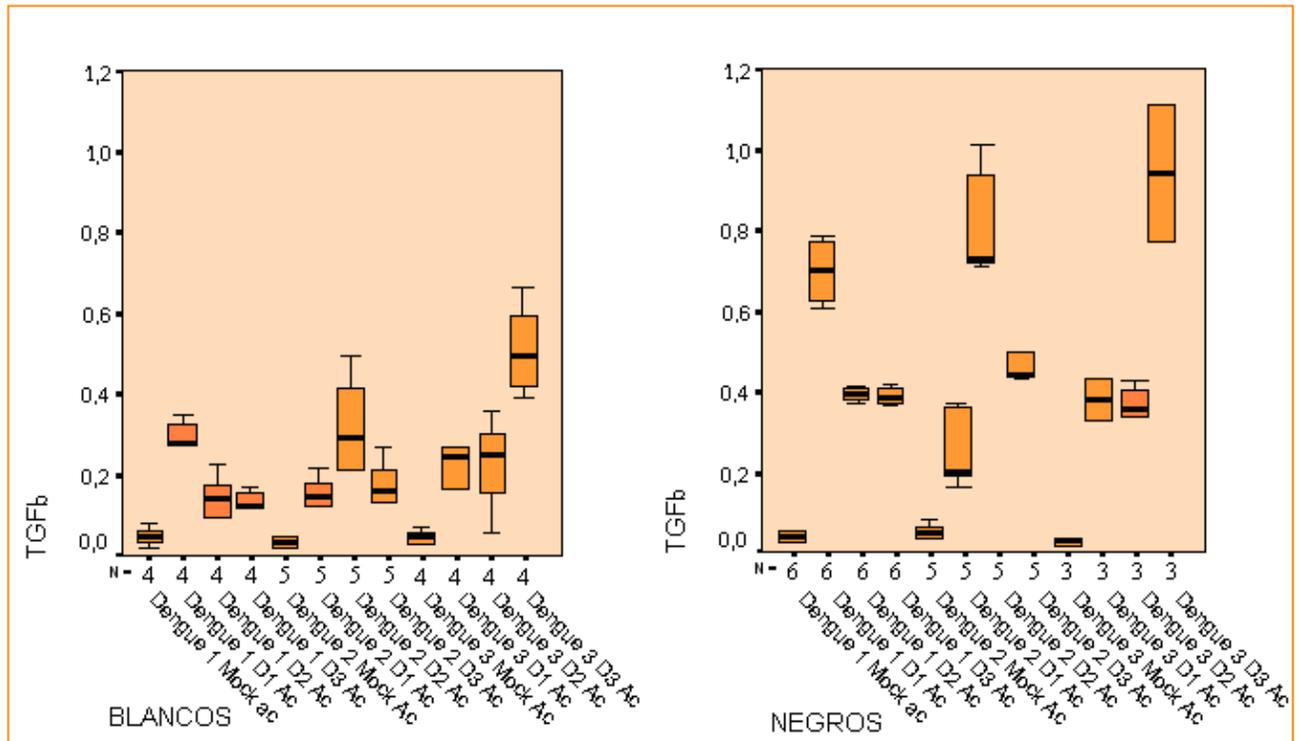


Figura 10 a. Expresión de TGF β en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con virus dengue.

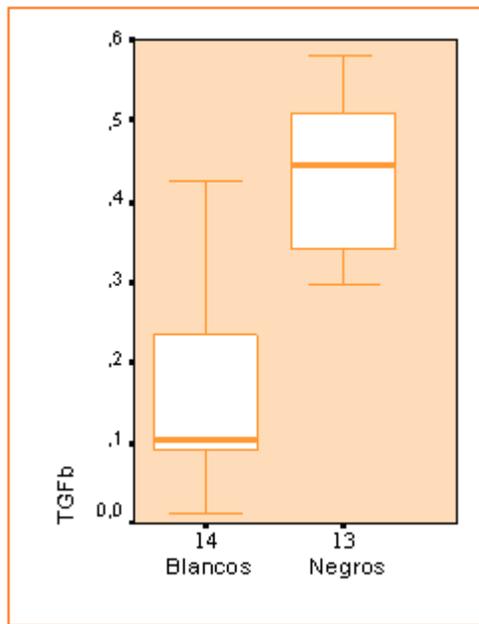


Figura 10 b. Expresión de TGF β en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación heterotípica con virus dengue.

Leyenda: Se muestra en figura 4.

Figura 11. Expresión de IL-10.

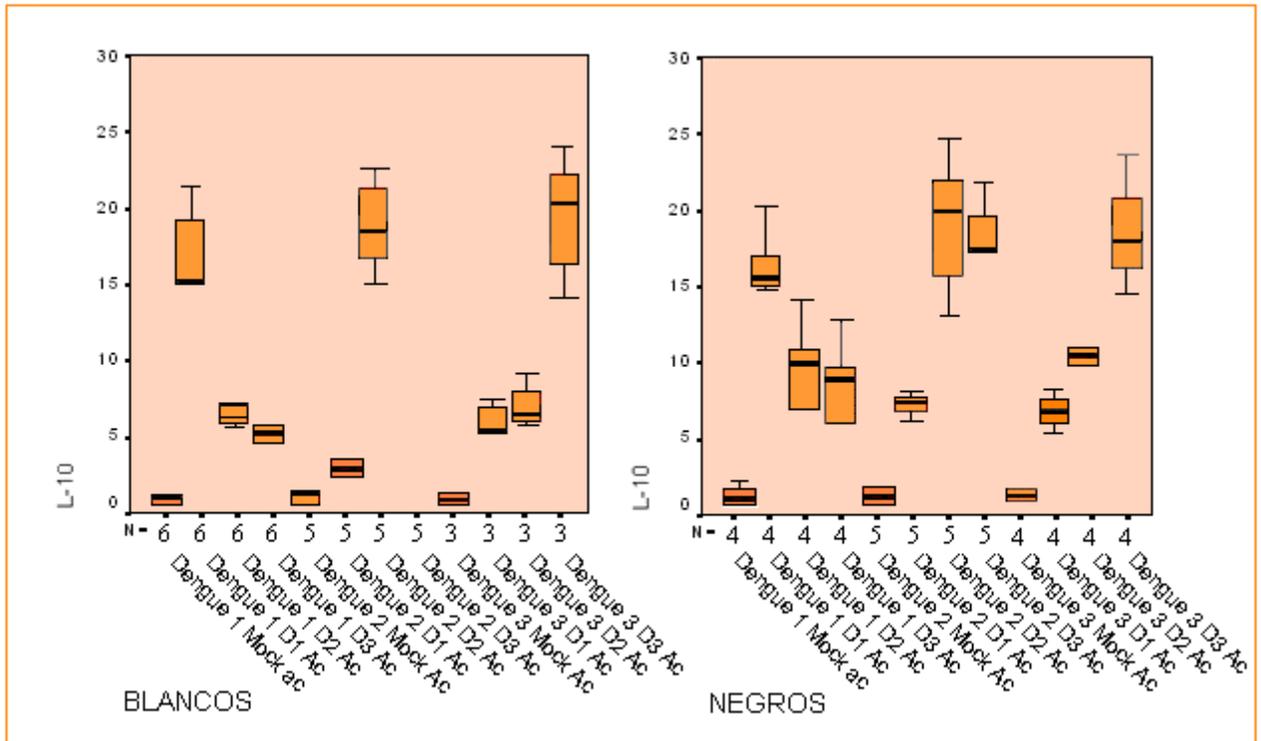


Figura 11 a. Expresión de IL-10 en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con virus dengue.

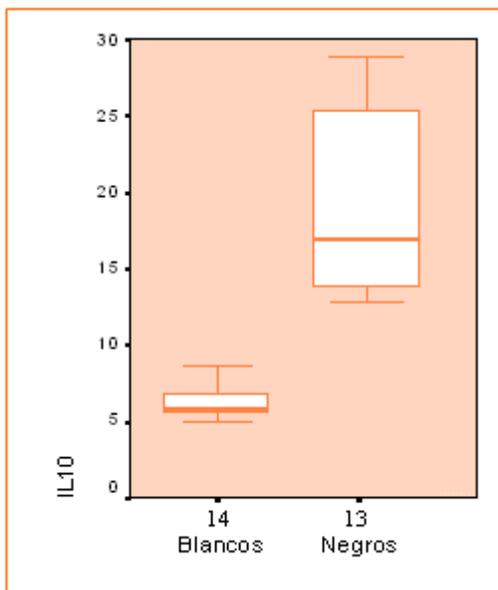


Figura 11 b. Expresión de IL-10 en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación heterotípica con virus dengue.

Leyenda: Se muestra en figura 4.

Figura 12. Expresión de FoxP3.

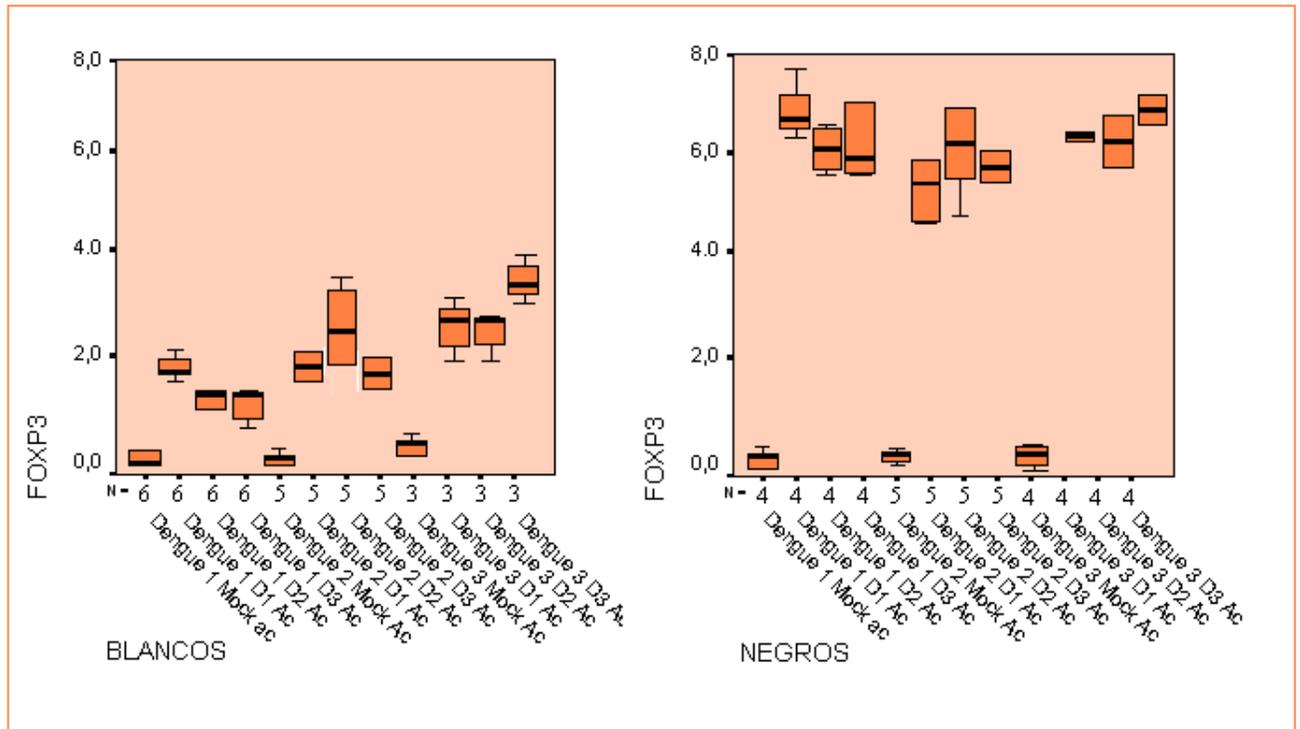


Figura 12 a.. Expresión de FoxP3 en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con virus dengue.

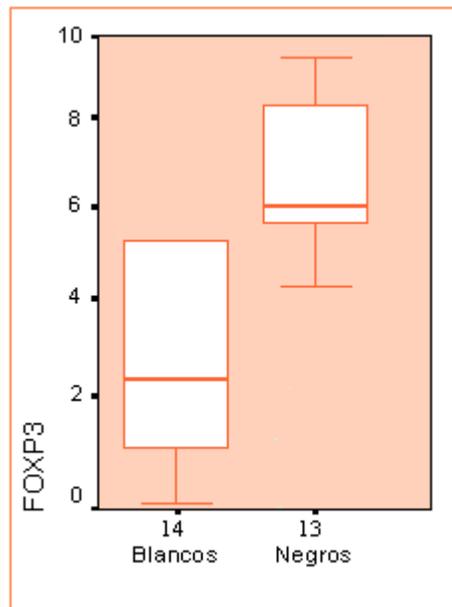


Figura 12 b. Expresión de FoxP3 en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación heterotípica con virus dengue.

Leyenda: Se muestra en figura 4.

Figura 14. Expresión de Granzima B.

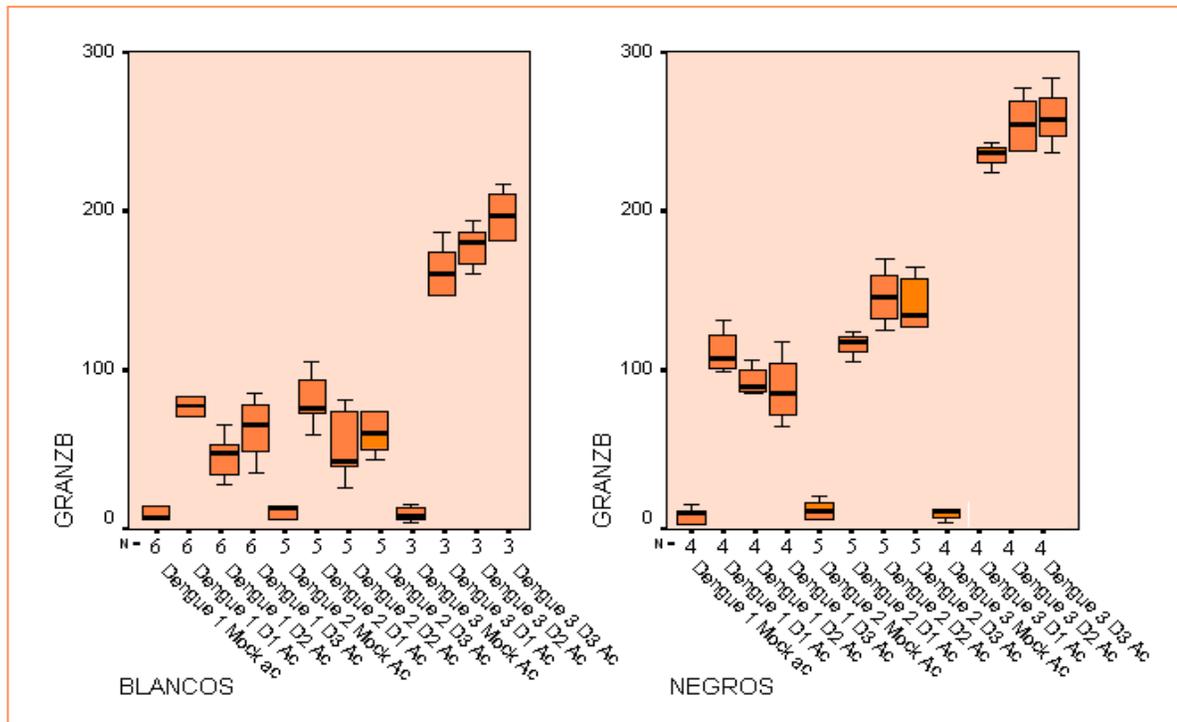


Figura 14 a. Expresión de Granzima B en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con virus dengue.

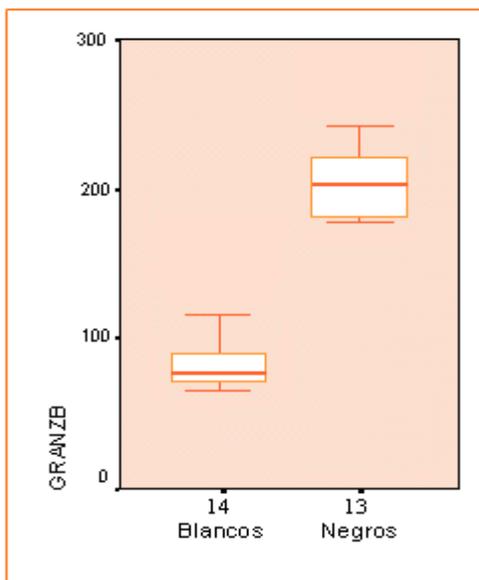


Figura 14 b. Expresión de Granzima B en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación heterotípica con virus dengue.

Leyenda: Se muestra en figura 4.

Figura 15. Expresión de Fas Ligando

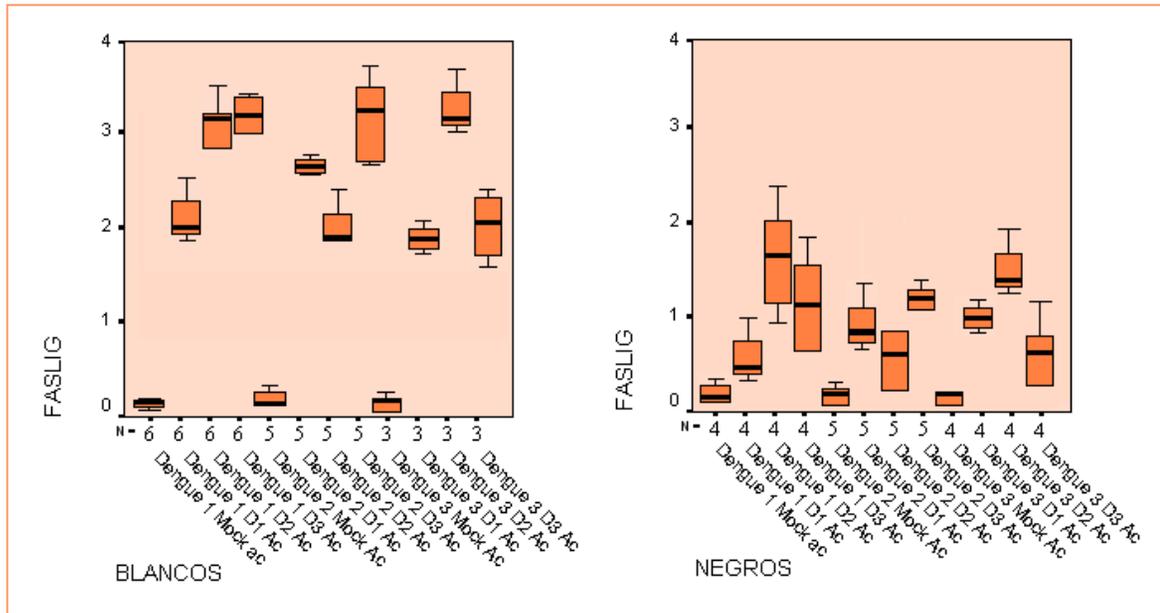


Figura 15 a. Expresión de Fas Ligando en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación homotípica y heterotípica con virus dengue.

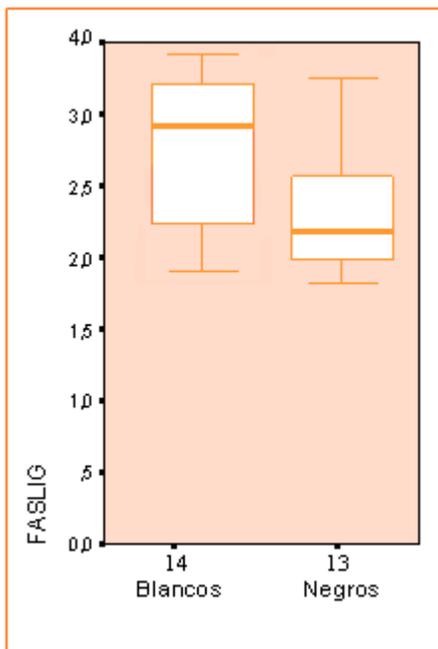


Figura 16 b. Expresión de Fas Ligando en individuos blancos y negros en respuesta a la estimulación heterotípica con virus dengue.

Leyenda: Se muestra en figura 4.

Figura 17. Censo poblacional 2001 Cuba. Resultados de color de la piel por provincia.

	Blancos		Negros		Mulatos		Total
Pinar del Rio	569 340	78.40%	84 529	11.60%	72 705	10%	726 574
La Habana	566 050	79.60%	57 798	8.10%	87 224	12.30%	711 066
C. Habana	1 302 068	59.14%	343 601	15.60%	555 941	25.30%	2 201 610
Matanzas	498 552	74.40%	74 877	11.20%	96 998	14.50%	670 427
Villa Clara	681 638	83.40%	47 500	5.80%	88 257	10.70%	817 395
Cienfuegos	300 983	76.20%	31 530	8.00%	62 670	15.90%	395 183
S. Spiritus	389 816	84.70%	24 745	5.40%	45 767	10%	460 328
C. de Avila	325 217	79%	31 014	7.50%	55 535	13.50%	411 766
Camaguey	593 664	75.70%	69 917	9%	120 597	15.40%	784 178
Las Tunas	394 192	75%	26 985	5.10%	104 308	20%	525 485
Holguin	823 061	80.60%	43 699	4.30%	154 561	15.10%	1 021 321
Granma	351 629	42.80%	31 396	3.80%	439 427	53.40%	822 452
S. de Cuba	296 900	28.70%	177 415	17.10%	561 966	54.20%	1 036 281
Guantanamo	125 608	24.80%	73 473	14.50%	308 037	60.70%	507 118
Isla de La juventud	53 208	61.50%	8 421	10%	24 930	28.80%	86 559
Total	7 271 926	65%	1 126 894	10.08%	2 778 923	24.86%	11 177 743

VIII. 2 Tablas

Tabla 1. Medias de la carga viral en unidades formadoras de placas (pfu) en sobrenadante de CMSP de individuos no inmunes a dengue, inmunes a dengue 1, inmunes a dengue 2, e inmunes a dengue 3, infectadas ex vivo.

pfu (unidades formadoras de placa)	Dengue1	Dengue2	Dengue3
Dengue no inmunes	67,0200	933,400	158,800
D1 inmunes	18,340	3301,00	214,300
D2 Inmunes	64,000	543,400	789,000
D3 Inmunes	40,7900	215,00	24,000

Tabla 2. Medias y desviaciones estándar de la expresión IFN γ y MIP-1 α en CMSP de individuos no inmunes a dengue.

	IFN γ	MIP-1 α
Mock	17,17 \pm 2,08	21,46 \pm 1,89
UVD1a	13,24 \pm 3,45	18,59 \pm 2,67
D1d	96,33 \pm 91,08*§	152,17 \pm 59,55*§
UVD2b	20,23 \pm 5,44	14,98 \pm 3,78
D2e	112,88 \pm 49,37*§	104,85 \pm 98,95*§
UVD3c	19,18 \pm 4,56	17,21 \pm 2,33
D3f	126,37 \pm 4,43*§	160,3 \pm 70,33*§

Leyenda: Mock: sobrenadante no infectivo de células C636, UVD: Sobrenadante infectivo inactivado con luz ultravioleta. D: Sobrenadante infectivo de células C636. *: Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) del sobrenadante infectivo respecto al Mock. §: Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) del sobrenadante infectivo en relación con el virus inactivado.

Tabla 3: Frecuencias génicas de los alotipos del sistema HLA clase I (A, B, C), y HLA clase II (DRB1, y DQB1) en individuos cubanos con historia de enfermedad por Dengue

Alelos	FG(%) (n=120)	HLA	FG(%) (n=120)	HLA	FG(%) (n=120)	HLA	FG(%) (n=85)	HLA	FG(%) (n=77)
A*02	23,7	B*35	7,5	CW*04	1,8	DRB1*07	9,4	DQB1*02	16,9
A*24	8,7	B*44	10,4	CW*07	1,8	DRB1*04	5,9	DQB1*05	10,4
A*68	7,1	B*07	5,8	CW*03	1,3	DRB1*01	5,9	DQB1*03	27,9
A*03	5,8	B*53	5,4	CW*06	1,1	DRB1*03	15,3	DQB1*06	27,9
A*23	4,2	B*14	3,3	CW*08	4,6	DRB1*11	18,2	DQB1*04	3,9
A*29	7,5	B*58	2,1	CW*17	5,0	DRB1*13	9,4	DQB1*25	0,64
A*30	10,0	B*40	4,6	CW*02	3,7	DRB1*15	8,2		
A*01	3,7	B*51	2,9	CW*16	8,7	DRB1*08	7,6		
A*33	3,3	B*08	2,5	CW*12	4,6	DRB1*09	3,7		
A*26	1,2	B*15	17,5	CW*05	2,9	DRB1*14	1,2		
A*74	4,2	B*18	3,7	CW*14	4,6	DRB1*16	0,6		
A*32	2,1	B*49	3,7	CW*15	1,7	DRB1*10	4,1		
A*11	0,4	B*42	3,7	CW*01	3,3	DRB1*12	0,6		
A*66	1,2	B*57	3,3	CW*18	0,8				
A*34	1,7	B*38	2,1						
A*36	2,5	B*45	2,9						
A*31	7,5	B*50	5,4						
A*25	1,7	B*39	3,3						
A*80	1,7	B*41	1,2						
		B*78	0,4						
		B*13	1,2						
		B*27	0,4						
		B*37	0,8						
		B*52	1,2						
		B*46	3,3						
		B*47	3,3						
		B*55	1,2						
		B*81	1,2						
		B*58	2,1						

Leyenda: FG: Frecuencia génica

Tabla 4: Frecuencias génicas de los alotipos del sistema HLA clase I (A, B, C), y clase II (DRB1) en individuos cubanos no emparentados, y geográfica y étnicamente pareados (n=189)

Alelos	FG(%)	HLA	FG(%)	HLA	FG(%)	HLA	FG(%)
A*02	18,1	B*35	9,8	CW*04	17,3	DRB1*07	19,7
A*24	9,2	B*44	9,7	CW*07	15,5	DRB1*04	14,2
A*68	8,6	B*07	8,9	CW*03	13,1	DRB1*01	13,8
A*03	8,0	B*53	7,5	CW*06	6,7	DRB1*03	9,9
A*23	7,6	B*14	5,8	CW*08	5,9	DRB1*11	8,8
A*29	7,2	B*58	5,4	CW*17	5,9	DRB1*13	7,0
A*30	7,0	B*40	5,3	CW*02	5,5	DRB1*15	6,4
A*01	6,7	B*51	4,7	CW*16	5,1	DRB1*08	4,2
A*33	5,4	B*08	4,6	CW*12	4,8	DRB1*09	3,2
A*26	3,1	B*15	4,4	CW*05	4,3	DRB1*14	3,0
A*74	3,1	B*18	4,3	CW*15	3,5	DRB1*16	2,1
A*32	2,7	B*49	4,0	CW*01	1,1	DRB1*10	1,2
A*11	2,7	B*42	4,0	CW*14	3,4		
A*66	2,7	B*57	2,7				
A*34	0,8	B*38	2,7				
A*36	1,5	B*45	2,3				
A*31	1,1	B*50	2,3				
A*25	0,4	B*39	1,8				
A*80	0,4	B*41	1,8				
		B*78	1,6				
		B*13	1,5				
		B*27	1,4				
		B*37	1,1				
		B*52	0,8				
		B*22	0,4				

Leyenda: FG: Frecuencia génica

Tabla 5: Análisis Estadístico de la comparación de las frecuencias alélicas del sistema HLA A, B, C, y DRB1 en individuos con infección clínica de Dengue vs. Individuos controles.

ASOCIACIÓN	X ²	P	Pc	OR (CI 95 %)
A*31 en FHD vs Controles	25.62	0.000001	0.000004	13.39 (3.63–53.75)
A*31 en FD + FHD vs Controles	16.17	0.00005	0.0002	7.60 (2.30–27.70)
B*15 en FD vs controles	14.37	0.0001	0.0004	4.77 (1.88–12.21)
B*15 en FHD vs Controles	9.65	0.001	0.004	4.07 (1.46–11.36)
B*15 en FD + FHD vs Controles	16.28	0.00005	0.0002	4.46 (1.96–10.29)
DRB1*07 en FD vs controles	10.34	0.001	0.004	0.24 (0.08–0.63)
DRB1*07 en FHD vs Controles	7.46	0.006	0.02	0.27 (0.09–0.77)
DRB1*07 en FD + FHD vs Controles	14.35	0.0001	0.0004	0.25 (0.11–0.55)

Leyenda:

X²: prueba de independencia Chi cuadrado de Mantel-Haenszel, P: Valor de la P derivada de la prueba de Chi cuadrado, Pc: Valor de la P corregida derivada de la prueba de disparidad de Bonferroni, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza; FD: fiebre dengue, FHD: fiebre hemorrágica por dengue.

Tabla 6 Análisis Estadísticos de la asociación de HLA A, B y C, y HLA DRB1 en individuos con infección primaria y secundaria por dengue vs. controles.

ASOCIACIÓN	X ²	P	Pc	OR (CI 95 %)
B*15 casos secundarios (FD + FHD) vs. controles	13.50	0,0002	0,002	4.45 (1.79 - 11.18)
DRB1*07 casos secundarios (FD+FHD) vs. controles	10.87	0,0009	0,009	0.24(0.09 - 0.62)
DRB1*04 casos secundarios (FD +FHD) vs. controles	9.70	0,001	0,01	0.19(0.05 - 0.63)
A*31 casos primarios (FD +FHD) vs. controles.	5.80	0,016	NS	2.98(1.20 - 7.75)

Leyenda:

X²: prueba de independencia Chi cuadrado de Mantel-Haenszel, P: Valor de la P derivada de la prueba de Chi cuadrado, Pc: Valor de la P corregida derivada de la prueba de disparidad de Bonferroni, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza; FD: fiebre dengue, FHD: fiebre hemorrágica por dengue. NS: no significativa

Tabla 7: Medidas de impacto potencial de los alelos asociados significativamente a la susceptibilidad a la enfermedad por dengue.

ASOCIACIÓN	RA	RAE%	RAP%	
A*31 casos vs A*31 controles	0,41	52%	2,63%	
B*15 casos vs B*15 controles	0,32	47%	74%	

Leyenda:

RA: Riesgo atribuible, RAE: Riesgo atribuible de expuestos porcentual

RAP: Riesgo atribuible poblacional porcentual

Tabla 8: Frecuencias génicas de los alelos del sistema HLA A, B, C, DRB1, y DQB1 en pacientes con Fiebre Dengue.

alelos	FG(%) (n=73)	HLA	FG(%) (n=73)	HLA	FG(%) (n=73)	HLA	FG(%) (n=52)	HLA	FG(%) (n=48)
A*02	2,23	B*35	6,84	CW*04	19,8	DRB1*07	11,7	DQB1*02	14,8
A*24	6,16	B*44	8,9	CW*07	18,49	DRB1*04	3,92	DQB1*05	9,57
A*68	7,53	B*07	4,1	CW*03	15	DRB1*01	5,88	DQB1*03	27,6
A*03	6,16	B*33	6,84	CW*06	10,9	DRB1*03	15,6	DQB1*06	28,7
A*23	5,47	B*14	4,1	CW*08	4,79	DRB1*11	18,6	DQB1*04	3,19
A*29	9,58	B*38	1,36	CW*17	4,79	DRB1*13	7,8	DQB1*25	1,06
A*30	7,53	B*40	6,16	CW*02	4,10	DRB1*15	7,8		
A*01	3,42	B*51	2,73	CW*16	5,47	DRB1*08	4,90		
A*33	2,73	B*08	2,73	CW*12	3,42	DRB1*09	7,8		
A*26	1,36	B*15	1,78	CW*05	2,73	DRB1*14	0		
A*74	6,16	B*18	4,10	CW*14	4,79	DRB1*16	0		
A*32	2,73	B*49	4,10	CW*15	0,68	DRB1*10	0		
A*11	0,68	B*42	4,79	CW*01	4,10	DRB1*12	0		
A*66	0,68	B*57	4,10	CW*18	0				
A*34	2,05	B*38	2,05						
A*36	0,68	B*45	2,05						
A*31	8,90	B*50	6,16						
A*25	1,36	B*39	2,73						
A*80	1,36	B*41	0,68						
		B*78	0,68						
		B*13	0,68						
		B*27	0,68						
		B*37	0,68						
		B*52	0,68						
		B*46	0,68						
		B*47	1,36						
		B*55	1,36						
		B*81	0,68						
		B*38	1,36						

Leyenda:

FG: Frecuencia génica

Tabla 9: Frecuencias génicas de los alelos del sistema HLA A, B, C, DRB1, y DQB1 en pacientes con Fiebre Hemorrágica por Dengue.

Alelos	FG(%) (n=47)	HLA	FG(%) (n=47)	HLA	FG(%) (n=47)	HLA	FG(%) (n=33)	HLA	FG(%) (n=29)
A*02	27,1	B*35	8,69	CW*04	16,3	DRB1*07	7,57	DQB1*02	18,9
A*24	10,8	B*44	0,13	CW*07	15,21	DRB1*04	9,09	DQB1*05	13,79
A*68	6,52	B*07	8,69	CW*03	10,86	DRB1*01	6,06	DQB1*03	31
A*03	5,43	B*53	3,26	CW*06	9,78	DRB1*03	9,66	DQB1*06	24,1
A*23	2,17	B*14	2,17	CW*08	4,34	DRB1*11	18,18	DQB1*04	5,17
A*29	4,34	B*58	3,26	CW*17	4,34	DRB1*13	0,12	DQB1*25	0
A*30	13	B*40	2,17	CW*02	2,17	DRB1*15	9,09		
A*01	4,34	B*51	3,26	CW*16	14,1	DRB1*08	9,09		
A*33	4,34	B*08	2,17	CW*12	6,52	DRB1*09	1,51		
A*26	1,08	B*15	16,3	CW*05	3,26	DRB1*14	0		
A*74	1,08	B*18	3,26	CW*14	2,17	DRB1*16	1,51		
A*32	1,08	B*49	3,26	CW*15	3,26	DRB1*10	4,54		
A*11	0	B*42	2,17	CW*01	2,17	DRB1*12	1,51		
A*66	2,17	B*57	2,17	CW*18	2,17				
A*34	1,08	B*38	2,17						
A*36	5,43	B*45	4,34						
A*31	4,34	B*50	4,34						
A*25	2,17	B*39	4,34						
A*80	2,17	B*41	2,17						
		B*78	0						
		B*13	2,17						
		B*27	0						
		B*37	1,08						
		B*52	1,08						
		B*46	1,08						
		B*47	0						
		B*55	1,08						
		B*81	2,17						
		B*58	3,26						

Leyenda: FG: Frecuencia génica

Tabla 10: Análisis Estadístico de la comparación de las frecuencias alélicas del sistema HLA A, B, C, y DRB1 en individuos con diferentes formas clínicas de infección por Dengue.

ASOCIACIÓN	X ²	P	P _c	OR (CI 95 %)
A*74 en FD vs FHD	4,25	0,03	NS	1,41 (2,05-2,73)
A*36 en FD vs FHD	5,18	0,02	0,03	0,12 (0,01-0,22)
CW*16 en FD vs FHD	5,25	0,02	0,03	0,35 (0,04-0,65)
CW*18 en FD vs FHD	3,08	0,04	NS	0,36 (0,04-0,52)

Leyenda: X²: prueba de Chi cuadrado de Pearson, P: valor de la P derivada de la prueba de chi cuadrado, P_c: valor de la P corregida derivada de la prueba de Yates, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, FD: fiebre dengue, FHD: fiebre hemorrágica por dengue. NS: no significativa.

Tabla 11: Frecuencias génicas de los alotipos del sistema HLA clase I (A, B, C), y HLA clase II (DRB1, y DQB1) en individuos cubanos con historia de enfermedad por Dengue, de color de piel blanco

Alebs	FG(%) (n=70)	HLA	FG(%) (n=70)	HLA	FG(%) (n=70)	HLA	FG(%) (n=52)	HLA	FG(%) (n=47)
A*02	29,2	B*35	6,42	CW*04	17,8	DRB1*07	9,61	DQB1*02	15,95
A*24	10	B*44	15	CW*07	15	DRB1*04	5,76	DQB1*05	9,57
A*68	5,71	B*07	4,28	CW*03	12,8	DRB1*01	5,76	DQB1*03	32,97
A*03	6,42	B*53	2,14	CW*06	8,57	DRB1*03	15,38	DQB1*06	24,46
A*23	3,57	B*14	5	CW*08	4,28	DRB1*11	18,26	DQB1*04	4,25
A*29	9,28	B*58	2,14	CW*17	5	DRB1*13	6,42	DQB1*25	0
A*30	7,14	B*40	5	CW*02	2,14	DRB1*15	6,42		
A*01	3,57	B*51	3,57	CW*16	8,57	DRB1*08	9,61		
A*33	3,57	B*08	0,71	CW*12	5,71	DRB1*09	7,69		
A*26	2,14	B*15	17,14	CW*05	5	DRB1*14	0,96		
A*74	1,42	B*18	5	CW*14	7,14	DRB1*16	0		
A*32	2,14	B*49	2,85	CW*15	2,14	DRB1*10	2,88		
A*11	0,71	B*42	2,85	CW*01	3,57	DRB1*12	0		
A*66	1,42	B*57	3,57	CW*18	0				
A*34	0	B*38	2,85						
A*36	0	B*45	1,42						
A*31	6,49	B*50	6,42						
A*25	2,14	B*39	2,14						
A*80	2,14	B*41	1,42						
		B*78	0,71						
		B*13	0,71						
		B*27	0						
		B*37	1,42						
		B*52	0						
		B*46	1,42						
		B*47	1,42						
		B*55	1,42						
		B*81	0						
		B*58	2,14						

Leyenda:

FG: Frecuencia génica

Tabla 12: Frecuencias génicas de los alotipos del sistema HLA clase I (A, B, C), y HLA clase II (DRB1, y DQB1) en individuos cubanos con historia de enfermedad por Dengue, de color de piel negro

Alelos	FG(%) (n=32)	alelos	FG(%) (n=32)	alelos	FG(%) (n=32)	alelos	FG(%) (n=24)	alelos	FG(%) (n=20)
A*02	15,6	B*35	9,37	CW*04	17,18	DRB1*07	6,25	DQB1*02	12,5
A*24	3,12	B*44	3,12	CW*07	21,87	DRB1*04	8,33	DQB1*05	15
A*68	6,25	B*07	9,37	CW*03	10,93	DRB1*01	6,25	DQB1*03	25
A*03	4,68	B*53	9,37	CW*06	15,62	DRB1*03	16,6	DQB1*06	37,5
A*23	6,25	B*14	0	CW*08	6,25	DRB1*11	20,8	DQB1*04	2,5
A*29	4,68	B*58	3,12	CW*17	4,68	DRB1*13	12,5	DQB1*25	2,5
A*30	18,75	B*40	0	CW*02	4,68	DRB1*15	8,33		
A*01	3,12	B*51	1,56	CW*16	9,37	DRB1*08	4,16		
A*33	4,68	B*08	4,68	CW*12	4,68	DRB1*09	0		
A*26	0	B*15	14	CW*05	0	DRB1*14	0		
A*74	6,25	B*18	1,56	CW*14	1,56	DRB1*16	2,08		
A*32	1,56	B*49	6,25	CW*15	1,56	DRB1*10	8,33		
A*11	0	B*42	4,68	CW*01	1,56	DRB1*12	2,08		
A*66	1,56	B*57	3,12	CW*18	3,12				
A*34	3,12	B*38	1,56						
A*36	7,81	B*45	7,81						
A*31	6,25	B*50	1,56						
A*25	1,56	B*39	4,68						
A*80	0	B*41	1,56						
		B*78	0						
		B*13	3,12						
		B*27	1,56						
		B*37	0						
		B*52	3,12						
		B*46	0						
		B*47	0						
		B*55	1,56						
		B*81	4,68						
		B*58	3,12						

Leyenda: FG: Frecuencia génica

Tabla 13: Frecuencias génicas de los alotipos del sistema HLA clase I (A, B, C), y HLA clase II (DRB1, y DQB1) en individuos cubanos con historia de enfermedad por Dengue, de color de piel mestizo

Alelos	FG(%) (n=18)	HLA	FG(%) (n=18)	HLA	FG(%) (n=18)	HLA	FG(%) (n=9)	HLA	FG(%) (n=10)
A*02	16,6	B*35	8,33	CW*04	19,4	DRB1*07	16,6	DQB1*02	30
A*24	13,8	B*44	5,55	CW*07	22,2	DRB1*04	0	DQB1*05	5
A*68	13,8	B*07	5,55	CW*03	16,6	DRB1*01	5,55	DQB1*03	10
A*03	5,55	B*53	11,1	CW*06	11,1	DRB1*03	11,1	DQB1*06	25
A*23	2,77	B*14	2,77	CW*08	2,77	DRB1*11	11,1	DQB1*04	5
A*29	5,55	B*58	0	CW*17	5,55	DRB1*13	5,55	DQB1*25	0
A*30	5,55	B*40	11,1	CW*02	8,33	DRB1*15	5,55		
A*01	5,55	B*51	2,77	CW*16	8,33	DRB1*08	5,55		
A*33	0	B*08	5,55	CW*12	0	DRB1*09	5,55		
A*26	0	B*15	11,1	CW*05	0	DRB1*14	5,55		
A*74	8,33	B*18	2,77	CW*14	0	DRB1*16	0		
A*32	0	B*49	2,77	CW*15	0	DRB1*10	0		
A*11	0	B*42	5,55	CW*01	5,55	DRB1*12	0		
A*66	0	B*57	2,77	CW*18	0				
A*34	5,55	B*38	0						
A*36	2,77	B*45	0						
A*31	11,1	B*50	8,33						
A*25	0	B*39	5,55						
A*80	2,77	B*41	0						
		B*78	0						
		B*13	0						
		B*27	0						
		B*37	0						
		B*52	2,77						
		B*46	0						
		B*47	0						
		B*55	0						
		B*81	0						
		B*58	0						

Leyenda:

FG: Frecuencia génica

Tabla 14: Magnitud de riesgo condicionado por el color de piel Blanco, de desarrollar infección clínica por dengue, de acuerdo en las frecuencias génicas de los alotipos del sistema HLA clase I (A,B,C).

ASOCIACIÓN	X ²	P	P _c	OR (IC 95 %)
A*02 en Blancos vs NoBlancos	5,69	0,017	0,029	2,17 (2,24-5,36)
B*44 en Blancos vs NoBlancos	7,56	0,006	0,007	4,23 (1,68-5,14)
CW*14 en Blancos vs NoBlancos	5,05	0,024	0,031	7,6 (2,87 - 10,02)
B*53 en Blancos vs NoBlancos	2,14	0,008	0,008	0,19 (0.05 - 0.63)
B*08 en Blancos vs NoBlancos	0,71	0,036	0,041	0,14 (0.07 - 0.52)

Leyenda: X²: prueba de Chi cuadrado de Pearson, P: valor de la P derivada de la prueba de chi cuadrado, P_c: valor de la P corregida derivada de la prueba de Yates, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza .

Tabla 15: Magnitud de riesgo condicionado por el color de piel Blanco, de desarrollar FHD por dengue, de acuerdo en las frecuencias génicas de los alotipos del sistema HLA clase I y clase II

ASOCIACIÓN	X ²	P	P _c	OR (CI 95 %)
DQB1*06 en Blancos vs NoBlancos	10,60	0,0006	0,0011	0,11 (0,18-0,25)
A*02 en Blancos vs NoBlancos	6,03	0,0141	0,0266	3,72 (2,14-5,16)

Leyenda: X²: prueba de Chi cuadrado de Pearson, P: valor de la P derivada de la prueba de chi cuadrado, P_c: valor de la P corregida derivada de la prueba de Yates, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Tabla 16. Distribución de casos de FHD y FD de acuerdo al método racial de clasificación en 120 individuos que sufrieron enfermedad por dengue durante la epidemia de dengue 2 ocurrida en Santiago de Cuba en 1997.

Cuadro Clínico	Método de clasificación racial									
	Observación color de la piel N (%)				Medición antropométrica N (%)					
	Blancos	Negros	Mestizos	Total	E	M-E	M	M-M	M-N	N
FHD	34(72)	8 (17)	5 (11)	47	13 (30)	11 (23)	22 (46)	0	1 (2)	0
FD	36(49)	24(32)	13 (19)	73	8 (11)	10 (14)	42 (57)	1(2)	12 (16)	0
Total	70	32	18	120	21	21	64	1	13	0

Leyenda: FD: fiebre por dengue, FHD: fiebre hemorrágica por dengue, E: europeoide, ME: mestizo con predominio de rasgos europeoide, M: mestizos sin predominio de ningún grupo étnico, MM: mestizo con predominio de rasgos mongoloides, MN: mestizo con predominio de rasgos negroides, N: negroides. No: número de individuos, %: porcentaje de individuos.

VIII.3 Consentimiento Informado

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; por este motivo la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera ésta entidad dentro de las enfermedades emergentes o re-emergentes a las cuales brinda especial atención. Se estima que al menos 50 millones de personas sufren la infección, 2,5 billones viven en áreas de riesgo, aproximadamente 250 mil desarrollan Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD) y 10 mil mueren anualmente a consecuencia de la infección viral, principalmente en edades pediátricas.

El Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK) es Centro de Referencia Nacional y Regional (para Latinoamérica) para enfermedades víricas, además de ser Centro colaborador de la OMS para dichas enfermedades.

El Laboratorio de Inmunología Celular del Departamento de Virología del IPK ha estado desarrollando estudios de un gran impacto científico y social sobre la enfermedad por virus dengue, los cuales abordan la relación entre la raza, los genes de respuesta inmune y el riesgo a desarrollar las formas más severas de la enfermedad por dengue.

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

"Raza: Factor de riesgo para el desarrollo de la fiebre hemorrágica por dengue. Implicación de la respuesta inmune."

Declaro que he sido suficientemente informado del objetivo del estudio, que participo en el mismo de forma totalmente voluntaria, y que puedo abandonar el estudio en el momento en que lo estime, sin sufrir ningún perjuicio por ello.

He sido informado de los beneficios que me aporta la participación en esta investigación, y acerca de la confidencialidad de los resultados de la misma, que la muestra de sangre obtenida para el estudio no será empleada para realizar ningún otro estudio ni prueba que no sea lo estrictamente estipulado en el presente proyecto. La extracción de la sangre será realizada en el laboratorio clínico del Instituto "Pedro Kouri", por personal autorizado y con experiencia en ese menester, y cumpliendo todas las normas éticas y de bioseguridad.

De acuerdo a la valoración médica no presento ninguno de los criterios de exclusión que a continuación se nombran para la admisión en esta investigación:

Enfermedad infecciosa aguda en el momento del estudio.

Tratamiento inmunosupresivo, corticoesteroides o enfermedades del sistema hematopoyético.

Por todo lo anterior doy mi consentimiento para que se me realice la extracción de 20 ml de sangre.

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

Firma del participante

Nombre y firma del encuestador

VIII.4 Planilla de recolección de datos

Fecha de la visita: _____

ID Muestra _____

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

VIII.5 Criterios de clasificación antropométrica según grupo racial. (Manual de prácticas de antropología física, Popspisil, M.F, 1965.

Parámetros predominantes	Europeoide	Negroide	Mongoloide
Color de la piel	Clara (matiz rosa)	oscura	clara (matiz amarillo/rojizo)
Color y forma del cabello	de rubio a negro, de lacio a ondulado	Oscuro, ensortijado	Negro, lacio recto
Color de ojos	Gris, verde, azul, todas las gamas de castaño. No hay forma característica	Oscuros. No hay forma característica	Oscuros, ángulo externo mas elevado que el interno
Labios	Delgados o medianos	Gruesos, el inferior prominente	Delgados o medianamente delgados
Forma de Nariz	Estrecha , saliente, de base alta	Ancha y poco prominente	Anchura mediana, poco saliente, y de dorso bajo
Prognatismo facial	ausente	Pronunciado, a expensas del maxilar superior	Medio, entre el europeoide y negroide
Mentón	Mentón cuadrado, poco voluminoso y prominente	Mentón poco cuadrado, menos voluminoso y prominente	Mentón con frecuencia cuadrado, más voluminoso y menos prominente que en el blanco
Prominencia de los pómulos	Poco saliente	Poco prominente	Ausente
Forma del pliegue del párpado superior	No presenta epicanto	No presenta epicanto	Presenta epicanto
Volumen craneal	volumen craneal ligeramente mayor	volumen craneal ligeramente menor	volumen craneal ligeramente menor
Desarrollo del vello corporal	Desarrollado, varia de mediano a espeso	Menos desarrollado	Casi ausente en el cuerpo, escaso en la barba y el bigote
Curvatura del sacro	curvatura lumbar moderada; sin esteatopigia	curvatura lumbar marcada; marcada esteatopigia	curvatura lumbar moderada; sin esteatopigia
Tronco	Torax menos profundo y largo que en negroides. Mayor anchura de los hombros que la pelvis.	Torax profundo y corto Mayor anchura de los hombros que la pelvis. Musculos bien definidos.	Torax menos profundo en Asiáticos y mas profundo en amerindios. Sin desproporción entre anchura de la pelvis y de los hombros
Longitud de extremidades	Medianamente largas, musculos menos desarrollados que en negroides	Muy largas, con musculos desarrollados	Menos largas, músculos de la pierna más delgados que en el blanco y el negro
Talla	Talla elevada	Talla media entre europeoide y negroide	Baja talla