

*Instituto de Medicina Tropical
“Pedro Kourí”*



*Cinética y capacidad neutralizante de los anticuerpos
homólogos y heterólogos contra serotipos de virus dengue
en relación con el intervalo entre las infecciones, la
secuencia de infección, duración de la viremia y la
amplificación dependiente de anticuerpos en infecciones
primarias y secundarias*

*Tesis en opción al Grado Científico de Doctor
en Ciencias de la Salud*

*Autor: Prof. Mayling Alvarez Vera, M.Sc.
Tutora: Prof. María G. Guzmán, Dr.Cs.*

*Ciudad de La Habana
2008*

SINTESIS

Para sustentar el papel de la infección secundaria en la etiopatogenia del Dengue y Dengue Hemorrágico en epidemias por Dengue 2 y 3 y la influencia de la secuencia de infección e intervalo de tiempo sobre la sensibilización, evaluamos la presencia de anticuerpos específicos contra serotipos, la cinética de anticuerpos neutralizantes en sueros inmunes a Dengue 1 colectados 4 y 20 años después de la primoinfección, la amplificación dependiente de anticuerpos después de 20 años, la capacidad neutralizante de sueros contra 7 cepas de Dengue 3 y la cinética de anticuerpos neutralizantes en relación con la viremia en infectados con virus dengue 3. Se confirma que la infección secundaria fue el factor de riesgo más importante en las epidemias de 1997 y 2001-2002 después de 20-24 años de la primoinfección, donde los serotipos en las secuencias de infección fueron importantes. Los anticuerpos homotípicos a Dengue 1 se incrementaron con la infección secundaria después de 20 años de la primoinfección, sugiriendo que ganan afinidad y pierden actividad heterotípica con el tiempo, mientras los heterotípicos disminuyeron o se mantuvieron bajos. Los mayores títulos de anticuerpos neutralizantes se encontraron frente a la cepa de Dengue 3 aislada al final de la epidemia 2001-2002. La duración de la viremia en la infección primaria en la epidemia 2001-2002 fue mayor que en la secundaria, no detectándose en los primeros anticuerpos neutralizantes durante la fase aguda, mientras que en la infección secundaria los niveles se elevaron después del quinto día, coincidiendo con la caída de la viremia.

Indice

| | |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUCCION | 2 |
| 1.1. Hipótesis | 6 |
| 1.2. Objetivos | 6 |
| 1.3. Novedad científica y valor teórico | 7 |
| 1.4. Valor práctico | 8 |
| 2. REVISION BIBLIOGRAFICA | 10 |
| 2.1. Definición | 10 |
| 2.2. Situación actual del DEN y su epidemiología | 10 |
| 2.3. Situación del DEN en Cuba | 11 |
| 2.4. Características del virus | 12 |
| 2.4.1. Propiedades fisico-químicas | 13 |
| 2.4.2. Características antigénicas | 13 |
| 2.5. Organización del genoma | 14 |
| 2.6. Proteínas virales | 15 |
| 2.6.1. Proteínas estructurales | 15 |
| 2.6.2. Proteínas no estructurales | 16 |
| 2.7. Células hospederas | 18 |
| 2.8. Replicación viral | 18 |
| 2.9. Ciclo de transmisión del virus | 19 |
| 2.10. Serotipos y subtipos genéticos | 20 |
| 2.11. Diagnóstico de laboratorio | 21 |
| 2.11.1. Aislamiento e identificación viral | 22 |
| 2.11.2. Técnicas serológicas | 23 |
| 2.11.3. Detección molecular | 24 |
| 2.12. Etiopatogenia | 24 |
| 2.13. Respuesta inmune a dengue | 26 |
| 2.13.1. Papel de las citoquinas y de la inmunidad celular | 26 |
| 2.13.2. Inmunopatogenia | 31 |
| 2.13.3. Viremia, respuesta de anticuerpos y severidad de la enfermedad | 35 |
| 2.14. Características clínicas de la enfermedad | 40 |
| 2.15. Vacuna | 42 |
| 2.16. Control | 43 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 46 |
| 3.1. Aspectos Éticos en los diferentes estudios | 46 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2. Caracterización de la infección secundaria en la epidemia cubana de virus DEN-2 Cuba, 1997 | 46 |
| 3.2.1. Muestras Serológicas | 46 |
| 3.2.2. Estudios Serológicos | 47 |
| 3.2.2.1. Determinación del título de anticuerpos IgG antídengue | 47 |
| 3.2.2.2. Detección de Anticuerpos neutralizantes a los virus DEN-1 y DEN-2 por la técnica de NRNP. | 47 |
| 3.2.3. Estudios Viroológicos y Moleculares | 52 |
| 3.2.3.1. Aislamiento Viral en las muestras de suero y vísceras de los fallecidos | 52 |
| 3.2.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) | 54 |
| 3.2.4. Análisis de los resultados | 54 |
| 3.3. Caracterización de la infecciones secundarias y terciarias en la Epidemia Cubana de Dengue 3 Cuba, (2001/2002). Influencia de determinadas secuencias de infección viral en el desarrollo de la forma severa de la enfermedad | 56 |
| 3.3.1. Muestras Serológicas | 56 |
| 3.3.2. Estudios serológicos | 56 |
| 3.3.2.1. Elisa de Captura de IgM (CAM-ELISA) | 56 |
| 3.3.2.2. Detección de anticuerpos IgG y neutralizantes | 56 |
| 3.3.3. Análisis Estadístico | 57 |
| 3.4. Variación de los anticuerpos neutralizantes homólogos y heterólogos a diferentes períodos de la infección primaria. Influencia de la ADA después de transcurrido 20 años. | 59 |
| 3.4.1. Muestras Serológicas | 59 |
| 3.4.2. Estudios serológicos | 59 |
| 3.4.2.1. Determinación de anticuerpos IgG y neutralizantes | 59 |
| 3.4.3. Ensayo de Amplificación Dependiente de Anticuerpos (ADA) | 60 |
| 3.4.3.1. Procedimiento seguido para la ADA | 60 |
| 3.4.4. Análisis Estadístico | 61 |
| 3.5. Cinética de la respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a cepas de diferentes genotipos de virus DEN-3 en un panel de sueros humanos. | 63 |
| 3.5.1. Muestras Serológicas | 63 |
| 3.5.2. Estudios Serológicos | 63 |
| 3.5.3. Análisis Estadístico | 64 |
| 3.6. Cinética de anticuerpos neutralizantes y su relación con la viremia en 22 pacientes de la Epidemia Cubana 2001-2002 | 66 |
| 3.6.1. Pacientes y muestras de suero | 66 |
| 3.6.2. Estudios serológicos | 67 |
| 3.6.2.1. Elisa de Captura de IgM (CAM-ELISA) | 67 |
| 3.6.2.2. Detección de anticuerpos IgG y neutralizantes | 67 |
| 3.6.3. Presentación de los resultados | 67 |
| 3.6.4. Definiciones | 68 |
| 3.6.5. Análisis de los resultados | 68 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSION | 71 |
| 4.1. Caracterización de la infección secundaria en la Epidemia Cubana de virus DEN-2 de 1997 | 71 |
| 4.2. Caracterización de las infecciones secundarias y terciarias en la Epidemia Cubana de Dengue 3, (2001/2002). Influencia de las secuencias de infección virales en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad | 76 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3. Variación de los anticuerpos neutralizantes homólogos y heterólogos a diferente periodo de la infección primaria. Influencia de la ADA después de transcurridos 20 años. | 87 |
| 4.4. Cinética de la respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a cepas de diferente genotipo de virus DEN-3 en un panel de sueros humanos. | 96 |
| 4.5. Cinética de anticuerpos neutralizantes y su relación con la viremia en 22 pacientes de la Epidemia Cubana 2001/2002 | 104 |
| 4.5.1. Viremia estimada a través del aislamiento viral en células C6/36 HT y de la RCP | 104 |
| 4.5.1.1. Aislamiento e identificación viral | 104 |
| 4.5.1.2. Duración de la viremia estimada por aislamiento viral | 105 |
| 4.5.2. Respuesta de Anticuerpos Neutralizantes | 105 |
| 4.5.2.1. Respuesta de anticuerpos neutralizantes según el tipo de infección | 105 |
| 4.5.2.2. Respuesta de anticuerpos neutralizantes según el cuadro clínico de la enfermedad | 107 |
| 4.5.3. Respuesta de anticuerpos y viremia | 109 |
| 5. CONCLUSIONES | 117 |
| 6. RECOMENDACIONES | 119 |

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

El dengue se considera una enfermedad emergente y la principal de las enfermedades virales transmitidas por artrópodos en términos de morbilidad y mortalidad en la actualidad. Se estima que anualmente ocurren entre 50-100 millones de infecciones. Esta enfermedad es la causa de 300,000 a 500,000 hospitalizaciones anuales con una tasa de letalidad del 1-5% (1, 2).

Los virus del Dengue (DEN) se encuentran dentro del grupo de los Arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) y pertenecen a la familia *Flaviviridae*, específicamente al género *Flavivirus*. El complejo que forman estos virus está constituido por cuatro serotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 relacionados antigénicamente (3). El genoma viral está constituido por una simple cadena de ácido ribonucleico positiva (ARN (+)) que codifica para tres proteínas estructurales C, PrM/M, E y siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (4).

Cualquiera de los 4 serotipos del DEN puede producir una infección asintomática o causar las dos formas clínicas de la enfermedad. El cuadro más leve es la Fiebre del Dengue (FD) en el cual se observan a veces hemorragias, y el más severo es la Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque del Dengue (FHD/SCD) (5-7).

Después de un período de más de 50 años en los que la enfermedad estuvo casi ausente en Las Américas, el dengue se ha tornado gradualmente hiperendémico en la mayoría de los países de la región, con circulación de más de un serotipo y epidemias frecuentes. En este contexto, la situación epidemiológica de Cuba se considera excepcional en el periodo 1970-2002 pues el mismo se ha caracterizado por el desarrollo de epidemias y brotes definidos en el tiempo. Los mismos han sido eliminados en un breve tiempo, evitando la endemidad de la enfermedad en el país.

En el periodo 1970-2002, Cuba ha reportado cuatro epidemias fundamentales, y cuatro brotes. La primera epidemia ocurrió en los años 1977-1978, la cual se extendió por toda la isla, observándose solamente casos de FD y tuvo como agente etiológico el DEN-1, genotipo Americano (8). Posteriormente, ocurrieron dos epidemias severas de FHD causadas por cepas de DEN-2. La primera de estas, ocurrida en 1981, afectó a todo el país y la segunda, ocurrida en 1997, se circunscribió al Municipio de Santiago de Cuba. Estas epidemias ocurrieron 4 y 20 años después de la epidemia causada por el DEN-1 (9, 10). En ambas, la proporción de casos de FHD/casos de FD, así como la proporción de fallecidos / casos de FHD se incrementó notablemente con la progresión de la epidemia (6, 11).

La última epidemia confirmada ocurrió en el periodo 2001-2002. Esta fue causada por el virus DEN-3 y en la misma se observó también un incremento en la severidad de la epidemia con la progresión de la misma en el tiempo (12).

Además de las 4 epidemias antes descritas, en Cuba han ocurrido 4 brotes de dengue. Uno en el año 2000 en la ciudad de La Habana de muy corta duración, con 138 casos de FD. En este se aislaron los serotipos DEN-3 y DEN-4 (6).

En el año 2005, ocurrieron 3 brotes de dengue, uno de ellos en el mes de abril en el Municipio de la Lisa en la ciudad de La Habana, el otro en la misma provincia pero en el municipio de Playa en el mes de septiembre causado por el virus DEN-4 y el tercero en la provincia de Camaguey causado por el virus DEN-3.

Finalmente en el 2006 tuvimos el último evento epidemiológico aún no clasificado por las autoridades nacionales de salud en relación a su severidad. Durante el mismo, en 8 provincias del país, se aislaron los serotipos de DEN-3 y DEN-4 (Camaguey, Ciego de Ávila, Cienfuegos, La Habana, Guantánamo, Las Tunas y Villa Clara) y en 2 provincias (Holguín y Santiago) se aisló el DEN-3 solamente (Comunicación Personal Dra. Maria G. Guzmán, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 2007).

Por años la patogénesis de la FHD ha sido un tema controvertido. Los primeros trabajos señalaban por una parte a la infección secundaria como el principal factor de riesgo mientras otros consideraban a la virulencia viral. Hoy se acepta que la infección secundaria es el factor de riesgo individual más importante, aunque factores como la virulencia viral y las características genéticas del hospedero modulan la severidad de la enfermedad (13-15).

Los primeros estudios en dengue demostraron que la FHD/SCD se observaba en niños (2-8 años) en el curso de una infección secundaria y en infantes (7-8 meses) con una infección primaria nacidos de madres inmunes a dengue (16).

La descripción clínica de la FHD en niños se realizó primeramente en el Sudeste Asiático en la década del 50 (17). Contrario a esta observación, en la región de Las Américas la FHD ha afectado tanto a niños como a adultos (6).

El primer estudio que sugirió la asociación de la FHD y la presencia de anticuerpos heterólogos a dengue fue realizado por Halstead en 1970 (18) dado por la observación que más del 85% de los niños con FHD en Bangkok en 1960 tenían altos niveles de anticuerpos de reactividad cruzada a dengue sugestivos de una infección previa por dengue. Estudios seroepidemiológicos posteriores realizados en Tailandia y en Myanmar confirmaron esta hipótesis (7, 19, 20) y estimaron que el riesgo relativo para la FHD en las infecciones secundarias es al menos 15 y para el SCD de 50-100 veces (7, 19, 21).

En 1987 Kourí y colaboradores plantearon una hipótesis integral para el desarrollo de la FHD (15). En la misma se plantea que la interacción de 3 grupos de factores dependientes del hospedero, el virus y aspectos epidemiológicos determinan la ocurrencia de las epidemias de FHD. Dentro de los factores individuales se encuentran el sexo, la raza, las enfermedades crónicas y la preexistencia de anticuerpos, la cual constituye el factor de riesgo principal.

A lo largo de más de 3 o 4 décadas, las investigaciones de la FHD/SCD en nuestro país han permitido la identificación de los siguientes factores de riesgo para la enfermedad severa.

- La infección secundaria.
- La secuencia de infección.
- La asociación con genotipos específicos.
- El intervalo de tiempo entre la primera y la segunda infección.
- La edad del hospedero.
- La etnicidad del hospedero.
- Las enfermedades crónicas del hospedero.

La FHD/SCD se ha observado principalmente en áreas con cocirculación de varios serotipos. En estas áreas ha sido muy complejo el estudio del papel de los factores de riesgo involucrados en la etiopatogenia de la enfermedad debido a que la misma es endémica.

Entre los factores asociados a la infección secundaria se encuentran la secuencia de infección, el intervalo entre las infecciones, la cinética de los anticuerpos neutralizantes en el tiempo, la amplificación dependiente de anticuerpos y el comportamiento de los anticuerpos neutralizantes frente a cepas de genotipos similares y diferentes. Teniendo en cuenta lo anterior y teniendo como ventaja la situación epidemiológica cubana única con relación al dengue hasta el año 2002 evaluamos estos factores. “Dada la importancia de definir la implicación de los anticuerpos en la etiopatogenia de la enfermedad se propuso valorar las características y el comportamiento de los anticuerpos homólogos y heterólogos frente a diferentes cepas del virus dengue en las epidemias ocurridas en Cuba, con especial referencia a las clases de inmunoglobulinas, su capacidad neutralizante y las variaciones en su título en función del tiempo transcurrido después de la primoinfección (sensibilización) , así como la relación de estas características con la duración de la viremia y el fenómeno de la amplificación dependiente de anticuerpos, como vía de sustentar las evidencias sobre el papel de la infección secundaria en la etiopatogenia de la FD y la FHD”.

1.1. Hipótesis

En el curso de una infección secundaria, a un mayor intervalo después de la infección primaria, determinadas secuencias de infección viral como DEN-1/DEN-2 y DEN-1/DEN-3 y la disminución de los anticuerpos neutralizantes heterotípicos a determinados genotipos juegan un papel fundamental en la severidad de la enfermedad.

1.2. Objetivos

Objetivo General

Contribuir al conocimiento del papel de la infección secundaria en la etiopatogenia de la FD y de la FHD.

Objetivos Específicos

1. Determinar el título de anticuerpos IgG y de anticuerpos neutralizantes frente a los virus DEN-1 y DEN-2 en el suero de pacientes de FD y FHD durante la epidemia de 1997, y su asociación con la infección secundaria heterotípica.
2. Definir la presencia de anticuerpos IgG y el título de anticuerpos neutralizantes frente a los 4 serotipos del virus dengue en sueros de pacientes con FD y FHD durante la epidemia del 2001/2002, y las secuencias virales de infección asociadas a las formas clínicas de la enfermedad.
3. Conocer la variación de los anticuerpos neutralizantes homólogos y heterólogos en diferentes períodos de la primoinfección y la influencia del fenómeno del ADA después de transcurridos 20 años.
4. Evaluar el título de anticuerpos neutralizantes en un panel de sueros postconvalescentes frente a diferentes cepas del virus DEN-3 de igual y diferente genotipo.

5. Determinar la cinética de los anticuerpos neutralizantes y la duración de la viremia en pacientes infectados con el virus DEN-3 durante la epidemia del 2001//2002 en relación con el cuadro clínico de la enfermedad y el tipo de infección.

1.3. Novedad científica y valor teórico

- Por primera vez a nivel mundial:
 - Se demuestra la asociación de la infección secundaria en el desarrollo de la FHD después de más de 20 años de la infección primaria.
 - Se realiza un estudio longitudinal de la cinética de los anticuerpos neutralizantes en sueros inmunes a DEN-1 encontrándose variación en el título de los mismos.
 - Se demuestran diferencias en la capacidad neutralizante de sueros de individuos inmunes a DEN-3 en presencia de cepas de virus DEN-3 de igual y diferente genotipo.
 - Se caracteriza la cinética de la respuesta de anticuerpos neutralizantes durante la fase aguda de la enfermedad y su relación a la viremia por virus DEN-3 en pacientes latinoamericanos.
- Los estudios aquí presentados son de gran valor científico a nivel internacional, dada la exclusividad que caracteriza la epidemiología del dengue en Cuba en el período estudiado, lo cual permitió relacionar los hallazgos del patrón de respuesta de anticuerpos neutralizantes con la etiopatogenia de la enfermedad.

1.4. Valor práctico

- De este estudio se derivan importantes conclusiones sobre la cinética de los anticuerpos neutralizantes y de los aspectos relacionados con la viremia, teniendo en cuenta el tipo de infección y la severidad de la enfermedad en individuos adultos de origen americano infectados por virus DEN-3, en los que la respuesta inmune previa se conoce con seguridad.
- El conocimiento aportado en este trabajo tiene una posible aplicación práctica en las acciones de prevención de la aparición de formas graves de la enfermedad, así como en la protección de los individuos que han sufrido una primoinfección (“Vigilancia Epidemiológica Personalizada”).
- Parte de los estudios realizados estuvieron enmarcados dentro del proyecto: “Investigation of the underlying basis for the emergence of dengue haemorrhagic fever in Cuba”, concluido recientemente. El proyecto fue calificado como muy satisfactorio por los evaluadores de la Wellcome Trust, lo que constituye un aval para el IPK y para Cuba en materia de ciencia a nivel internacional.
- Los resultados presentados dieron lugar a 8 publicaciones, 6 en revistas internacionales de alto impacto y 2 nacionales.
- Se demuestra que la infección secundaria y diferentes características asociadas, así como las diferencias de los anticuerpos neutralizantes en un panel de sueros frente a cepas de igual serotipo pero diferente genotipo, tienen implicaciones en la patogenia de la enfermedad y en el desarrollo de una vacuna para el DEN.

REVISION BIBLIOGRAFICA

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Definición

El DEN es una enfermedad viral aguda transmitida por mosquitos (generalmente *Aedes aegypti*), que puede producir desde una forma inaparente o asintomática a una amplia gama de formas clínicas que van desde la fiebre indiferenciada, la FD, hasta las formas graves de la enfermedad, la FHD y el síndrome de choque por DEN (SCD) (22).

El virus DEN pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Este género está compuesto por 70 virus entre los que se encuentra el virus de la fiebre amarilla (FA), que es la especie prototipo de la familia, y el virus de la encefalitis japonesa (EJ). Existen cuatro serotipos del virus DEN, DEN -1, DEN-2, DEN-3 y DEN 4 (23).

2.2. Situación actual del DEN y su epidemiología

El DEN se clasifica como una enfermedad emergente y reemergente debido a la aparición de sus manifestaciones clínicas severas (FHD/SCD), al incremento del número de casos y a la diseminación de sus cuatro serotipos. La reemergencia de la FD tuvo lugar hace más de veinte años y desde entonces tanto el vector que la transmite, como los serotipos del virus, se han expandido geográficamente provocando un aumento de la actividad epidémica (24).

Esta enfermedad es una de las entidades virales de mayor impacto mundial por las elevadas cifras de enfermos que se reportan anualmente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 2.5 billones de personas se encuentran en riesgo de infectarse. Cada año se presentan entre 50 y 100 millones de casos de FD y de 250 000 a 500 000 de FHD/ SCD, de los cuales, el 95 % son niños. Durante el 2002 en América Latina se informaron más de un millón de casos de FD, más de 17 000 de FHD/SCD y 225 fallecidos (2).

En la actualidad no existen medidas para el control efectivo del DEN, lo cual está dado por la falta de una vacuna y por la ineficacia de los programas de control del vector en los países afectados (6).

La pobreza y las inequidades en salud están relacionadas con la ineficacia de las medidas de control y con las conductas del ser humano que no posee sentido de la amenaza de la

enfermedad y por tanto no coopera en las campañas de prevención y erradicación del vector.

El mundo tropical ha sido la zona geográfica donde tradicionalmente se informa la mayor cantidad de casos de DEN. Hoy en día, sin embargo, la epidemiología de esta enfermedad ha cambiado, otras zonas geográficas están siendo afectadas y la incidencia del DEN se ha incrementado dramáticamente. La enfermedad ha sido reconocida en más de 100 países y es endémica en África, el Mediterráneo Oriental, el Sudeste Asiático, el Pacífico Occidental y en las Américas (2).

En la mayoría de los países del centro y el sur de América el DEN se hace gradualmente endémico, siguiendo la tendencia observada en Asia, lo cual representa una amenaza potencial para las regiones tropicales y subtropicales del hemisferio. Sin embargo, la incidencia de las hemorragias gastrointestinales observadas en Cuba y Puerto Rico, las manifestaciones neurológicas, la insuficiencia renal y la miocarditis, así como la distribución de los casos de FHD por grupos de edades, difieren de lo observado en Asia (25). Estas diferencias pudieran deberse al menos en parte al amplio acceso de nuestra población a los niveles de salud, particularmente de la atención primaria de salud, que ha hecho posible la identificación de estas manifestaciones clínicas asociadas al DEN, así como identificar específicamente los grupos de edades involucrados.

2.3. Situación del DEN en Cuba

En Cuba los últimos informes de la enfermedad antes de 1977 se corresponden a los primeros años de la década del 40. Esto fue corroborado en un estudio realizado por inhibición de la hemaglutinación y por neutralización en 1975, donde se confirma la circulación de los virus de DEN-1 y DEN-2 con anterioridad a 1977, en personas de más de 40 años en ese momento (26). La primera epidemia de DEN ocurrida en Cuba en la segunda mitad del siglo pasado se informó entre los años 1977-1979 causada por el virus DEN-1, donde se diagnosticaron más de 400 000 casos clasificados clínicamente como FD (27). En 1981 aparece en Cuba y por primera vez en las Américas la FHD. Esta epidemia provocada por el virus DEN-2, tuvo un total de 344 203 personas infectadas, de las cuales 10 312 desarrollaron FHD/SCD y fallecieron 158 personas, de ellas 101 niños y 57 adultos (9).

Desde principios y hasta mediados de 1997 vuelven a detectarse en nuestro país casos de DEN en el municipio de Santiago de Cuba. Al inicio de esta epidemia fueron considerados 17 114 casos febriles como posibles infectados. Sin embargo, los análisis serológicos realizados a 10 024 pacientes confirmaron la infección de solo 3012 personas, de las cuales 205 desarrollaron FHD/SCD y fallecieron 12 adultos (10). En esta ocasión la cepa aislada se correspondió con el virus DEN-2 propagado ampliamente por el Caribe y Latinoamérica en los últimos años.

Un nuevo brote ocurrió en el año 2000 afectando a la ciudad de La Habana, donde se aisló como causantes a los serotipos DEN-3 y DEN-4. En esta ocasión, solamente 138 casos de FD fueron diagnosticados (2). En el año 2001 se produce una nueva epidemia teniendo al virus DEN-3 como agente etiológico y reportándose 14 443 casos, 81 de los cuales desarrollaron FHD y 3 personas fallecieron (28).

En el año 2005 se reportaron 198 casos confirmados de dengue en el país .Específicamente en el brote de Marzo en La Lisa, en la ciudad de la Habana se identificó por Neutralización el serotipo 2 y se confirmaron 80 casos, todos de FD, mientras que en los brotes de Septiembre en la ciudad de La Habana y Camaguey se identificó por aislamiento el serotipo 4, se confirmaron 148 casos y uno de los casos fue de FHD. (Comunicación Personal Dra. Maria G. Guzmán, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 2007).

Durante el año 2006 se reportó en el país el último evento epidemiológico de dengue. En 8 provincias del país se aislaron los serotipos de DEN-3 y DEN-4 (Camaguey, Ciego de Ávila, Cienfuegos, ciudad de La Habana, Guantánamo, La Habana, Las Tunas y Villa Clara) y en las provincias de Holguín y Santiago de Cuba se aisló el DEN-3 (Comunicación Personal Dra. Maria G.Guzman, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 2007 comunicación personal).

2.4. Características del virus

Los viriones maduros del DEN son esféricos, de aproximadamente 50nm de diámetro. Los mismos poseen un genoma de ARN de simple cadena, rodeado de una nucleocápside de simetría icosaédrica, constituida por la proteína de la cápside (C) y una envoltura. La envoltura es una bicapa lipídica de 10nm de grosor derivada posiblemente de membranas del retículo endoplasmático de las células hospederas, que tiene asociadas dos proteínas, la

proteína de la envoltura (E) y la proteína de membrana (M), que dan lugar a las proyecciones de 7nm de longitud que sobresalen de la superficie del virión (29).

Las partículas virales que se encuentran dentro de las vesículas intracelulares son inmaduras, contienen exclusivamente a la proteína precursora prM sin procesar y son menos infecciosas que las partículas liberadas al medio extracelular (30).

2.4.1. Propiedades físico-químicas

Los viriones del DEN presentan una densidad de flotación de 1.23 cm³ y un coeficiente de sedimentación de 210S (30). La envoltura lipídica constituye el 17% de los viriones, y como se deriva de lípidos celulares, las lipasas y los solventes lipídicos provocan la pérdida de la infectividad de la partícula viral. Estas son también inactivadas por el cloroformo, la formalina, el sulfato de protamina, el duodecil sulfato de sodio, las proteasas, la luz ultravioleta y las radiaciones gamma. El tratamiento con beta-propiolactona es eficiente para la inactivación de los virus del DEN, y permite retener la actividad antigénica mejor que la formalina o el tratamiento con fenol. La proteólisis enzimática con tripsina, quimotripsina, o papaína disminuyen la reactividad antigénica de la proteína E y los detergentes no iónicos, como el Tritón-X la solubilizan totalmente (31).

Los virus del DEN son rápidamente inactivados a altas temperaturas: a 50°C la infectividad se reduce en un 50% en sólo 10 minutos y la inactivación total del virus en la sangre o en soluciones proteicas ocurre por calentamiento a 56°C durante 30 minutos. Las bajas temperaturas preservan la infectividad, con una mayor estabilidad a temperaturas menores de 60°C, y se mantiene estable a 4°C cuando el virus está liofilizado (32).

2.4.2. Características antigénicas

Los miembros del género Flavivirus comparten sitios antigénicos comunes que son revelados por la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH), inicialmente tomada como base para su clasificación (33). La prueba de neutralización por reducción del número de placas (NRNP) es mucho más discriminatoria, por lo que puede ser usada para distinguir virus individuales dentro del género y subgrupos estrechamente relacionados. Usando como base la neutralización cruzada con antisueros hiperinmunes policlonales, 49 flavivirus han sido divididos en 8 complejos antigénicos que se corresponden con la asociación a un

vector; lo que permite inducir un posible origen evolutivo. Otros 17 virus no han sido relacionados claramente, por lo que no se encuentran incluidos en esos complejos (34).

Los virus que conforman el complejo dengue existen como 4 serotipos diferentes. Estos 4 serotipos DEN-1-2-3-4 están antigénicamente relacionados, pero distintos cada uno del otro (34). Tienen entre 60-70% de homología entre ellos, exhibiendo alrededor de un 30% de divergencia en sus poliproteínas (35, 36).

La complejidad de la relación antigénica entre los virus ha sido demostrada utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína E. Estos análisis han demostrado la presencia de determinantes antigénicos de grupo, de complejo y tipo específicos, y además especificidad de subgrupos, de subcomplejos, de cepas y de subcepas. De esta forma se ha reconocido al complejo DEN que agrupa a los cuatro serotipos y a los subcomplejos DEN-1/DEN-3 y DEN-2/DEN-4 (37).

La existencia de estos dos subcomplejos serológicos (DEN-1/DEN-3 (38, 39) y DEN-2/DEN-4) están dados por el mayor porcentaje de homología en la glicoproteína de la Envoltura (37). Esto significa que compartan sitios antigénicos o epítopes relacionados fundamentalmente dirigidos a la envoltura (40). Aunque el dominio III de los 4 serotipos tiene un 65% de homología entre ellos, se ha planteado que sustituciones de un simple a.a tienen un efecto marcado en el reconocimiento de epítopes involucrados en la NT, así como que la estructura de los puentes disulfuros de los Dominios II y III tienen una gran importancia en la conformación de los Acs. Nts (41). Estos datos serían de interés para comprender mejor las consecuencias de la infección secundaria en cuanto a la secuencias de infección viral pues en una infección secundaria la unión del virus a epítopes no neutralizantes o a anticuerpos neutralizantes en una concentración por debajo de la requerida para neutralizar la infectividad, conllevaría a la amplificación de la infección por el fenómeno de la ADA.

2.5. Organización del genoma

El genoma viral consiste de una molécula de ARN de tira única y polaridad positiva de aproximadamente 11 kilobases (kb). Su extremo 5' está cubierto por una caperuza y su extremo 3' carece de cola de poliA. En ambos extremos del genoma están presentes secuencias no codificadoras, necesarias para los procesos de replicación, transcripción y

traducción. El codón de iniciación se corresponde con AUG y da inicio a un marco abierto de lectura ininterrumpido, de aproximadamente 10 250 nucleótidos, que codifica para un precursor polipeptídico, del cual se derivan 10 proteínas virales a través del procesamiento co y postraduccional. Estos procesamientos del precursor resultan en la formación de tres proteínas estructurales, —C, M y E —, y siete proteínas no estructurales (NS), —NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. Los genes que codifican para las proteínas estructurales se localizan hacia el extremo 5' terminal, mientras que el segmento restante abarca las proteínas no estructurales (30).

2.6. Proteínas virales

2.6.1. Proteínas estructurales

La proteína C tiene un peso molecular de 13,5 kDa y es el primer polipéptido sintetizado durante la traducción. El carácter altamente básico que posee esta proteína podría permitirle interactuar con el ARN que se encuentra en el interior de la nucleocápside para formar un complejo ribonucleotídico. El dominio hidrofóbico en su extremo C-terminal le sirve de anclaje transitorio a la membrana en el sitio de replicación. Además, actúa como transductor de señales de transmembrana para la inserción de la prM dentro del retículo endoplasmático rugoso e interviene en el ensamblaje del virión. Este dominio hidrofóbico puede ser eliminado por una proteasa codificada por el virus antes de completar su maduración, dando lugar finalmente a la proteína C que forma el virión maduro (30).

Durante la maduración y después de la ruptura de la proteína C tiene lugar la escisión proteolítica específica del precursor prM glicosilado de 22 kDa, liberándose su extremo N-terminal que da lugar a la proteína no glicosilada M de 8 kDa (42). Esta digestión parece ocurrir en las vesículas ácidas del post-Golgi y precede a la liberación del virus de la célula. La proteína prM es considerada no estructural y quizás se exprese en viriones que tienen defecto en la maduración (43).

La proteína E de 53-54 kDa de peso molecular constituye la principal proteína estructural de los flavivirus y la más conservada en este género (30). Un modelo estructural que se propone para esta proteína consiste en 3 dominios antigénicos no superpuestos designados como A, B y C, compuestos por al menos 16 epítopes. Otro modelo propuesto es aquel donde en la cadena polipeptídica que conforma el fragmento soluble de la proteína se

reconocen 3 dominios, en los cuales predomina la hoja plegada como estructura secundaria (44, 45).

Para que ocurra un apropiado plegamiento, asociación a membrana y ensamblaje de la proteína E, se requiere de su cosíntesis y expresión con la proteína prM (46). Existen evidencias de que en el heterodímero prM-E, la proteína prM estabiliza epítopes sensibles a pH de la proteína E, lo que evita cambios conformacionales irreversibles durante la secreción de la partícula viral a través del compartimiento acidificado. Algunos de estos cambios sufridos por la proteína E a bajo pH en las vesículas ácidas de la vía exocítica, parecen ser de gran importancia en la infectividad del virus por relacionarse con la actividad fusogénica de la proteína (29).

Los dominios funcionales de esta proteína determinan actividades biológicas fundamentales del virión como la maduración, el tropismo tisular, el enlace al receptor celular específico, la fusión de membrana catalizada por ácidos y la inducción de anticuerpos neutralizantes, inhibidores de la hemaglutinación e inmunoamplificadores. Además, han sido determinados en esta proteína la presencia de epítopes específicos para células T, lo que le atribuye importancia en la inmunidad y en la etiopatogenia de la enfermedad (47).

2.6.2. *Proteínas no estructurales*

NS1 es una glicoproteína de 48 kDa de peso molecular, sintetizada y modificada en el retículo endoplasmático rugoso y que finalmente se transporta al aparato de Golgi donde completa su glicosilación. Puede permanecer intracelular, expresarse en la membrana plasmática o ser secretada por la célula. La glicoproteína presenta un mosaico de determinantes antigénicos específicos de serotipo, complejo y grupo, así como algunos de reactividad cruzada (48). Esta proteína puede intervenir en el ensamblaje y la maduración del virión facilitando la conformación apropiada de la proteína E (49).

Algunos autores, basados en la detección de niveles más elevados de NS1 en plasma para los casos de FHD y en su correlación con los niveles de viremia, han sugerido la implicación de esta proteína en la patogénesis de la enfermedad por DEN (50). Sin embargo, otros informes no han mostrado diferencias significativas en los niveles de la proteína NS1 en plasma de pacientes con FHD y FD (51), por lo que su papel en la patogénesis de la enfermedad constituye todavía una línea de investigación.

La región que codifica para la proteína NS2 se divide en NS2a y NS2b. NS2a se ha identificado como una proteína hidrofóbica de 20 kDa de peso molecular que se localiza en los supuestos sitios de replicación del ARN, donde participa en el reclutamiento de los templates de ARN necesarios para la replicasa que se encuentra unida a la membrana. Además, presenta varios dominios de transmembrana que se requieren para el procesamiento proteolítico del extremo C-terminal de NS1 (52). NS2b es una proteína hidrofóbica de 14,5 kDa de peso molecular que se encuentra asociada a la membrana. El funcionamiento como cofactor en el complejo NS2b-NS3 con actividad proteasa requiere de una región de 40 aminoácidos presente en su dominio central conservado. Este complejo es responsable, junto con la peptidasa señal del hospedero, del procesamiento de las uniones entre las proteínas no estructurales NS2a-NS2b-NS3-NS4a y NS4b-NS5, y de mediar la ruptura proteolítica del precursor E-prM-C (53).

La proteína hidrofóbica NS3 tiene un peso molecular de 70 kDa y se encuentra muy conservada en los Flavivirus. Funciona como una proteasa viral activa en el procesamiento postraduccional de la poliproteína sintetizada a partir del genoma viral, o como un componente de la polimerasa viral de ARN, aunque puede tener ambas funciones enzimáticas. En efecto, la comparación de secuencias nucleotídicas y los análisis bioquímicos de NS3 sugieren que es una proteína trifuncional, con actividad proteasa, helicasa y trifosfatasa de ARN. En cuanto a su actividad proteasa, NS3 es una proteasa específica de serina que requiere tanto de una peptidasa señal del hospedero, como de un cofactor, que es NS2b (30).

La proteína NS4 es modificada postraduccionalmente y se divide en NS4a y NS4b. Ambas proteínas son hidrofóbicas y presentan 16 y 27 kDa de peso molecular respectivamente. NS4b puede encontrarse en los sitios de replicación del ARN, dispersa en la membrana y posiblemente en el núcleo. Basada en su distribución e interacción con NS1, NS4b parece intervenir en la replicación del ARN, anclando componentes de la replicasa a la membrana celular o asociada a la membrana junto con el complejo de replicación NS3-NS5 (52).

La proteína NS5 es la de mayor tamaño de los flavivirus con 104 kDa de peso molecular. Esta proteína básica se encuentra altamente conservada en la familia *Flaviviridae*. Los análisis de la secuencia aminoacídica de su extremo C-terminal y la presencia de una región muy conservada de 666-668 aminoácidos, que es característica de los virus con genoma de

ARN de cadena positiva, sugieren que esta proteína podría funcionar como ARN polimerasa dependiente de ARN. Además, presenta una secuencia gli-asp-asp, que es común para otras polimerasas virales (54). La homología de algunas regiones de NS5, con secuencias características de las enzimas metiltransferasas involucradas en la formación de la caperuza de ARN, sugiere su posible participación en la metilación de la caperuza del extremo 5' del ARN viral (53).

2.7. Células hospederas

La picadura del mosquito vector puede inocular al virus DEN en el espacio subcutáneo del hospedero, donde las células dendríticas inmaduras podrían intervenir en la transformación del virus y en su presentación en los linfonodos regionales (55).

Las células blanco primarias para el virus DEN son los monocitos/macrófagos y otras células de origen retículo-endotelial. Sin embargo, el antígeno se detecta en las células de Kupffer, en los macrófagos alveolares, en los fagocitos mononucleares de la piel y en los monocitos de la circulación (56). Estudios recientes sugieren como blanco importante de la infección al linfocito B (57). Los mastocitos y los basófilos al expresar algunos receptores para Fc en su superficie pueden ser blancos potenciales de la infección por el virus. Como hospederos potenciales se han reportado los hepatocitos, las células endoteliales, dérmicas e intersticiales y las neuronas (58-61).

2.8. Replicación viral

La interacción de los flavivirus con sus células susceptibles ocurre mediante dos mecanismos:

1. Unión del virus al receptor celular: endocitosis mediada por el receptor.

La unión primaria del virus a la célula ocurre a través de un receptor sensible a tripsina específico para la proteína E. La interacción inicial se produce mediante glucosaminoglicanos que transfieren el virión a un receptor de alta afinidad, a través del cual ocurre la endocitosis. Similar a otros virus envueltos, la fusión de la envoltura del virus DEN con las membranas de la célula hospedera ocurre en el compartimiento endocítico donde las condiciones ácidas inducen determinados cambios conformacionales en la proteína E que activan su fusión, lo cual permite la deposición de la nucleocápsida en el citoplasma (62).

2. Unión del virus a la célula por formación de inmunocomplejos.

Este mecanismo ocurre durante una infección secundaria al formarse inmunocomplejos (anticuerpos heterotípicos de tipo IgG en concentraciones subneutralizantes unidos al virión) que se unen a los receptores para Fc presentes en las células sensibles. La internalización es mediante la formación de un endosoma (63).

Independientemente del tipo de interacción virus-célula, el evento siguiente es la internalización del virus. Cuando se libera la nucleocápside en el citoplasma ocurre el desnudamiento del ARN, la traducción de proteínas virales en el retículo endoplasmático, y la síntesis de las nuevas cadenas de ARN que dan origen a las partículas de la progenie viral. No se conoce el sitio principal donde tiene lugar la replicación del virus in vivo. Sin embargo, estudios realizados sugieren como posible sitio de replicación la región perinuclear de la célula infectada, en asociación con las membranas lisas (30).

El ensamblaje de la nucleocápside (a partir de la proteína C y el ARN) y la adquisición de la envoltura ocurren intracelularmente. Las partículas virales son llevadas en vesículas de transporte, que se derivan de la membrana del retículo endoplasmático hasta el pre-Golgi, y pasan posteriormente al aparato de Golgi. La escisión de las proteínas prM, E y NS1 se produce en las vesículas ácidas del post-Golgi y opera, además, un transporte exocítico de glicoproteínas de membrana a la superficie de la célula. La escisión de la proteína prM provoca la reorganización de la estructura del virión, lo cual implica que las formaciones iniciales heterodiméricas prM-E pasen a ser homodímeros de la proteína E (30).

La liberación de los viriones puede ocurrir por la fusión de las membranas de las vesículas exocíticas que los contienen con la membrana citoplasmática, o por efecto citopático a través de rupturas puntuales en la membrana celular (63).

2.9. Ciclo de transmisión del virus

El DEN es transmitido por la picada de la hembra del mosquito *Aedes aegypti*. Esta especie es muy adaptable a la vida urbana por sus hábitos domésticos, pone sus huevos preferiblemente en agua limpia y estancada, ya sea en depósitos naturales o artificiales. Su capacidad de vuelo es corta, generalmente limitada a las habitaciones y sus alrededores. Otros vectores, pero de mantenimiento, son *Aedes albopictus*, presente también en las Américas y *Aedes pseudoscutellaris* que se localiza en el Pacífico Central y del Sur (64).

Se ha planteado que el mantenimiento del DEN en la naturaleza, en ausencia de hospederos susceptibles, puede estar dado por un mecanismo de transmisión vertical que involucra al vector (65). El virus DEN persiste en la naturaleza mediante el ciclo de transmisión hombre-mosquito-hombre (66). La transmisión selvática del DEN con un ciclo que incluye a monos de las especies *Presbytis*, *Macaca* y *Erythrocebus patas* y a vectores mosquitos secundarios del género *Ochlerotatus* y *Aedes* (*taylori-furcifer*, *leuteocephalus*, *opok*) no es responsable de la emergencia actual de epidemias explosivas, a diferencia de los brotes del virus de la FA, que si depende de ciclos enzooticos (36, 67).

2.10. Serotipos y subtipos genéticos

Los cuatro tipos serológicos del virus DEN muestran una homología de secuencia de un 70% aproximadamente. Esta homología es mayor para DEN-1, DEN-3 y DEN-4, no así para DEN-2, que parece diferir en su origen evolutivo. Estudios genómicos han demostrado la presencia de varios subtipos genéticos dentro de un mismo serotipo viral (68).

Los estudios realizados en un fragmento de 240 nucleótidos en el segmento de unión de los genes E/NS1 (2.2% del genoma total del virus) demostraron la existencia de cinco genotipos para el virus DEN-1 con una diferencia superior al 6% en el intervalo estudiado: El genotipo I aislado en las Américas, África y en el Sudeste Asiático, el genotipo II aislado en Sri Lanka, el genotipo III aislado en Japón, el genotipo IV aislado en el Sudeste Asiático, en el Pacífico Sur, Australia y México, y el genotipo V aislado en Taiwán y en Tailandia (69).

Twiddy y colaboradores (2002), analizaron en varias cepas de DEN-2 la región del genoma viral que codifica para la glicoproteína E de la envoltura viral y reportaron la existencia de cinco genotipos con una diferencia promedio de 7.3% en la secuencia estudiada:

El genotipo selvático aislado en África y Asia, el genotipo asiático 1 aislado en Tailandia y Malasia, el genotipo asiático 2 aislado en Filipinas, Taiwan, Viet Nam, China y en Sri Lanka, el genotipo americano aislado en Perú, Venezuela, en el Caribe y en el Pacífico Sur, el genotipo asiático americano aislado en China, Tailandia, Vietnam, Brasil, Venezuela y en el Caribe, y el genotipo cosmopolita aislado en África, Australia, en la India y en el Sudeste Asiático (70).

Otras investigaciones realizadas en un fragmento de 1 479 nucleótidos de la región que codifica para la glicoproteína E demostraron la existencia de cinco genotipos del virus DEN-3, clasificados de acuerdo al esquema de Lanciotti y colaboradores del año 1994, pero con un nuevo genotipo identificado (genotipo V):

El genotipo I aislado en Tailandia, Indonesia, Malasia, Filipinas y en el Pacífico Sur, el genotipo II aislado en Tailandia, Malasia y en Myanmar, el genotipo III aislado en la India, en Sri Lanka, Brasil, Tailandia y en el Pacífico Sur, el genotipo IV aislado en China, Filipinas y en Malasia, y el genotipo V aislado en Puerto Rico (71, 72).

La secuencia codificadora para la glicoproteína E fue utilizada, además, para agrupar los genotipos del virus DEN-4. Las diferencias encontradas en la secuencia nucleotídica entre los dos genotipos descritos fueron menores del 8%:

El genotipo I aislado en Filipinas, Tailandia y en Sri Lanka, y el genotipo II aislado en Indonesia, en América Central y del Sur, en el Caribe y en el Pacífico Sur (73).

2.11. Diagnóstico de laboratorio

El virus DEN se encuentra entre los Arbovirus más difíciles de detectar y propagar debido a las dificultades para su multiplicación en cultivos celulares o en animales de laboratorio. Su diagnóstico se basa fundamentalmente en el aislamiento viral, la detección del genoma en muestras de sueros, tejidos y mosquitos, así como en la detección de anticuerpos IgM e IgG que permiten discriminar entre una infección reciente o pasada (74).

Para el aislamiento del agente causal del dengue se recomienda la toma de muestras de sangre durante el período febril y sobre todo antes del quinto día de comienzo de la enfermedad. En los casos fallecidos, se pueden utilizar muestras frescas de tejidos (hígado, bazo, nódulos linfáticos, sangre del ventrículo) las que son homogenizadas y procesadas según el sistema diagnóstico a emplear. Además se pueden utilizar muestras de tejidos fijadas en formalina e incluidas en parafina para la detección de antígenos virales, con la utilización de métodos inmunohistoquímicos o la detección del genoma viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (74, 75).

Para el diagnóstico serológico a partir de la determinación de anticuerpos IgM, se recomienda la toma de la muestra de suero después del quinto día de comienzo de los síntomas. Mientras que para determinar el incremento en título o la seroconversión de

anticuerpos IgG se utilizan muestras pareadas de sueros (tomadas en los primeros siete días de comienzo de los síntomas y 14 a 21 días después). Adicionalmente, se ha demostrado la utilidad de las muestras de sangre seca sobre el papel de filtro, tanto para la detección de anticuerpos IgM como IgG específicos contra los virus del dengue; así como la utilidad de la saliva para la detección de dichos anticuerpos, IgM e IgG (76).

2.11.1. Aislamiento e identificación viral

La muestra más utilizada para el aislamiento de los virus del DEN es el suero o el plasma obtenidos durante el período febril (preferiblemente antes del quinto día del inicio de los síntomas), cuando la viremia es elevada. En los casos fatales, pueden ser utilizados tejidos frescos de necropsia de algunos órganos específicos como hígado, bazo, ganglios linfáticos y timo (74).

Los sistemas biológicos empleados para el aislamiento viral son ratones lactantes, cultivos celulares y mosquitos (74).

La inoculación intratorácica de mosquitos es la técnica de mayor sensibilidad para el aislamiento del virus DEN. Entre las especies más utilizadas están el *Aedes albopictus*, *Toxorhynchites amboinensis* y *Toxorhynchites splendens*. Este método tiene la desventaja de que requiere de facilidades especiales para el establecimiento y mantenimiento de las colonias de mosquitos, así como de cierto grado de entrenamiento técnico para la manipulación de los mismos (77).

La inoculación intracerebral de ratones lactantes ha sido utilizada tradicionalmente para el aislamiento del virus DEN. Actualmente es considerado el método menos sensible (74).

La aplicación de las técnicas de cultivo celular para el aislamiento de los virus del DEN ha permitido elevar la sensibilidad del mismo, con respecto a la inoculación intracerebral de ratones lactantes. Para este propósito se han empleado líneas celulares de mamíferos: Vero (riñón de mono verde africano), BHK-21 (riñón de hámster recién nacido), LLCMK2 (riñón de mono). Sin embargo, las líneas celulares obtenidas a partir de mosquitos son las más sensibles y las de más amplio uso para el aislamiento de estos virus. Entre ellas están AP61 (*Aedes pseudoscutellaris*), Tra-284 (*Toxorhynchites amboinensis*), C6/36 (*Aedes albopictus*), AP64 y CLA-1 (clonos de una línea celular de *Aedes pseudoscutellaris*) (78, 79). La sublínea celular C6/36 HT está adaptada a crecer a 33° C y exhibe el mismo efecto

citopático que las C6/36 originales, manifestándolo más rápidamente, y se obtienen mayores títulos virales que a 28° C (80).

El efecto citopático inducido por los cuatro serotipos virales en las líneas celulares puede ser variable, reportándose la formación de sincitios, la presencia de células gigantes multinucleadas y la fagocitosis (6).

Independientemente del sistema biológico empleado para el aislamiento, la identificación viral puede realizarse por ensayos de inmunofluorescencia (IF) y de NRNP, utilizando anticuerpos monoclonales y sueros hiperinmunes (81, 82). Existen anticuerpos monoclonales específicos de complejo, de subcomplejo y de tipo. La IF representa un método simple, económico, confiable y rápido para la identificación viral (6).

El principal problema asociado a la identificación de los virus del DEN en los cultivos celulares con la utilización de anticuerpos monoclonales es, en ocasiones, la pobre replicación viral. Por tal razón, la identificación en la siembra primaria resulta imposible en algunos casos, por lo que son necesarios 1 ó 2 pases en el mismo sistema celular con el objetivo de incrementar el número de células infectadas por el virus (6).

2.11.2. Técnicas serológicas

El diagnóstico serológico de los virus del DEN es complicado debido a la existencia de determinantes antigénicos de reactividad cruzada compartidos por los cuatro serotipos virales y otros flavivirus (68).

Entre los métodos clásicos desarrollados para demostrar la presencia de anticuerpos contra los virus del DEN están la IH con eritrocitos de ganso, la NRNP y la fijación del complemento (FC) (82, 83). La IH y la FC no permiten la determinación del serotipo infectante. La NRNP es más sensible y específica de tipo, aunque más costosa y compleja (6).

Las técnicas serológicas más utilizadas para el diagnóstico del virus DEN son la IF, los ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA) y los radioinmunoensayos. Los ELISA son de gran utilidad como pruebas diagnósticas por ser económicos, rápidos, fáciles de ejecutar y por mostrar a su vez una elevada sensibilidad. La detección de anticuerpos anti-DEN por ELISA de captura de IgM (CAM-ELISA) es el ensayo serológico utilizado por la mayoría de los laboratorios para la vigilancia del DEN. Por lo general, la IgM se

detecta al quinto día de la enfermedad, y no se puede detectar después de 30 a 60 días del comienzo de los síntomas (74).

También es muy utilizado el ELISA de Inhibición (MEI), que permite detectar y titular las inmunoglobulinas totales contra los virus del DEN (84).

La presencia de anticuerpos contra las proteínas de los virus del DEN ha sido demostrada, además, por Western Blotting en sueros de pacientes colectados durante la fase convaleciente de la enfermedad. Los casos primarios de DEN muestran títulos bajos de anticuerpos de tipo IgG contra la proteína de la envoltura y contra las proteínas no estructurales NS3 y NS5. Los pacientes con una infección secundaria por alguno de los virus del DEN, poseen anticuerpos de tipo IgG con títulos elevados contra la proteína de la envoltura y muchas otras, incluyendo NS1, NS3, NS5 y C (85).

2.11.3. Detección molecular

Los procedimientos de transcripción reversa (TR) y reacción en cadena de la polimerasa (RCP) son ampliamente utilizados en la detección rápida y en la serotipificación de los virus DEN (86). Esta técnica permite la detección del agente de forma directa en muestras de suero, células, larvas y muestras de tejido frescas y embebidas en parafina (6).

La transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP) ha sido ampliamente utilizada, además, en la detección cuantitativa y semicuantitativa del virus DEN, a partir de muestras de suero de pacientes infectados o de primates no humanos inoculados con el virus. Recientemente ha sido desarrollado un sistema de TR-RCP fluorogénico para la identificación cuantitativa de los cuatro serotipos del virus (87).

La hibridación de ácidos nucleicos ha sido aplicada tanto en el diagnóstico como en los estudios epidemiológicos. El Dot/Blot puede ser empleado utilizando ARN extraído tanto de células como de mosquitos infectados con el virus (88) .

2.12. Etiopatogenia

Los mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad no están totalmente esclarecidos. En este sentido se han planteado varias hipótesis que tratan de explicar la aparición de las formas severas de la enfermedad:

1) Halstead 1970, expresa la manifestación de la FHD/SCD en las personas que tienen anticuerpos contra algún serotipo del virus DEN. Los anticuerpos heterotípicos no

neutralizantes desarrollados en la infección primaria, en presencia de un segundo serotipo infectante, permiten la formación de complejos inmunes que facilitan la entrada del virus a las células susceptibles a través de los receptores celulares para Fc, desencadenando una serie de procesos en los que participan activamente los monocitos y que concluyen en el aumento de la permeabilidad vascular. El fenómeno es conocido como inmunoamplificación dependiente de anticuerpos (ADA) (89).

2) Rosen 1977, expone que la virulencia de las distintas cepas de los cuatro serotipos del virus puede aumentar cuando estas pasan repetidamente por el hospedero humano. De esta forma, las cepas más virulentas serían las responsables de las formas severas de la enfermedad. La virulencia de ciertas variantes virales puede estar ligada a un cierto determinismo genético. 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 (14).

3) Kourí 1987, plantea una hipótesis integral en la que se incluyen factores de riesgo individual relacionados con la existencia de anticuerpos contra el virus DEN, la edad, el sexo, la raza y las enfermedades crónicas como el asma y la diabetes; factores de riesgo epidemiológico relacionados con el vector (capacidad de ser transmisor y alta densidad), el intervalo entre ambas infecciones, la amplia circulación viral y factores relacionados con el serotipo y la virulencia del agente. La presencia de estos factores individuales en el contexto de los factores epidemiológicos y virales, hace posible la ocurrencia de una epidemia de FHD/SCD (15).

La aparición de mutantes de escape a la neutralización es una hipótesis que trata de explicar el rápido incremento de casos fatales de DEN dentro de una epidemia. El fenómeno fue observado en el virus de la poliomielitis tipo 3 después de la administración de la vacuna trivalente oral en individuos inmunes. En el caso del virus DEN, un mecanismo parecido de selección de mutantes de escape podría ocurrir por la presencia de anticuerpos neutralizantes heterotípicos después de la infección primaria. Estos anticuerpos neutralizantes heterotípicos podrían ejercer una presión selectiva sobre las cepas circulantes, dando lugar en el transcurso del tiempo a cepas más virulentas (90).

Las diferencias estructurales entre las cepas de origen asiático y americano del virus DEN-2 se correlacionan con la virulencia y la patogenicidad. Las diferencias están dadas por sustituciones aminoacídicas en la región codificadora (proteínas prM, E, NS4b y NS5) que pueden afectar la antigenicidad o la unión del virus a la célula, y por cambios nucleotídicos dentro de las regiones no codificadoras que influyen en la estructura secundaria del ARN y por tanto en la replicación (91).

La comparación de secuencias de varias cepas del virus DEN-2, aisladas de pacientes con diferentes grados de severidad y de la misma área epidémica en el noreste de Tailandia, reveló evidencias directas sobre las teorías de virulencia viral. Las cepas causantes de FD poseían una sustitución aminoacídica específica de I por R en la proteína prM y las cepas causantes de SCD una sustitución de D por G en la región genómica de la proteína NS1 (92).

Otros autores han correlacionado la sustitución no conservativa de aminoácidos en las proteínas PreM, NS1, NS2a, NS3 y NS5 con tres subtipos de acuerdo al grado de severidad mostrada en los pacientes enfermos. El análisis de múltiples secuencias del virus DEN-2 permitió separarlas en cepas que pueden inducir SCD, cepas que pueden inducir FD en una primera infección y FHD en una infección secundaria y cepas que solo inducen FD ante infecciones tanto de tipo primarias como secundarias (93).

2.13. Respuesta inmune a dengue

Los anticuerpos antiviral median tres funciones fundamentales en la eliminación de las partículas virales infectantes: la neutralización del virus, la histólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Las células B, en la medida que se activan y proliferan, son capaces de capturar y procesar antígenos virales para presentarlos a las células T auxiliaadoras, incrementando el número de estas células activadas.

2.13.1. Papel de las citoquinas y de la inmunidad celular

La producción de citoquinas y la citólisis mediada por células T son factores que influyen en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. La elevación de los niveles de marcadores solubles de activación de células T (CD4, CD8, IL-2 y receptor de TNF), ha sido encontrada en pacientes en fase aguda infectados por el virus del DEN (94-96).

Además, la expansión de poblaciones de células T específicas se ha asociado a la severidad de la enfermedad. Las células T específicas lisan otras células infectadas con el virus por mecanismos dependientes de perforinas y también causan la lisis de células circundantes no infectadas (97, 98).

Las células T CD4⁺ producen TNF- α , TGF- β e IFN- γ en respuesta a la estimulación *in vitro*. El IFN- γ incrementa la expresión de receptores Fc- γ en los monocitos y por tanto, provoca el aumento de la infección a través de los complejos virus-anticuerpos (99).

El cambio de una respuesta de tipo Th1 (predominante en pacientes de FD) a Th2 se ha reportado en los casos severos de FHD grado IV (100, 101). La IL-12 tiene un marcado efecto en la diferenciación hacia células Th1, mientras que su ausencia cambia el balance hacia la producción de citoquinas de tipo Th2. Elevados niveles de IL-12 se han encontrado en pacientes con FD y una ausencia total en pacientes con FHD grado III y IV (102). En varios estudios, los casos de infección severa por el virus del DEN presentan un incremento en los niveles de IL-10, IL-13, IL-18 y TGF- β (103-105).

La presencia de IL-8 en el suero y de ARNm de IL-8 en las células mononucleares de sangre periférica es asociada al incremento de la severidad de la enfermedad y a la muerte del paciente (106). La IL-8 promueve la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales y estimula su migración a través del endotelio del epitelio pulmonar y de las monocapas de fibroblastos (107, 108). Los neutrófilos activados liberan proteinasas como la elastasa y facilitan el daño endotelial y la activación de los sistemas fibrinolítico, de coagulación y del complemento (101). Además, elevados niveles de elastasa son encontrados en el suero de pacientes con la forma severa de la enfermedad (106).

Niveles elevados de IL-6 también son encontrados en los sueros de pacientes con FHD/SCD (109). La IL-6 es producida principalmente por las células endoteliales y los mastocitos. Esta citoquina tiene un papel dual al actuar como molécula pro-inflamatoria y anti-inflamatoria e incrementar la permeabilidad de las células endoteliales (110, 111). Shi y cols encontraron que a medianas y bajas concentraciones de IL-6 hay un incremento de la replicación del virus DEN 2 en las células dendríticas, mientras que a elevadas y medianas concentraciones de TNF- α , se inhibe la replicación del virus (112).

Por otra parte, Chaturvedi y cols han postulado la presencia de una única citoquina llamada factor citotóxico (FC). La mayoría de los pacientes con dengue muestran la presencia de FC

en el suero y las cantidades más elevadas se encuentran en los casos de FHD grado IV. Esta citoquina puede iniciar una serie de eventos que provoquen un cambio de respuesta de tipo Th1 en la FD a una respuesta de tipo Th2 en la FHD/SCD. El FC elimina selectivamente a las células T CD4⁺ y a los macrófagos H2A⁻ e induce a los macrófagos H2A⁺ a la producción de otra citoquina (FC2), que amplifica los efectos del FC (113).

El complejo FC/FC2 induce a los macrófagos a producir radicales libres y a provocar la muerte de las células dianas por apoptosis. Además, regulan directamente la expresión por los macrófagos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-8 y de peróxido de hidrógeno (114). Una alteración en los niveles relativos de TGF- β induce el cambio de una respuesta Th1 a una respuesta Th2, y esta respuesta se ha asociado al desarrollo de las formas severas de la enfermedad y a la muerte del paciente. La permeabilidad vascular característica de la FHD/SCD se incrementa por el efecto combinado de la histamina, los radicales libres, las citoquinas pro-inflamatorias y el complemento (101).

El análisis de la respuesta de células T al virus del DEN en el curso de una infección primaria muestra una asociación entre la respuesta de TNF- α *in vitro* a antígenos del virus y la severidad de la enfermedad durante la infección secundaria. La liberación sistémica de TNF- α puede ser responsable del aumento de la permeabilidad vascular observada en los pacientes con FHD/SCD (115). La asociación de TNF- α con la severidad de la enfermedad ha sido demostrada en modelos animales y en pacientes con choque (95, 116-118).

La respuesta celular de reactividad cruzada se ha propuesto como un factor de riesgo para el desarrollo de la FHD durante la infección secundaria (119). En un estudio realizado en el año 2003, se demostró que existe una activación de las células T de reactividad cruzada en los casos de FHD. Estas células reconocen epítopes con diferencias de pocos aa entre los cuatro serotipos del virus del DEN. En el período agudo de enfermedad, se ha sugerido que las células T con alta afinidad por el serotipo que causó la segunda infección aguda sufren apoptosis y no son capaces de proliferar ni de secretar IFN- γ . Al fenómeno de la activación preferencial de los linfocitos T de reactividad cruzada generados por la infección con el primer serotipo y a su baja afinidad por el segundo serotipo infectante, le denominaron pecado original (98). Este fenómeno había sido reportado previamente para la respuesta inmune humoral en la infección por el virus del DEN (120).

El efecto de la diferencia de secuencia de aa en los epítopes de las células T es complejo, debido a la amplia gama de funciones efectoras de las células T. Variantes de péptidos o ligandos peptídicos alterados, inducen diferentes señales de activación en los linfocitos antígenos específicos y por lo tanto, modulan las funciones efectoras específicas de las células T CD4⁺ y las CD8⁺ (121, 122). Diferentes variantes de los epítopes de NS4A y de NS4B inducen una mayor respuesta de citoquinas en comparación con sus respectivas secuencias heterólogas. La estimulación con variantes de péptidos también alteró la frecuencia relativa de proliferación de grupos de células que expresan IFN- γ , TNF- α y MIP-1 β (123).

Mangada y Rothman caracterizaron la respuesta de citoquinas liberadas por las células T CD4⁺ en seis individuos que recibieron una vacuna atenuada monovalente contra el virus del DEN. En este estudio, una respuesta de IFN- γ y TNF- α inactivaba los antígenos inoculados y la razón de producción de TNF- α con respecto a IFN- γ fue elevada después de la estimulación con antígenos de un serotipo heterólogo (124).

Como en otros virus, la respuesta de células T va dirigida hacia las múltiples proteínas virales. La glicoproteína E es el principal componente de la superficie externa del virión (29) y es un blanco dominante en la respuesta de anticuerpos contra el virus. Las proteínas no estructurales como NS1 y NS3 son también blancos importantes en la respuesta inmune contra dengue; NS1 es expresada en la superficie de las células infectadas y también es secretada en la circulación como un dímero soluble (125), mientras que NS3 parece ser particularmente inmunogénica con cierto predominio de epítopes de células T (126).

La reactividad de las células T varía en su habilidad de reconocer diferentes serotipos del virus dengue, dependiendo del grado de homología de un epítopo determinado. Sin embargo, la reactividad cruzada con múltiples serotipos es común, especialmente en epítopes altamente conservados como las proteínas NS (127, 128).

Ante la infección primaria con un serotipo del virus dengue se genera un patrón linfocitario heterogéneo. En este patrón se encuentran tanto los linfocitos T serotipo-específico como los de reactividad cruzada, pudiendo jugar ambos un papel importante en el desarrollo de la FHD/SCD (129).

Tras la infección secundaria con un serotipo los linfocitos T CD4⁺ con patrón de citoquinas Th1, proliferan y producen IFN gamma, IL-2 y TNF β , siendo estas responsables de las

reacciones inflamatorias de hipersensibilidad retardada, lesiones titulares en infecciones y enfermedades auto-inmunes. Por otra parte los linfocitos T CD4+ con un patrón de citoquinas Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13 respectivamente y están muy relacionados con la producción de anticuerpos por las células B, por lo que infecciones dominadas por una respuesta inmune humoral inducen una alta expresión de citoquinas del patrón Th2.

Chaturvedi et al., (113, 130) observaron en sus estudios cambios en la respuesta de los patrones Th1 y Th2 en pacientes con FD y cuadros severos. Encontró niveles en suero de IL-4, IL-6 y IL-10 en pacientes con FHD grado 3 y 4 y en contraste, altos niveles de IFN γ e IL-2 en casos de FD.

Las células blanco primarias para el virus dengue son los monocitos/macrófagos y otras células de origen retículo-endotelial (131). Sin embargo, el antígeno se detecta en las células de Kupffer (132), en los macrófagos alveolares, en los fagocitos mononucleares de la piel (133) y en los monocitos de la circulación (134). Los mastocitos y los basófilos al expresar receptores Fc γ en su superficie, son blancos potenciales de la infección por el virus. Los mastocitos residen principalmente en los tejidos y están estrechamente asociados con los vasos sanguíneos y los nervios, mientras que los basófilos circulan normalmente en la sangre (135).

Un número incrementado de monocitos/macrófagos infectados con el virus dengue implicaría un incremento de la activación de las células T, lo que resultaría en un aumento de los niveles de citoquinas y mediadores químicos.

Se ha señalado que la rápida elevación y el efecto sinérgico de los mediadores como TNF, IL-2, IL-6, IFN γ , PAF, C3a, C5a y histamina inducen un incremento de la permeabilidad vascular, extravasación del plasma, shock y mal funcionamiento del sistema de coagulación, lo cual conduce al cuadro hemorrágico (136-138).

La activación del complemento pudiera conllevar a la filtración capilar y contribuir por tanto a la patogénesis de la FHD. La cascada del complemento podría ser activada por los complejos inmunes formados por los virus circulantes y los anticuerpos específicos contra estos. Los niveles de anticuerpos aumentan más rápidamente en las infecciones secundarias, alcanzándose altos títulos de estos antes de la desaparición de la viremia, lo que incrementa la posibilidad de formación de los inmunocomplejos. La disminución en los

niveles séricos de C3, C4, C5 y factor B, y el incremento de C3a y C5a se ha relacionado con el grado de severidad de la enfermedad (139, 140) .

Otro hecho de interés que explicaría el marcado consumo de complemento en el cuadro hemorrágico, sería la expresión de antígenos virales por las células infectadas, coincidente con la aparición de altos títulos de anticuerpos como los que se observan en la infección secundaria, capaces de activar la vía alterna del complemento. Los productos derivados de la activación del complemento (C') incluyen fragmentos de C3 y varios agentes formadores de poros con propiedades análogas al complejo C5b-9 del C, los cuales inducen la síntesis y/o liberación de IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral de las células monocíticas. La formación de poros en las células endoteliales provoca la producción de eicosanoides, y la disfunción citoesquelética que contribuye a la lisis de las células infectadas, incluyendo plaquetas y células endoteliales. Esto último podría explicar la trombocitopenia aguda, que junto a la extravasación de plasma, son elementos centrales del choque que acompaña a la FHD (141-143).

2.13.2. Inmunopatogenia

La respuesta inmune a la infección por el virus DEN juega dos papeles opuestos en el desarrollo de la enfermedad: la prevención y recuperación, y la inmunopatología de la FHD/SCD (142).

Entre las funciones *in vitro* de la respuesta inmune humoral generada contra el DEN se encuentran: la ADA (89), la neutralización viral (82), la ADCC (144) y la citólisis mediada por complemento (140).

La infección primaria por determinado serotipo origina anticuerpos neutralizantes homólogos capaces de proteger al individuo a largo plazo y anticuerpos neutralizantes heterólogos de corta duración, responsables del efecto de ADA. El desarrollo de los síntomas severos de la enfermedad depende en la mayoría de los casos de una sensibilización inmune anterior por una infección heterotípica. La presencia en niños pequeños de anticuerpos maternos contra el virus adquirido pasivamente podría ser otra causa de la manifestación de las formas severas de la enfermedad (6).

Los complejos virus-anticuerpos, al contrario del virus sólo, son potentes inductores de la activación de los mastocitos y los basófilos, y por tanto en condiciones de ADA se produce

un incremento selectivo en la liberación de quimoquinas, citoquinas vasoactivas y proinflamatorias como la interleuquina uno beta (IL-1 β), IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y los mediadores lipídicos (135).

En presencia de fluidos de sangre periférica con monocitos infectados, las células endoteliales del cordón umbilical se activan y aumentan la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 y selectina E en su superficie. La máxima activación *in vitro* se ha observado con fluidos para los cuales la infección viral fue amplificada al adicionar un suero inmune al virus DEN, sugiriendo la previa inmunidad como el mayor factor de riesgo para el desarrollo de la FHD. El tratamiento de los fluidos de monocitos con anticuerpos anti-TNF α elimina este efecto de activación. El resultado muestra que el virus puede modular la función de las células endoteliales de modo indirecto, de manera tal que el TNF α liberado de los monocitos infectados por el virus DEN parece ser el intermediario principal (60).

Los anticuerpos son considerados el mecanismo más importante de protección en la infección por el virus DEN; sin embargo, en esta respuesta, el cambio de los isotipos y el desarrollo de células de memoria son eventos dependientes de linfocitos T (145). Estos eventos son mediados por las interacciones bidireccionales del ligando CD40-CD40 entre las células T y B, y por las citoquinas derivadas de las células T. Las células B en la medida que se activan y proliferan, son capaces de capturar y procesar antígenos virales para presentarlos a las células T auxiliaoras, participando de forma directa en la activación de las mismas (146).

Ante la infección primaria con un serotipo del virus DEN se genera un patrón linfocitario heterogéneo. En este patrón se encuentran tanto los linfocitos T serotipo-específicos como los de reactividad cruzada, pudiendo jugar ambos un papel importante en el desarrollo de la FHD/SCD (147).

Las funciones de los linfocitos T serotipo-específicos han sido estudiadas *in vitro* fundamentalmente. Los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ citotóxicos lisan las células infectadas por el virus a través de las perforinas en el contexto de las glicoproteínas del MHC clase I y II respectivamente. Los linfocitos T CD4⁺ utilizan además otro mecanismo de lisis que involucra a las interacciones entre las moléculas FasL expresadas en los linfocitos T

activados y las Fas expresadas en las células diana. Este mecanismo pudiera explicar la lisis de los hepatocitos que no son infectados por el virus (148).

El patrón de citoquinas generado por los linfocitos T CD4⁺ cooperadores serotipo-específicos después de una infección primaria parece ser Th 1 (productor de interferón gamma (INF γ), IL-2 y linfoquinas) y Th 0 (productor de citoquinas del patrón Th 1 y del Th 2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10)). Estas citoquinas y los mediadores químicos pueden tener efectos sinérgicos entre sí por lo cual la producción de algunas está inducida por otras. Una vez secretadas un grupo de citoquinas, se induce una producción adicional en un ciclo de regulación positiva, provocando un estado en el que los niveles tan elevados producen la permeabilidad vascular en un corto período (149).

Después de una infección secundaria con el virus DEN los linfocitos T de memoria inducidos por la infección primaria muestran reactividad cruzada y proliferan rápidamente (149). Las células T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria son muy activas y con su reactividad cruzada pueden contribuir a la patogénesis de la FHD/SCD. Los niveles sanguíneos de IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF e INF γ y de moléculas CD4⁺ y CD8⁺ solubles son significativamente más altos en pacientes con FHD/SCD que en pacientes con FD (142, 150). Las citoquinas como el TNF α y la IL-1 β contribuyen al choque séptico y los mediadores lipídicos, como el factor activante de plaquetas, pueden afectar la agregación plaquetaria (151).

Los linfocitos T CD4⁺ de reactividad cruzada con patrón de linfoquinas Th 1, producen niveles elevados de IFN γ e IL-2 tras la infección secundaria por un serotipo del virus DEN. El IFN γ parece contribuir a la patogénesis de la FHD/SCD aumentando la expresión de receptores Fc gamma. Además, conjuntamente con la inducción de los receptores, se produce un aumento de la expresión de moléculas MHC clase I y II en las células infectadas, que facilitan el reconocimiento de los antígenos por las células citotóxicas del sistema inmune (142). La estimulación de la producción de mediadores inflamatorios (TNF α , IL-2, prostaglandinas de la serie E y leucotrienos) por las células monocíticas infectadas aumentan la adherencia del monocito al endotelio. Lo anterior, unido a la activación del complemento, conduce a una función alterada de las células endoteliales

vasculares, conllevando a la exudación de plasma al espacio intersticial, la hipovolemia y el choque (142).

El aumento en la destrucción de las plaquetas o la disminución en su producción, pudiera ser causa de la trombocitopenia presente en la FD y en la FHD/SCD. Los complejos virus-anticuerpos encontrados en la superficie de las plaquetas de pacientes con FHD sugieren que la respuesta inmune desempeña algún papel en la destrucción de las mismas. Los anticuerpos IgM de reactividad cruzada contra las plaquetas, encontrados en el suero de pacientes con FHD, podrían ser capaces de causar su lisis y de esta forma involucrarse en la patogénesis de la enfermedad (152).

El daño plaquetario también puede deberse al daño endotelial (agregación espontánea in vitro de células endoteliales infectadas que causan lisis y destrucción plaquetaria) o a la coagulación intravascular diseminada. El factor activante de plaquetas puede inducir el consumo de plaquetas y aumentar la adherencia de las células endoteliales vasculares y de los leucocitos, provocando la trombocitopenia y leucopenia encontradas en la FHD/SCD (153).

La activación del complemento pudiera conllevar a la filtración capilar y contribuir, por tanto, a la patogénesis de la FHD. La cascada del complemento podría ser activada por los complejos inmunes formados por los virus circulantes y los anticuerpos específicos contra estos. Los niveles de anticuerpos aumentan más rápidamente en las infecciones secundarias, alcanzándose altos títulos de estos antes de la desaparición de la viremia, lo que incrementa la posibilidad de formación de los complejos inmunes. La disminución en los niveles séricos de C3, C4, C5 y factor B, y el incremento de C3a y C5a se ha relacionado con el grado de severidad de la enfermedad (140).

Otro hecho de interés que explicaría el marcado consumo de complemento en el cuadro hemorrágico sería la expresión de antígenos virales por las células infectadas. Este momento coincide con la aparición de altos títulos de anticuerpos, como los que se observan en la infección secundaria, capaces de activar la vía del complemento. Los fragmentos de C3 y varios agentes formadores de poros con propiedades análogas al complejo C5b-9 inducen la síntesis y/o liberación de IL-1, IL-6 y el TNF de las células monocíticas. La formación de poros en las células endoteliales provoca la producción de eicosanoides y la disfunción citoesquelética contribuyendo a la lisis de las células infectadas,

incluyendo plaquetas y células endoteliales. Esto último podría explicar la trombocitopenia aguda que junto a la extravasación de plasma son elementos centrales del choque que acompaña a la FHD (153).

2.13.3. Viremia, respuesta de anticuerpos y severidad de la enfermedad

Los anticuerpos al virus dengue o a sus proteínas no estructurales usualmente actúan para prevenir o controlar la infección.

La respuesta de anticuerpos a dengue debe tener en cuenta fundamentalmente la dicotomía entre una infección primaria y una infección secundaria. La respuesta de anticuerpos secundaria es marcadamente diferente a la primaria. La respuesta secundaria heterotípica ocurre cuando el hospedero ha sido inmunizado (por infección o vacunación) por otro serotipo de dengue o por otro flavivirus fuera del complejo dengue (154).

Ha sido reportado que la duración de la inmunidad homotípica a dengue es de por vida. El dato más convincente en relación a esto es la persistencia de anticuerpos neutralizantes por más de 4 décadas sugiriendo que la inmunidad homotípica puede durar toda la vida (154, 155).

Por su parte el término de infección terciaria heterotípica ha sido definido también en relación a hospederos que han experimentado 3 o más infecciones por flavivirus. En un estudio de corte realizado en Rayong, Tailandia, la infección terciaria fue definida para aquellos participantes que tenían anticuerpos neutralizantes a 2 o 3 serotipos virales a dengue y que un año después el suero contenía anticuerpos a un serotipo adicional (19).

En las infecciones primarias a dengue, la inmunoglobulina IgM es la primera que aparece generalmente al quinto día de comienzo de la fiebre (156, 157). Los niveles picos de esta se alcanzan en las 2 semanas siguientes y disminuyen en las 2 semanas posteriores, siendo indetectables de 2 a 3 meses de la infección (156,157-159). Por su parte en las infecciones secundarias la cinética de la respuesta de IgM es más variada. Esta generalmente aparece tarde durante la fase febril de la enfermedad, frecuentemente precedida por la IgG (156). Los niveles picos de IgM son menores que en las infecciones secundarias y a los 30 días son indetectables. En un número limitado de pacientes, esta inmunoglobulina no se detecta. Sin embargo cuando la infección por dengue ocurre luego de la infección con otro flavivirus (como por ejemplo el virus de la Fiebre Amarilla) entonces muchos epítopes son

presentados y los niveles de IgM pueden ser altos (156, 157). La diferencia entre la infección primaria y la secundaria a dengue se hace mayor cuando comparamos conjuntamente la cinética de IgM e IgG. En las infecciones primarias, sólo bajos niveles de IgG son detectados en la fase febril o convaleciente temprana, mientras que los niveles de IgM son altos y sobrepasan a los alcanzados por la IgG de 2 a 4 semanas. En las infecciones secundarias, altos niveles de IgG son detectados en la fase aguda, los cuales se incrementan en las próximas 2 semanas, mientras que los niveles de IgM son ausentes o bajos, aumentan poco en comparación con la IgG y disminuyen rápidamente (156, 157). La respuesta de anticuerpos a dengue involucra también la producción de inmunoglobulina IgA (160). La misma ha sido detectada por IH tanto monomérica como oligomérica. La IgA al igual que la IgG es ampliamente crossreactiva a los 4 serotipos a diferencia de la IgM que lo es mucho menos. En un estudio realizado por Koraka y colaboradores (161) más recientemente se plantea que los anticuerpos IgA fueron significativamente mayores en la fase aguda en pacientes con SCD cuando lo comparamos con los pacientes de FD.

Los estudios sobre IgD o IgE son escasos (162). Pavri y colaboradores reportaron que niños con FHD tienen altos niveles de IgE si los comparamos con niños saludables.

El fenómeno “original antigenic sin” en dengue (163) postula que en hospederos remotamente infectados con virus dengue, la respuesta aguda y postconvalescente en una infección posterior por dengue es mayor al serotipo original infectante. Este postulado sólo es aplicable a los anticuerpos neutralizantes pues el resto de las técnicas como la FC y la IH son insuficientemente serotipo específicas. Desde que Halstead propuso esta teoría, diferentes reportes han sugerido la correcta aplicación de la teoría. Por ejemplo, si la infección fue un flavivirus no dengue (como Fiebre Amarilla y Encefalitis Japonesa), raramente la teoría predice el serotipo primario infectante (164).

La determinación de anticuerpos a las proteínas virales de dengue ha sido caracterizada por Electroforesis en gel de poliacrilamida y por Western Blott. Uno de los trabajos iniciales y más completos en relación a esta temática es el desarrollado por Churdboonchart y colaboradores (85) en sueros convalecientes de infección primaria identificaron anticuerpos a la proteína estructural E y a las proteínas no estructurales NS3 y NS5 y en sueros agudos y convalecientes de pacientes con infección secundaria identificaron IgG

reactiva a la proteína E, mientras que en los sueros convalecientes se detectaron anticuerpos adicionales a las proteínas C, pre-M, NS1, NS3, NS4a y NS5.

Entre las funciones de los anticuerpos a dengue se encuentran la protección. Sin embargo los anticuerpos levantados contra una infección por dengue o por otro flavivirus pueden amplificar una siguiente infección por dengue, fenómeno este llamado ADA (Amplificación Dependiente de Anticuerpos).

La amplificación de la infección fue caracterizada originalmente utilizando antisueros a dengue en concentraciones subneutralizantes (154). Con estudios con anticuerpos monoclonales se conoce que la amplificación de los anticuerpos está dirigida a las proteínas E y pre-M y que muchos anticuerpos monoclonales capaces de neutralizar, cuando reaccionan con el virus a altas diluciones, amplifican la infección (165). La relativa habilidad de varias subclases de IgG para mediar la amplificación de la infección al virus dengue es desconocida. Se conoce que anticuerpos monoclonales murinos IgG1, IgG2a y IgG2b pueden amplificar las infecciones in vitro (165, 166).

Un estudio realizado en 1993 nos revela que sueros colectados en la fase aguda de pacientes con FHD o SCD contienen altos niveles de anticuerpos anti IgG1 a dengue lo que no difiere de los sueros procedentes de pacientes con FD. Sin embargo los niveles de anticuerpos anti IgG2 en los sueros agudos de los pacientes con FHD fueron bajos en comparación con los de FD y no se observaron diferencias en los anticuerpos anti-dengue IgG3 e IgG4 (167).

Los anticuerpos a dengue, monoclonales y policlonales, pueden promover o proteger contra las infecciones por dengue, dependiendo de su concentración y del título viral.

Anticuerpos monoclonales a las proteínas estructurales E y pre-M han sido evaluados para protección pasiva y se ha encontrado que existen diferencias entre neutralización en un fenómeno in vitro y protección in vivo. También se ha evaluado la protección pasiva para las proteínas no estructurales NS1 y NS3.

En las infecciones primarias por dengue, la IgM puede activar el complemento in vivo (160, 168, 169). La activación del complemento más típica ocurre en las infecciones secundarias y esta es mediada por la inmunoglobulina IgG. Las subclases de IgG varían en su capacidad para activar el complemento, IgG1 e IgG3 lo activan eficientemente, IgG2 e IgG4 lo activan pobremente.

Pocos estudios de ADCC en pacientes con DEN sugieren que la ADCC pudiera estar implicada en la patogénesis del dengue. Uno de estos estudios revela que la actividad de ADCC fue detectada en sueros agudos de FHD/SCD pero no en sueros procedentes de pacientes con FD, pero sin embargo un año después de la infección, la actividad de ADCC fue observada en todos los casos (170).

La respuesta de anticuerpos y la viremia han sido correlacionadas en múltiples estudios con la severidad de la enfermedad. La viremia aparece en todos los casos febriles de dengue. Esta ocurre previa al comienzo de la fiebre y de los síntomas y alcanza sus picos máximos de 2-3 días después que desaparece la fiebre. Vaughn y colaboradores han cuantificado la viremia diaria en pacientes con infección secundaria por virus DEN-1 y DEN-2, demostrando asociación entre el desarrollo de viremia temprana y el curso de la enfermedad. Además, los títulos de los picos virales han resultado significativamente superiores en pacientes que desarrollan SCD, comparados con aquellos de FD. Sin embargo, no se ha demostrado asociación entre la severidad de la enfermedad y la duración estimada de la viremia. Estos resultados están en concordancia con los informes relacionados con la capacidad replicativa del virus y con los anticuerpos amplificadores (171).

Por otra parte, en pacientes con infección secundaria por virus DEN-3, la viremia y la subsiguiente activación inmune parecen ser de mayor magnitud en los cuadros clínicos más severos. En la fase temprana de la enfermedad los niveles de viremia son más elevados en pacientes con FHD en comparación con los de FD. Los niveles máximos de viremia están correlacionados inversamente de manera significativa con la hemoconcentración. Los valores de virus en los cuadros clínicos más severos reflejan una mayor cantidad de células infectadas, que por consiguiente aumentan la respuesta inmune innata y adaptativa conducida por el antígeno. Además de la ADA, otros mecanismos pudieran estar implicados en el desarrollo de la FHD. Las variaciones genéticas a través de las cepas de DEN-3, de la misma forma que ha sido reportado para las de DEN-2, pueden contribuir con la infección celular y con la capacidad replicativa viral (172).

El virus DEN-2 circula en la naturaleza como dos genotipos: DEN-2 genotipo americano no relacionado a epidemias de FHD/SCD y el DEN-2 genotipo asiático causante de epidemias de FHD (173). Empleando la tecnología de los clones infecciosos se han

realizado mutaciones en la proteína E del virus DEN en las regiones 3' y 5' no codificadoras para evaluar su efecto sobre la replicación del virus en cultivos celulares primarios humanos. La estructura correspondiente al genotipo americano influye en la salida del virus de los monocitos y de las células dendríticas humanas, pudiendo ser la responsable de su pobre replicación en las células humanas y de sus características de virulencia durante la infección (174).

Los sueros humanos inmunes a DEN-1 neutralizan más eficientemente al virus DEN 2 de genotipo americano que al de genotipo asiático. Este hecho pudiera estar relacionado con la ausencia de FHD en individuos infectados con DEN-1 en 1990-1991, seguido por DEN-2 genotipo americano en 1995 en Iquitos, Perú (175).

Los niveles de NS1 secretoria encontrados en sueros de pacientes con infección por DEN durante la fase aguda están relacionados con la magnitud de la viremia y son mayores en los pacientes con FHD comparados con los de FD. Los pacientes en riesgo de desarrollar la FHD presentan elevados niveles de NS1 secretoria a las 72 horas de comienzo de la enfermedad (50).

Las inmunoglobulinas predominantes durante la infección por DEN suelen ser IgM, IgG1 e IgG3, tanto en los cuadros de FD como en los de FHD/SCD. La presencia de IgM específica a DEN en suero está más asociada con infección primaria o secundaria que con la severidad de la enfermedad. En la fase aguda de la enfermedad, los pacientes que desarrollan SCD tienen niveles de IgA significativamente mayores que los pacientes de FD o de FHD (161).

El grupo poblacional más afectado por la FHD/SCD suelen ser los infantes, quienes adquieren FHD/SCD durante el pequeño período en que los anticuerpos maternos han disminuido aproximadamente a 1/10. La distribución por edad de la FHD/SCD muestra que pocos casos son observados en infantes menores de tres meses y que el mayor número reportado se encuentra entre seis y ocho meses de edad (173).

La viremia que se requiere para infectar los mosquitos no se conoce con exactitud. En infecciones en humanos los títulos virales pueden ser tan altos como 10^8 DIM₅₀, mientras que en estudios realizados en monos esta ha alcanzado los niveles de 10^6 DIM₅₀ (176).

2.14. Características clínicas de la enfermedad

Las infecciones causadas por los cuatro serotipos del virus DEN pueden cursar de forma asintomática o sintomática. Las infecciones sintomáticas producen una variada gama de formas clínicas que van desde la fiebre indiferenciada, pasando por la FD o DEN clásico, hasta la FHD, que en ocasiones se acompaña del SCD (177).

La fiebre indiferenciada se observa fundamentalmente en infantes y niños pequeños, pudiendo estar acompañados de una erupción. El síndrome febril benigno o la clásica enfermedad febril aguda, autolimitada, es más común en niños mayores y adultos. Las formas severas se producen mayormente en niños menores de 15 años, aunque en las Américas se observa con frecuencia en los adultos. En los menores, la fiebre aguda se ha visto asociada con la diátesis hemorrágica y con la tendencia a desarrollar el choque (64).

La FD es una enfermedad bifásica benigna con un periodo febril inicial de 1 a 2 días, que declina posteriormente y reaparece de forma abrupta al cabo del tercer día. Presenta un período de incubación que puede oscilar entre 3 y 15 días. Clínicamente se caracteriza por presentar fiebre elevada (39.5-40°C) acompañada o no de escalofríos, cefalea supraorbital intensa y dolor retroocular o retroorbital característico, dolores musculares, articulares y óseos. Al cabo de una semana de evolución reaparece la fiebre y puede presentarse una erupción similar a la del sarampión, que se manifiesta de forma variable, ya sea temprana o tardíamente en el 50% de los enfermos. Las linfadenopatías generalizadas y en ocasiones los fenómenos hemorrágicos menores como la epistaxis, las petequias, las hemorragias gastrointestinales y el sangramiento gingival se asocian con la FD (178). La enfermedad se soluciona en la segunda semana y el periodo de convalecencia puede prolongarse por semanas, asociándose a debilidad y a depresión. Generalmente no se reportan casos fatales y tampoco secuelas posteriores al paso de la infección (179).

La FHD/SCD se puede clasificar en base a cuatro grados de severidad. Los grados I y II se asocian a la FHD, y la diferencia con la FD está dada por la presencia, en la FHD, de trombocitopenia y hemoconcentración. Los grados III y IV se consideran como SCD (180). Los síntomas iniciales de la FHD coinciden con los del comienzo y la fase temprana de la FD. Sin embargo el estado del paciente se deteriora rápidamente, desarrolla trombocitopenia, hemoconcentración, irritabilidad, dolores epigástricos, hipoproteinuria,

hepatomegalia, hipotensión, insuficiencia circulatoria, hemorragias de todo tipo y otras manifestaciones como ascitis, íctero, derrame pleural y síntomas neurológicos (5).

Un paciente con los síntomas anteriores puede presentar el SCD caracterizado por hipotensión arterial, piel fría y húmeda, pulso acelerado y débil, incluso imperceptible, llegando a ser fatal (5). La duración de los síntomas es relativamente corta, y si no recibe el tratamiento apropiado en un plazo de 8 a 24 horas, se puede producir la muerte debido a la extravasación de plasma por aumento de la permeabilidad vascular. El tratamiento consiste en el suministro de electrolitos, líquidos y oxígeno. Las personas que reciben atención médica a tiempo, con reemplazamiento del líquido intravascular y de los electrolitos se recuperan sin dejar secuelas, incluso en aquellas con pulso y presión arterial casi indetectables. La caída del hematocrito que se produce es resultado de la rápida absorción del flujo extravasado; aparentemente no se producen lesiones vasculares destructivas. En la FHD/SCD la hepatomegalia se presenta de forma variable en diferentes países según la epidemia, la cepa y/o el serotipo del virus circulante. Los cambios hemostáticos en la FHD/SCD involucran tres factores: cambios vasculares, trombocitopenia y alteraciones en la coagulación. Casi todos los pacientes con FHD tienen un aumento en la fragilidad capilar. La hemorragia gastrointestinal es apreciable en la mayoría de los casos fatales (119).

Las formas clínicas poco usuales han tomado gran interés. La miocarditis ha sido reportada como una de estas formas infrecuentes, es autolimitada y no progresa hasta el fallo cardíaco (181). Las manifestaciones neurológicas observadas en algunos pacientes infectados con el virus DEN incluyen somnolencia, confusión mental, parálisis y signos extrapiramidales. Esta sintomatología se ha definido con el término de encefalopatía por DEN. La etiología de estas complicaciones es considerada un tema controversial, se plantea que son resultado de una vasculitis con extravasación de líquido, edema cerebral, hipoperfusión y cambios electrolíticos. Existe la posibilidad de que el virus atraviese la barrera hematoencefálica e invada directamente el cerebro debido a la coincidencia de la fase virémica con el comienzo de la encefalitis en algunos casos individuales (59).

2.15. Vacuna

Una vacuna efectiva contra el DEN debe desarrollar inmunidad protectora contra los cuatro serotipos para disminuir el riesgo de infección secundaria, y poder ser administrada a niños de seis meses a un año de edad, por ser el grupo poblacional más susceptible a la infección (182).

Entre las principales dificultades para el desarrollo de un candidato vacunal se encuentran la existencia de cuatro serotipos, el fenómeno de inmunoamplificación, la inexistencia de un modelo animal que reproduzca adecuadamente la enfermedad, y el poco conocimiento que se tiene de la etiopatogenia de la misma (183).

Las principales estrategias utilizadas para la obtención de un candidato vacunal contra el virus DEN han sido:

- Las vacunas de primera generación o convencionales: vacunas inactivadas y atenuadas.
- Las vacunas de segunda generación: incluyen la expresión de proteínas recombinantes, la preparación de vectores vivos y de clones infecciosos.
- Las vacunas de tercera generación: vacunas de ADN.

Las estrategias más avanzadas hasta el momento son las basadas en la generación de vacunas vivas atenuadas, tanto por pases seriados en células que no son hospederos naturales como por vía molecular (184). La formulación más adelantada es la desarrollada por Bhamarapavati y colaboradores en la Universidad de Mahidol, quienes han obtenido la atenuación de los virus DEN-1, DEN-2 y DEN-4 por pases seriados en cultivo primario de riñón de perro beagles, y de DEN-3 por pases seriados en cultivo primario de riñón de mono verde africano (185). La administración por vía subcutánea de dos dosis de esta vacuna a voluntarios entre 18 y 40 años de edad fue capaz de inducir seroconversión a los cuatro serotipos del virus en el 71 % de los vacunados (186). En niños tailandeses con edad comprendida entre 5 y 12 años se logró seroconversión en todos los casos después de tres dosis de esta vacuna atenuada (186). Los ensayos clínicos de dicha formulación se encuentran actualmente en fase II.

Las investigaciones sobre virus quiméricos intertípicos están centralizadas en el desarrollo de un candidato vacunal que podría proteger contra los cuatro serotipos del virus DEN en una simple inmunización. La vacuna de la FA ha sido utilizada para desarrollar un candidato quimérico recombinante FA/DEN. En este caso, sobre el genoma atenuado de la

cepa vacunal de FA se han sustituido los genes que codifican para las proteínas estructurales por los correspondientes de los cuatro serotipos del virus DEN. Los monos inoculados con una dosis subcutánea de esta formulación mostraron un 100% de seroconversión y un 92% de protección frente al reto viral (187).

Raviprakash y colaboradores han desarrollado candidatos vacunales de tercera generación modificando las regiones citoplasmáticas y de transmembrana de la proteína E y reemplazándolas por las de la proteína M asociada a lisosomas. Esta construcción dirige los antígenos hacia las vesículas lisosomales e incrementa la presentación de los antígenos por el CMH clase II, fortaleciendo así la respuesta inmune mediada por los linfocitos T CD4⁺ (188).

La primera estrategia desarrollada por investigadores cubanos se basó en la generación de un candidato por subunidades utilizando la tecnología del ADN recombinante. Inicialmente se clonaron y expresaron las proteínas E de los virus DEN 2 y DEN 4 en el sistema de expresión *Pichia pastoris*. La evaluación de estas proteínas recombinantes en diferentes modelos animales levantó una buena respuesta humoral y ofreció protección frente al reto viral. Sin embargo, la estrategia mostró limitaciones relacionadas con el bajo nivel de expresión de las proteínas y con los requerimientos del proceso de purificación (189).

Las limitaciones anteriores conllevaron a utilizar una nueva estrategia basada en la expresión (en forma de proteínas de fusión) de regiones altamente funcionales de la proteína E del virus. Las construcciones clonadas y expresadas contienen al dominio B de la proteína E insertado o fusionado a los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína recombinante P64K de *Neisseria meningitidis*. Hasta el momento las variantes evaluadas en los distintos modelos animales muestran resultados alentadores en cuanto a la generación de anticuerpos funcionales anti-DEN, a la respuesta celular y a la protección frente al reto viral (190, 191).

2.16. Control

El control del dengue pasa por la erradicación del insecto vector *Aedes aegypti*, la acción más común es el uso de insecticidas, lo cual es controversial porque es caro, perjudicial a las personas, induce resistencia y contamina el ambiente. Además elimina sólo al mosquito

adulto, si en el sitio fumigado existen criaderos del mosquito a las 48 horas se tendrá nuevamente la presencia del mosquito adulto.

La abatización para la eliminación de las larvas y la eliminación de los criaderos dentro de las casas parecen ser las vías para el control del dengue, estos se tienen que trabajar con la participación comunitaria.

En 1997 la OPS/OMS, a partir del PLAN CONTINENTAL para el control del dengue establecen la participación comunitaria y la comunicación social como componentes de los programas nacionales, el cual viene fortalecido el año 1999 con el PLAN DETALLADO DE ACCION PARA LA PROXIMA GENERACIÓN.

MATERIALES Y METODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos en los diferentes estudios

En todos los estudios que conforman este documento y que lo requirieron se contó con la aprobación del protocolo de investigación por parte del Comité de Ética del centro.

En los diferentes estudios descritos, primeramente se brindó la información a los voluntarios participantes y posteriormente se recogió el consentimiento informado de los mismos. Fue una premisa esencial la información de los resultados obtenidos a los voluntarios. En Anexos aparece el Modelo de Consentimiento Informado empleado, así como toda la documentación requerida para estos fines.

3.2. Caracterización de la infección secundaria en la epidemia cubana de virus DEN-2 Cuba, 1997

3.2.1. Muestras Serológicas

Se estudiaron 3 grupos de muestras

a) **252** sueros colectados entre el 5to y el 7mo día de comienzo de la fiebre y que fueron recibidos a través de la vigilancia de dengue durante la epidemia de Santiago de Cuba de 1997. Estos sueros escogidos al azar provenían de **111** casos clasificados como FHD/SCD y **141** clasificados como FD (PAHO, 1994). Todos los sueros procedían de pacientes adultos.

b) **12** muestras de suero y 28 de vísceras (hígado, bazo, riñón, cerebro, corazón, pulmón) correspondientes a fallecidos durante la epidemia con un diagnóstico de FHD (PAHO, 1994). Al total de las vísceras se les intentó el aislamiento viral y en 21 se les realizó la RCP.

Los sueros incluidos en los grupos a y b corresponden a enfermos con una infección confirmada por dengue durante la epidemia.

c) **205** muestras de suero de menores de 16 años que acudieron al cuerpo de guardia de dos hospitales pediátricos en Santiago de Cuba a finales de 1998 con una enfermedad diferente a dengue.

3.2.2. Estudios Serológicos

Se determinó el título de anticuerpos IgG antidengue mediante un Elisa de Inhibición (MEI) y la presencia de anticuerpos neutralizantes a los virus DEN-1 y DEN-2 mediante NRNP siguiendo los protocolos descritos a continuación.

3.2.2.1. Determinación del título de anticuerpos IgG antidengue

La detección de anticuerpos IgG a virus dengue se realizó en todos los casos que fue necesario siguiendo el protocolo de Técnicas del Laboratorio de Arbovirus según las modificaciones realizadas por Vázquez y cols (192). Los criterios de positividad seguidos fueron los siguientes:

- Criterios empleados en la clasificación por esta técnica

Una muestra de suero obtenida entre 5-7 día del comienzo de la fiebre con un título de anticuerpos de IgG antidengue $\geq 1/1280$ mediante MEI fue considerada como un caso de infección secundaria mientras que aquellas muestras con un título de anticuerpos ≤ 20 se consideraron como casos de infección primaria.

3.2.2.2. Detección de Anticuerpos neutralizantes a los virus DEN-1 y DEN-2 por la técnica de NRNP.

- Células empleadas

Para el desarrollo de este objetivo, se emplearon las células BHK21. La línea celular BHK-21 clono 15 (riñón de Hámster) obtenida a partir de la línea BHK-21 clono 13 (ATCC 1992) y donada al laboratorio de Arbovirus por el Prof. S.B. Halstead (Director Científico de la Iniciativa para la Vacuna Pediátrica de Dengue) fue empleada en la NRNP y en la titulación de los lotes virales. Las células fueron crecidas a 37°C en frascos plásticos estériles de 75 cm² utilizando medio MEM suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (100X) y 10% de SFBI, y pasadas semanalmente a una razón de pase de 1:8. Para la realización de ambas técnicas se prepararon suspensiones celulares a una concentración de 2×10^5 células/mL.

- Cepas empleadas en la NRNP

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

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

| Cepas virales | Historial de pases | Lugar de aislamiento | Año de aislamiento |
|----------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| DEN-1 Angola * | 4P C6/36 2P Vero 1P C6/36 HT | Angola | 1988 |
| DEN-2 A15/1981 | 4PR 4P C6/36 HT | Cuba | 1981 |
| DEN 2 I348600* | 4P C6/36 | Colombia | 1986 |
| DEN-3 116/00 | 3P C6/36 HT | Cuba | 2000 |
| DEN-4 Dominica* | 1P C6/36 6P C6/36 HT | Dominica | 1981 |

P: Pase, R: Ratón

* Cepas gentilmente donadas por el Dr. Robert Shope (ya fallecido) de la Universidad de Texas, EUA.

En este estudio la NRNP se realizó a los virus DEN-1 y DEN-2 dado que en el momento del mismo sólo se habían reportado epidemias de estos dos serotipos en nuestro país. Los datos de las cepas DEN-1 Angola y DEN-2 A15/1981 utilizadas aparecen en la tabla 1 anterior.

- Preparación de los lotes virales para la NRNP
1. Frascos plásticos estériles de 25cm² con monocapa confluyente de células C6/36 HT fueron inoculados con 500 µl de la dilución de las cepas virales utilizadas en el estudio (ver acápite de cepas virales empleadas en cada uno de los estudios realizados). Todas las cepas fueron inoculadas a una multiplicidad de infección de 0.001, empleando medio de mantenimiento para la dilución viral.
 2. Las células inoculadas se incubaron durante una hora a 33°C para facilitar la entrada del virus.
 3. Posteriormente se añadieron 5 ml de medio de mantenimiento a cada uno de los frascos.
 4. Los cultivos infectados con las diferentes cepas fueron incubados a 33°C y observados diariamente hasta que el ECP se extendió por toda la monocapa celular (figura 1(b)). En las cepas que no mostraron ECP la replicación se detectó por inmunofluorescencia (Hronovsky, 1981) utilizando líquido ascítico hiperinmune de ratón anti DEN

preparado en el laboratorio de Producción del Dpto. de Virología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”.

5. Cuando la multiplicación viral fue confirmada, los frascos fueron congelados a -86°C previa adición de SFBI al 2%. Finalmente, los cultivos fueron descongelados de forma rápida a 37°C y distribuidos en alícuotas de 200 μl . El título viral se determinó mediante la técnica de titulación viral por placas empleando células BHK-21 clono 15 (82).

- Titulación por Placas

1. Se prepararon diluciones seriadas en base 10 de los virus desde 10^{-1} hasta 10^{-7} .
2. Se añadieron 0.5 ml de la suspensión de células BHK21 a cada pozo de la placa de 24 pocillos y se dejaron en reposo por 1 hora a temperatura ambiente.
3. Se inocularon 50 μl de cada dilución viral a las células incubándose por 4 horas a 37°C en incubadora de CO_2 , al 5%.
4. Se añadieron 0.5 ml de medio recubrimiento “overlay”, incubándose a 37°C por 5 días para el virus DEN-2, 6 días para el virus DEN-4 y 7 días para los virus DEN-1 y DEN-3, en incubadora de CO_2 al 5%.
5. Luego de la incubación se descartó el medio y se lavaron las monocapas celulares con agua de la pila. A cada pozo de la placa le fue añadido 0,5 ml de una solución del colorante Naphthol Blue Black (Acido Acético 60 ml, Naphthol Blue Black 1g y 13,6 g Acetato de Sodio).
6. Para conocer el título infectivo de los virus titulados se aplicó la siguiente formula:

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

Donde:

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

20: Factor de corrección para expresar el título en ufp/ml (1000 μl /Volumen Inóculo).

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

Neutralización por Reducción del Número de Placas (NRNP)

1. Los sueros a estudiar fueron inicialmente tratados con cloroformo y posteriormente se realizaron diluciones en base 10 ($1/10$ - $1/1000000$) utilizando medio de mantenimiento. Los sueros controles negativos y positivos se emplearon a la dilución $1/10$.

2. De acuerdo al título viral previamente calculado, se preparó la dilución de trabajo para cada una de las cepas virales empleadas la que consistió en 80 (ufp) por cada 0,1 mL de dilución.
3. Las diluciones de los sueros se mezclaron con igual volumen de la dilución viral de trabajo (0,1mL de cada una). Para cada virus se preparó un control viral que consistió en mezclas de 0,1mL de medio de mantenimiento con 0,1mL de la dilución de trabajo de la cepa viral correspondiente.
4. Las mezclas de virus más suero o virus más medio se incubaron durante una hora a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.
5. Posteriormente, 0,05mL de cada una de las mezclas virus-suero y de los controles virales (virus-medio) fueron inoculados en 0,5mL de la suspensión de células BHK-21 clono 15 previamente sembradas en las placas plásticas de 24 pozos a la concentración previamente mencionada en este acápite.
6. Las células inoculadas se incubaron durante 4 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.
7. El medio de recubrimiento se añadió a razón de 0,5mL por pozo. Las células fueron incubadas durante cinco días para el virus DEN-2, seis días para el DEN-4, y 7 días para los virus DEN-1 y DEN-3.
8. Luego de la incubación se descartó el medio y se lavaron las monocapas celulares con agua de la pila. A cada pozo le fue añadido 0,5 mL de una solución del colorante (Acido Acético 60 mL, Naphthol Blue Black 1g y 13,6 g Acetato de Sodio).
9. El valor porcentual de reducción del número de placas con respecto al control viral se calculó según la relación:

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

En la cual:

X_s -- promedio del número de placas obtenido para cada dilución de suero.

X_m -- promedio del número de placas obtenido para el control viral.

Para conocer el título de anticuerpos de un suero pueden emplearse 2 métodos.

Método 1

Cuando el suero se prueba a una dilución específica (1/30), frente a una dilución constante de virus (193) . En este caso se obtiene el % de reducción de placas para la dilución de

suero utilizada, lo cual indicaría si el suero tiene o no anticuerpos (% de reducción). Cuando este % de reducción es $\geq 50\%$, se considera que el suero es positivo (**presencia de anticuerpos**).

Método 2

Cuando el suero se prueba en varias diluciones, frente a una dilución constante de virus. A cada dilución de suero se le determinó el valor porcentual de reducción del número de placas virales por la fórmula anterior. **El título de anticuerpos neutralizantes de cada suero fue calculado utilizando un papel semilogarítmico donde el título se correspondió con la dilución de suero que redujo en un 50 % el número de placas virales del virus control (82).**

En este acápite se empleó el **método 1** para corroborar que los niños durante esta infección sólo habían sufrido una infección primaria, así como para conocer la secuencia de infección en los casos confirmados de FD y FHD respectivamente.

En la figura 2 se muestra un ejemplo de NRNP a virus DEN-2. En las posiciones 4, 7 y 10 aparece el control de virus, en la posición 1 el control de células, en la posición 2 un suero positivo, en la posición 3 un suero negativo, en las posiciones 5, 8 y 11 un suero a testar en las diluciones de 1:10 a 1:10³ y en las posiciones 6, 9 y 12 otro suero a testar en las mismas diluciones.

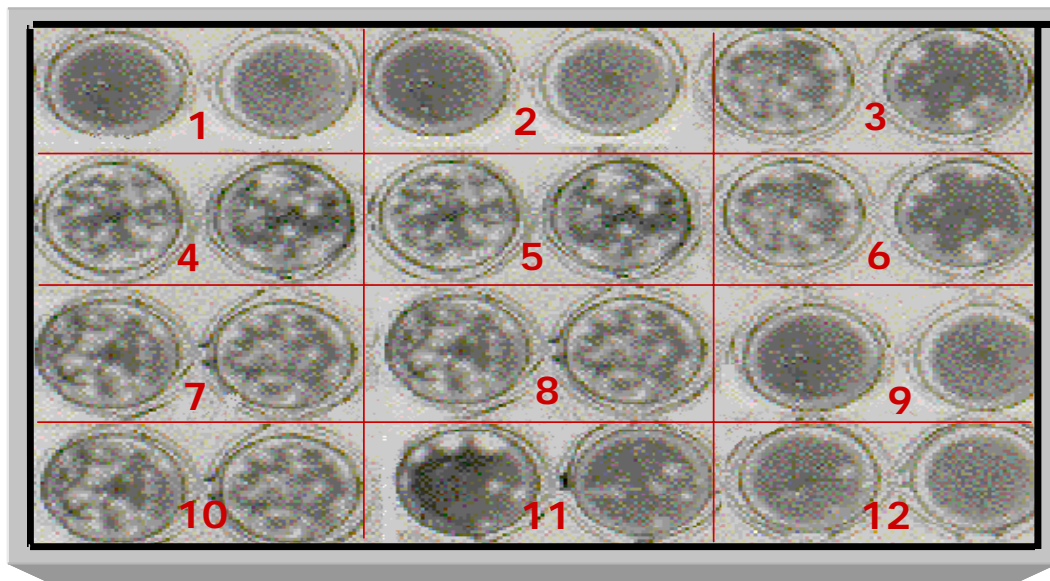


Figura 1. Neutralización por reducción del número de placas al virus DEN-2

Fuente: Libro de Técnicas del Laboratorio de Arbovirus, IPK, 2007.

- Clasificación serológica según esta técnica

Acorde al criterio previamente establecido (193), los sueros agudos y convalecientes con un título de anticuerpos neutralizantes $\geq 1/30$ a un serotipo fueron considerados como casos de infección primaria mientras que los que tenían anticuerpos a DEN-1 y DEN-2 fueron considerados como casos con una infección secundaria.

3.2.3. Estudios Viroológicos y Moleculares

El aislamiento e identificación de virus DEN y la detección del genoma en las vísceras y sueros de fallecidos por FHD/SCD se realizó siguiendo los protocolos que a continuación se exponen.

3.2.3.1. Aislamiento Viral en las muestras de suero y vísceras de los fallecidos

- Células empleadas

Para el desarrollo de este objetivo, se emplearon las células C6/36 HT.

C6/36 HT: La línea celular C6/36 HT (*Aedes albopictus*), obtenida por Kuno y Oliver en 1989 a partir de la línea celular C6/36 (Igarashi, 1979) y donada al laboratorio de Arbovirus del IPK por el Dr. Javier Díaz del Laboratorio Departamental de Medellín, Colombia fue utilizada para el aislamiento del virus DEN a partir del suero de los pacientes colectados durante la fase aguda de la enfermedad. Las células se mantuvieron mediante pases semanales a una razón de pase de 1:6 utilizando como medio de crecimiento Medio Esencial Mínimo (MEM), suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (100X), 2mM de glutamina, antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomycinina 100 mg/mL) y 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBI) por calor (30 minutos a 56⁰C). Para el aislamiento viral, las células fueron sembradas en placas plásticas estériles de 24 pozos.

Las mismas se incubaron a 33°C en atmósfera de CO₂ al 5%, empleando el mismo medio de crecimiento y se utilizaron cuando la monocapa fue confluyente.

- Metodología empleada para el aislamiento.

En dependencia del estudio, el aislamiento viral se realizó en tubos plásticos o en placas plásticas de 24 pocillos.

1. A tubos plásticos estériles sembrados con células C6/36 HT y con monocapa celular se les descartó el medio de crecimiento. Las células fueron inoculadas con 0.1mL de una dilución 1/20 de las muestras de suero colectadas entre el segundo y el sexto día de comienzo de la fiebre. Cuando se empleó la técnica de “shell vial”, las células se sembraron en placas plásticas de 24 pozos. Una vez obtenida la monocapa confluyente, se retiró el medio de crecimiento y se inoculó 100 ul/pozo en duplicado de la muestra de suero en la misma dilución anteriormente mencionada. Las células inoculadas se centrifugaron durante 15 min a 1500 rpm a temperatura ambiente según el protocolo descrito por Rodriguez y colaboradores (80).
2. Las células inoculadas (en tubos o placas de 24 pozos) se incubaron durante una hora a 33°C adicionándose posteriormente 1mL de medio de mantenimiento que consistió en medio de crecimiento pero con 2% de SFBI en lugar del 10%.
3. Las células fueron incubadas a 33°C nuevamente y fueron observadas durante siete días en busca de la aparición de ECP. Al cabo de este tiempo la identificación viral se realizó empleando la IFI con líquido ascítico hiperinmune y anticuerpos monoclonales específicos a los cuatro serotipos del virus DEN (81). Los anticuerpos monoclonales fueron gentilmente donados por el Dr. D. Gubler, director de la Unidad de Arbovirus del Centro para Control de Enfermedades, EUA.
4. En la figura 1 (a y b) se muestran los cultivos de células C6/36 HT. (a) Células C6/36 HT Controles (sin inocular) y (b) Células C6/36 inoculadas con virus DEN-2 mostrando un ECP de sincitios.

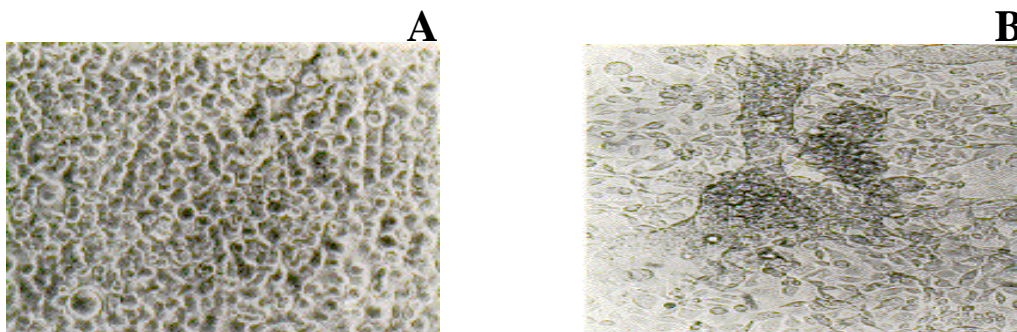


Figura 2. A: Cultivo de células C6/36 HT, B: Cultivo de células C6/36 HT con ECP

Fuente: Libro de Técnicas del Laboratorio de Arbovirus, IPK, 2007.

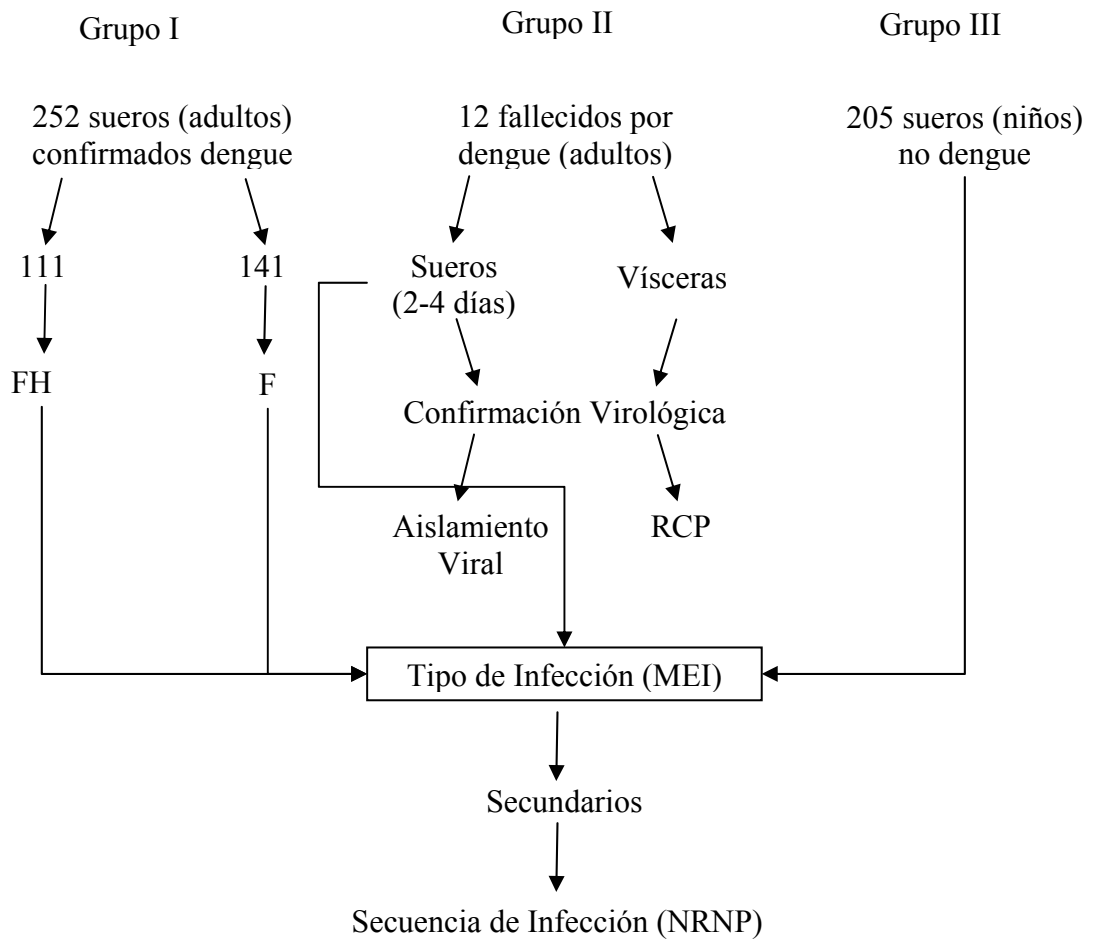
3.2.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)

La extracción del ARN viral se realizó por el protocolo del Trizol LS Reagent (Gibco BRL). La detección y tipificación de los virus DEN fue realizado según el protocolo de Lanciotti y cols, (1992) con las modificaciones de Rosario y cols (1998), donde se amplifica un fragmento de la región C-prM-M del genoma de 521 pb (86, 194).

3.2.4. Análisis de los resultados

Los datos no fueron analizados estadísticamente pues sólo se observó una secuencia de infección viral.

Flujo de Trabajo



3.3. Caracterización de la infecciones secundarias y terciarias en la Epidemia Cubana de Dengue 3 Cuba, (2001/2002). Influencia de determinadas secuencias de infección viral en el desarrollo de la forma severa de la enfermedad

3.3.1. Muestras Serológicas

Se estudiaron cuatro grupos de sueros:

- a) **6** sueros colectados entre el 5to-7mo día de la fiebre de casos clínicamente diagnosticados como FD (n=3) y FHD (n=3) en los que el diagnóstico clínico fue confirmado mediante la detección de anticuerpos IgM a dengue (178).
- b) **17** pares de sueros colectados entre el 5to-7mo día de la fiebre (primer suero) y 17-24 meses después (convaleciente tardío) en individuos con un cuadro clínico confirmado de FHD/SCD durante la epidemia de DEN-3 del 2001-2002 (178).
- c) **37** sueros de individuos con un cuadro clínico confirmado de FHD/SCD durante la epidemia de DEN-3 del 2001-2002 y que fueron colectados 17-24 meses después del inicio de la fiebre (178).
- d) **40** sueros de individuos con un cuadro clínico confirmado de FD durante la epidemia de DEN-3 del 2001-2002 y que fueron colectados 17-24 meses después del inicio de la fiebre (178).

3.3.2. Estudios serológicos

3.3.2.1. Elisa de Captura de IgM (CAM-ELISA)

La detección de anticuerpos IgM a virus dengue se realizó en todos los casos que fue necesario, siguiendo el protocolo de Técnicas del Laboratorio de Arbovirus según las modificaciones realizadas por Vázquez y cols (195).

3.3.2.2. Detección de anticuerpos IgG y neutralizantes

Se determinó el título de anticuerpos IgG mediante MEI siguiendo el protocolo descrito en el acápite III.2.2. La presencia de anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos del virus se realizó mediante NRNP siguiendo el protocolo descrito en el mismo acápite. En este estudio se empleó el método 2 en la determinación del título de anticuerpos neutralizantes en los grupos estudiados.

- Células empleadas

Para el desarrollo de este objetivo, se emplearon las células C6/36 HT y BHK21. La preparación de las mismas ha sido descrita en el acápite III.2.2.

- Cepas empleadas en la NRNP

La Tabla 1 del acápite III.2.2 muestra las cepas virales de los 4 serotipos empleadas en el estudio referente a la Epidemia de DEN-3 del 2001-2002. La cepa de DEN-2 (I348600) no fue empleada en este estudio.

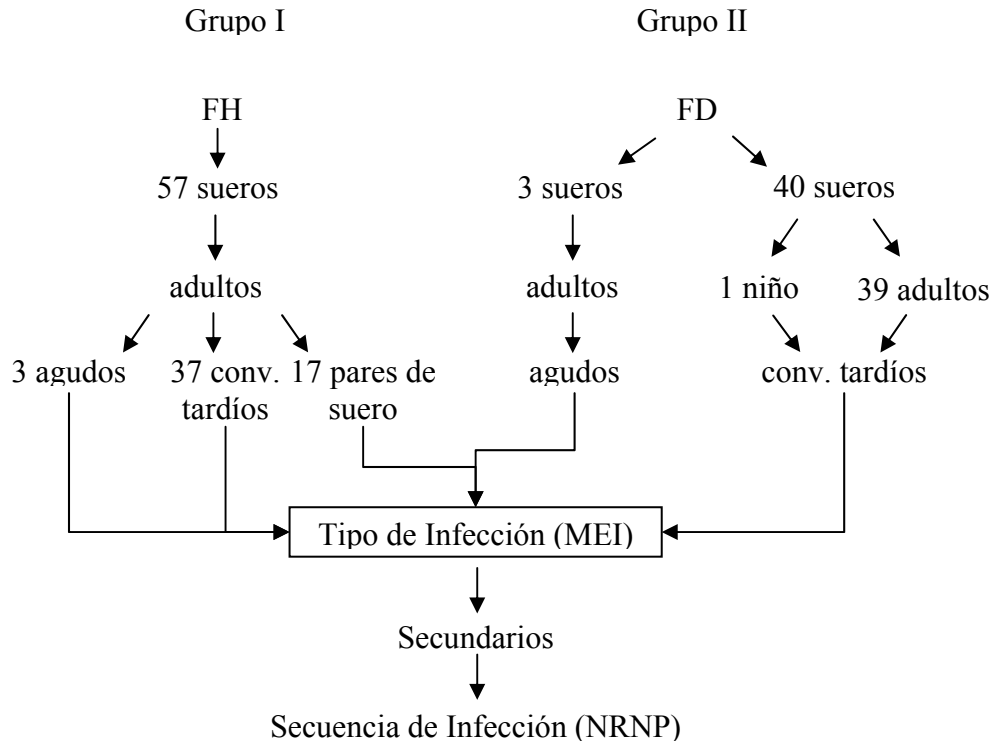
- Criterios empleados en la clasificación serológica de los sueros

Una muestra de suero obtenida a los 5-7 días del comienzo de la fiebre con un título de anticuerpos IgG antidengue ≥ 1280 fue considerado como un caso de infección secundaria mientras que aquellas muestras con un título de anticuerpos ≤ 20 fueron consideradas como casos de infección primaria según criterio establecido en el acápite III.3.6. Acorde al criterio previamente establecido (193), los sueros agudos y convaleciente tardíos con un título de anticuerpos neutralizantes $\geq 1/30$ a un serotipo fueron considerados como casos de infección primaria mientras que los que tenían anticuerpos a más de un serotipo fueron considerados como casos con más de una infección. La secuencia de infección viral se determinó en los sueros convalecientes tardíos. Cuando el suero agudo tenía sólo anticuerpos a DEN-1 o el suero convaleciente tenía anticuerpos a DEN-1 y a DEN-3, el caso fue clasificado como “Secundario DEN -1 – 3 Los pacientes que los sueros convalecientes tenían anticuerpos contra DEN-1-2 -3 con títulos de anticuerpos a DEN-2 iguales o mayores a 1:30, fueron clasificados como casos con una infección terciaria.

3.3.3. Análisis Estadístico

Se compararon los porcentos de la secuencia de infección DEN-1/DEN-3 en los casos de FD y FHD por la Prueba de Chi Cuadrado.

Flujo de Trabajo



3.4. Variación de los anticuerpos neutralizantes homólogos y heterólogos a diferentes períodos de la infección primaria. Influencia de la ADA después de transcurrido 20 años.

3.4.1. Muestras Serológicas

Las muestras de suero estudiadas fueron recibidas a través del Sistema de Vigilancia de dengue en el período 1981-1985 (103 muestras) y 1999 (2000 muestras) en las que no se demostró la infección reciente por este agente. Con el objetivo de evitar cualquier error se excluyeron las muestras de suero provenientes de la provincia de Santiago de Cuba, teniendo en cuenta que en la misma se reportó una Epidemia de DEN-2 en 1997 (10, 196). En el ensayo de ADA se incluyeron 24 sueros de las muestras colectadas en 1999 y que tenían títulos de anticuerpos neutralizantes a virus DEN-2 A15 menores de 1/10.

3.4.2. Estudios serológicos

3.4.2.1. Determinación de anticuerpos IgG y neutralizantes

Se determinó el título de anticuerpos IgG mediante MEI siguiendo el protocolo descrito en el acápite III.2.2. El título de anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos del virus se realizó mediante NRNP siguiendo el protocolo descrito en este mismo acápite. En este acápite se emplearon ambos métodos descritos en el acápite III.2.2 para la determinación de anticuerpos neutralizantes. El primero se utilizó en la selección del grupo de sueros inmunes a DEN-1 y el segundo en la determinación de anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos en los grupos de sueros estudiados (sueros colectados a 4 y 20 años de la primoinfección). Los TPG se calcularon para cada grupo de estudio y dentro de estos para cada serotipo viral.

- Células empleadas

Para el desarrollo de este objetivo, se emplearon las células C6/36 HT y BHK21. La preparación de las células C6/36 HT y de las BHK21 han sido descritas en el acápite III.2.2.

- Cepas utilizadas en la NRNP

En la tabla 1 del acápite III.2.2 se muestran las características de las cepas virales utilizadas.

- Criterios empleados en la clasificación serológica de los sueros

Toda muestra de suero con niveles de anticuerpos IgG por MEI a virus DEN ≥ 20 fue considerada como un caso con una infección pasada por virus DEN (192).

Teniendo en cuenta que en el periodo de 1977 a 1999 sólo se habían reportado epidemias de DEN-1 y DEN-2 en Cuba, los sueros con títulos de anticuerpos neutralizantes de 1/30 o mayores a DEN-1 fueron considerados como de infección primaria por DEN-1, los que tenían títulos de 1/30 o mayores a DEN-2 A15 (cepa aislada durante la epidemia de 1981) fueron considerados como infección primaria por DEN-2 y los que mostraron un título mayor o igual a 1/30 a ambos serotipos fueron considerados de infección secundaria (197). Sólo los sueros de individuos inmunes a DEN-1 (Primarios DEN-1) fueron empleados en esta investigación. Es importante señalar que los anticuerpos fueron medidos a la cepa de DEN-2 que circuló durante la epidemia de 1981 y a una cepa de DEN-1 del mismo genotipo de la que circuló en 1977.

3.4.3. *Ensayo de Amplificación Dependiente de Anticuerpos (ADA)*

- Células empleadas

Para el desarrollo de este objetivo, se emplearon las células K562. La línea celular K562 de macrófagos humanos fue mantenida por pases seriados en medio RPMI suplementado con 10% de SFBI a una razón de pase semanal de 1:3. La misma se utilizó para la realización de la técnica de ADA y fue donada a nuestro laboratorio por el Prof. S.B. Halstead (Director Científico de la Iniciativa para la Vacuna Pediátrica de Dengue).

3.4.3.1. *Procedimiento seguido para la ADA*

Este ensayo se realizó en micrométodo empleando células K562. Las condiciones del ensayo (multiplicidad del virus, concentración de células, diluciones y tiempo de incubación) fueron previamente normalizadas usando un suero humano inmune a DEN-1 de título de anticuerpos conocido por ADA (estos datos no forman parte de este estudio).

Se prepararon diluciones en base 10 en medio RPMI de los sueros estudiados. Se mezclaron 50ul de cada dilución de suero con 50ul de virus DEN-2 A15 diluido para producir una multiplicidad de infección de $m=0.0006$. Las mezclas virus-suero se incubaron por una hora a 37°C. A 100ul de la suspensión celular de 2×10^5 cels/ml se le inocularon 100 ul de la mezcla virus-suero. Cada mezcla de dilución de suero más virus se inoculó por duplicado. Después de 48h de incubación a 37°C en 5% de atmósfera de CO₂,

las células fueron congeladas a -80°C . El virus producido fue cuantificado en células BHK21 como se describió en el acápite III.2.1 (82). La ADA fue determinada comparando el título viral en las células K562 en presencia y ausencia de anticuerpos empleando la fórmula de Detre (198).

Fórmula Detre

$X1-X0 / X1+ X0 \geq 1.96$ (Siempre que los resultados de esta fórmula sean \geq a 1.96 se considera que ha ocurrido una amplificación dependiente de anticuerpos)

Donde

X1 células infectadas en presencia de suero

X0 células infectadas en ausencia de suero

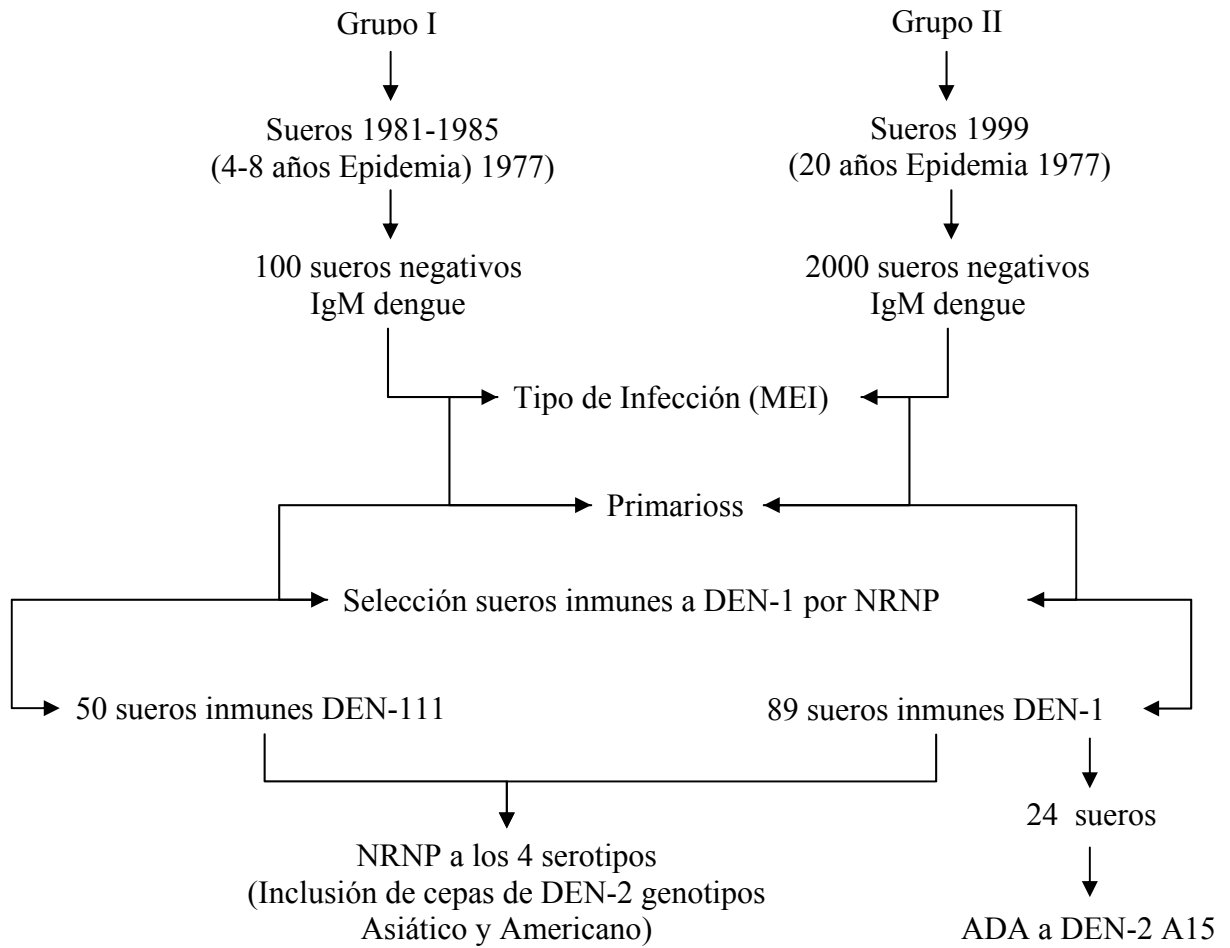
3.4.4. Análisis Estadístico

El programa GraphPad Prim 2.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) fue empleado para el análisis de los datos. Con el objetivo de comparar el número de casos positivos de anticuerpos neutralizantes a cada virus en cada grupo de suero se empleó la Prueba de Fisher.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes se presentan como la media del \log_{10} de estos. La comparación de medias fue realizada para detectar diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos a los virus en cada grupo estudiado y en ambos grupos de suero usando un análisis de varianza (ANOVA) seguido por la Prueba de Múltiple Comparación de Bonferroni. La significación estadística fue definida por una $p < 0.05$.

La prueba de Fisher fue empleada para comparar los porcentajes positivos de anticuerpos neutralizantes a cada virus en cada grupo de muestras.

Flujo de Trabajo



3.5. Cinética de la respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a cepas de diferentes genotipos de virus DEN-3 en un panel de sueros humanos.

3.5.1. Muestras Serológicas

Para este estudio se utilizaron 20 muestras de suero colectadas de pacientes serológicamente confirmados como FD (10) y FHD/SCD (10) durante la epidemia de DEN-3 2001/2002 (28). Estos sueros fueron colectados 18-24 meses después de la fase aguda de la enfermedad. Los estudios serológicos previos (192) realizados durante la fase aguda de la enfermedad permitieron la clasificación de los mismos en primarios o secundarios: Primarios DEN-3 (4 casos de FD) y Secundarios DEN-1/DEN-3 (6 casos de FD y 10 casos de FHD/SCD). Estos resultados iniciales no forman parte de esta tesis. Un líquido ascítico hiperinmune murino (Cepa DEN-3 H₈₇) fue empleado como control positivo y un suero humano sin anticuerpos a DEN fue empleado como control negativo.

3.5.2. Estudios Serológicos

Se determinó el título de anticuerpos neutralizantes a las cepas de virus DEN-3 (tabla 2) mediante NRNP siguiendo el protocolo descrito en el acápite III.2.4. Se empleó el método 2 en la determinación de anticuerpos neutralizantes a las diferentes cepas del mismo genotipo. El ensayo fue repetido en 3 días diferentes con el objetivo de garantizar la repetibilidad del estudio.

- Células empleadas

Para el desarrollo de este objetivo, se emplearon las células C6/36 HT y BHK21. La preparación de las mismas ha sido descrita en el acápite III.2.2.

- Cepas empleadas en la NRNP

Las cepas virales empleadas en la NRNP se muestran en la Tabla 2. Seis de estas cepas son del genotipo III aisladas en diferentes momentos durante la epidemia del 2001/2002 y del Brote del 2000 respectivamente y la otra cepa perteneciente al genotipo V (cepa Puerto Rico aislada en 1977). Los títulos virales de las mismas fluctuaron entre 2.5×10^4 y 1.3×10^5 ufp/ml.

Tabla 2. Historial de pases, lugar y año de aislamiento de las cepas utilizadas en la NRNP

| Cepa | Genotipo | Fecha de aislamiento | Lugar de aislamiento | Número de pases | Referencia |
|--------------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------|
| 116/00 | III | 2000 | | 1P C6/36 HT | ^d |
| 118/00 | III ^c | 2000 | | 1P C6/36 HT | - |
| 140/00 | III ^c | 2000 | | 1P C6/36 HT | - |
| 167/01 | III ^c | 2001/2002 | Cuba | 1P C6/36 HT | - |
| 557/01 | III ^c | 2001/2002 | | 1P C6/36 HT | - |
| 21/02 ^a | III | 2001/2002 | | 1P C6/36 HT | ^d |
| Puerto Rico ^b | V | 1977 | Puerto Rico | 5P C6/36 HT | ^e |

^a Todas las cepas de DEN-3 fueron aisladas de casos de FD con la excepción de la cepa 21/02, aislada de un fallecido por FHD/SCD

^b Cepa donada por el Prof. R Shope (ya fallecido) de la Universidad de Texas, EUA

^c Estas cepas fueron aisladas durante la epidemia del 2001/2002 y durante el brote del 2000 pero su genoma no ha sido estudiado

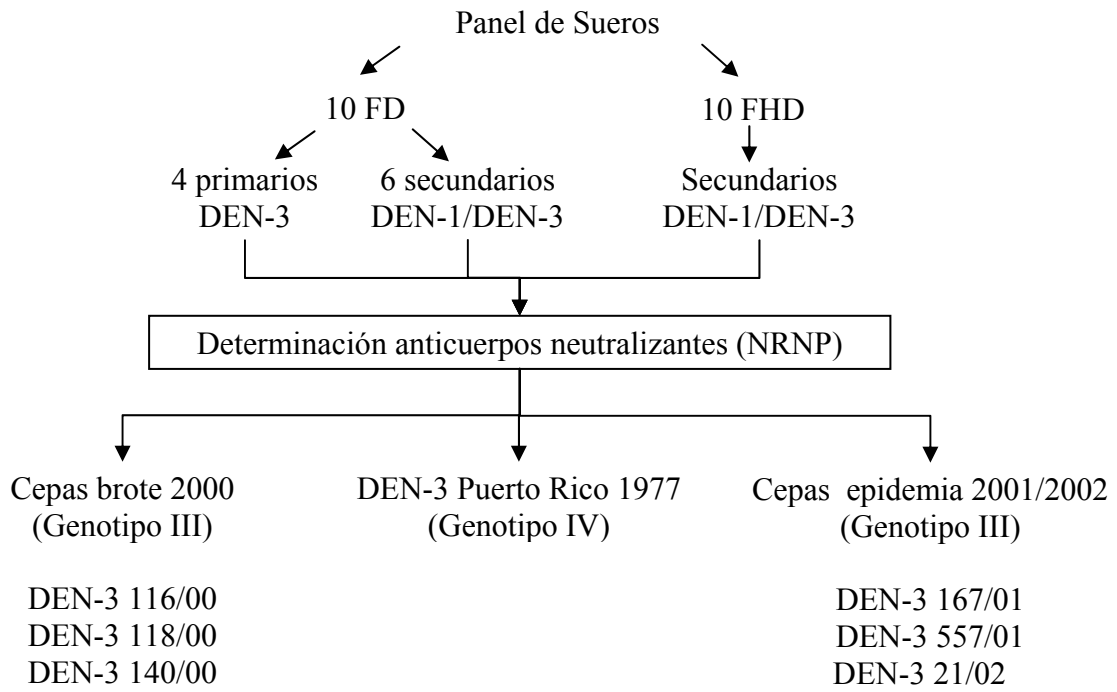
^d: Rodríguez-Roche, Alvarez et al. 2005 (199)

^e: Uzcategui, Comach et al. 2003 (200)

3.5.3. Análisis Estadístico

Los resultados se muestran en las tablas y gráficos confeccionados al efecto. El TPG de anticuerpos se calculó mediante la media geométrica de los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos en cada experimento. Para la comparación de los TPG de anticuerpos se aplicó una transformación de escala (transformación logarítmica) a cada uno de los valores para llevarlos a una distribución normal y se calculó la media aritmética. En la comparación de las medias se aplicó un análisis paramétrico (prueba T) mediante el programa GraphPad Prim 2.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Flujo de Trabajo



3.6. Cinética de anticuerpos neutralizantes y su relación con la viremia en 22 pacientes de la Epidemia Cubana 2001-2002

3.6.1. Pacientes y muestras de suero

En este estudio se incluyeron muestras de suero colectadas de 22 pacientes adultos, cubanos, que desarrollaron FD (n=19) y FHD (n=3) durante la epidemia de virus DEN-3 del 2001-2002. En los mismos el diagnóstico clínico de la enfermedad se confirmó mediante la determinación de anticuerpos IgM a virus DEN en la muestra de suero colectada entre el 5to-7mo día de la fiebre mediante el ELISA de Captura de IgM, (178, 195) descrito en el acápite III.3.2.

Los pacientes fueron sangrados diariamente desde su ingreso al hospital generalmente en el segundo o tercer día de comienzo de la fiebre hasta el día del egreso (aproximadamente día ocho). A los mismos se les realizó una última extracción 15 a 30 días después en consulta ambulatoria.

La tabla 3 muestra las características generales de los pacientes. Los casos habían sido previamente clasificados según el tipo de infección en primarios o secundarios (192) .

Tabla 3. Datos de los pacientes incluidos en el estudio

| Tipo de infección | Cuadro clínico | No. pacientes | Grupo de edad | Género (No. sexo F) | Grupo de estudio |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------|
| Primaria | FD | 4 | 21-39 | 2 | FD primario |
| Secundaria | FD | 15 | 26-58 | 6 | FD secundario |
| | FHD | 3 | 29-54 | 3 | FHD |

F: Femenino

3.6.2. Estudios serológicos

3.6.2.1. Elisa de Captura de IgM (CAM-ELISA)

La detección de anticuerpos IgM a virus dengue se realizó en todos los casos que fue necesario, siguiendo el protocolo de Técnicas del Laboratorio de Arbovirus según las modificaciones realizadas por Vázquez y cols (195).

3.6.2.2. Detección de anticuerpos IgG y neutralizantes

Se determinó el título de anticuerpos IgG mediante MEI siguiendo el protocolo descrito en los acápites III.2.3.1. La presencia de anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos del virus se realizó mediante NRNP siguiendo el protocolo descrito en el acápite III.2.3.2. En este acápite se empleó el método 2 en la determinación del título de anticuerpos neutralizantes en los grupos estudiados.

- Células empleadas

Para el desarrollo de este objetivo, se emplearon las células C6/36 HT y BHK21. La preparación de las mismas ha sido descrita en el acápite III.2.1.

- Cepas virales de los cuatro serotipos empleadas en la NRNP

Las cepas virales empleadas en la NRNP se muestran en la Tabla 1 del acápite III.2.4. Se empleó el método 2 en la determinación del título de anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos.

3.6.3. Presentación de los resultados

El análisis de los resultados fue realizado a través de la comparación de los pacientes según el tipo de infección (primaria o secundaria) y la clasificación clínica de la enfermedad (FD y FHD). Adicionalmente, en determinadas ocasiones se compararon las variables estudiadas entre pacientes de FD con infección primaria y secundaria.

Los valores cinéticos de anticuerpos neutralizantes específicos a virus DEN fueron presentados como el título promedio geométrico (TPG) de anticuerpos neutralizantes en los pacientes con infección primaria o secundaria. Los resultados de duración media de la viremia fueron presentados como la media y la desviación estándar (DS) de los datos de cada grupo analizado. Así, pueden realizarse las comparaciones entre los grupos teniendo en cuenta el rango en que oscilaron los valores.

3.6.4. Definiciones

La viremia en suero fue mostrada como el log₁₀ del título viral.

El primer día de la enfermedad fue el día de comienzo de la fiebre.

La duración de la viremia fue determinada asumiendo que cada paciente estaba en fase virémica desde el día de comienzo de la enfermedad hasta el último día en que el virus fue detectado. Por ejemplo, si la última muestra positiva de un paciente fue la colectada el 5to día de la enfermedad, la duración de la viremia fue de cinco días.

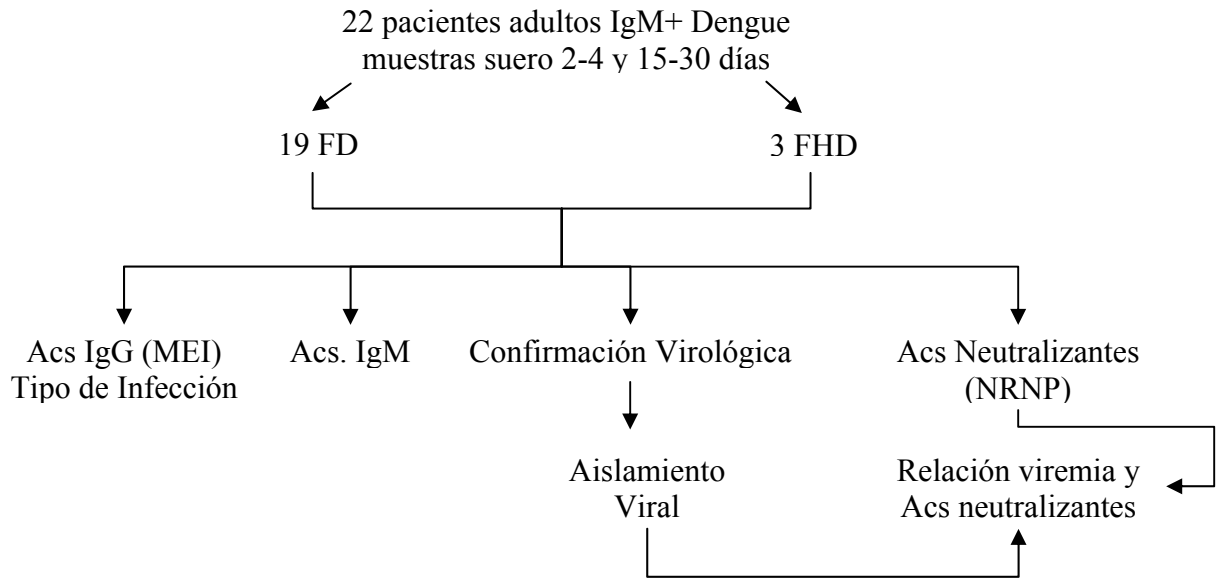
Cuando la viremia no fue detectada por el aislamiento viral, se asumirá la duración de la viremia como 0.

A los efectos del presente estudio, los casos con una infección secundaria según los resultados del MEI, serán nominados como tal aunque no se descarta que hayan desarrollado una infección terciaria.

3.6.5. Análisis de los resultados

Este fue un estudio descriptivo en el cual no fueron aplicados métodos estadísticos por la baja proporción de pacientes con infección primaria (n=4) y con FHD (n=3).

Flujo de Trabajo



RESULTADOS Y DISCUSION

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Caracterización de la infección secundaria en la Epidemia Cubana de virus DEN-2 de 1997

En la epidemia cubana de virus DEN-2 ocurrida en el año 1981, la infección secundaria constituyó el factor de riesgo principal para el desarrollo de la forma severa de la enfermedad con un intervalo de 2-4 años entre la infección primaria (por virus DEN-1) y la secundaria. En la misma no se reportaron niños de 1-2 años con la forma grave de la enfermedad posiblemente porque en ese momento sufrían la infección primaria por DEN-2 (no estaban nacidos en el momento en que ocurre la epidemia de DEN-1 de 1977-1979) (8, 9).

Después de la epidemia de 1981 un estudio retrospectivo realizado en el municipio Cerro de la capital del país demostró que el 17.6 % de los individuos estudiados eran inmunes a los virus DEN-1 y DEN-2 y se observó una mayor asociación de la infección secundaria a la forma severa de la enfermedad en los niños que en los adultos (195).

Durante la epidemia de DEN-2 de 1997, se reportaron casos de dengue hemorrágico. Dada las observaciones iniciales realizadas en Cuba en 1981 y los reportes internacionales al respecto (6, 7, 193, 201-203), era de interés conocer si la infección secundaria fue un factor de riesgo de la enfermedad en estas situaciones epidemiológicas recientes. Aún más, fue de gran interés conocer si existe un tiempo límite para la sensibilización, luego de una infección primaria. Para evaluar si la infección secundaria se asoció al dengue hemorrágico durante esta epidemia ocurrida después de más de 20 años de la primoinfección se estudiaron un grupo de muestras de FD y FHD. En los sueros confirmados de casos de FD Y FHD se observó que el 92% de los primeros y el 98% de los segundos desarrollaron una infección secundaria DEN-1/DEN-2. Estos resultados sugieren la asociación de la infección secundaria con el cuadro severo de la enfermedad teniendo en cuenta que los casos de FHD estudiados representan el 52,6 % del total de casos reportados durante la epidemia que evolucionaron favorablemente.

Para profundizar aún más en esta asociación, se estudiaron las muestras procedentes de los casos de FHD que fallecieron durante la epidemia de DEN-2 de 1997. Dada la importancia

de este grupo de pacientes, se realizaron estudios virológicos, serológicos y moleculares en muestras de los mismos con el objetivo de confirmar el diagnóstico clínico asegurando que fallecieron por dengue hemorrágico. La tabla 4 muestra los principales hallazgos virológicos y moleculares obtenidos. El virus DEN-2 fue detectado por aislamiento viral en las 12 muestras de suero (100%) de los pacientes y por RCP fue detectado en 17 muestras de tejidos de las 21 probadas (en 9 muestras de hígado, en 6 muestras de Bazo y en 2 muestras de riñón) para un 80.9% de positividad. Por su parte en estas muestras procedentes de tejidos se logró el aislamiento en 12/28 (42.8%). Los anticuerpos IgM anti-dengue fueron detectados en 11 (91.6%) de los casos. En el paciente en que no se detectaron anticuerpos IgM, el diagnóstico virológico se confirmó por el aislamiento viral y por la determinación de virus DEN-2 por RCP en una muestra de bazo. Los resultados obtenidos confirmaron la infección por virus DEN-2 en todos los fallecidos.

Tabla 4. Porcentaje de Aislamiento y de RCP positiva en las muestras procesadas de fallecidos por FHD/SCD, Santiago de Cuba, 1997

| Especímenes | Aislamiento Viral Positivos/Total (%) | RCP Positivos/Total (%) |
|--------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|
| Hígado | 5/10 (50.0) | 9/10 (90.0) |
| Bazo | 3/9 (33.3) | 6/7 (85.7) |
| Riñón | 1/3 (33.3) | 2/2 (100) |
| Cerebro | 1/1 (100) | - |
| Corazón | 1/3 (33.3) | 0/1 (-) |
| Pulmón | 1/2 (50.0) | 0/1 (-) |
| Total | 12/28 (42.8) | 17/21 (80.9) |

Los estudios serológicos de los 12 casos fatales demostraron la infección secundaria en el 91.6% de los mismos (11 casos). El caso en el cual no se detectó la presencia de anticuerpos IgM, presentaba al día 4to de la fiebre un título de anticuerpos IgG de 1:320. Títulos de anticuerpos IgG ≥ 10240 son considerados como criterio de infección secundaria (204). No obstante la presencia de títulos de anticuerpos 1/320 al 4to día de la

enfermedad pudiera relacionarse a una infección secundaria dado que en los casos primarios la elevación de los anticuerpos IgG ocurre tardíamente (después del 7mo día) (205).

Los resultados obtenidos apoyan el papel de la infección secundaria como factor de riesgo que conllevó a la forma grave de la enfermedad durante esta epidemia.

Fue llamativo que todos los casos de FHD reportados ocurrieron en adultos observándose sólo un caso en un joven de 17 años. Teniendo en cuenta que en el período 1982-1996 no hubo transmisión de dengue en nuestro país y que una parte de la población adulta de Santiago de Cuba era inmune a virus DEN-1, por lo que era de esperarse que estos estaban a riesgo de sufrir una infección secundaria y que los casos severos se reportarían en adultos. Los resultados serológicos obtenidos en el estudio de pacientes con FHD (de evolución satisfactoria y fallecidos) demuestran que la infección secundaria se observó en el 97.5% de los casos estudiados que representan el 60% de los 205 casos de FHD reportados en Santiago de Cuba en 1997. Estos resultados apoyan el papel de la infección secundaria como factor de riesgo de severidad del cuadro clínico y están acordes con las observaciones epidemiológicas previas (15, 193, 202).

Por años la FHD ha sido considerada una enfermedad de niños, sin embargo en la epidemia cubana de 1997 el promedio de edad de los pacientes fue de 40 años, muy diferente a estudios previos (206, 207) realizados en áreas endémicas como Indonesia y Tailandia donde los pacientes de FHD son menores de 15 años (7). Se considera que la elevada endemia en estos países ha provocado que los niños durante su infancia se pongan en contacto con varios serotipos del virus DEN y de esta forma cuando llegan a adultos ya son inmunes a 3 o 4 serotipos. Por otra parte estudios posteriores a estos realizados en Brasil reportan la ocurrencia de casos de FHD en adultos (208), lo que está en correspondencia con los resultados nuestros.

Durante la epidemia de 1997, se reportaron 3012 casos confirmados por dengue de los que 195 (0.05%) eran niños y sólo uno de estos presentó el cuadro severo de la enfermedad en el cual se demostró la infección primaria por DEN (209).

Aunque los antecedentes epidemiológicos en nuestro país, con anterioridad a 1997, sugerían que los individuos nacidos con posterioridad a 1981 estaban a riesgo de sufrir una infección primaria por virus DEN, era de interés corroborar esta observación. Para ello,

estudiamos una muestra de 205 niños sanos en los que se investigó la presencia de anticuerpos a virus DEN y se determinó el tipo de infección.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de los 205 niños (tabla 5) debemos esperar que aproximadamente 2401 de la población infantil de Santiago de Cuba al momento de la epidemia se infectaron por virus DEN, no obstante, de acuerdo a los datos obtenidos a través de la vigilancia clínico epidemiológica y de laboratorio, sólo en 195 niños se corroboró la infección por virus DEN. Teniendo en cuenta las acciones de vigilancia activa realizadas durante esta epidemia donde la búsqueda casa a casa de casos febriles fue una premisa, debemos esperar que la mayoría de los niños infectados por virus DEN-2 en 1997 desarrollaran una infección asintomática en el curso de una infección primaria por virus DEN-2.

Tabla 5. Distribución de anticuerpos neutralizantes a DEN-2 en los niños sanos (edades 1-16 años), Santiago de Cuba, 1997

| Grupo de edades (años) | Número de Muestras | Anticuerpos a DEN-2 | Porcentaje (%) |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 1-4 | 47 | 1 | 2.12 |
| 5-9 | 82 | 0 | 0 |
| 10-14 | 71 | 1 | 1.4 |
| 15-16 | 5 | 0 | 0 |
| Total | 205 | 2 | 0.97 |

El 92% de los pacientes adultos con FD estudiados desarrolló una infección secundaria por virus DEN-2. Aunque esta muestra fue seleccionada al azar, los resultados obtenidos sugieren que la infección secundaria también se comportó como un factor de riesgo de desarrollo de la enfermedad, en este caso para la FD. Solo el 8% eran casos con una infección primaria. Tomando en conjunto, los resultados obtenidos en niños y adultos sugieren que la infección primaria al menos, por esta cepa de virus DEN-2, se comportó prácticamente silente a diferencia de la secundaria. Los resultados obtenidos en la encuesta

seroepidemiológica a virus dengue realizada en el municipio de Santiago de Cuba con posterioridad a 1997 confirmaron estas observaciones (11).

La secuencia de infección documentada en todos los pacientes estudiados fue DEN-1/DEN-2, la cual se esperaba de acuerdo a la situación epidemiológica del país en ese momento en la cual sólo dos serotipos DEN-1 y DEN-2 habían circulado. Esta secuencia de infección es una de las más frecuentemente asociadas a casos de FHD (210) y fue similar a la reportada durante la epidemia de 1981.

La observación de casos de FHD en el transcurso de una infección secundaria por DEN-2 después de 20 años de la infección primaria por DEN-1 demostrada aquí es un hecho nuevo no reportado con anterioridad en la historia global del DEN. Posiblemente la hiperendemicidad observada en los países del Sudeste Asiático no ha permitido documentar esta observación con anterioridad (7). Estudios previos han sugerido que el riesgo de desarrollo de FHD está limitado a las infecciones secundarias ocurridas en los cinco años de la primoinfección (211). Los resultados obtenidos aquí están en total contradicción con esta hipótesis y sugieren que no hay límites en la sensibilización que sigue a una infección primaria al menos en la secuencia de infección DEN-1/DEN-2. Este fenómeno pudiera estar asociado al desarrollo de la ADA tema estudiado a mayor profundidad posteriormente, en el acápite IV.4.2.

La mayor replicación viral y de ahí el mayor número de células infectadas, se ha sugerido como uno de los factores principales que determinan la severidad de la enfermedad. Particularmente, se plantea que de desarrollarse el fenómeno de la ADA en el transcurso de una infección secundaria, se facilita la infección de un mayor número de células. Vaughn y cols, (212) y Wang y cols (213), observaron una mayor viremia en casos de FHD con relación a casos de FD y la asociaron a la infección secundaria. Aunque en el caso de los fallecidos de Santiago de Cuba el número de células infectadas en los tejidos no se conoce, la presencia de virus en diferentes tejidos en un mismo paciente en el momento del fallecimiento sugiere una replicación viral amplia y elevada y posiblemente un daño mayor. Es de señalar que otros autores han reportado una baja frecuencia de aislamiento de virus DEN en muestras de tejidos (205).

Varios autores han señalado que la infección secundaria es el principal factor de riesgo de FHD/SCD y que dicho riesgo se incrementa 15 veces cuando el segundo serotipo es el DEN-2 (7, 15, 210). Ambas condiciones se cumplieron en el caso de Santiago Cuba.

4.2. Caracterización de las infecciones secundarias y terciarias en la Epidemia Cubana de Dengue 3, (2001/2002). Influencia de las secuencias de infección virales en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad

En la epidemia cubana de DEN-3 del 2001/2002 se reportaron 78 casos de FHD adultos. Considerando el desarrollo del cuadro severo de la enfermedad en el curso de una infección por virus DEN-3 era de interés estudiar también en esta epidemia la posible asociación de la infección secundaria a la FHD y el estudio de las secuencias de infección involucradas en el desarrollo del cuadro severo de la enfermedad.

Para el desarrollo de esta investigación se estudiaron muestras de 57 pacientes (73.2%) con un diagnóstico clínico de FHD. En el 100% de los mismos se demostró la infección por más de un tipo de DEN lo que sugiere que también en estas nuevas condiciones epidemiológicas, la infección por más de un serotipo del virus se asoció al cuadro severo de la enfermedad.

Con el objetivo de investigar el desarrollo de los anticuerpos neutralizantes en la etapa aguda de la enfermedad, se determinó la presencia de los mismos en muestras seriadas de seis pacientes con infección documentada por DEN-3 quienes fueron hospitalizados durante la Epidemia del 2001/2002, 3 de los cuales se clasificaron como FD y 3 como FHD. Estos pacientes ingresaron al comienzo de la enfermedad y fueron sangrados en varios días consecutivos. La Tabla 6 muestra los resultados serológicos obtenidos.

Tabla 6. Resultados virológicos y serológicos en 6 pacientes de la epidemia 2001/2002

| No Caso | DCE | Aisl. | PCR | IgM* | IgG** | NRNP ₅₀ Titulo Reciproco*** | | | | Patrón Inmunológico |
|---------|-----|--------|--------|-------|-------|----------------------------------------|------|------|-----|---------------------------------------------|
| | | | | | | D1 | D2 | D3 | D4 | |
| 1 (FHD) | 3 | DEN- 3 | DEN -3 | 0,95 | 40 | 42 | <10 | <10 | <10 | “Anticuerpos Monovalentes a DEN -1 ” |
| | 4 | | | 10,9 | 5120 | 100 | 190 | 42 | 33 | |
| | 5 | | | 2,9 | 5120 | 130 | 44 | 120 | 17 | |
| | 6 | | | 13,6 | 20480 | 1700 | 5600 | 3300 | 60 | |
| | 7 | | | 4 | 40960 | 760 | 960 | 740 | 120 | |
| | 21 | | | 2,8 | 20480 | 390 | 780 | 760 | 210 | |
| 2 (FHD) | 3 | DEN- 3 | DEN- 3 | 1,81 | 160 | 39 | 35 | <10 | <10 | “Anticuerpos Bivalentes a DEN-1 y DEN-2 ” |
| | 4 | DEN- 3 | DEN- 3 | 2,1 | 2560 | 390 | 74 | <10 | <10 | |
| | 5 | | | 16,3 | 20480 | 2500 | 420 | 330 | 22 | |
| | 6 | | | 15,8 | 2560 | 120 | 340 | Es | <10 | |
| | 7 | | | 16,8 | 40960 | 620 | 490 | 1200 | <10 | |
| | 8 | | | 16,4 | 40960 | 270 | 740 | 290 | 37 | |
| 21 | | | 5 | 5120 | 3600 | 410 | 300 | 60 | | |
| 3(FHD) | 3 | DEN- 3 | DEN- 3 | 1,08 | 40 | 58 | 150 | <10 | <10 | “Anticuerpos Bivalentes a DEN- 1 y DEN -2 ” |
| | 4 | DEN- 3 | DEN- 3 | 1,44 | 320 | 180 | 110 | <10 | <10 | |
| | 5 | | | 13,8 | 20480 | 1100 | 410 | 470 | <10 | |
| | 6 | | | 6,9 | 5120 | 680 | 760 | 820 | <10 | |
| | 7 | | | 7,7 | 20480 | 3300 | 540 | 2700 | <10 | |
| | 8 | | | 7,9 | 10240 | 2000 | 540 | 1700 | <10 | |
| 21 | | | 5,2 | 10240 | 500 | 330 | 60 | <10 | | |

* DO IgM valor de corte, **Recíproco del título de anticuerpos.

DCE: Días de comienzo de la enfermedad

Tabla 6. Resultados virológicos y serológicos en 6 pacientes de la epidemia 2001/2002 (Continuación)

| No Caso | DCE | Aisl. | PCR | IgM* | IgG** | NRNP ₅₀ Titulo Reciproco*** | | | | Patrón Inmunológico |
|------------|-----|--------|--------|------|-------|----------------------------------------|------|------|-----|---------------------------------------------------------------------------------|
| | | | | | | D1 | D2 | D3 | D4 | |
| 4(FD) | 3 | DEN- 3 | DEN- 3 | 1,44 | 40 | 11 | <10 | <10 | <10 | “Anticuerpos Monovalentes a DEN-1 ” |
| | 4 | DEN- 3 | DEN- 3 | 5,71 | 1280 | 26 | 42 | 18 | <10 | |
| | 5 | | | 11,1 | 5120 | 92 | 260 | 330 | 19 | |
| | 6 | | | 14,1 | 10240 | 420 | 560 | 330 | 86 | |
| | 7 | | | 13,5 | 40960 | 450 | 580 | 510 | 180 | |
| | 8 | | | 13,2 | 20480 | 4800 | 1000 | 1800 | 140 | |
| 5 (FD) | 3 | DEN- 3 | DEN- 3 | 1,67 | 20 | 22 | <10 | <10 | <10 | “Anticuerpos Monovalentes a DEN-1 ” |
| | 4 | DEN- 3 | DEN- 3 | 1,7 | 80 | 54 | <10 | <10 | <10 | |
| | 5 | | | 3,17 | 640 | 100 | 12 | 200 | <10 | |
| | 6 | | | 7 | 2560 | 100 | 230 | 620 | 12 | |
| | 7 | | | 9,8 | 10240 | 1300 | 240 | 2600 | <10 | |
| | 8 | | | 10,4 | 20480 | 150 | 420 | 1000 | <10 | |
| | 21 | | | 5,52 | 20480 | 210 | 740 | 1800 | <10 | |
| 6(FD) | 3 | DEN- 3 | DEN- 3 | 3,43 | 320 | 60 | 10 | 130 | <10 | “Anticuerpos neutralizantes predominantemente contra DEN-1 y DEN-3” |
| | 4 | DEN- 3 | DEN- 3 | 8,9 | 1280 | 490 | 64 | 540 | <10 | |
| | 5 | | | 13,8 | 10240 | 540 | 700 | 640 | <10 | |
| | 6 | | | 15,1 | 20480 | 1200 | 390 | 370 | <10 | |
| | 7 | | | 15,1 | 40960 | 120 | 1200 | 1000 | <10 | |
| | 8 | | | 14,9 | 20480 | 350 | 540 | 1600 | <10 | |

* DO IgM valor de corte, **Recíproco del título de anticuerpos.

DCE: Días de comienzo de la enfermedad

Dada la especificidad de los anticuerpos neutralizantes a un virus conocido que circuló previamente en el país, es lógico asumir que los anticuerpos que encontraríamos en esta primera fase de la enfermedad se correspondan con los desarrollados durante la infección primaria. De los sueros evaluados, 3 (1, 4 y 5) tenían anticuerpos monovalentes a virus DEN-1. Los otros 2 casos (2 y 3) presentaban un patrón de anticuerpos heterotípicos al 3er día de la enfermedad que recordaba al observado en el día 4 en los casos anteriores que presentaban anticuerpos monovalentes a virus DEN-1. El sexto caso tenía anticuerpos a los virus DEN-1 y DEN-3, un patrón encontrado al 5to día en otro caso de esta serie (caso 5). Asumiendo que la cinética de la respuesta inmune difiere entre individuos, la aparición temprana de los anticuerpos a DEN-1 y DEN-2 es consistente con la respuesta normal de anticuerpos heterovalente que sigue a la infección por virus DEN-3 en individuos inmunes a virus DEN-1.

En la Tabla 7 se muestran los títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros colectados en la fase aguda y convaleciente tardía en 17 casos de FHD/SCD. En 11 de los sueros (64,7%) colectados tardíamente no se detectaron títulos de anticuerpos neutralizantes a virus DEN-2. Los mismos se clasificaron como casos con una infección secundaria DEN-1/DEN-3. Seis casos (35,3%) que presentaban títulos de anticuerpos neutralizantes $\geq 1/30$ a virus DEN-2, se clasificaron como casos de infección terciaria por virus DEN-3.

En 37 casos adicionales de FHD/SCD pudo colectarse una muestra entre 18-24 meses después del desarrollo la enfermedad. Tres de estos (8,1%) casos mostraron un patrón de infección primaria por virus DEN-3, 30 (81,1%) mostraron anticuerpos neutralizantes a los virus DEN-1 y DEN-3 sugestivos de una infección secundaria y 4 (10,8%) presentaron anticuerpos a los virus DEN-1, DEN-2 y DEN-3 sugestivos de una infección terciaria. Estos mostraron títulos de anticuerpos elevados a los serotipos DEN-1, DEN-2 y DEN-3. Ninguno de los sueros estudiados sugirió la infección en la secuencia de virus DEN-2/DEN-3. Las secuencias de infección observadas para estos casos se ejemplifican en la tabla 8.

Tabla 7. Título de Anticuerpos Neutralizantes a los virus DEN-1 – 4 en sueros agudos y postconvalescientes obtenidos de 17 pacientes adultos hospitalizados con FHD/SCD en la ciudad de La Habana, 2001-2002

| No. Caso | FCS | TCS | NRNP ₅₀ Título Recíproco | | | | Interpretación |
|----------|----------|-------|-------------------------------------|-------|-------|-------|------------------------------------------|
| | | | DEN 1 | DEN 2 | DEN 3 | DEN 4 | |
| 32522 | 23/9/01 | 3 d | >1000 | 13 | >1000 | 50 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| | | 16 m | 240 | 22 | 68 | <10 | |
| 31951 | 17/11/01 | 4 d | >1000 | 200 | 70 | 310 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| | | 17 m | >1000 | 12 | 25 | <10 | |
| 34064 | 1/12/01 | 4 d | 170 | <10 | 10 | <10 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| | | 17 m | 160 | <10 | 110 | <10 | |
| 34063 | 30/11/01 | 5 d | 800 | 39 | 100 | 17 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| | | 17 m | 410 | 17 | 60 | <10 | |
| 34698 | 5/12/01 | 5 d | 100 | 490 | >1000 | 180 | “ Infección Terciaria DEN-1/DEN-2/DEN-3” |
| | | 16 m | 400 | 70 | 700 | <10 | |
| 35345 | 6/12/01 | 5 día | >1000 | 210 | 820 | 98 | “ Infección Terciaria DEN-1/-2/-3??” |
| | | 17 m | 360 | 42 | 90 | <10 | |
| 35753 | 7/12/01 | 5 d | >1000 | 170 | >1000 | <10 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| | | 17 m | 400 | 21 | 300 | <10 | |
| 35756 | 8/12/01 | 5 d | >1000 | <10 | >1000 | <10 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| | | 17 m | 92 | 10 | 170 | <10 | |
| 30574 | 31/12/01 | 5 d | 540 | 47 | 430 | 44 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| | | 17 m | 160 | 16 | 110 | <10 | |
| 30619 | 17/11/01 | 5 d | >1000 | >1000 | >1000 | 240 | “ Infección Terciaria DEN-1/DEN-2/DEN-3” |
| | | 17 m | >1000 | 80 | 250 | 12 | |
| 1067 | 3/1/02 | 5 d | >1000 | 19 | 420 | 90 | “Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| | | 17 m | 140 | <10 | 160 | <10 | |
| 33659 | 30/11/01 | 6 d | >1000 | 68 | 150 | 52 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| | | 17 m | 250 | 12 | 42 | <10 | |
| 35999 | 9/12/01 | 6 d | 10 | <10 | <10 | <10 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| | | 17 m | 780 | 15 | 88 | <10 | |
| 37733 | 6/12/01 | 6 d | >1000 | 450 | >1000 | 220 | “Infección Terciaria DEN-1/DEN-2/DEN-3” |
| | | 17 m | 560 | 35 | 150 | <10 | |
| 30576 | 7/12/01 | 6 d | >1000 | 140 | >1000 | <10 | “ Infección Terciaria DEN-1/DEN-2/DEN-3” |
| | | 19 m | 130 | 44 | 15 | <10 | |
| 29960 | 4/11/01 | 7 d | >1000 | 80 | 490 | 98 | |

| | | | | | | | |
|-------|----------|-------------|--------------|------------|-----------|------------|------------------------------------------------|
| | | 18 m | 250 | 30 | 260 | <10 | “Infección Terciaria DEN-1/DEN- 2/DEN-3” |
| 36687 | 13/12/01 | 7 d 19 m | >1000 170 | <10 <10 | 64 100 | <10 <10 | “Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |

FCS: fecha de comienzo de los síntomas, d: días, m: meses, TCS: tiempo de comienzo de los síntomas

Tabla 8. Título de Anticuerpos Neutralizantes a los virus DEN-1-4 en una selección de los sueros convalecientes tardíos de 37 pacientes adultos hospitalizados con FHD/SCD en la ciudad de La Habana, 2001-2002

| No Caso | FCS | TCS | NRNP ₅₀ Título Reciproco | | | | Interpretación |
|------------|----------|------|-------------------------------------|-------|-------|-------|------------------------------------------------|
| | | | DEN 1 | DEN 2 | DEN 3 | DEN 4 | |
| 32521 | 23/9/01 | 15 m | 240 | 22 | 68 | <10 | “Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| 30904 | 10/11/01 | 17 m | 330 | 10 | 340 | <10 | “Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| 15533 | 5/09/01 | 20 m | 110 | <10 | 76 | <10 | “Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| 18496 | 19/9/01 | 21 m | 2000 | 27 | 80 | <10 | “Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| 147 | 16/10/01 | 20 m | 360 | 11 | 66 | <10 | “Infección secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| 33325 | 24/11/01 | 21 m | 800 | <10 | 230 | <10 | “Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| 443 | 21/9/01 | 29 m | 170 | 40 | 90 | <10 | “Infección Terciaria DEN1-2-3” |
| 33851 | 28/11/01 | 18 m | 740 | 52 | 260 | 18 | “Infección Terciaria DEN-1/DEN-2/DEN- 3” |
| 37710 | 21/12/01 | 18 m | 1000 | 100 | 58 | 14 | “Infección Terciaria DEN-1/DEN-2/DEN- 3” |
| 32690 | 21/11/01 | 27 m | 640 | 40 | 170 | <10 | “Infección Terciaria DEN-1/DEN-2/DEN- 3” |

FCS: Fecha de comienzo de los síntomas

TCS: Tiempo de comienzo de los síntomas

m: meses

Es conocido por estudios epidemiológicos que los residentes en la ciudad de La Habana pudieran ser inmunes a 3 de los 4 serotipos del virus DEN, previo a la circulación del DEN-3 en la Epidemia 2001/2002. El virus DEN-1 circuló en esta provincia durante el período 1977-79 mientras que el virus DEN-2 circuló en 1981 y en algún momento durante o antes de 1945. En el 2000 ocurrió un pequeño brote de virus DEN-4 y DEN-3 en 2 áreas de salud de esta provincia. Debido a la circulación previa de los serotipos DEN-1 y DEN-2 en esta provincia, existen varias posibilidades de secuencia de infección en los individuos que se infectaron por virus DEN-3 en la epidemia del 2001/2002: 1) Individuos sin anticuerpos a Flavivirus , 2) Individuos inmunes a virus DEN-1 , 3) Individuos inmunes a virus DEN-2 debido a la epidemia de 1981, 4) Individuos inmunes a virus DEN-2 debido al brote de 1945, 5) Individuos inmunes a virus DEN-4 debido al brote del 2000, 6) Individuos inmunes a DEN-1 infectados por DEN-2 en 1981, 7) Individuos inmunes a virus DEN-1 infectados por virus DEN-2 en 1940 o previamente, 8) Individuos inmunes a virus DEN-1 y que previamente fueron infectados por virus DEN-2 y DEN-4. En las muestras estudiadas, hay sólo un individuo que tiene posibilidades de haberse infectado en 1945, una mujer de 65 años con anticuerpos neutralizantes a virus DEN-1 y a DEN-3. Del total de casos de FHD/SCD reportados durante la epidemia sólo 5 tenían más de 60 años y por tanto, tuvieron oportunidad de sufrir la infección en 1945.

De los 78 pacientes con FHD/SCD reportados en la Epidemia del 2001/2002, 75 estuvieron hospitalizados en nuestra institución, lo que nos permitió estudiar la respuesta serológica de los mismos, en muestras colectadas durante la hospitalización y en un pequeño grupo pudimos intentar reconstruir la historia de infección.

Conociendo que la respuesta de anticuerpos neutralizantes se hace más específica con el tiempo decidimos estudiar la respuesta de anticuerpos neutralizantes en sueros obtenidos 18-24 meses después del comienzo de la enfermedad. Once de los 17 individuos donde pudimos estudiar sus pares de suero mostraron un patrón de anticuerpos neutralizantes sugestivo de una infección DEN-1/ DEN-3. Seis individuos tenían títulos elevados de anticuerpos a los virus DEN-1 y DEN-3 y títulos de 1:30 o mayores a virus DEN-2. Estos resultados sugieren una infección pasada por virus DEN-1 y DEN-2 previo a la infección por virus DEN-3. Aunque no podemos descartar que estos casos pudieran representar

también el espectro de anticuerpos neutralizantes heterovalente más alto producido después de dos infecciones por virus DEN. Resultados similares fueron obtenidos en 37 sueros colectados de casos de FHD en etapa convaleciente tardía. En estos, 30 casos desarrollaron una infección secundaria y 4 una infección terciaria por virus DEN-3.

En 40 sueros colectados en etapa convaleciente tardía de casos de FD infectados por virus DEN-3 durante esta misma epidemia del 2001-2002 el patrón de anticuerpos neutralizantes indica claramente una infección previa por DEN-1 en un 45 %, con DEN-2 en un 15% y con DEN-1 y DEN-2 seguido por DEN-3 en un 15%. Se encontraron 6 casos primarios DEN-3 (15%) y 34 casos (85%) secundarios. De estos 34, 22 (55%) presentaron la secuencia DEN-1/DEN-3, 6 fueron terciarios (15%) DEN-1/DEN-2/DEN-3 y 6 (15%) la secuencia DEN-2/DEN-3. Esto sugiere que la secuencia de infección primaria por virus DEN-2 seguida por virus DEN-3 estuvo limitada a los casos de FD. La Tabla 9 presenta ejemplos donde se aprecian las 3 secuencias de infección encontradas.

Tabla 9. Título de Anticuerpos Neutralizante a los virus DEN 1– 4 en sueros convalecientes tardíos de 10 pacientes adultos seleccionados de los hospitalizados con FD en la ciudad de La Habana, 2001-2002

| No Caso | TCS | NRNP ₅₀ Título Recíproco | | | | Interpretación |
|---------|-------|-------------------------------------|-------|-------|-------|--------------------------------------|
| | | DEN 1 | DEN 2 | DEN 3 | DEN 4 | |
| 1 | >20 m | 120 | 23 | 56 | <10 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| 2 | >20 m | 250 | 16 | 350 | <10 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| 3 | >20 m | 240 | 24 | 80 | <10 | “ Infección Secundaria DEN-1/DEN-3 ” |
| 4 | >20 m | 18 | 45 | 60 | <10 | “ Infección Secundaria DEN-2/DEN-3 ” |
| 5 | >20 m | <10 | 54 | 80 | <10 | “ Infección Secundaria DEN-2/DEN-3 ” |
| 6 | >20 m | 18 | 78 | 360 | <10 | “ Infección Secundaria DEN-2/DEN-3 ” |
| 7 | >20 m | 27 | 39 | 84 | <10 | “ Infección Secundaria DEN-2/DEN-3 ” |

| | | | | | | |
|----|-------|-----|-----|-----|-----|---------------------------------------------|
| 8 | >20 m | 130 | 160 | 60 | <10 | “ Infección Terciaria DEN-1/DEN-2/DEN-3” |
| 9 | >20 m | 270 | 78 | 150 | <10 | “ Infección Terciaria DEN-1/DEN-2/DEN-3” |
| 10 | >20 m | 250 | 140 | 390 | <10 | “ Infección Terciaria DEN-1/DEN-2/DEN-3” |

TCS: Tiempo de comienzo de los síntomas, m: meses

Los resultados obtenidos en el estudio de los casos de FD sugieren que algunos individuos pueden haber experimentado una infección por DEN-3 seguido a una infección previa por DEN-1 y DEN-2 (Infección Terciaria). Al comparar los porcentos de la secuencia de infección DEN-1/DEN-3 en los casos de FD y FHD observamos diferencias significativas para una $p < 0.005$ por el Método de χ^2 . La tabla 10 compara los porcentos de casos con infección primaria, secundaria y terciaria en las muestras colectadas en etapa convaleciente tardía de los casos de FD y FHD estudiados aquí.

Tabla 10. Porciento de infección primaria, secundaria y terciaria en las muestras convalecientes tardías (16-24 meses) de FD y FHD estudiadas

| Tipo de infección | Casos FD (%) | Casos FHD (%) |
|--------------------------|---------------------|----------------------|
| Infección Primaria | 6 (15%) | 3 (5.3%) |
| Infección Secundaria | 28 (70%) | 41 (77.2%) |
| Infección Terciaria | 6 (15%) | 10 (17.5%) |

La FHD y la FD son los 2 síndromes asociados a la enfermedad del dengue, aunque también es posible observar casos con fiebre indiferenciada. Como existen 4 serotipos del virus (DEN-1-DEN-2-DEN-3-DEN-4), infecciones primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias son teóricamente posibles (214).

Experiencias de Tailandia y más recientemente en Cuba expuestas anteriormente apoyan el papel de la infección secundaria por un serotipo diferente como factor de riesgo de importancia para la forma severa de la enfermedad. En estos 2 países, la FHD/SCD ha sido observada en el 2-4% de los individuos que sufrieron una infección de tipo secundaria (11, 15, 19, 157, 215).

Aunque la infección primaria por DEN induce una inmunidad protectora de por vida al serotipo infectante no existe una inmunidad protectora de reactividad cruzada contra los otros virus (216). Los individuos infectados por virus DEN sólo mantienen una protección corta (2-3 meses) frente a los restantes serotipos (217).

Durante la epidemia de 2001-2002, era de esperar que un número elevado de individuos desarrollaran una infección terciaria. Los adultos de la ciudad de La Habana previamente infectados durante las epidemias causadas por los virus DEN-1, 1977 y DEN-2, 1981 estaban en riesgo de sufrir una infección terciaria y de desarrollar una infección asintomática o un cuadro de dengue (FD o FHD). La infección terciaria (DEN-1/DEN-2/DEN-3) fue demostrada en 10 (17,5%) individuos con antecedentes de salud que sufrieron la forma severa de la enfermedad durante la epidemia y en 6 (15%) con la forma leve de la enfermedad, la FD.

Se ha sugerido que las infecciones terciarias o cuaternarias cursan en forma asintomática posiblemente debido a que la inmunidad a más de un serotipo induce una protección cruzada frente a los serotipos restantes (218). Estudios experimentales en monos también mostraron que la infección por un serotipo de dengue diferente confiere resistencia a la infección por un tercer serotipo (21). Por otra parte en un estudio prospectivo en niños realizado en Rayong, Tailandia se encontró que el 13.3% de los mismos tenían anticuerpos a 3 serotipos (Infección Terciaria). Este reporte está en correspondencia con el porcentaje encontrado por nosotros para la infección terciaria.

La situación epidemiológica cubana con relación al virus DEN permite estudiar con mayor exactitud este fenómeno. Los resultados obtenidos aquí sugieren que la infección terciaria pudiera constituir un factor de riesgo de FHD al menos en un porcentaje bajo de los individuos.

Observaciones recientes apoyan el desarrollo de la infección terciaria durante una infección por FD. Durante la reciente epidemia por virus DEN-4 ocurrida en la ciudad de La Habana en el 2006, se documentaron tres casos de FD por este virus que habían desarrollado la forma severa de la enfermedad (FHD) durante la epidemia del 2001-2002 en los que la infección secundaria DEN-1/DEN-3 había sido confirmada. (Comunicación Personal Dr. Daniel Gonzalez, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, 2007). Estas observaciones

apoyan el desarrollo de la enfermedad en el transcurso de una infección terciaria DEN-1/DEN-3/DEN-4.

En relación a la infección terciaria Halstead reportó en sus primeros trabajos viremia en infecciones terciarias en monos rhesus (219) y en su último artículo señala la documentación de casos de infección terciaria acompañando una infección con un tercer serotipo (176). No obstante todavía existen interrogantes en relación a que fracción del total de casos de FHD cursan una infección terciaria, así como que porcentaje de individuos inmunes a 3 serotipos serían susceptibles a una infección con un cuarto virus. Un estudio realizado recientemente con niños en Bangkok, Tailandia mostró que el número de niños hospitalizados por infecciones terciarias o cuaternarias fue extremadamente baja (0.08-0.8%) respectivamente (220).

Sin embargo nuestros resultados sugieren que una infección terciaria por dengue podría estar asociada a la forma severa de la enfermedad FHD/SCD y que este fenómeno puede ocurrir después de 24-25 años de la infección primaria. Estas observaciones representan otro reto en el curso de la enfermedad severa.

El estudio del 73 % de los casos de FHD/SCD reportados en la ciudad de La Habana en el 2001-2002 nos permite concluir que: a) La mayoría (94.7%) de los individuos con FHD por virus DEN-3 habían desarrollado previamente una infección primaria por virus DEN-1; b) La secuencia de infección DEN-1 seguida por DEN-3 ocurrida en un intervalo de 24 años resultó en un cuadro clínico de FHD/SCD; c) Aunque la secuencia DEN-2/DEN-3 fue capaz de inducir el cuadro de FD, no pudimos evidenciar la misma en los casos de FHD; c) La mayoría de los casos de FHD/SCD ocurrieron en personas infectadas con virus DEN-3 con antecedentes de infección secundaria DEN-1 /DEN-2 a partir de las epidemias de 1977-79 y de 1981 o del brote de 1945. Se requieren de otros estudios que permitan comprender el por qué las infecciones primarias por virus DEN-2 aparentemente no sensibilizan a los individuos a desarrollar la forma severa de la enfermedad. El desarrollo de casos de FHD/SCD por virus DEN-3 décadas después de la infección primaria por DEN-1 aporta nuevos conocimientos con relación a esta entidad. A su vez representa un reto mayor para el desarrollo de una vacuna protectora para dengue.

En nuestro estudio no encontramos asociación de la secuencia DEN-2/DEN-3 a los casos de FHD, a pesar de haber sido previamente reportada en este grupo de pacientes en

Tailandia (19). Si tenemos en cuenta la teoría multifactorial planteada por Kourí y colaboradores (15), podríamos pensar que es producto de una conjunción de factores virales, factores de riesgo individual y factores epidemiológicos. En relación a los factores virales, quizás el DEN-2 genotipo Asiático a pesar de no encontrarse en el mismo subcomplejo; comparta determinados epítopes comunes en el Dominio III de la envoltura con el DEN-3 genotipo Asiático de la epidemia del año 2001 provocando entonces un incremento en los anticuerpos neutralizantes debido a su replicación reducida y de esta forma se evita la aparición de la forma severa de la enfermedad, lo cual pueda estar dado por una similitud en los a.a del Dom III de la envoltura, fundamentalmente en el a.a K 305 y en el P 389. (Comunicación Personal Dr. Chin Juh-Lai, en el Evento Asiático de la Red de Dengue de la Iniciativa para la Vacuna Pediátrica en Dengue, 2007). Por otra parte ha sido planteado que un único cambio en el dominio III puede conllevar a un cambio en la neutralización (41). Además los factores de riesgo individual juegan un papel fundamental, en este caso en el momento de la ocurrencia de la epidemia de DEN-3 en la ciudad de La Habana donde existía un mayor número de individuos con una inmunidad previa a DEN-1, aumentando o favoreciendo la ocurrencia de la forma grave de la enfermedad en estos individuos. Todo esto sin restarle menos importancia a los factores epidemiológicos como pueden ser una mejor transmisión del DEN-1 por mosquitos, provocando un mayor número de individuos inmunes a este con posibilidad de sufrir una infección secundaria por DEN-3.

4.3. Variación de los anticuerpos neutralizantes homólogos y heterólogos a diferente periodo de la infección primaria. Influencia de la ADA después de transcurridos 20 años.

Teniendo en cuenta que la infección secundaria DEN-1/DEN-2 se asoció a la forma severa de la enfermedad después de 20 años de la primoinfección, estudiamos el comportamiento de los anticuerpos homotípicos y heterotípicos en sueros de individuos inmunes a virus DEN-1 después de 4 y 20 años de la primoinfección.

Estudios previos han demostrado la mayor severidad de la epidemia de 1997 comparada con la de 1981 (221). Específicamente la relación de fallecidos por casos de FD y de FHD fue mayor en la epidemia de 1997, ocurrida 20 años después de la primoinfección por DEN-1. Estos hallazgos sugieren que el riesgo de contraer la FHD está presente años después o quizás durante toda la vida con posterioridad a una infección primaria (6, 222,

223). Otros factores de riesgo como la raza, las enfermedades crónicas, los virus que causan ambas infecciones y más importante aún las características genéticas de estos virus y del individuo, podrían modular el riesgo. En ambas epidemias la secuencia de infección fue la misma, DEN-1/DEN-2. Los virus causantes de la segunda infección se clasificaron en dos ramas diferentes del genotipo asiático. Ambos tienen el mismo a.a en la posición 390 considerado un marcador de virulencia (69), pero en 2 ramas diferentes; el DEN-2 1981 se encuentra en el Genotipo Asiático y el DEN-2 1997 en el Genotipo Asiático/Americano. Es posible que cambios en la avidéz de los anticuerpos en el tiempo pudieran estar relacionados con la mayor severidad de la infección secundaria por virus DEN-2 y que el incremento en la avidéz de los anticuerpos en el tiempo pudiera acompañarse de una disminución de la actividad neutralizante heterotípica dirigida a sitios neutralizantes heterólogos. Por otra parte si estos sitios no son neutralizados durante una segunda infección, el fenómeno de la inmunoamplificación podría desarrollarse (224).

Todo esto nos indica que la severidad de la epidemia de 1997 fue mayor que la de 1981 a pesar de que la secuencia de infección en los casos severos fue similar (DEN-1/DEN-2). Nosotros atribuimos esta diferencia a cambios en la avidéz de los anticuerpos en el tiempo, propiciando una severidad mayor, producto de una disminución de la actividad neutralizante heterotípica dirigida a sitios neutralizantes heterólogos. Esta diferencia en la avidéz de los anticuerpos puede estar propiciada por cambios aminoacídicos en la proteína de la envoltura de ambas cepas; teniendo en cuenta el trabajo de Pandey y cols que al estudiar diferentes cepas de DEN-2 de diferente origen geográfico encontró que las cepas de origen Asiático y Americano se encontraban en grupos separados y que las cepas de Tailandia estudiadas se agruparon en 3 grupos diferentes de acuerdo a las formas clínicas de la enfermedad. De esta forma podríamos relacionar el hecho con que al estudiar la región de la Envoltura del virus DEN-2 aislado en 1997, este compartía menos epítopes involucrados en la neutralización con el DEN-1 de la primoinfección. Además del trabajo de Pandey encontramos estudios más recientes que apoyan esto como los realizados en Perú y Sri Lanka (225-227).

Aunque debemos tener en cuenta que los títulos mayores de anticuerpos neutralizantes, necesariamente no conllevan a una mayor avidéz dado que la avidéz es una propiedad físico-química que influye en la interacción antígeno-anticuerpo, mientras que la capacidad

de neutralizar es una propiedad biológica funcional. Por lo que la propiedad biológica no conlleva necesariamente a la propiedad físico-química. Es decir, pueden existir sueros con una alta avidéz y que los anticuerpos que lo integren sean altamente neutralizantes, o por el contrario, no neutralizar, sino ser buenos fijadores del complemento u otra propiedad biológica. Para profundizar en este fenómeno, se estudiaron los títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros de individuos inmunes a virus DEN-1 colectados 4-8 años y 20-22 años después de la infección primaria.

Cincuenta sueros de 103 (48.5%) colectados en el período 1981-1985 (grupo 1) y 826 sueros de 2000 (41.3%) colectados en 1999 (grupo 2), mostraron anticuerpos IgG detectados por la técnica de MEI. De acuerdo a los resultados obtenidos en la NRNP, 50 sueros del grupo 1 y 89 del grupo 2 se clasificaron como sueros de individuos inmunes a virus DEN-1.

La Tabla 11 muestra que el TPG de los anticuerpos neutralizantes al virus homólogo se incrementó en los sueros colectados a los 22 años con respecto a los colectados de 4-8 años después de la infección por virus DEN-1. En contraste, para el mismo período, los anticuerpos neutralizantes heterotípicos dirigidos contra la cepa de virus DEN-2 genotipo americano, disminuyeron significativamente tanto en el número de muestras que tenían anticuerpos neutralizantes a este genotipo como en sus TPG. En el 8% y el 2% de los sueros del grupo 1 se demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes heterólogos a los virus DEN-3 y DEN-4 respectivamente.

Tabla 11. Neutralización a los virus del dengue en sueros de individuos inmunes a DEN-1 colectados 4-8 años y de 20-22 años después de la primoinfección

| Serotipo/Cepa | Grupo 1 ^a | | Grupo 2 ^a | |
|----------------------------|----------------------|-----|----------------------|-------|
| | Positivos (%) | TPG | Positivos (%) | TPG |
| DEN -1 | 50 (100) | 93 | 89 (100) | 140.6 |
| DEN- 2/A15/81 | 6 (12) | 5.5 | 19 (21) | 6.5 |
| DEN-2/I348606 ^c | 36 (72) ^b | 30 | 40 (45) ^c | 10.2 |
| DEN-3/116/00 | 4 (8) | 5.6 | 9 (10) | 5.9 |
| DEN-4 | 1 (2) | 5.1 | 13 (15) | 6.2 |

^a Grupo 1: Sueros colectados después de 4-8 años postinfección; Grupo 2: Sueros colectados después de 20-22 años de la infección primaria

^b $p < 0.00001$ Cuando comparamos los virus DEN- 2 (A15/81), DEN -3 y DEN- 4 en el Grupo 1

^c $p < 0.01-0.0001$ Cuando comparamos los virus DEN- 2 (A15/81), DEN- 3 y DEN- 4 en el Grupo 2

^d $p < 0,01$ Cuando comparamos el virus de DEN-2 (I348606) en ambos grupos

La figura 3 muestra la media del \log_{10} del título de anticuerpos neutralizantes a los virus probados en los 2 grupos de sueros estudiados. La media de los anticuerpos neutralizantes a virus DEN-1 difiere significativamente entre los grupos 1 y 2. Las medias de los títulos de anticuerpos neutralizantes mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) cuando comparamos el virus DEN-2 (I/348600) con los virus DEN-3 y DEN-4. Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en la neutralización heterotípica al virus DEN-2 (I/348600) en los sueros de los grupos 1 y 2. Al comparar las medias de los TPG de anticuerpos a los virus DEN-2 (A15/81), DEN-3 y DEN-4 no encontramos diferencias entre los grupos 1 y 2.

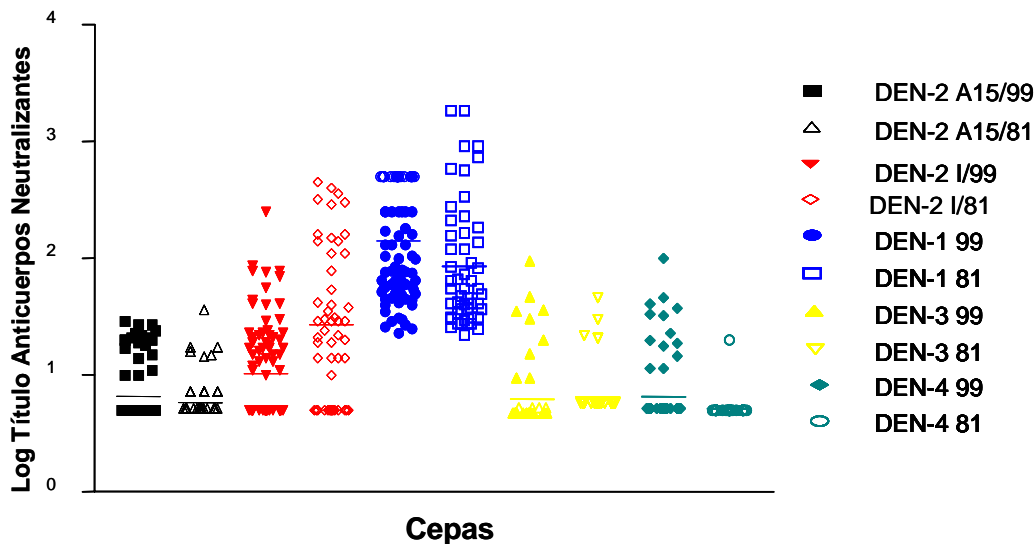


Figura 3. Log₁₀ del título de anticuerpos neutralizantes en los dos grupos de sueros inmunes a DEN-1 estudiados

Nuestro estudio brinda información en relación a la neutralización cruzada del genotipo americano de virus DEN-2 por los anticuerpos desarrollados por infecciones por el virus DEN-1 en Cuba. Consistente con nuestra hipótesis, observamos una disminución en el tiempo de los anticuerpos heterotípicos a virus DEN-2. Similar a esta experiencia fueron las observaciones realizadas en Iquitos, Perú donde la población inmune a virus DEN-1 fue infectada con el virus DEN-2 y no desarrollaron la forma severa de la enfermedad (228). El virus DEN-2 que causó este brote se identificó como perteneciente al genotipo americano y cuando este virus fue probado contra sueros de individuos inmunes a virus DEN-1 se observó una neutralización con títulos elevados (175).

Similar a Kochel y colaboradores (175) fuimos incapaces de detectar una neutralización heterotípica significativa al genotipo asiático del virus DEN-2. El estudio de 50 sueros de individuos inmunes a virus DEN-1 probados frente a la cepa de virus DEN-2 genotipo asiático aislada durante la epidemia cubana de 1981 brindó resultados similares a los de Kochel (175) y a los obtenidos por nosotros frente a la cepa 58/97 aislada durante la epidemia de 1997 (datos no mostrados). Todas estas observaciones sugieren una baja capacidad neutralizante heteróloga a cepas del genotipo asiático. No obstante, aunque no detectamos una neutralización heterotípica a las cepas de DEN-2 genotipo asiático en la dilución 1:10 de los sueros, no podemos descartar que algún grado de neutralización a diluciones más bajas del suero pudiera ocurrir.

Estos resultados son evidencias que estamos ante sustituciones aminoacídicas entre la envoltura del DEN-2 Genotipo Americano y la Envoltura del DEN-2 Genotipo Asiático, considerando que esta proteína es el antígeno mas importante en la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Estudios que avalan esto son los realizados tanto por Vaughn y colaboradores como por Cologna y colaboradores (171, 229). Vaughn y colaboradores al comparar la secuencia aminoacídica de la envoltura de estos 3 virus encontraron 4 cambios

aa entre el genotipo Asiático y el Americano y 2 de ellos son conservados en DEN-1 y posiblemente estén involucrados en este fenómeno. Por su parte Cologna y colaboradores encontraron que el DEN-2 Genotipo Americano en la posición 390 (determinante de virulencia para los virus del DEN) tiene un aa básico (Aspartato) mientras el DEN-2 genotipo Asiático tiene un aa neutro (Asparagina). También se ha encontrado que la especificidad de los anticuerpos se ha relacionado con cambios en la carga o en la hidrofobicidad de los epítopes (230). Por lo que podemos concluir que la aparición de mutantes de escape a la neutralización es por su parte una consecuencia de las sustituciones aminoacídicas entre ambas (229).

No observamos incremento en los títulos de anticuerpos heterotípicos a los serotipos DEN-3 y DEN-4. Sorprendentemente observamos un incremento en el título de los anticuerpos homólogos a virus DEN-1 en el tiempo.

Previamente al estudio realizado por nosotros teníamos la evidencia de la circulación del serotipo 1 en Cuba antes de la epidemia de 1977 (década del 40) y la perpetuación de estos anticuerpos 40 años después, pero no conocíamos si estos habían variado en el tiempo (26). Por otra parte tenemos el reporte reciente de la detección de anticuerpos neutralizantes a DEN-1 después de más de 60 años de la infección en Hawaii (231).

Nuestros resultados demuestran cambios en el tiempo en los anticuerpos neutralizantes heterotípicos a dengue. Aunque no detectamos neutralización al virus DEN-2 (genotipo asiático) in vitro, nos preguntamos si algún grado de neutralización puede haber ocurrido in vivo, el cual pudiera modular la severidad de la enfermedad. Existen reportes que sugieren que la prueba de neutralización no es particularmente buena para predecir la inmunidad protectora. Recientemente Endy y colaboradores (232) reportaron que los niveles de anticuerpos neutralizantes antes de la infección no se asociaron con la severidad de la infección secundaria por el virus DEN-2. Sin embargo, altos niveles de anticuerpos neutralizantes preexistentes contra el virus DEN-3 se asociaron con viremias más bajas y con una enfermedad moderada. Las características de la prueba de neutralización así como la capacidad de los anticuerpos de neutralizar a cepas diferentes del mismo genotipo pudieran explicar estas observaciones.

El primer reporte de que los anticuerpos neutralizantes heterotípicos pueden jugar un papel importante en la regulación de la severidad de la infección por dengue se dedujo de un

estudio prospectivo en escolares en Bangkok, Tailandia. Los niños que tenían anticuerpos neutralizantes heterotípicos previos al virus DEN-2, desarrollaron una infección secundaria inaparente por este serotipo. En contraste, los niños que desarrollaron la FHD/SCD, habían perdido los anticuerpos neutralizantes heterotípicos pero tenían anticuerpos amplificadores (233).

La explicación actual de la persistencia de los anticuerpos en el tiempo se basa en la presencia de células B de memoria y células plasmáticas de larga duración. El incremento en el título de anticuerpos neutralizantes homotípicos y la disminución en el título de anticuerpos neutralizantes heterotípicos observada aquí, puede relacionarse a la maduración de los anticuerpos. En un estudio previo realizado en militares norteamericanos, con una infección inaparente por Encefalitis Japonesa se demostró que el índice de neutralización se incrementó de 1,7 a 3,5 después de un período de 1-5 años de la infección (234). Este estudio y el nuestro son de los pocos en medir los atributos cualitativos de los anticuerpos humanos después de largos períodos de una infección por flavivirus. Nuestros resultados sugieren un proceso continuo de selección de los anticuerpos a dengue con un incremento en la reactividad homóloga y una disminución de la reactividad cruzada heteróloga.

Con el objetivo de validar la hipótesis de que sueros humanos inmunes a virus DEN-1 colectados 20-22 años de la infección primaria y con títulos bajos de anticuerpos neutralizantes heterólogos a virus DEN-2 ($<1/10$) pudieran mostrar una capacidad inmunoamplificadora frente a este serotipo, estudiamos un grupo de sueros con títulos bajos de anticuerpos neutralizantes a virus DEN-2 genotipo asiático.

De un total de 24 sueros con anticuerpos neutralizantes a DEN-2 menores de $1/10$, en 19 de (79,2%) se observó el fenómeno de ADA a diluciones variables del suero. De ellos en 7 (29,2%) y en 4 (16,6%) sueros ocurrió el ADA a diluciones bajas de $1/50$ y $1/10$ del suero respectivamente. En los restantes 8 (33,3%) el ADA fue demostrado en diluciones elevadas como se reporta en la mayoría de los estudios (235). En los restantes 5 sueros la ADA no fue observada. La tabla 12 muestra las diluciones de suero con ADA significativa así como la actividad amplificadora determinada por la Fórmula de Detre. Los sueros con actividad de ADA a una dilución de $1/10$ del suero mostraron bajos valores de ADA. El estudio realizado por Kliks y colaboradores, 1989 mostró que la ausencia de anticuerpos neutralizantes heterotípicos y la presencia de anticuerpos amplificadores en sueros no

diluidos previa a la enfermedad fueron factores de riesgo para el desarrollo de la FHD/SCD durante el curso de una infección secundaria (233).

Tabla 12. Títulos de Anticuerpos Neutralizantes a DEN y actividad amplificadora a DEN-2 en sueros humanos inmunes a DEN-1 de 20-22 años de la infección primaria*

| No suero | DEN-1 | DEN-2 | Dilución más baja de suero con ADA** (valor de amplificación)*** | Diluciones más elevadas de suero con actividad amplificadora a DEN-2. **** |
|----------|-------|-------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 2507 | >250 | <10 | - | - |
| 2534 | >250 | <10 | - | - |
| 2569 | >250 | <10 | - | - |
| 2774 | >250 | <10 | - | - |
| 3574 | 40 | <10 | - | - |
| 2346 | >250 | <10 | 10 (5.1) | 1250 (3.3) |
| 2347 | >250 | <10 | 10 (7.02) | 250 (3) |
| 2427 | >250 | <10 | 31250 (3.2) | 62500 (5.9) |
| 2545 | >250 | <10 | 50 (2.5) | 250 (2.3) |
| 2557 | >250 | <10 | 50 (4.7) | 50 (4.7) |
| 2609 | >250 | <10 | 50 (2.3) | 156250 (3) |
| 2614 | >250 | <10 | 1250 (7) | 781250 (5.3) |
| 2860 | >250 | <10 | 50 (6.3) | 1250 (3.9) |
| 3390 | 500 | <10 | 10 (6) | 6250 (4.9) |
| 3398 | >250 | <10 | 1250 (5.7) | 1250 (5.7) |
| 3593 | 58 | <10 | 250 (3) | 6250 (3.4) |
| 3600 | 57 | <10 | 250 (4.2) | 250 (4.2) |
| 3601 | 44 | 20 | 250 (2.1) | 250 (2.1) |
| 3634 | 110 | <10 | 50 (2.9) | 156250 (2.9) |
| 3636 | 30 | <10 | 6250 (5.2) | 6250 (5.2) |
| 3644 | 46 | <10 | 50 (4.0) | 781250 (4.4) |
| 3657 | 40 | <10 | 1250 (2.4) | 156250 (3.2) |
| 4164 | 40 | <10 | 10 (5) | 50 (3.9) |
| 4178 | >250 | <10 | 50 (6.8) | 1250 (6.8) |
| 4193 | 47 | <10 | 6250 (4.0) | 781250 (6.6) |

*Títulos de anticuerpos neutralizantes a DEN-3 y DEN-4 menores de 1/10 ** Dilución más baja de suero con actividad amplificadora a DEN-2 ***Actividad amplificadora determinada por la fórmula de Detre****Diluciones más elevadas de suero con actividad amplificadora a DEN-2.

En nuestro estudio encontramos que el 16,6% de los sueros sin anticuerpos neutralizantes heterotípicos al DEN-2 genotipo Asiático no amplificó la infección a una dilución de suero de 1/10. Por contar con volúmenes de suero limitados no pudimos medir la amplificación a diluciones más bajas o con los sueros puros. Este resultado obtenido in vitro es consistente con la tasa de casos de FHD/SCD observados durante la infección secundaria en 1997 y es una evidencia más de que la ADA es el mecanismo patogénico definitivo involucrado en la FHD/SCD (171, 236). La ADA incrementa la severidad de las manifestaciones clínicas del DEN mediante el incremento de la replicación en los receptores Fc de las células hospederas. Recientemente estudios en Tailandia han demostrado (237) que la ADA no sólo facilita el proceso de entrada, sino que también modifica los mecanismos antivirales intracelulares de las respuestas innata y adaptativa, resultando en una replicación no restringida. Además, a partir de modelos matemáticos y de las observaciones realizadas en niños hospitalizados con FHD/SCD (238, 239); se ha hipotetizado que la ADA prevé una ventaja competitiva a los virus en poblaciones con una prevalencia sustancial de anticuerpos a DEN y particularmente a algunos serotipos que son amplificados más que otros. Nuestro estudio añade nuestros conocimientos sobre la ADA, al demostrar la capacidad amplificadora de los anticuerpos heterotípicos después de un largo intervalo de la infección primaria.

Por otra parte nuestros resultados sugieren que si la ADA está definitivamente involucrada en el mecanismo patogénico inicial de la FHD/SCD, un gran número de individuos inmunes a virus DEN-1 con niveles de anticuerpos neutralizantes heterólogos a virus DEN-2 genotipo asiático menores de 1:10 pudieran estar en riesgo de desarrollar la forma severa de la enfermedad durante una segunda infección por este genotipo. Los resultados obtenidos permiten sugerir que este fenómeno pudiera estar involucrado en la mayor severidad de la epidemia de 1997 y particularmente en la mayor severidad observada después de largos intervalos de la infección primaria.

No contamos con muestras de sueros suficientes colectadas de individuos inmunes al DEN-1 del periodo 1981-1985, para demostrar el fenómeno del ADA a 4 años de la epidemia de 1977.

4.4. Cinética de la respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a cepas de diferente genotipo de virus DEN-3 en un panel de sueros humanos.

Se ha reportado un incremento significativo en el tiempo en la severidad de las epidemias de 1981, 1997 y 2001-2002 lo que pudiera estar relacionado a la aparición de mutantes de escape a la neutralización y/o a cambios en los virus que circularon durante las mismas (6, 12). Teniendo en cuenta la situación epidemiológica de nuestro país y particularmente las dos introducciones de virus DEN-3 ocurridas en los años 2000 y 2001/2002 nos preguntamos si pudieran existir diferencias en la capacidad neutralizante de los sueros frente a cepas de diferentes genotipos. Para ello se estudió la capacidad neutralizante en sueros convalecientes tardíos procedentes de individuos inmunes a virus DEN-3 que enfermaron durante la epidemia del 2001/2002 frente a tres cepas aisladas durante esta epidemia y 3 aisladas durante el brote del 2000, todas pertenecientes al genotipo asiático. Se incluyó además una cepa de DEN-3 genotipo americano aislada en Puerto Rico en 1977. Los títulos de anticuerpos neutralizantes a las 7 cepas de virus DEN-3 se determinaron simultáneamente en todas las muestras de suero estudiadas. La tabla 12 muestra el recíproco del título de anticuerpos neutralizantes y el TPG en los casos de FD y FHD así como el TPG en todas las muestras estudiadas. Se obtuvieron resultados similares en los 3 diferentes días en que se realizó el ensayo.

Tabla 13. Título de anticuerpos neutralizantes a las 7 cepas de DEN-3 en sueros colectados de individuos inmunes a dengue^a

| No. Suero | Cuadro Clínico | 116/00*** | 118/00 | 140/00 | 167/01 | 557/01 | 21/02 | P. Rico |
|-----------------|----------------|-----------|--------|--------|--------|--------|-------|---------|
| 2 ^b | FD | 22 | 15 | 5 | 62 | 65 | 52 | 5 |
| 22 | | 18 | 23 | 28 | 96 | 96 | 290 | 22 |
| 25 | | 29 | 26 | 20 | 64 | 85 | 102 | 27 |
| 26 | | 17 | 15 | 11 | 29 | 29 | 70 | 14 |
| 28 | | 33 | 46 | 51 | 148 | 243 | 93 | 42 |
| 38 | | 5 | 15 | 5 | 19 | 55 | 30 | 17 |
| 45 ^b | | 31 | 53 | 40 | 570 | 533 | 620 | 32 |
| 50 | | 5 | 5 | 5 | 34 | 53 | 43 | 12 |

| | | | | | | | | |
|------------------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 51 ^b | | 5 | 11 | 5 | 66 | 53 | 55 | 5 |
| 58 ^b | | 12 | 15 | 17 | 60 | 62 | 97 | 12 |
| TPG | | 14 | 18 | 13 | 69 | 84 | 92 | 15 |
| 14 | FHD/SCD | 5 | 12 | 5 | 13 | 20 | 65 | 5 |
| 17 | | 5 | 17 | 5 | 10 | 54 | 54 | 17 |
| 18 | | 5 | 11 | 5 | 21 | 19 | 55 | 5 |
| 19 | | 5 | 10 | 10 | 35 | 26 | 50 | 5 |
| 39 | | 160 | 120 | 100 | 2000 | 2000 | 2000 | 96 |
| 40 | | 11 | 5 | 5 | 29 | 13 | 22 | 5 |
| 41 | | 5 | 10 | 5 | 41 | 60 | 69 | 15 |
| 43 | | 5 | 5 | 11 | 15 | 37 | 100 | 5 |
| 44 | | 17 | 24 | 20 | 50 | 49 | 44 | 14 |
| 52 | | 9 | 10 | 12 | 109 | 73 | 83 | 5 |
| TPG | | 9 | 13 | 10 | 42 | 51 | 80 | 9 |
| TPG Total | | 11 | 16 | 11 | 54 | 65 | 86 | 12 |

^a Resultados expresados como la dilución recíproca de la NRNP₅₀

^b Infección Primaria

^c Título de anticuerpos neutralizantes <10 se consideraron como 5 y título de anticuerpos neutralizantes >1000 se consideraron como 2000

Los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a las cepas homólogas de la epidemia de DEN-3 2001/2002 (167/01, 557/01 y 21/02) se muestran en la tabla 12. Seis sueros (30%) mostraron un incremento en el título de anticuerpos neutralizantes de 2 veces o más a la cepa 21/02 aislada al final de la epidemia si la comparamos con la cepa 167/01 aislada al inicio de la epidemia. El TPG de anticuerpos neutralizantes para el total de sueros estudiados se incrementó de 54 (frente a la cepa aislada un mes después de comenzada la epidemia) a 86 (frente a la cepa aislada 7 meses después de comenzada la misma). Para las cepas del 2001/2002, se observó una tendencia ascendente en el TPG de los anticuerpos neutralizantes de acuerdo al momento de evolución de la epidemia (Figura 4).

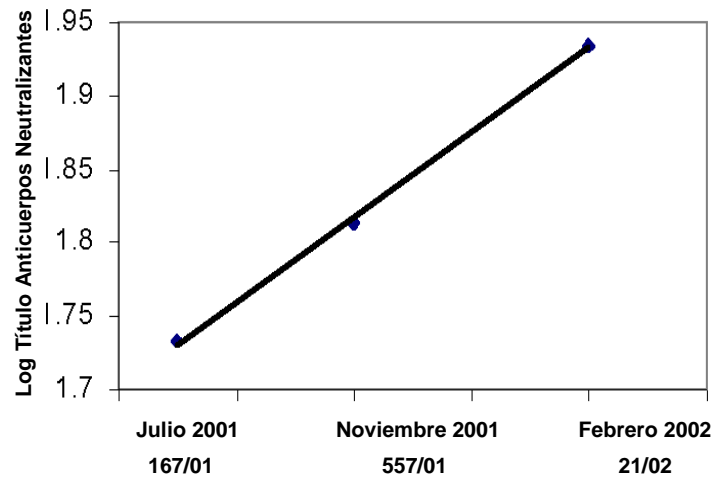


Figura 4. Tendencia de incremento en el \log_{10} del título de anticuerpos neutralizantes a las cepas del 2001/2002 estudiadas y su relación con el tiempo de aislamiento de las mismas

Los títulos de anticuerpos neutralizantes más elevados se observaron frente a las cepas homólogas de DEN-3 aisladas durante la epidemia 2001/2002 ($p < 0,0001$). Esta observación se realizó tanto para los casos de FD ($p < 0,001$) como de FHD ($p < 0,05$).

Los títulos menores y los TPG más bajos se observaron frente a las cepas de DEN-3 aisladas en el brote del 2000 y a la cepa de Puerto Rico. Los TPG a estas últimas cepas fluctuaron entre 9 (SD $\pm 2,99$) y 18 (SD $\pm 1,98$). La figura # 5 muestra los resultados puntuales y la media del \log_{10} del título de anticuerpos neutralizantes en los sueros estudiados a todas las cepas probadas. Las figuras 6 y 7 muestran los resultados puntuales y la media del \log_{10} del título de anticuerpos neutralizantes a las cepas probadas en los sueros de casos de FD y FHD respectivamente. Resultados similares se obtuvieron cuando los sueros de los 4 casos primarios se excluyeron del análisis (datos no mostrados).

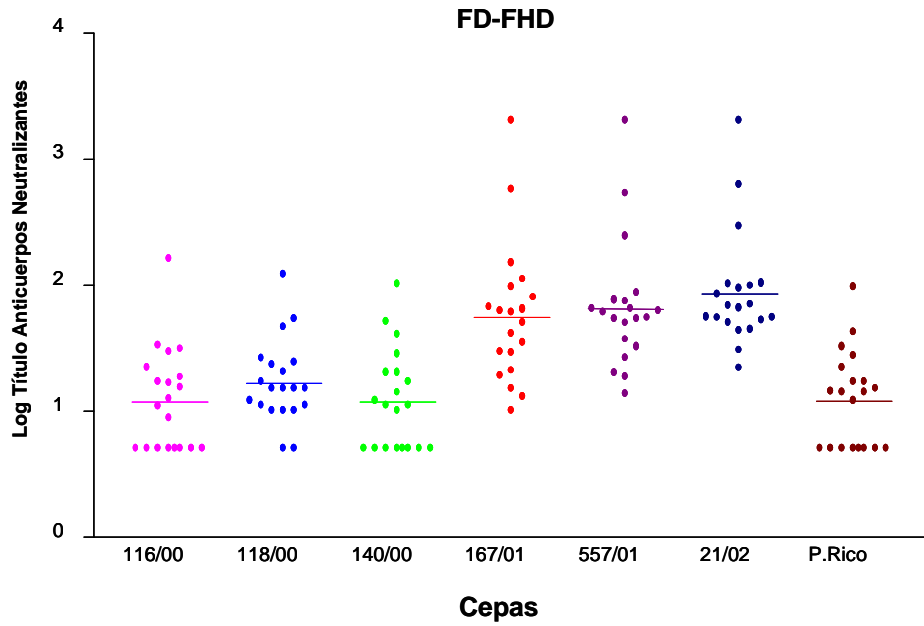


Figura 5. Log₁₀ del título de anticuerpos neutralizantes en sueros convalecientes

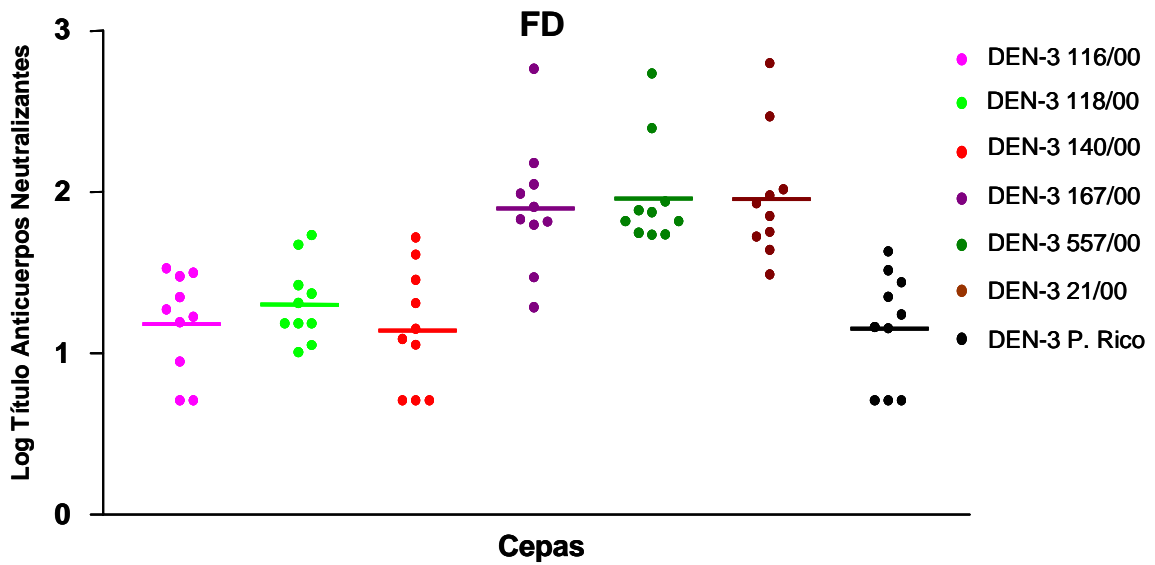


Figura 6. Log₁₀ del título de anticuerpos neutralizantes a las 7 cepas de DEN-3 en las muestras de FD estudiadas

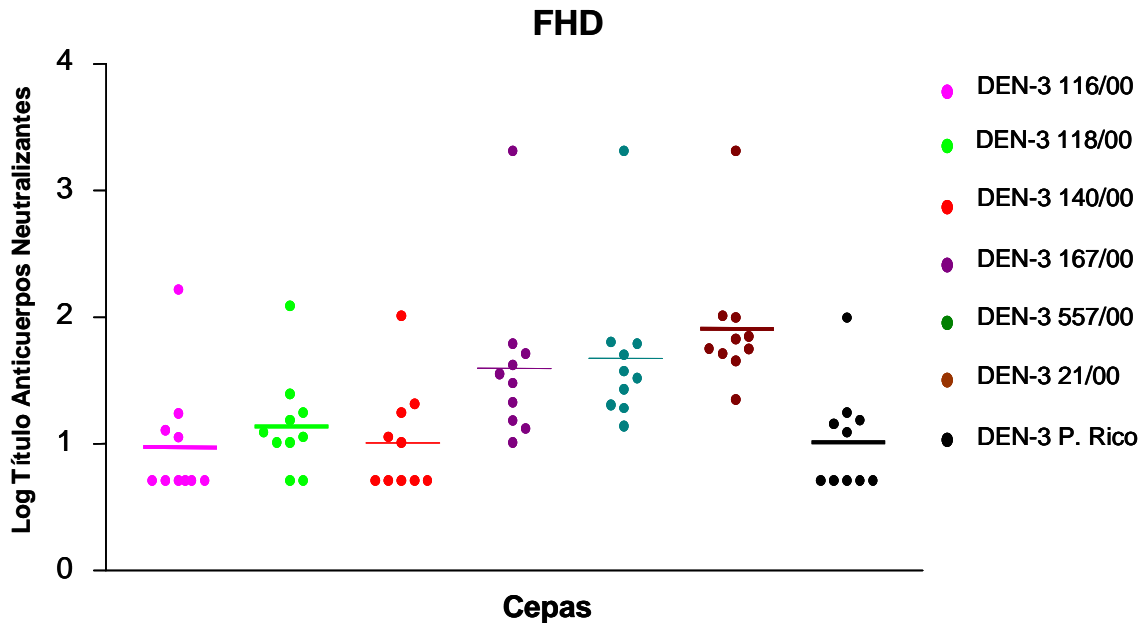


Figura 7. Log₁₀ del título de anticuerpos neutralizantes a las 7 cepas de DEN-3 en las muestras de FHD estudiadas

La circulación de los 4 serotipos de dengue se ha incrementado en los últimos años, acompañándose por un incremento en la diversidad genética en cada serotipo. Estudios de epidemiología molecular han demostrado la elevada variabilidad genética entre los serotipos de DEN reconociéndose de 2 a 5 genotipos diferentes en los mismos (6).

El incremento en el intercambio de los virus entre los países y consecuentemente el aumento en la transmisión ha posiblemente elevado la tasa de evolución de estos virus, dando lugar a la aparición de subtipos con un mayor potencial epidémico (240). El incremento en la diversidad de los virus del DEN, la observación de recombinación homóloga y la evidencia de que pueden observarse diferencias en la virulencia entre las cepas, sugieren que en el futuro estaremos expuestos a cepas virales con una mayor patogenicidad. Específicamente pudiéramos observar la emergencia de virus con antigenicidad, virulencia o tropismo celular alterados y con una mayor capacidad de producir la forma severa de la enfermedad (240).

La virulencia de los virus del DEN ha sido difícil de medir por la ausencia de un modelo animal que reproduzca la enfermedad. En un intento por determinar las secuencias

nucleotídicas asociadas a virulencia, Rico Hesse y colaboradores compararon el genoma de virus aislados de pacientes con diferente cuadro clínico (230). Por otra parte, la tecnología de clones infecciosos se ha aplicado para medir los efectos de mutaciones específicas sobre las características fenotípicas del virus (241).

Los anticuerpos neutralizantes a virus DEN juegan un papel muy importante en la prevención de las infecciones y los anticuerpos no neutralizantes de reactividad cruzada incrementan la infección (138). La ADA como una explicación a la severidad de la enfermedad sugiere que las vacunas necesitan ser capaces de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes protectores de larga duración frente a los 4 serotipos.

A pesar de la importancia de los anticuerpos neutralizantes en la prevención de la infección por virus DEN, y las implicaciones de la variabilidad genética del virus en el mecanismo patogénico de la enfermedad, se han desarrollado pocos estudios para correlacionar ambos fenómenos.

En esta investigación medimos la actividad neutralizante a 7 cepas de virus DEN-3 de 2 genotipos diferentes en sueros de individuos inmunes a este serotipo. Estos individuos habían desarrollado un cuadro clínico de FD y FHD 18-24 meses antes de la colecta de los sueros.

Una observación inesperada e importante fue la capacidad neutralizante baja de los sueros estudiados frente a algunas cepas de virus DEN-3 diferentes a las que causaron la enfermedad pero clasificadas como pertenecientes al mismo genotipo. Se observaron además niveles bajos de anticuerpos neutralizantes a la cepa prototipo de DEN-3 de genotipo Americano.

Considerando que la proteína E es el antígeno más importante en la respuesta de anticuerpos neutralizantes, las diferencias aminoacídicas de esta proteína entre las cepas de virus DEN-3 estudiadas podrían estar involucrados en estas observaciones. Dos de los virus cubanos incluidos en este estudio se clasifican en 2 grupos diferentes: la cepa 116/00 muy relacionada a los virus aislados en Brasil/Martinica en el año 2000, mientras que la cepa 21/02, aislada durante la epidemia 2001/2002, se encuentra formando un “cluster” separado (199). Las cepas cubanas de ambos brotes (2000 y 2001/2002) muestran 3 sustituciones no sinónimas, las cuales resultan en cambios aminoacídicos (E19 Treonina/Prolina, E226 Isoleucina/Treonina y E329 Alanina/Valina). Además la última cepa aislada durante la

epidemia del 2001/2002 presentó un cambio aminoacídico no conservado (E22 Asparagina/Valina). La Tabla 13 muestra los cambios aminoacídicos de 3 de las cepas de virus DEN-3 incluidos en este trabajo.

Tabla 14. Cambios aminoacídicos de las cepas estudiadas*

| Cepas | Genotipo | Cambios aminoacídicos y posiciones | | | | |
|-----------------|----------|------------------------------------|----|-----|-----|-----|
| | | 19 | 22 | 224 | 226 | 329 |
| 21/02 | III | P | V | T | T | V |
| 116/00 | III | T | D | - | I | A |
| Puerto Rico1977 | III | T | E | A | V | A |

* En rojo aparecen los cambios aminoacídicos no conservados

La proteína E contiene 3 dominios, I, II y III. El Dominio III (aminoácidos 300-400) consiste de aproximadamente 100 aminoácidos y ha sido propuesto como el receptor viral. Estudios experimentales empleando el dominio III de la proteína E recombinante han mostrado que las sustituciones de un aminoácido influyen en el reconocimiento de epítopes y en la neutralización de los viriones (41). El dominio II incluye los aminoácidos 51 a 135 y del 195 al 299 siendo un dominio linealmente discontinuo dividido por el dominio I (aminoácidos 1-50 y del 136-194). Se ha planteado que los dominios II y III contienen epítopes conformacionales de neutralización (41, 129).

El cambio no conservado en E19 (Prolina por Treonina) aunque no está localizado en el Dominio III pudiera influir en las diferencias observadas en los anticuerpos neutralizantes. La Prolina es un aminoácido muy rígido y su presencia crea un lazo en la cadena polipeptídica. En ocasiones la Prolina se encuentra en puntos de la superficie de las proteínas donde la cadena polipeptídica hace un lazo por detrás de la proteína. Específicamente este cambio aminoacídico se observó en cepas pertenecientes al mismo genotipo y a un genotipo diferente. El cambio de Valina por Alanina en E329, localizado en el dominio III pudiera también influir en las diferencias observadas. En concordancia con nuestros resultados están los previamente publicados por Zulueta y colaboradores (242). Estos autores estudiaron el Dom III de la proteína de la envoltura de dos cepas de DEN-3

(la cepa de referencia H₈₇ y un aislamiento de la epidemia de Nicaragua de 1994) expresadas como proteína recombinante en *E.coli*. Ellos encontraron 4 cambios aminoacídicos entre estas, uno de ellos localizado en la posición 329. Otro resultado de interés que apoya el nuestro es que la proteína recombinante que contiene el Dom III de la cepa H₈₇ no fue reconocido por ninguno de los sueros colectados de pacientes durante la epidemia de DEN-3 2001/2002.

Aunque las cepas Puerto Rico 1977 y 116/00 muestran diferencias aminoacídicas en E226, ambos Valina e Isoleucina son aminoácidos hidrofóbicos que pudieran explicar el comportamiento similar en el patrón de los anticuerpos neutralizantes. Cambios en el tamaño de los anticuerpos y en su hidrofobicidad pudieran también ser la causa de las diferencias encontradas.

No podemos excluir que los cambios aminoacídicos en la proteína de Membrana pudieran haber sido responsables de las diferencias en la capacidad de neutralización a las cepas estudiadas, aunque se han reportado niveles bajos de actividad neutralizante asociados a esta proteína (129, 243).

El estudio de la secuencia nucleotídica completa de varias cepas de virus DEN-3 está bajo investigación. Sin embargo estudios previos con las cepas de virus DEN-3 aisladas en diferentes momentos durante la epidemia del 2001/2002 muestran que estos virus presentan diferencias en algunas de sus propiedades biológicas como la neurovirulencia en ratón lactante y la capacidad de replicación en cultivo de tejidos (Datos no publicados, Dra. Rosmari Rodríguez Roche, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 2007). La tendencia de incremento en la actividad neutralizante contra los virus aislados en diferentes momentos de la epidemia 2001/2002 pudiera ser también una consecuencia de los cambios aminoacídicos encontrados entre las cepas.

Otro hallazgo interesante de nuestro trabajo fue el mayor nivel de anticuerpos neutralizantes al virus homólogo en los sueros convalecientes tardíos colectados de pacientes de FD si lo comparamos con los colectados de pacientes con FHD. Aunque no es posible definir la causa de esta observación, podríamos especular que algunos casos de FD probablemente desarrollaron una respuesta inmune más efectiva y regulada con una mayor afinidad de los anticuerpos y por tanto consecuentemente tuvieron un mejor control de la infección que los casos de FHD. Encontrándose de esta forma una mayor persistencia en el

tiempo de los anticuerpos con una mayor afinidad al virus DEN-3 en los sueros colectados de los pacientes de FD.

En este trabajo hemos encontrado nuevas observaciones. Particularmente, se demuestran diferencias en la capacidad neutralizante de los sueros estudiados frente a cepas de diferentes genotipos e incluso dentro del mismo genotipo. Estos resultados deben tenerse en cuenta con relación a la patogénesis del dengue y en el desarrollo de vacunas.

4.5. Cinética de anticuerpos neutralizantes y su relación con la viremia en 22 pacientes de la Epidemia Cubana 2001/2002

4.5.1. Viremia estimada a través del aislamiento viral en células C6/36 HT y de la RCP

Después de conocer que los anticuerpos homotípicos y heterotípicos varían con el tiempo y que la capacidad neutralizante de los anticuerpos puede ser diferente frente a cepas del mismo serotipo, aún dentro del mismo genotipo nos dimos a la tarea de conocer la cinética de la respuesta de anticuerpos neutralizantes durante la etapa aguda de la enfermedad. Para ello estudiamos un grupo de pacientes con una infección primaria o secundaria colectados durante la fase aguda de la enfermedad de DEN-3. También relacionamos esta con el desarrollo de la viremia.

4.5.1.1. Aislamiento e identificación viral

Las muestras de suero de los 22 pacientes incluidos en el estudio, colectadas entre los días 2 y 6 del comienzo de la fiebre, fueron inoculadas en células C6/36 HT para el aislamiento viral. De 91 muestras estudiadas, 36 (39.5%) fueron positivas, identificándose en todas el serotipo 3 del virus DEN. Este agente viral se aisló en 20 (90.9%) del total de pacientes estudiados.

El aislamiento viral resultó positivo, en su mayoría, en las muestras colectadas entre los días 2 y 4 de la enfermedad. El virus DEN-3 se aisló en el 100% de las muestras colectadas al segundo día de la fiebre y en el 90,4% de las correspondientes al tercer día. En el cuarto día la positividad se redujo al 54,5% y en el quinto día sólo 1 caso (4,5%) resultó positivo.

En 2 de los 22 pacientes (casos 502/01 y 525/01 el virus no pudo ser aislado en ninguna de las muestras procesadas, sin embargo, los resultados serológicos (presencia de anticuerpos

IgM a dengue) confirmaron la infección por DEN. En el 525/01 se detectó, además, la presencia del genoma viral mediante RCP.

4.5.1.2. Duración de la viremia estimada por aislamiento viral

En la tabla 15 se presenta la duración de la viremia determinada por aislamiento viral según la clasificación clínica de la enfermedad y el tipo de infección. La duración media de la viremia por aislamiento viral en los 22 pacientes fue de $3,4 \pm 1,2$ días. En los pacientes en los que se demostró una infección primaria la duración media de la viremia fue de $4,0 \pm 1,0$ días, mientras que en los de infección secundaria fue de $3,4 \pm 1,0$. En los pacientes de FD con infección secundaria la duración fue de $3,3 \pm 1,0$ días y en los pacientes de FHD fue de $3,7 \pm 0,6$.

Tabla 15. Duración estimada de la viremia determinada por aislamiento viral de acuerdo al tipo de infección y al cuadro clínico de la enfermedad*

| Grupo de estudio | Aislamiento viral (días) |
|-------------------------|---------------------------------|
| Infección primaria | $4,0 \pm 1,0$ |
| Infección secundaria | $3,4 \pm 1,0$ |
| FD secundarios | $3,3 \pm 1,0$ |
| FHD secundarios | $3,7 \pm 0,6$ |
| Total | $3,4 \pm 1,2$ |

4.5.2. Respuesta de Anticuerpos Neutralizantes

4.5.2.1. Respuesta de anticuerpos neutralizantes según el tipo de infección

De acuerdo a los resultados obtenidos por el MEI, de los 22 pacientes, 4 tenían una infección primaria y el resto una infección secundaria.

Los cuatro pacientes clasificados como de infección primaria presentaron un cuadro clínico de FD y todos los pacientes con un cuadro clínico de FHD se correspondieron con casos de infección secundaria. A diferencia de los pacientes con una infección primaria, el 16,7% de

los pacientes con una infección secundaria desarrollaron la FHD y el resto desarrolló un cuadro de FD.

El título de anticuerpos neutralizantes a los cuatro serotipos del virus se determinó en todas las muestras de los pacientes colectadas durante la etapa aguda y en la muestra tomada entre 15 y 30 días después de la enfermedad. En los casos previamente clasificados como de infección de tipo primaria por MEI no se demostraron niveles de anticuerpos neutralizantes a ninguno de los virus estudiados en las muestras colectadas entre los días 2 al 8 de comienzo de la enfermedad. En estos pacientes no pudo colectarse una muestra posterior al octavo día.

En la figura 8 se muestran los TPG de anticuerpos neutralizantes para cada serotipo viral por día de comienzo de la enfermedad en los 18 pacientes con una infección secundaria.

Al día 2 de comienzo de la enfermedad en los pacientes con infección secundaria se detectaron niveles bajos de anticuerpos al virus DEN-1 los cuales se elevaron aceleradamente en los días posteriores entre 1,6 y 3,7 veces por encima del valor obtenido para los virus DEN- 2 y DEN- 3. Los títulos de anticuerpos neutralizantes a los virus DEN- 2 y DEN-3 comenzaron a elevarse a partir del cuarto día de comienzo de la enfermedad, y alcanzaron los niveles máximos al día 6. Los títulos de anticuerpos neutralizantes al virus DEN-4 se elevaron de forma discreta a partir del día 5, manteniéndose siempre por debajo de 1/30.

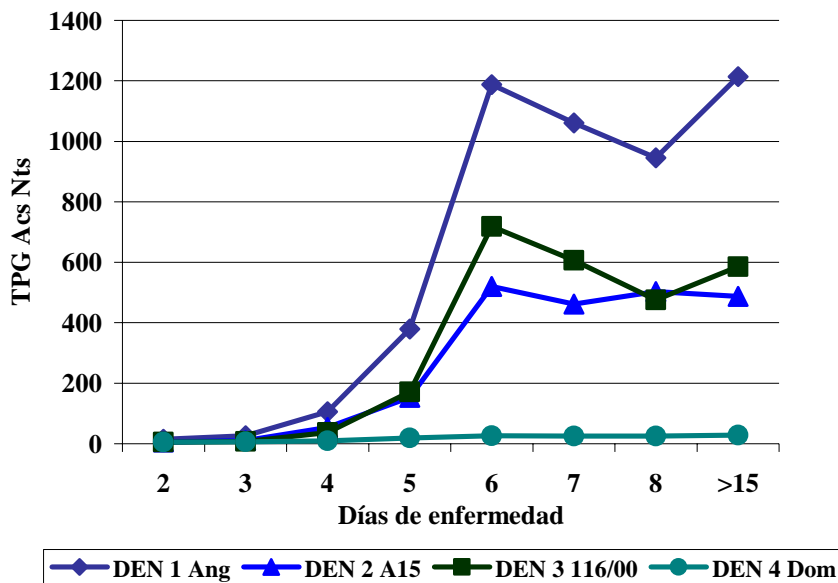


Figura 8. Cinética de anticuerpos neutralizantes a los cuatro serotipos del virus dengue en pacientes con infección secundaria. Los valores están representados como el recíproco del TPG de anticuerpos neutralizantes

4.5.2.2. *Respuesta de anticuerpos neutralizantes según el cuadro clínico de la enfermedad*

Las figuras 9 y 10 muestran los TPG de anticuerpos neutralizantes por día de comienzo de la enfermedad, frente a los cuatro serotipos del virus DEN en pacientes de FD con infección secundaria y de FHD respectivamente. Los casos de FD con infección secundaria de forma general mantienen el mismo comportamiento que la media de todos los casos secundarios antes descritos. Por el contrario, los pacientes con FHD a partir del séptimo día muestran un incremento en los niveles de anticuerpos neutralizantes a los cuatro serotipos virales comparados con los de FD con infección secundaria.

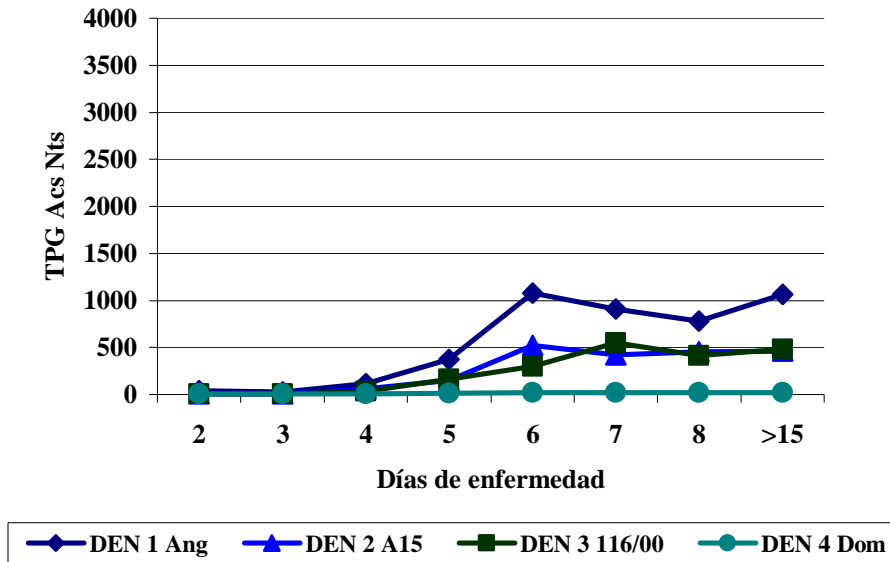


Figura 9. Cinética de anticuerpos neutralizantes a los cuatro serotipos del virus dengue en pacientes con FD de infección secundaria. Los valores están representados como el recíproco del TPG de anticuerpos neutralizantes

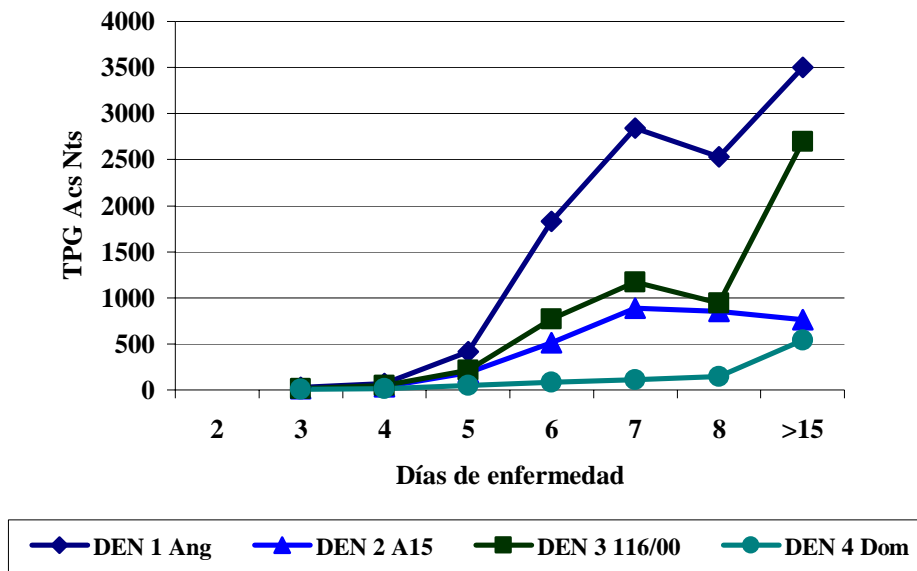


Figura 10. Cinética de anticuerpos neutralizantes a los cuatro serotipos del virus dengue en pacientes con FHD. Los valores están representados como el recíproco del TPG de anticuerpos neutralizantes

Este incremento fluctuó entre 3,1 y 3,3 veces para DEN-1; 1,6 y 2,1 para DEN-2; 2,1 y 5,6 para DEN-3 y 5,4 y 28,4 para DEN-4.

En todos los casos tanto de FD como de FHD los mayores títulos fueron al DEN-1. El fenómeno ocurre por la presencia de epítomos compartidos entre los serotipos que resultan más inmunogénicos y refuerzan la respuesta anamnésica de la primera infección. Esto es debido a que en una primoinfección con DEN-1 el sistema inmune reconoce epítomos muy inmunogénicos que también posee el DEN-2, por tanto en la primera respuesta se elaboran anticuerpos con cierta especificidad que es compartida con DEN-2. Cuando se produce la infección secundaria por DEN-2 esos epítomos estimulan al sistema inmune como una nueva puesta en contacto que refuerza la primera, así para los epítomos compartidos del DEN-1 se produce una respuesta secundaria. Para que esto ocurra, los determinantes de especificidad pueden tener secuencias de aminoácidos públicas, es decir pequeños péptidos compartidos que inestiman y son reconocidos por los anticuerpos heterotípicos sin que se afecte el reconocimiento en sistemas de detección de especificidad. Teniendo así el DEN-1 una respuesta secundaria y el DEN-2 una respuesta primaria.

4.5.3. Respuesta de anticuerpos y viremia

La cinética de desarrollo de los anticuerpos neutralizantes se relacionó con la duración de la viremia detectada por aislamiento viral.

Los pacientes con infección primaria, en los que no se demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes en las muestras estudiadas, mostraron una viremia superior y más prolongada que los casos con infección secundaria.

En los casos con infección secundaria la respuesta de anticuerpos neutralizantes comienza a elevarse al quinto día de la enfermedad, coincidiendo con la caída de la viremia (figuras 8 y 9).

La cinética de la respuesta inmune humoral y celular en pacientes infectados por virus DEN ha sido poco estudiada. En su mayoría, los trabajos informados han sido realizados en niños procedentes del Sudeste Asiático (171, 244). Aún más, existen pocos estudios que integran en un mismo grupo de pacientes las observaciones de la respuesta inmune humoral y celular con el cuadro clínico de la enfermedad y los hallazgos virológicos.

Aquí se estudian, los hallazgos virológicos (particularmente la duración de la viremia) y el desarrollo de anticuerpos neutralizantes homotípicos y heterotípicos en relación con el tipo de infección y el cuadro clínico de la enfermedad.

El serotipo infectante determinado en el 95,4% de los pacientes estudiados, mediante aislamiento viral se correspondió con el virus DEN-3, acorde con la situación epidemiológica existente en el país en el momento de colecta de las muestras. Los pacientes incluidos en el estudio desarrollaron su enfermedad durante la epidemia de virus DEN-3 que afectó a Cuba en los meses comprendidos entre junio del año 2001 y febrero del año 2002 (28).

En general, la duración media de la viremia por aislamiento viral para el total de pacientes estudiados resultó inferior ($3,4 \pm 1,2$ días) a los datos de la literatura, en los que usualmente se informan medias entre 4 y 5 días. Es de señalar, que estos autores han empleado para el aislamiento viral la inoculación intratorácica de mosquitos, que ha demostrado ser el método más sensible para el aislamiento del virus DEN (245). Además, en ocasiones ha sido considerada la fecha de comienzo de la viremia como 18 horas antes (1 día) del inicio

de los síntomas de la enfermedad, basados en los estudios de inoculación de virus DEN en humanos realizados por diferentes autores (171, 246, 247). Por otra parte, los pacientes incluidos en nuestro estudio son adultos, mientras que la mayoría de los trabajos informados han sido realizados en niños. La edad de los pacientes determina la madurez del sistema inmune y, por tanto, la capacidad de responder ante las infecciones.

La relativa demora del sistema inmune en los casos con una infección primaria para generar una respuesta inmune capaz de aclarar el virus pudiera explicar la mayor duración de la viremia en estos pacientes. En los casos secundarios la viremia puede ser modulada tanto por los niveles de anticuerpos circulantes como por los linfocitos T de reactividad cruzada generados durante la infección primaria previa.

Varios autores han observado diferencias en la duración de la viremia en pacientes infectados con virus DEN. Específicamente, Vaughn y cols informan en el año 2000, diferencias significativas en la duración de la viremia entre niños tailandeses con infección primaria y secundaria por el virus DEN-3 (171). Por su parte, Murgue y cols en ese propio año estudian la duración de la viremia en niños hospitalizados durante el brote de DEN-2 de los años 1996-1997 ocurrido en Polinesia Francesa, y demuestran diferencias significativas cuando comparan pacientes con infección primaria y secundaria (248).

El 100% de los casos de infección primaria, a pesar de tener una duración media de la viremia superior, desarrollaron la forma benigna de la enfermedad. Sin embargo, el 16,7% de los pacientes con una infección secundaria desarrollaron la FHD. Este hallazgo está acorde a lo informado en la literatura y sugiere, como ha sido planteado por otros autores (6), que la presencia de anticuerpos a una infección previa se comporta como un factor de riesgo para el desarrollo de la forma severa de la enfermedad. Cuando los mecanismos protectores existentes en los pacientes con infección secundaria fallan pueden desencadenarse los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en la FHD/SCD (249).

Los pacientes de FD con infección primaria y secundaria constituyen grupos que bajo condiciones inmunológicas diferentes logran resolver la enfermedad de forma benigna. La diferencia observada en cuanto a la duración de la viremia por aislamiento entre estos dos grupos fue de 0,7 días, similar a la observada entre los propios casos primarios y todos los pacientes con infección secundaria. Este resultado podría indicar que la inmunidad previa

heteróloga en dichos pacientes fue capaz de aclarar el virus durante la infección y que, por tanto, no fueron favorecidos los mecanismos inmunopatogénicos de la enfermedad.

La diferencia en la duración de la viremia detectada por aislamiento viral entre los pacientes con FD de infección secundaria y FHD fue inferior a 0,5 días. Otros informes no muestran relación entre la duración de la viremia y la severidad de la enfermedad, aunque sí entre la intensidad de la viremia y la severidad de la enfermedad (172).

La respuesta inmune en las infecciones secundarias es conducida por los niveles virales y por los factores hospederos preexistentes. Los menores niveles de viremia en los casos de infección secundaria sugieren la aclaración del virus durante la infección, como ha sido discutido previamente o puede ser por el acoplamiento del virus a anticuerpos. Sin embargo, los tres casos de FHD analizados mostraron niveles de viremia superiores a la media de los casos con infección secundaria al cuarto día de la enfermedad, por lo que es probable que en estos pacientes los anticuerpos previos estén facilitando la amplificación viral. Es posible, además, que los factores específicos del virus puedan determinar que las infecciones virales sean reducidas o amplificadas por el sistema inmune. En este sentido, ciertos serotipos y genotipos tienen la capacidad de replicarse más fácilmente en grupos poblacionales específicos (171) o puede que haya mayor viremia por el ADA.

La determinación de la cinética de anticuerpos con capacidad neutralizante a los cuatro serotipos del virus DEN en los 22 pacientes constituyó otro de nuestros objetivos principales. La respuesta de anticuerpos neutralizantes juega un papel fundamental en la protección contra la infección, por lo que la respuesta humoral, y específicamente el desarrollo de anticuerpos con capacidad neutralizante es uno de los objetivos principales en la obtención de candidatos vacunales. Similar a lo informado para otras vacunas virales, la capacidad protectora de los candidatos vacunales contra el virus DEN ha sido inferida por la habilidad de inducir una respuesta elevada de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, los títulos de anticuerpos neutralizantes necesarios para conferir protección y las funciones de dichos anticuerpos en la disminución o en el aumento de la severidad de la enfermedad no están totalmente esclarecidos.

La NRNP al virus DEN-3 fue realizada empleando la cepa aislada durante el brote ocurrido en Ciudad de la Habana en el año 2000. La secuenciación nucleotídica del gen que codifica para la proteína de la envoltura de aislamientos procedentes de las epidemias cubanas de los

años 2000 y 2001/2002 agrupó a los aislamientos de ambos períodos dentro del genotipo III del virus, aunque en grupos diferentes donde están incluidos otros aislamientos de la región (71).

Debido a que las muestras incluidas en el estudio fueron colectadas durante la fase aguda de la enfermedad, y a que en la última muestra colectada aún los anticuerpos permanecían elevados, no fue posible identificar la secuencia de infección para los casos con una infección secundaria. En este sentido, sería necesario una muestra previa a la infección por virus DEN-3 o una posterior cuando los anticuerpos hayan disminuido a sus valores normales.

Las muestras obtenidas de los pacientes con infección primaria no mostraron la presencia de los anticuerpos neutralizantes. Es posible que los títulos de anticuerpos neutralizantes hasta dicho momento se encuentren en niveles inferiores a 1/10, que constituyó la dilución de partida de nuestra técnica. El no contar con muestras clínicas colectadas entre los días 15-30 de la enfermedad de estos 4 pacientes, no nos permitió detectar dichos anticuerpos.

Para la clasificación de las infecciones secundarias de acuerdo al título de anticuerpos neutralizantes se considera todo nivel de anticuerpos por debajo de 1/30 como criterio de anticuerpos heterotípicos, como ha sido establecido con anterioridad, y todo nivel de anticuerpos mayor o igual a 1/30 como criterio de anticuerpos homotípicos (193). En nuestro estudio, este criterio no pudo ser utilizado por tratarse de muestras de la fase aguda que tienen incrementados los niveles de anticuerpos neutralizantes a todos los serotipos. Las infecciones secundarias en este caso fueron corroboradas por el desarrollo de una rápida respuesta anamnésica después de la infección.

En los casos secundarios los niveles promedios de anticuerpos neutralizantes al virus DEN-1 se incrementan de forma acelerada, mostrando títulos superiores a los observados para el resto de los serotipos. Este fenómeno observado para el virus DEN-1 ha sido informado con anterioridad y es conocido como teoría del pecado original. La misma plantea que durante las infecciones secundarias se produce un mayor incremento de los títulos de anticuerpos al virus que ocasionó la primoinfección (120). A pesar de que la secuencia de infección no pudo ser determinada, los resultados sugieren que la mayoría de estos pacientes deben haber sufrido la primera infección por virus DEN-1 en los años 1977-1979, por lo que la secuencia de infección en la mayoría de estos casos debe ser DEN-1/DEN-3. Además, los

dos pacientes con edad inferior a 22 años en el momento de colecta de las muestras, que no tuvieron la oportunidad de infectarse con virus DEN-1, sufrieron una infección de tipo primaria.

En estudios previos, realizados en individuos cubanos inmunes al virus DEN-1 sangrados 20 años después de la primoinfección, se han demostrado niveles de anticuerpos neutralizantes a este serotipo superiores a 1/100, (estudio que forma parte también de esta tesis). Por tanto, los niveles de anticuerpos neutralizantes en la población cubana inmune al virus DEN-1 en el momento de la epidemia de DEN-3 deben tener valores similares a estos. En nuestro estudio, al inicio de la infección secundaria, los niveles de anticuerpos neutralizantes a DEN-1 se encuentran disminuidos si los comparamos con los observados en los estudios previos. La media de los títulos de anticuerpos neutralizantes a DEN-1 detectados al tercer día en nuestro estudio para los casos secundarios fue de de 1/15, por lo que al parecer hubo un consumo de estos anticuerpos durante la etapa virémica de la enfermedad.

Los resultados anteriores nos podrían indicar que gran parte de los anticuerpos presentes en el momento de la infección son capaces de reconocer al virus DEN-3. Sin embargo, los anticuerpos heterotípicos detectados en los individuos inmunes a DEN-1, sangrados 20 años después de la primoinfección, no fueron capaces de neutralizar al virus DEN-3 in vitro. De acuerdo a estos resultados, es probable que durante la infección secundaria por virus DEN-3 la capacidad neutralizante de los anticuerpos heterotípicos sea limitada. Estos anticuerpos de reactividad cruzada podrían participar en otros mecanismos protectores como la ADCC o estar involucrados en la inmunopatogenia de la infección por virus DEN. De hecho, las infecciones secundarias por virus DEN-3 han sido informadas como un factor de riesgo para el desarrollo de las formas severas de la enfermedad y particularmente, en nuestro estudio, todos los cuadros clínicos severos fueron desarrollados en pacientes con infección secundaria (28, 232) .

Los anticuerpos neutralizantes contra DEN-2 y DEN-3 en los casos secundarios muestran un comportamiento similar durante toda la cinética, alcanzando niveles elevados, aunque menores a los obtenidos frente al virus DEN-1. En el momento en que los títulos a DEN-3 comienzan a elevarse aún los clones de células B vírgenes no han sido formados, lo que indica la activación de clones de memoria y apoya el hecho de que el virus está siendo

reconocido de forma heterotípica. La similitud de los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos frente al virus DEN-2 con los de DEN-3 sugiere que la mayoría de estos pacientes no han sufrido una infección por dicho serotipo y que los anticuerpos capaces de reconocer al DEN-2 tras la infección también podrían formar parte de la respuesta de reactividad cruzada.

Los niveles inferiores de anticuerpos detectados frente al virus DEN-4 pudieran estar dados por una baja homología entre el DEN-4 y el resto de los serotipos, y por tanto, con un menor reconocimiento por la respuesta de reactividad cruzada generada tras la infección. Los anticuerpos a DEN-4 en el grupo de pacientes inmunes a DEN-1 sangrados 20 años después de la primoinfección se mantenían por debajo de los niveles detectables (Estos resultados forman parte de esta tesis).

La comparación de los niveles de anticuerpos neutralizantes entre los pacientes con infección secundaria con FD y FHD mostró diferencias en los patrones de respuesta entre ambos grupos. De forma general, los anticuerpos neutralizantes inducidos alcanzaron niveles inferiores en los pacientes de FD comparados con los de FHD. Es llamativo el hecho de que los anticuerpos neutralizantes al virus DEN-4 tomaran valores superiores a 1/30 sólo en el grupo de pacientes que desarrollaron la FHD y que, particularmente, los niveles de anticuerpos neutralizantes a DEN-3 se encuentren elevados en los pacientes con un cuadro hemorrágico comparados con los de FD. El incremento de los anticuerpos neutralizantes en la FHD pudiera estar dado por la fuerte activación inmune inducida en estos casos como resultado de una infección severa. Es probable, además, que en los pacientes que desarrollan la FHD el reconocimiento del virus por los anticuerpos neutralizantes heterotípicos sea menor durante la fase virémica y que, por tanto, exista una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes libres que pueden ser detectados posteriormente por la NRNP.

Ademas pudieramos considerar que en la pléyade de anticuerpos que se generan frente a un virus, una parte de ellos puede provocar neutralización porque es capaz de conllevar a la formación de redes de compuestos inmunitarios que son fácilmente eliminados por las células fagocíticas. Pero si existe un exceso de anticuerpos en relación con la concentración de virus los inmunocomplejos pueden comportarse como patogénicos. En las figuras 9 y 10 los niveles de anticuerpos neutralizantes para los 3 serotipos son inferiores en los casos de

FD si los comparamos con los de FHD. Por lo que en estos casos de FHD, estos anticuerpos podrían comportarse como patogénicos favoreciendo la inmunoamplificación y de esta manera los mejores respondedores tienen un mayor riesgo de desarrollar formas graves de la enfermedad.

En este sentido, diferentes teorías han correlacionado a variantes de cepas más virulentas con las infecciones clínicas más severas. Según Rosen (1986), las cepas incrementan su virulencia en la medida que pasan repetidamente de un hospedero a otro, siendo los cuadros clínicos graves responsabilidad de las cepas más virulentas (250). Además, para el virus DEN-2 se ha planteado, basado en hallazgos epidemiológicos, la posible generación de mutantes de escape a la neutralización, que podrían ser responsables de la amplificación de la enfermedad en los casos de infección secundaria (90). Mecanismos similares pueden ser los que ejerzan influencia en la formación de variantes virales no reconocidas por los anticuerpos heterotípicos durante las infecciones severas por el virus DEN-3.

En los pacientes con FHD los TPG de anticuerpos neutralizantes a DEN-3 detectados en la muestra colectada entre los 15 y 30 días de comienzo de la enfermedad muestran niveles cercanos a los de DEN-1, lo que pudiera estar justificado por la presencia en este momento de una respuesta homotípica al virus de la infección. Sin embargo, en los casos de FD con infección secundaria los títulos de anticuerpos neutralizantes a DEN-3 en la última muestra estudiada mantienen la diferencia con respecto a los de DEN-1. Es probable que los casos secundarios con FD, que logran resolver la infección sin complicaciones hemorrágicas, desarrollen una respuesta homotípica de menor magnitud y que, por tanto, los títulos de anticuerpos neutralizantes a DEN-3 no se eleven después del día 8 de la enfermedad.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Se confirma que la infección secundaria es un factor de riesgo de la FHD luego de más de 20 años de la primoinfección en las epidemias de DEN de los años 1997 y 2001/2002.
2. Durante la epidemia del 2001/2002 los casos de FHD se asociaron a las secuencias de infección virales DEN-1/DEN-3 y DEN-1/DEN-2/DEN-3 y no a la de DEN-2/DEN-3.
3. Se demuestra el desarrollo de la FHD en el transcurso de una infección terciaria y que este fenómeno se produce después de 24 años de la primoinfección.
4. Se demuestra que los anticuerpos neutralizantes se incrementan en el tiempo al virus homólogo y disminuyen al virus heterólogo.
5. Se confirma que aún después de 20 años de la primoinfección, los sueros de los individuos inmunes al virus DEN-1 pueden provocar ADA in vitro, lo que alerta sobre el riesgo que tienen las personas de desarrollar formas graves de la enfermedad durante una infección secundaria, aunque ellos consideren que ya no existe amenaza.
6. Se demuestran diferencias en la capacidad neutralizante de sueros de individuos inmunes a DEN frente a diferentes cepas de un mismo genotipo de DEN-3.
7. Se detectaron diferencias en la capacidad neutralizante de sueros de individuos inmunes a DEN-3 frente a diferentes cepas de un mismo genotipo de DEN-3 lo que podría relacionarse con la asociación de la severidad de la enfermedad a determinados genotipos.
8. Se encontraron diferencias en la duración de la viremia y en la cinética de anticuerpos neutralizantes en tres pacientes con infección primaria y secundaria lo que se relaciona con la severidad de la enfermedad.
9. El intervalo entre las infecciones por dengue, la secuencia de infección viral, la cinética de los anticuerpos neutralizantes y el fenómeno ADA juegan un papel fundamental en la severidad de la enfermedad.

RECOMENDACIONES

6. RECOMENDACIONES

- Estudiar la secuencia nucleotídica completa de varias cepas de DEN-3 aisladas al inicio, en el medio y en el final de la epidemia del 2001/2002 y correlacionarlo con los resultados obtenidos.
- Analizar integralmente los resultados obtenidos con los otros aspectos relativos a la clínica, a las respuestas inmune humoral y celular, a las características virales y a la genética del individuo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995;1(2):55-7.
2. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 2003;27(1):1-13.
3. Leyssen P, De Clercq E, Neyts J. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(1):67-82, table of contents.
4. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 1985;229(4715):726-33.
5. Martinez-Torres E. [Dengue and hemorrhagic dengue: the clinical aspects]. *Salud Publica Mex* 1995;37 Suppl:S29-44.
6. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2002;2(1):33-42.
7. 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.
8. Mas P. Dengue fever in Cuba in 1977:some laboratory aspects. *PAHO Scientific Publication* 1979;375:40-43.
9. 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.
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. 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;152(9):793-9.
12. Guzman MG. Global voices of science. Deciphering dengue: the Cuban experience. *Science* 2005;309(5740):1495-7.
13. Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. II. Clinical laboratory responses to heterologous infection. *J Infect Dis* 1973;128(1):15-22.
14. Rosen L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. *S Afr Med J* 1986;Suppl:40-2.
15. 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.
16. Del Mundo F, Barrion LE. Dengue and dengue-like fevers in children. *J Philipp Med Assoc* 1963;39:42-53.
17. Halstead SB. WHO fights dengue haemorrhagic fever. *WHO Chron* 1982;36(2):65-7.

18. Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med* 1970;42(5):350-62.
19. 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.
20. 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.
21. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* 1980;58(1):1-21.
22. Rodriguez Tan RS, Weir MR. Dengue: a review. *Tex Med* 1998;94(10):53-9.
23. Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. In: Knippe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1043-1125.
24. Guzman MG, Kouri G, Pelegrino JL. [Emerging viral diseases]. *Rev Cubana Med Trop* 2001;53(1):5-15.
25. WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. WHO, Geneva; 1997.
26. Mas Lago P, Palomera Rosa y Magaly Jacobo. Dengue: algunos aspectos epidemiológicos. *Rev Cub Med Trop* 1983;22(noviembre-diciembre):565-570.
27. Cantelar de Francisco N, Fernandez A, Albert Molina L, Perez Balbis E. [Survey of dengue in Cuba. 1978-1979]. *Rev Cubana Med Trop* 1981;33(1):72-8.
28. Pelaez O, Guzman MG, Kouri G, Perez R, San Martin JL, Vazquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis* 2004;10(4):719-22.
29. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002;108(5):717-25.
30. Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Fields BM, editor. *Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996. p. 931-960.
31. Heinz FX, Kunz C. Protease treatment and chemical crosslinking of a flavivirus: tick borne encephalitis virus. *Arch Virol* 1979;60(3-4):207-16.
32. Beaty BJ, Bishop DH, Gay M, Fuller F. Interference between bunyaviruses in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Virology* 1983;127(1):83-90.
33. Gould EA. Antigenicity of flaviviruses. *Archives of Virology* 1990;Supplementum 1:137-152.
34. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *Journal of General Virology* 1989;70(Pt 1):37-43.
35. 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.
36. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 2003;3(1):19-28.
37. Henchal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32(1):164-9.
38. Russell PK, Nisalak A. Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. *J Immunol* 1967;99(2):291-6.

39. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31(4):830-6.
40. Trent DW. Antigenic characterization of flavivirus structural proteins separated by isoelectric focusing. *J Virol* 1977;22(3):608-18.
41. Halstead SB, Heinz FX, Barrett AD, Roehrig JT. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. *Vaccine* 2005;23(7):849-56.
42. Randolph VB, Stollar V. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J Gen Virol* 1990;71(Pt 8):1845-50.
43. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 1990;3(4):376-96.
44. Mandl CW, Heinz FX, Stockl E, Kunz C. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology* 1989;173(1):291-301.
45. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol* 1990;44:649-88.
46. Konishi E, Mason PW. Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* 1993;67(3):1672-5.
47. Wang S, He R, Anderson R. PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J Virol* 1999;73(3):2547-51.
48. 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.
49. Fan W, Mason PW. Membrane association and secretion of the Japanese encephalitis virus NS1 protein from cells expressing NS1 complementary DNA. *Virology* 1990;177(2):470-476.
50. 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;186(8):1165-8.
51. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, et al. Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 2000;62(2):224-32.
52. Chambers TJ, McCourt DW, Rice CM. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. *Virology* 1989;169(1):100-9.
53. Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Knippe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 991-1042.
54. Tan BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH, Chan YC, Tan YH. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology* 1996;216(2):317-25.
55. 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.

56. Bhamarapravati N, Yoksan S. Study of bivalent dengue vaccine in volunteers. *Lancet* 1989;1(8646):1077.
57. 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;30(4):718-28.
58. 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.
59. Lum LC, Lam SK, Choy YS, George R, Harun F. Dengue encephalitis: a true entity? *Am J Trop Med Hyg* 1996;54(3):256-9.
60. 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;71(6):4226-32.
61. 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.
62. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 1997;3(8):866-71.
63. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: Fields BN, editor. *Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996. p. 961-1034.
64. Gubler DJ. Perspectives on the prevention and control of dengue hemorrhagic fever. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi* 1994;10 Suppl:S15-8.
65. Savage HM, Fritz CL, Rutstein D, Yolwa A, Vorndam V, Gubler DJ. Epidemic of dengue-4 virus in Yap State, Federated States of Micronesia, and implication of *Aedes hensilli* as an epidemic vector. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58(4):519-24.
66. McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2000;2(9):1041-50.
67. Wang CH, Chang NT, Wu HH, Ho CM. Integrated control of the dengue vector *Aedes aegypti* in Liu-Chiu village, Ping-Tung County, Taiwan. *J Am Mosq Control Assoc* 2000;16(2):93-9.
68. Monath TP. Early indicators in acute dengue infection. *Lancet* 1997;350(9093):1719-20.
69. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990;174(2):479-93.
70. Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology* 2002;298(1):63-72.
71. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* 1994;75 (Pt 1):65-75.
72. Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* 2002;301(1):148-56.
73. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 9):2279-84.
74. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 2004;8(2):69-80.

75. Vorndam AV, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler D, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Wallingford: CAB International; 1997. p. 313-334.
76. Balmaseda A, Guzman MG, Hammond S, Robleto G, Flores C, Tellez Y, et al. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(2):317-22.
77. Lam SK, Chew CB, Poon GK, Ramalingam S, Seow SC, Pang T. Isolation of dengue viruses by intracerebral inoculation of mosquito larvae. *J Virol Methods* 1986;14(2):133-40.
78. Morier Diaz L, Aleman Miranda MR, Castillo Alvarez A, Perez Forcada V. [Preliminary study of AP-64 cell line (*Aedes pseudoscutellaris*) for dengue-1 and -2 virus multiplication]. *Rev Cubana Med Trop* 1991;43(3):156-61.
79. Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3(6):621-7.
80. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Guzman MG, Morier L, Kouri G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3508-10.
81. Hronovsky V, Benda R. Use of hyperimmune mouse ascitic fluids for arbovirus differentiation by indirect immunofluorescence and conventional serology. *Acta Virol* 1981;25(5):295-303.
82. 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(2):250-4.
83. Clarke DH, Casals J. Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-73.
84. Fernandez RJ, Vazquez S. Serological diagnosis of dengue by an ELISA inhibition method (EIM). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;85(3):347-51.
85. 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;44(5):481-93.
86. Rosario D, Alvarez M, Diaz J, Contreras R, Rodriguez R, Vazquez S, et al. Reaccion en cadena de la polimerasa para la deteccion rapida y determinacion del serotipo de virus del dengue en muestras clinicas. [Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples]. *Rev Panam Salud Publica* 1998;4(1):1-5.
87. Houngh HS, Chung-Ming Chen R, Vaughn DW, Kanesa-thasan N. Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3' noncoding sequences. *J Virol Methods* 2001;95(1-2):19-32.
88. Ruiz BH, Zamora MP, Liu S. Detection of dengue viral RNA by microplate hybridization. *J Virol Methods* 1995;54(2-3):97-108.
89. 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;42(5):276-92.
90. Guzman MG, Kouri G, Halstead SB. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? *Lancet* 2000;355(9218):1902-3.

91. 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;73(6):4738-47.
92. Igarashi A. Impact of dengue virus infection and its control. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;18(4):291-300.
93. Pandey BD, Morita K, Hasebe F, Parquet MC, Igarashi A. Molecular evolution, distribution and genetic relationship among the dengue 2 viruses isolated from different clinical severity. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000;31(2):266-72.
94. 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;88(5):1473-80.
95. Hober D, Delannoy AS, Benyoucef S, De Groote D, Wattre P. High levels of sTNFR p75 and TNF alpha in dengue-infected patients. *Microbiol Immunol* 1996;40(8):569-73.
96. 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;177(3):778-82.
97. Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Nisalak A, et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1999;180(5):1429-35.
98. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 2003;9(7):921-7.
99. Kontny U, Kurane I, Ennis FA. Gamma interferon augments Fc gamma receptor-mediated dengue virus infection of human monocytic cells. *J Virol* 1988;62(11):3928-33.
100. Chaturvedi UC, Raghupathy R, Pacsa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R. Shift from a Th1-type response to Th2-type in dengue haemorrhagic fever. *Curr Sci* 1999;63-9.
101. Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. Macrophage and dengue virus: friend or foe? *Indian J Med Res* 2006;124(1):23-40.
102. 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;28(2):151-5.
103. 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.
104. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol* 1999;59(3):329-34.
105. Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;30(3):229-33.
106. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 1998;56(3):280-5.
107. Huber AR, Kunkel SL, Todd RFr, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991;254(5028):99-102.

108. Mul FP, Zuurbier AE, Janssen H, Calafat J, van Wetering S, Hiemstra PS, et al. Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. *J Leukoc Biol* 2000;68(4):529-37.
109. 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;65(1):70-5.
110. 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;189(2):221-32.
111. 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.
112. Shi YJ, Jiang ZY, Zeng K. [Effect of IL-6 and TNF-alpha on Dengue virus infection of human dendritic cells.]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2006;22(4):469-71.
113. Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;28(3):183-8.
114. Misra A, Mukerjee R, Chaturvedi UC. Release of reactive oxygen intermediates by dengue virus-induced macrophage cytotoxin. *Int J Exp Pathol* 1996;77(5):237-42.
115. Chaturvedi UC. Tumour necrosis factor & dengue. *Indian J Med Res* 2006;123(1):11-4.
116. 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;123(1):25-30.
117. Chen L, Lei H, Liu C, Shiesh S, Chen S, Liu H, et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:142-7.
118. Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Beatty PR, Harris E. Murine model for dengue virus induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol* 2006;80(20):10208-17.
119. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology* 1999;257(1):1-6.
120. Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32(1):154-6.
121. Evavold BD, Sloan-Lancaster J, Allen PM. Tickling the TCR: selective T-cell functions stimulated by altered peptide ligands. *Immunol Today* 1993;14:602-9.
122. Sloan-Lancaster J, Allen PM. Altered peptide ligand induced partial T-cell activation: molecular mechanisms and role in T-cell biology. *Annu Rev Immunol* 1996;14:1-27.
123. Bashyam HS, Green S, Rothman AL. Dengue virus-reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. *J Immunol* 2006;176(5):2817-24.
124. Mangada MM, Rothman AL. Altered Cytokine Responses of Dengue-Specific CD4+ T Cells to Heterologous Serotypes. *J Immunol* 2005;175(4):2676-83.

125. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1053-7.
126. Kurane I, Brinton MA, Samson AL, Ennis FA. Dengue virus-specific, human CD4+ CD8- cytotoxic T-cell clones: multiple patterns of virus cross-reactivity recognized by NS3-specific T-cell clones. *J Virol* 1991;65(4):1823-8.
127. Kurane I, Zeng L, Brinton MA, Ennis FA. Definition of an epitope on NS3 recognized by human CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones cross-reactive for dengue virus types 2, 3, and 4. *Virology* 1998;240(2):169-74.
128. 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.
129. 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.
130. 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;59(3):335-40.
131. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 1977;146(1):201-17.
132. Hall WC, Crowell TP, Watts DM, Barros VL, Kruger H, Pinheiro F, et al. Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45(4):408-17.
133. Boonpucknavig S, Vuttiviroj O, Bunnag C, Bhamarapavati N, Nimmanitya S. Demonstration of dengue antibody complexes on the surface of platelets from patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28(5):881-4.
134. Killen H, O'Sullivan MA. Detection of dengue virus by in situ hybridization. *J Virol Methods* 1993;41(2):135-46.
135. King CA, Marshall JS, Alshurafa H, Anderson R. Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. *J Virol* 2000;74(15):7146-50.
136. Kurane I, Ennis FA. Cytotoxic T lymphocytes in dengue virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;189:93-108.
137. 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.
138. Kurane I, Takasaki T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. *Rev Med Virol* 2001;11(5):301-11.
139. Boonpucknavig S, Bhamarapavati N, Nimmannitya S, Phalavadhtana A, Siripont J. Immunofluorescent staining of the surfaces of lymphocytes in suspension from patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Pathol* 1976;85(1):37-48.
140. Malasit P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987;18(3):316-20.
141. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48(3):324-31.

142. Kurane I, Ennis FE. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol* 1992;4(2):121-7.
143. Markoff L, Chang A, Falgout B, Sithiprasasna R, Strickman D, Innis BL, et al. Processing of Flavivirus Structural Glycoproteins: Stable Membrane Insertion of Premembrane Requires the Envelope Signal Peptide
ELISA for detecting dengue and Japanese encephalitis viral antigen in mosquitoes. *Virology* 1994;204(2):526-540.
144. Kurane I, Meager A, Ennis FA. Induction of interferon alpha and gamma from human lymphocytes by dengue virus-infected cells. *J Gen Virol* 1986;67 (Pt 8):1653-61.
145. Bielefeldt Ohmann H, Beasley DW, Fitzpatrick DR, Aaskov JG. Analysis of a recombinant dengue-2 virus-dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 11):2723-33.
146. Kulkarni AB, Mullbacher A, Parrish CR, Westaway EG, Coia G, Blanden RV. Analysis of murine major histocompatibility complex class II-restricted T-cell responses to the flavivirus Kunjin by using vaccinia virus expression. *J Virol* 1992;66(6):3583-92.
147. Bielefeldt-Ohmann H, Beasley DW, Fitzpatrick DR, Aaskov JG. Analysis of a recombinant dengue-2 virus-dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 11):2723-33.
148. 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;73(5):3623-9.
149. Livingston PG, Toomey S, Kurane I, Janus J, Ennis FA. Modulation of the functions of dengue virus-specific human CD8+ cytotoxic T cell clone by IL-2, IL-7 and IFN gamma. *Immunol Invest* 1995;24(4):619-29.
150. Juffrie M, van Der Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infect Immun* 2000;68(2):702-7.
151. Yang KD, Wang CL, Shaio MF. Production of cytokines and platelet activating factor in secondary dengue virus infections. *J Infect Dis* 1995;172(2):604-5.
152. 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;63(2):143-9.
153. Isarangkura P, Tuchinda S. The behavior of transfused platelets in dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993;24 Suppl 1:222-4.
154. Halstead SB. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg* 1974;23(5):974-82.
155. Okuno Y, Fukunaga T, Tadano M, Fukai K, Ikeda T, Sekii K, et al. Serological studies on volunteers inoculated experimentally with a dengue virus strain in 1943. *Biken J* 1983;26(4):161-3.
156. Innis BL, Thirawuth V, Hemachudha C. Identification of continuous epitopes of the envelope glycoprotein of dengue type 2 virus. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40(6):676-87.
157. Vazquez S, Perez AB, Ruiz D, Rodriguez R, Pupo M, Calzada N, et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol* 2005;33(2):132-7.
158. Summers PL, Eckels KH, Dalrymple JM, Scott RM, Boyd VA. Antibody response to dengue-2 vaccine measured by two different radioimmunoassay methods. *J Clin Microbiol* 1984;19(5):651-9.

159. Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Cavalcanti SM, de Carvalho R. Use of MAC-ELISA for evaluation of yellow fever vaccination. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992;34(5):447-50.
160. Russell PK, Intavivat A, Kanchanapilant S. Anti-dengue immunoglobulins and serum beta 1 c-a globulin levels in dengue shock syndrome. *J Immunol* 1969;102(2):412-20.
161. Koraka P, Suharti C, Setiati TE, Mairuhu AT, Van Gorp E, Hack CE, et al. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *J Clin Microbiol* 2001;39(12):4332-8.
162. Pavri KM, Sheikh BH, Ghosh SN, Chodankar VP. Immunoglobulin E in sera of patients of dengue haemorrhagic fever. *Indian J Med Res* 1977;66(4):537-43.
163. Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. I. Clinical laboratory responses to primary infection. *J Infect Dis* 1973;128(1):7-14.
164. Bancroft WH, Top FH, Jr., Eckels KH, Anderson JH, Jr., McCown JM, Russell PK. Dengue-2 vaccine: virological, immunological, and clinical responses of six yellow fever-immune recipients. *Infect Immun* 1981;31(2):698-703.
165. Henchal EA, McCown JM, Burke DS, Seguin MC, Brandt WE. Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34(1):162-9.
166. Morens DM, Halstead SB. Disease severity-related antigenic differences in dengue 2 strains detected by dengue 4 monoclonal antibodies. *J Med Virol* 1987;22(2):169-74.
167. Thein S, Aaskov J, Myint TT, Shwe TN, Saw TT, Zaw A. Changes in levels of anti-dengue virus IgG subclasses in patients with disease of varying severity. *J Med Virol* 1993;40(2):102-6.
168. Russell PK, Gould DJ, Yuill TM, Nisalak A, Winter PE. Recovery of dengue-4 viruses from mosquito vectors and patients during an epidemic of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1969;18(4):580-3.
169. Kuberski TT, Rosen L. Identification of dengue viruses using complement fixing antigen produced in mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 1977;26(3):538-43.
170. G.Garcia AM, Perez AB, Fonte L, Sierra B, Rodriguez-Roche R, Aguirre E, Fiterre I, Guzman MG. Antibodies from patients with dengue viral infection mediate cellular cytotoxicity. *J Clin Virol* 2006;Sep;37(1):53-7.
171. 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;181(1):2-9.
172. Libraty DH, Endy TP, Houg HSH, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis* 2002;185(9):1213-21.
173. Halstead SB, Lan NT, Myint TT, Shwe TN, Nisalak A, Kalyanarooj S, et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. *Emerg Infect Dis* 2002;8(12):1474-9.
174. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* 2003;77(7):3929-38.

175. 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;360(9329):310-2.
176. Halstead S. Dengue Virus-Mosquito Interactions. *Annu Rev Entomol* 2008;53:15.1-15.10.
177. Kautner I, Robinson MJ, Kuhnle U. Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *J Pediatr* 1997;131(4):516-24.
178. PAHO. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Scientific publication no.548. Washington: PAHO. 1994.
179. Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(7):2395-400.
180. Nimmannitya S, Thisyakorn U, Hemsrichart V. Dengue haemorrhagic fever with unusual manifestations. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987;18(3):398-406.
181. Gowrishankar K, Rajajee S. Varied manifestations of viral myocarditis. *Indian J Pediatr* 1994;61(1):75-80.
182. Tolou H, Pisano MR, Deubel V, Nicoli J. Consequences of choice of the immunization protein in the vaccines of the future against flavivirus. *Travaux Scientifiques Des Chercheurs Du Service De Sante Des Armees* 1991;0(12):85-86.
183. Halstead SB. Vaccines aplenty. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15(5):461-3.
184. Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, et al. Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23(2):99-109.
185. Bhamarapavati N, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 2000;18 Suppl 2:44-7.
186. Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, et al. Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multiple doses. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(3):264-72.
187. Guirakhoo F, Pugachev K, Zhang Z, Myers G, Levenbook I, Draper K, et al. Safety and efficacy of chimeric yellow Fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. *J Virol* 2004;78(9):4761-75.
188. Raviprakash K, Marques E, Ewing D, Lu Y, Phillips I, Porter KR, et al. Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. *Virology* 2001;290(1):74-82.
189. Guzman MG, Rodriguez R, Hermida L, Alvarez M, Lazo L, Mune M, et al. Induction of neutralizing antibodies and partial protection from viral challenge in *Macaca fascicularis* immunized with recombinant dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris*. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69(2):129-34.
190. Hermida L, Rodriguez R, Lazo L, Bernardo L, Silva R, Zulueta A, et al. A fragment of the envelope protein from dengue-1 virus, fused in two different sites of the meningococcal P64k protein carrier, induces a functional immune response in mice. *Biotechnol Appl Biochem* 2004;39(Pt 1):107-14.

191. Hermida L, Bernardo L, Martin J, Alvarez M, Prado I, Lopez C, et al. A recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue-2 envelope protein is immunogenic and protective in nonhuman primates. *Vaccine* 2006;24(16):3165-71.
192. Vazquez S, Bravo JR, Perez AB, Guzman MG. [Inhibition ELISA. Its utility for classifying a case of dengue]. *Rev Cubana Med Trop* 1997;49(2):108-12.
193. Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Soler M, Martinez E. Sequential infection as risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) during the 1981 dengue hemorrhagic Cuban epidemic. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86(3):367.
194. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30(3):545-51.
195. Vazquez S, Saenz E, Huelva G, Gonzalez A, Kouri G, Guzman M. [Detection of IgM against the dengue++ virus in whole blood absorbed on filter paper]. *Rev Panam Salud Publica* 1998;3(3):174-8.
196. 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.
197. Guzman MG, Rosario D, Rodriguez ME, Alvarez M, Rodriguez R, Oropesa S, et al. [Virological diagnosis of an outbreak of fever and rashes caused by parvovirus B19, Cuba, 1995]. *Rev Cubana Med Trop* 1997;49(1):14-20.
198. Morier L, Kouri G, Guzman G, Soler M. Antibody-dependent enhancement of dengue 2 virus in people of white descent in Cuba. *Lancet* 1987;1(8540):1028-9.
199. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Holmes EC, Bernardo L, Kouri G, Gould EA, et al. Dengue virus type 3, Cuba, 2000-2002. *Emerg Infect Dis* 2005;11(5):773-4.
200. Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M, et al. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 6):1569-75.
201. Murgue B, Cassar O, Roche C, Deparis X. [Pathogenesis of dengue: the emperor is still naked!]. *Med Mal Infect* 2004;34(Suppl 1):S31-S33.
202. 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.
203. 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.
204. Vazquez S, Valdes O, Pupo M, Delgado I, Alvarez M, Pelegrino JL, et al. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods* 2003;110(2):179-84.
205. 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- 243.
206. Sumarmo, Wulur H, Jahja E, Gubler DJ, Suharyono W, Sorensen K. Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia. *Bull World Health Organ* 1983;61(4):693-701.

207. Nimmannitya S. Dengue and Dengue Haemorrhagic fever. In: Cook GC, editor. *Manson's Tropical Diseases*. 20th ed. London: Saunders WB; 1998.
208. Zagne SM, Alves VG, Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Tavares W. Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88(6):677-9.
209. 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;6(1):16-25.
210. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988;239(4839):476-81.
211. Fischer DB, Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. V. Examination of age-specific sequential infection rates using a mathematical model. *Yale J Biol Med* 1970;42(5):329-49.
212. Vaughn DW. Invited commentary: Dengue lessons from Cuba. *Am J Epidemiol* 2000;152(9):800-3.
213. Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, et al. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology* 2003;305(2):330-8.
214. Halstead SB, Udomsakdi S, Singharaj P, Nisalak A. Dengue chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. 3. Clinical, epidemiologic, and virologic observations on disease in non-indigenous white persons. *Am J Trop Med Hyg* 1969;18(6):984-96.
215. Nimmannitya S, Halstead SB, Cohen SN, Margiotta MR. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1969;18(6):954-71.
216. Kinney RM, Huang CY. Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology* 2001;44(2-3):176-97.
217. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1952;1(1):30-50.
218. Bhamarapravati N, Yoksan S, Chayanitayothin T, Angsubphakorn S, Bunyaratvej A. Immunization with a live attenuated dengue-2-virus candidate vaccine (16681-PDK 53): clinical, immunological and biological responses in adult volunteers. *Bull World Health Organ* 1987;65(2):189-95.
219. Halstead SB, Casals J, Shotwell H, Palumbo N. Studies on the immunization of monkeys against dengue. I. Protection derived from single and sequential virus infections. *Am J Trop Med Hyg* 1973;22(3):365-74.
220. R. V. Gibbons SK, R. G. Jarman, A. Nisalak, D. W. Vaughn, T.P. Endy, M.P.Mammen Jr and A. Srikiatkachorn. Analysis of Repeat Hospital Admissions for Dengue to Estimate the Frequency of Third or Fourth Dengue Infections Resulting in Admissions and Dengue Hemorrhagic Fever, and Serotype Sequences. *Am.J.Trop.Med. Hyg.* 2007;77(5):910-913.
221. Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis* 2002;6(2):118-24.
222. McBride WJ. Deaths associated with dengue haemorrhagic fever: the first in Australia in over a century. *MJA* 2005;183((1)):35-37.

223. 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;11(4):223-7.
224. Rico-Hesse R. Dengue Virus Evolution and Virulence Models. *CID* 2007;44:1462-6.
225. 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. *Lancet* 1999;354(9188):1431-4.
226. Messer WB, Vitarana UT, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala LD, Ramesh R, et al. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(6):765-73.
227. 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;9(7):800-9.
228. 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.
229. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 2005;79(2):853-9.
230. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003;59:315-41.
231. Imrie A., Meeks J., Gurary A., Sukhbaatar M., Truong TT., Cropp B. C, et al. Antibody to dengue 1 detected more than 60 years after infection. *Viral Immunol* 2007; Winter 20(4):672-5.
232. Endy TP, Nisalak A, Chunsuttitwat S, Vaughn DW, Green S, Ennis FA, et al. Relationship of Preexisting Dengue Virus (DV) Neutralizing Antibody Levels to Viremia and Severity of Disease in a Prospective Cohort Study of DV Infection in Thailand. *J Infect Dis* 2004;189(6):990-1000.
233. Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40(4):444-51.
234. Halstead S, Russ SB. Subclinical Japanese Encephalitis. II. Antibody responses of American to single exposure to JE virus. *Am J Hyg* 1962;75:202-211.
235. Halstead SB. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis* 1979;140(4):527-33.
236. Libraty DH, Endy TP, Houn H, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis* 2002;185(9):1213-21.
237. Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj 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.
238. Cummings DA, Schwartz IB, Billings L, Shaw LB, Burke DS. Dynamic effects of antibody-dependent enhancement on the fitness of viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(42):15259-64.
239. Halstead SB, Suaya JA, Shepard DS. The burden of dengue infection. *Lancet* 2007;369(9571):1410-1.

240. Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol* 2000;8(2):74-7.
241. Gritsun TS, Gould EA. Infectious transcripts of tick-borne encephalitis virus, generated in days by RT-PCR. *Virology* 1995;214(2):611-8.
242. Zulueta A, Martin J, Hermida L, Alvarez M, Valdes I, Prado I, et al. Amino acid changes in the recombinant Dengue 3 Envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. *Virus Res* 2006.
243. Keelapang P, Tariyo P, Butphet S, Hachaibhum J, Puttikhunt C, Kasinrek W, Malasit P, Sittisombut N. Role of anti-preM antibodies in neutralisation of dengue virus. Meeting on Flavivirus Vaccines, WHO Steering Committee, Thailand 2004.
244. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis* 1999;179(4):755-62.
245. Rosen L, Shroyer DA. Comparative susceptibility of five species of Toxorhynchites mosquitoes to parenteral infection with dengue and other flaviviruses. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34(4):805-9.
246. Siler JF, Hall MW, Hitchens AP. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine J Science* 1926;29:1-304.
247. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. *J Infect Dis* 1997;176(2):322-30.
248. Murgue B, Roche C, Chungue E, Deparis X. Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. *J Med Virol* 2000;60(4):432-8.
249. Rothman AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res* 2003;60:397-419.
250. Rosen L. [Pathogenesis of hemorrhagic dengue: critical discussion of current hypotheses]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1986;79(3):342-9.

ANEXOS

ANEXOS

Modelo de 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. El Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) es centro de referencia nacional y regional. El Departamento de Virología del IPK ha estado desarrollando estudios de importancia científica y social sobre la enfermedad por virus dengue.

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

“Factores de Riesgo para el Desarrollo del Dengue y el Dengue Hemorrágico”

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

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

Por todo lo anterior doy mi consentimiento para que se me realicen 3 extracciones de sangre durante mi ingreso y de 2 a 3 extracciones a diferente tiempo después.

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

Firma del que suscribe

Firma Testigo

Hoja 2

Los pacientes recibirán como beneficio el conocer la inmunidad que presentan a los diferentes serotipos del DEN, lo que a su vez les permitirá conocer el riesgo de sufrir una infección secundaria en el caso de ocurrencia de una epidemia.

Los datos personales de cada paciente serán confidenciales, es decir el grupo de trabajo sólo empleará una numeración para cada paciente. Estos datos serán debidamente guardados por el Jefe del Proyecto.

En caso de dudas con relación al estudio o de insatisfacciones con el trato recibido puede contactar a la Jefa del Departamento de Virología: Dra. Maria G. Guzmán.

Composición del Medio Overlay o Medio de Recubrimiento

Suero de ternera Fetal Inactivado- 10 ml

L-Glutamina 2 mM- 1 ml

2X MEM sin Rojo Fenol- 100 ml

Carboximetilcelulosa al 3%- 50 ml

Antibiótico- 0.2 ml

BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS

- **Alvarez M**, Rodriguez-Roche, R., Bernardo, L., Morier, L., Guzman, G., **2005**. Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of Some Factors. **Dengue Bulletin** 29: 1-9.
- **Alvarez M**, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, Castro O, Kouri G, Halstead SB, Guzman MG, **2006**. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. **Am J Trop Med Hyg** **75**: 1113-7.
- **Alvarez M**, Pavón A, Vázquez S, Morier L, Alvarez AM, Guzmán MG, **2008**. Secuencias de infección viral asociadas a la fiebre del dengue durante la epidemia de dengue 3 de ciudad de La Habana, 2001-2002. **Rev Cubana de Medicina Tropical (in press)**.
- **Alvarez M**, Pavón A, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Sanchez L, Alvarez AM, Guzmán MG, **2008**. Neutralizing antibody response variation against dengue 3 strains. **Journal Medical Virology (in press)**.
- Guzman MG, **Alvarez M**, Rodriguez R, Bernardo L, Montes T, Vazquez S, Morier L, Alvarez A, Gould E A, Halstead S **2007**. Following infection with Dengue 1 virus, neutralizing antibodies become increasingly specific with time. **Emerg Infect Dis** **Vol.13, No.2, February**.
- Guzman MG, **Alvarez M**, Vazquez S, Gustavo Kouri, **2005**. Laboratory diagnosis of dengue infection epidemiology and field studies. **TDR/IRM/DIAG/DEN/05.1**
- Guzman MG, **Alvarez M**, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Valdes L, Cabrera MV, Kouri G, **1999**. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. **Int J Infect Dis** **3**: 130-5.
- Pelaez O, Guzman MG, Kouri G, Perez R, San Martin JL, Vazquez S, Rosario D, Mora R, Quintana I, Bisset J, Cancio R, Masa AM, Castro O, Gonzalez D, Avila LC, Rodriguez R, **Alvarez M**, Pelegrino JL, Bernardo L, Prado I, **2004**. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. **Emerg Infect Dis** **10**: 719-22.
- **Alvarez M**, Rodriguez R, Bernardo L, Pavon A, Morier L, Kourí G y Maria G. Guzman **2006**. Fiebre hemorrágica del Dengue causada por la secuencia Den1/Den 3 después de

un largo intervalo de la primoinfección. **Revista Habanera de Ciencias Médicas Volumen 5 (4) Octubre-Diciembre.**

Eventos Científicos donde se han presentado los diferentes objetivos que forman parte de este trabajo.

- 1) VI Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, Cuba 2002
- 2) International Congress Biotechnology Havana 2002.
- 3) II International Congress on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever, Havana Cuba 2004.
- 4) Congreso Internacional de Biotecnología Havana 2004.
- 5) 14th International Scientific Congress, CNIC, Havana Cuba 2005.
- 6) 2nd Asian Regional dengue research network meeting, Singapore 2005.
- 7) V Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos y otros Materiales Biológicos. IIFT Cuba 2005.
- 8) BTJ Joven Ciencia, Diciembre 2005.
- 9) Simposio de Dengue “25 años de experiencia en la lucha contra el dengue” dentro del 10^{mo} Curso Internacional de Dengue. IPK, Cuba 2007.
- 10) VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical, 8th Central American & Caribbean Congreso on Parasitology & Tropical Medicine. Palacio de las Convenciones, Cuba, Diciembre, 2007.

Este trabajo formó parte de 2 tesis de grado para optar por el título de Licenciatura en Microbiología y de 2 tesis para optar por el grado de Master en Virología.

Tesis de Diploma

1. Estudio clínico, virológico y molecular de los fallecidos por FHD/SCD en la epidemia cubana de dengue en 1997. Universidad de La Habana, 1998.
2. Anticuerpos neutralizantes en sueros humanos frente a 4 cepas diferentes del virus dengue 3. Universidad de La Habana, 2005.

Tesis de Maestría

1. Papel de los anticuerpos amplificadores en la severidad de la infección por dengue. IPK, 2000.

2. Estudio de las propiedades biológicas de cepas de dengue de los serotipos 2 y 3 causantes de las epidemias de 1997 (Santiago de Cuba) y 2001/2002 (Ciudad Habana). IPK, 2003.
3. Estudio cinético de la viremia y del desarrollo de anticuerpos neutralizantes en pacientes cubanos infectados por virus dengue 3. IPK, 2004.