



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BIOLOGIA CELULAR
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA Y SALUD PUBLICA DEL ESTADO MERIDA

MARCADORES VIRALES, INMUNES Y DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA
EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE Y SU ASOCIACIÓN CON
EL GRADO DE SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD

Tesis Doctoral como requisito para optar al grado de Doctor (a) en Biología Celular

María Inés Odreman Macchioli

Tutor (a):

Silvana Aurey Vielma Angarita

Mérida, Octubre de 2014

DEDICATORIA

www.bdigital.ula.ve

A los Pacientes y sus Familiares

Razón de este estudio

RECONOCIMIENTOS

A la Ilustre Universidad de Los Andes, icono de excelencia académica, a sus profesores, personal administrativo y obrero quienes con sus enseñanzas me permitieron alcanzar la formación profesional.

A la Dra. Silvana Vielma quien con su valioso conocimiento me brindó la orientación y asesoría necesaria para el desarrollo de este trabajo enmarcado en el contexto de tesis doctoral.

Al Microbiólogo Carlos Torres, por el apoyo profesional y personal invaluable brindado en los momentos más laboriosos del trabajo experimental.

Al personal asistencial y administrativo del Laboratorio de Microbiología y Salud Pública del Estado Mérida por el soporte técnico brindado durante el cumplimiento del marco metodológico de esta investigación.

www.bdigital.ula.ve

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología por aportar los recursos necesarios para el desarrollo de este trabajo, a través de la ejecución del proyecto FONACIT G-2005000821: *“Asociación entre los Marcadores de Activación de Linfocitos y de Disfunción Endotelial en Pacientes con Fiebre Dengue y Dengue Hemorrágico Febril en el Estado Mérida. Estudio de Tamizaje Tipo Caso-Control”*.

Al Consejo de Desarrollo Científico, Técnico y Humanístico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes, por el aporte parcial de recursos necesarios para el desarrollo de este trabajo, a través de la ejecución del proyecto CDCHT-ULA M-841-05-07-A denominado: *"Aislamiento y Caracterización de los Serotipos Virales del virus Dengue y su asociación con fiebre Dengue y dengue Hemorrágico Febril en el Estado Mérida"* y su proyecto satélite CDCHT-ULA M-842-05-07-C denominado: *"Asociación entre los Marcadores de Disfunción endotelial en Pacientes con Fiebre Dengue y dengue Hemorrágico Febril"*.

A todas aquellas personas quienes con su inestimable conocimiento profesional brindaron las sugerencias necesarias para el buen término de este proyecto de investigación.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	II
RECONOCIMIENTOS	III
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	XI
CAPITULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
Dengue: Marco histórico y Epidemiología.....	2
Agente etiológico del dengue: Organización y estructura genómica.....	4
Historia natural de la infección por el virus dengue.....	10
Características clínicas de la enfermedad.....	14
Respuesta Inmune en la infección por el virus dengue.....	18
Inmunopatogenia de la enfermedad.....	20
Genética evolutiva del virus dengue.....	37
Diagnóstico de la infección por el virus dengue.....	38
Vacunas contra el dengue: características esenciales.....	41
Justificación de la investigación.....	45
Objetivos.....	47
CAPITULO 2: ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN DE TRES REGIONES GENÓMICAS DEL VIRUS DENGUE POR LA TECNICA DE AMPLIFICACION DE PCR EN TIEMPO REAL	48
Introducción.....	49
Materiales y métodos.....	51
Resultados.....	58
Discusión.....	74

CAPITULO 3: SEROTIPOS DEL VIRUS DENGUE PREVALENTES Y SU EVOLUCIÓN EPIDÉMICA E INTER-EPIDÉMICA EN EL ESTADO MERIDA.....	78
Introducción.....	79
Materiales y métodos.....	82
Resultados.....	85
Discusión.....	95
CAPITULO 4: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR Y ANALISIS FILOGENETICO DE CEPAS DEL DENV PROVENIENTES DEL ESTADO MERIDA Y OTRAS REGIONES DE VENEZUELA.....	98
Introducción.....	99
Materiales y métodos.....	102
Resultados.....	105
Discusión.....	111
CAPITULO 5: CAMBIOS DINÁMICOS DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS, MOLECULAS DE ADHESIÓN Y MARCADORES DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA COMO INDICADORES TEMPRANOS DE SEVERIDAD EN PACIENTES CON DENGUE.....	115
Introducción.....	116
Materiales y métodos.....	119
Resultados.....	122
Discusión.....	128
CAPITULO 6: RECOMENDACIONES, PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES.....	133
CAPITULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	136
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

	Pág.
1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la detección y serotipificación del DENV por RT-qPCR.....	55
2. Evaluación de las eficiencias de amplificación de las regiones genómicas del DENV C-prM, NS5 y 3'UTR a través del ensayo RT-qPCR SYBR Green I [®]	59
3. Distribución de las muestras procesadas según el día de inicio del cuadro febril, clasificación clínica de la enfermedad y pruebas confirmatorias de laboratorio (RT-qPCR SYBR Green I [®] /ELISA IgM anti-dengue).....	61
4. Promedio de los valores hematológicos y químicos de los pacientes con diagnóstico confirmatorio de infección por el DENV.....	65
5. Evaluación del nivel de concordancia entre las regiones genómicas C-prM, NS5 y 3'UTR del DENV empleando el ensayo RT-qPCR SYBR Green I [®] ..	66
6. Distribución de los casos de dengue de acuerdo a la entidad clínica, carga viral, serotipo viral infectante e infecciones concurrentes.....	70
7. Evaluación externa del ensayo de RT-qPCR con química SYBR Green I [®] para la detección universal y serotipificación del DENV.....	71
8. Análisis comparativo de los ensayos RT-qPCR SYBR Green I [®] /C-prM y RT-qPCR TaqMan [®] /NS5 para la serotipificación del DENV.....	73
9. Distribución temporal de los serotipos del DENV por Municipios del Estado Mérida - Venezuela.....	92
10. Hallazgos clínicos y de laboratorio en pacientes con dengue al momento de ser admitidos en el estudio.....	124

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Genoma del DENV.....	6
2. Clasificación clínica del dengue según criterios del Programa de Adiestramiento e Investigación en Enfermedades Transmisibles de la Organización Mundial de la Salud.....	17
3. Distribución de los pacientes según el día de inicio del cuadro febril y entidad clínica reconocida.....	60
4. Distribución de los pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue por grupos etarios y entidad clínica de la enfermedad.....	62
5. Distribución de los pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue por género y entidad clínica de la enfermedad.....	63
6. Distribución de los principales signos y síntomas según el cuadro clínico de la enfermedad.....	64
7. Distribución de las manifestaciones hemorrágicas según el cuadro clínico de la enfermedad.....	65
8. Distribución de los serotipos del DENV según la entidad clínica de la enfermedad.....	67
9. Distribución de las infecciones concurrentes según el cuadro clínico de la enfermedad.....	68
10. Carga viral en pacientes con infecciones por el DENV distribuidos según la entidad clínica de la enfermedad y serotipos infectantes.....	69
11. Distribución de los casos de dengue según el cuadro clínico establecido por la OMS/2007 y grupos etarios para el período 2006-2007.....	85
12. Distribución de los casos de dengue según el cuadro clínico establecido por la OMS/2007 y grupos etarios para el período 2008-2009.....	86

Lista de Figuras... continuación**Pág**

13.	Distribución de los casos de dengue según el cuadro clínico establecido por la OMS/2007 y grupos etarios para el período 2010.....	86
14.	Comparación de los casos de acuerdo a la clasificación clínica del dengue según los criterios OMS/2007 y TDR/OMS 2009.....	87
15.	Distribución de los serotipos del DENV en el período 2006-2007.....	88
16.	Distribución de los serotipos del DENV en el período 2008-2009.....	88
17.	Distribución temporal de los serotipos del DENV en el período 2010.....	89
18.	Distribución de los serotipos del DENV identificados en los casos de pacientes fallecidos según el periodo de estudio.....	90
19.	Distribución de los casos confirmados de dengue según entidad clínica y Municipios del Estado Mérida durante el periodo 2006-2007.....	92
20.	Distribución de los casos confirmados de dengue según entidad clínica y Municipios del Estado Mérida durante el periodo 2008-2009.....	93
21.	Distribución de los casos confirmados de dengue según entidad clínica y Municipios del Estado Mérida durante el periodo 2010.....	93
22.	Distribución del porcentaje de pacientes fallecidos por municipios del Estado en los periodos 2006-2007, 2008-2009 y 2010.....	94
23.	Región genómica y oligonucleótidos empleados para la detección y serotipificación del DENV por qPCR-RT.....	103
24.	Árbol filogenético derivado de secuencias nucleotídicas del genoma completo del DENV1.....	107
25.	Árbol filogenético derivado de secuencias nucleotídicas del genoma completo de DENV2.....	108
26.	Árbol filogenético derivado de secuencias nucleotídicas del genoma completo de DENV3.....	109
27.	Árbol filogenético derivado de secuencias nucleotídicas del genoma completo de DENV4.....	110

28.	Niveles de IL-8 y TNF- α en pacientes con dengue sin signos de alarma/dengue con signos de alarma y dengue severo determinados durante el curso de la enfermedad y ajustados según el día de inicio de la fiebre.....	126
29.	Niveles de sICAM-1 y sVCAM-1 en pacientes con dengue sin signos de alarma/dengue con signos de alarma y dengue severo determinados durante el curso de la enfermedad y ajustados según el día de inicio de la fiebre.....	127
30.	Niveles de sIL-2R y sTNF-Rp75 en pacientes con dengue sin signos de alarma/dengue con signos de alarma y dengue severo determinados durante el curso de la enfermedad y ajustados según el día de inicio de la fiebre.....	128

www.bdigital.ula.ve



**REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO DE BIOLOGIA CELULAR**

**MARCADORES VIRALES, INMUNES Y DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA EN LA
INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE Y SU ASOCIACIÓN CON
EL GRADO DE SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD**

María Inés Odreman Macchioli

Tutor (a):
Silvana Aurey Vielma Angarita

RESUMEN

El diagnóstico precoz de la infección por el virus dengue (DENV) constituye un elemento clave para la prevención de las complicaciones clínicas propias de la enfermedad. El objetivo del estudio fue en primer lugar evaluar la eficiencia de amplificación de tres regiones genómicas del DENV (C-prM, NS5 y 3'UTR) para su detección y serotipificación mediante un ensayo de qPCR. Se recolectaron 167 muestras de suero de pacientes con síndrome febril agudo. Las tres regiones genómicas tuvieron perfiles de amplificación/coeficientes de correlación similares (0,987-0,999). Sin embargo, la región NS5 tuvo la eficiencia de amplificación más elevada para los cuatro serotipos (98-100%). Durante el proceso de validación, 41,1% (67/167) de las muestras de suero resultaron positivas para DENV al menos por dos de las regiones genómicas empleadas. Los valores de concordancia entre las regiones NS5/C-prM y NS5/3'UTR fueron de 56,7% y 97%, respectivamente. La concordancia fue débil entre las regiones NS5/C-prM ($k= 0,109$; CI 95%), sin embargo, fue moderada entre las regiones NS5/3'UTR ($k= 0,489$; CI 95%). El ensayo de tipificación uniplex en formato NS5/TaqMan[®] mostró alta sensibilidad en contraste con el protocolo C-prM/SYBR Green I[®]. De acuerdo a los resultados obtenidos, la región NS5 ofrece la mayor opción para la detección y serotipificación del DENV en muestras clínicas. Por otro lado, varios mecanismos inmuno-patogénicos se han propuesto para explicar el incremento masivo de la permeabilidad vascular observada en las formas severas de la infección por el DENV. Posteriormente, una vez confirmada la co-circulación de los cuatro serotipos del DENV en el Estado Mérida y establecida la relación de cepas autóctonas con genotipos asiáticos implicados en casos de dengue grave, a través de estudios de epidemiología molecular, se evaluaron los cambios cinéticos de mediadores inflamatorios (IL-8, TNF- α), marcadores soluble de activación linfocitaria temprana (sIL-2R, sTNF-Rp75) y fracciones solubles de moléculas de adhesión celular (sICAM-1, sVCAM-1) como elementos predictores de severidad en pacientes con dengue. Los resultados indicaron que sIL-2R y sVCAM-1, marcadores tempranos de activación linfocitaria y endotelial, servirían como indicadores de severidad en la fase aguda de la infección causada por el DENV.

CAPITULO 1

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Dengue, inmunopatogenia de la enfermedad y genética evolutiva del virus dengue

www.bdigital.ula.ve

1.1 DENGUE: MARCO HISTORICO Y EPIDEMIOLOGIA

Desde el punto de vista clínico-epidemiológico, el dengue, representa la infección transmitida por artrópodos con mayor índice de morbilidad y mortalidad en las áreas urbanas, peri-urbanas y rurales de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Su agente etiológico, el virus dengue (DENV), es un arbovirus perteneciente a la familia *Flaviviridae* (1). Hasta la fecha, se conocen cuatro serotipos (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4), con analogía estructural, antigénica y patogénica, transmitidos al ser humano por mosquitos del género *Aedes* (2). Este Flavivirus es responsable de un amplio espectro de entidades clínicas que van desde un cuadro febril agudo y autolimitado conocido como dengue, hasta un cuadro grave de hemorragia y *shock* sistémico definido como dengue severo (DS) (3).

Aun cuando no se ha determinado con exactitud la carga real de la enfermedad, es evidente que las cifras de prevalencia e incidencia de la infección han aumentado dramáticamente en las zonas de riesgo a lo largo de los últimos 30 años. Dependiendo de la actividad epidémica de cada región, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que cada año se presentan entre 50 - 100 millones de casos de dengue y de 250.000 a 500.000 casos de DS, de los cuales aproximadamente 5% mueren como consecuencia del deterioro clínico característico de los casos complicados de la enfermedad (4, 5).

La primera descripción de una entidad clínica compatible con dengue se publicó en la Enciclopedia China en el año 992 de nuestra era (6). Sin embargo, fue en la década del año 1600 cuando se conoció en las Indias Francesas del Oeste un reporte similar, suscribiendo a la enfermedad con el nombre "*Coup de Barre*". En 1779, se reportaron epidemias de casos febriles en Batavia, Indonesia y el Cairo, Egipto identificando las dolencias con el nombre "*Knockelkoorts*" (fiebre de huesos) y "*Mal de Genoux*" (problemas de rodilla) respectivamente. Un año después, en 1780 en Filadelfia, Estados Unidos, se describió a la enfermedad febril como un cuadro de "*escarlatina reumática*".

A lo largo de la historia fueron varios los nombres asociados a esta enfermedad de acuerdo a la región geográfica, sin embargo, el término finalmente introducido al glosario médico universal fue "*dengue*" un vocablo derivado de la expresión swahili (lengua bantú africana) "*dinga, dyenga*

o ki denga pepo" (golpe súbito causado por un espíritu maligno) (6). A partir de la década de los años cincuenta se denominó fiebre dengue (FD) a la forma clásica de la enfermedad y dengue hemorrágico febril (DHF)/síndrome de *shock* por dengue (SSD) a las formas severas de esta patología. (6).

La aparición casi simultánea de epidemias en Asia y África después de la Segunda Guerra Mundial, reveló una distribución cosmopolita del virus y su vector (7). Para el año 1970 solo nueve países habían notificado casos de DHF, no obstante, en la actualidad se ha confirmado su presencia en más de 100 países constituyendo una causa importante de hospitalización y muerte fundamentalmente para la población pediátrica. Por ello, se considera una enfermedad emergente para la cual las principales estrategias de control deben estar dirigidas a reducir la población de vectores y detectar de forma precoz la infección hasta el desarrollo de una vacuna eficaz (8, 9).

Durante el año 2008, en la región de las Américas, Asia Sudoriental y Pacífico Occidental se registraron más de 1.2 millones de casos de dengue y DS; tan solo dos años después esta cifra se ubicó por encima de 2.3 millones de casos (sin distinción de la condición clínica, según datos oficiales presentados por los países miembros a la OMS), calculo epidemiológico que no registró descenso alguno para el año 2013 (10).

Los factores determinantes del incremento sustancial en el número de casos de dengue, se asocian con el crecimiento sin precedentes de la población, la urbanización masiva sin previa planificación, el escaso abastecimiento de agua potable, la disposición inadecuada de los residuos sólidos y depósitos no biodegradables, el aumento del número de viajeros y de las migraciones poblacionales, el deterioro de los sistemas de salud y los programas de control vectorial así como la acentuación de la pobreza, condiciones que han contribuido notablemente a agravar la situación epidemiológica regional e incluso global (11).

Asimismo, la aparición de cepas con mayor virulencia y capacidad de transmisibilidad, asociado a la circulación simultánea de más de un serotipo en una misma región, también ha influido en el recrudecimiento de las epidemias. Recientemente, se demostró que los cambios climáticos de los últimos años contribuyen a la transmisión viral, por lo que se espera que en el futuro aumente el número de casos (11, 12).

1.1.1 El dengue en las Américas

La segunda mitad del siglo XX marcó un giro en la situación epidemiológica del dengue en la región de las Américas. Así, a comienzos de la década del año 1980, se confirmó la primera epidemia de dengue en Santiago de Cuba con 24.000 casos confirmados de DHF, 10.000 casos de SSD y 158 muertes en un período de tres meses, la mayoría de las cuales involucraron a individuos menores de 15 años de edad (13-15). La cepa causante de la epidemia fue identificada años más tarde como DENV2, genotipo asiático, prototipo *Nueva Guinea C* (16). Una vez superado este incidente, no se observaron más casos de DHF hasta que sobrevino la segunda epidemia más importante del continente durante el año 1989 en Venezuela, causada por los serotipos DENV1 y DENV2 con un saldo de 73 fallecidos (17). A partir de ese momento las autoridades sanitarias declararon la situación epidemiológica de endemidad en todo el territorio nacional, una condición que lamentablemente se agudizó con el transcurrir del tiempo al constatar la circulación de los cuatro serotipos, algunos de ellos con variantes de alta patogenicidad.

1.2 DENGUE VIRUS: ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURA GENÓMICA

La partícula del DENV es de forma esférica y mide entre 40 nm a 50 nm de diámetro, presentando proyecciones superficiales de 5 nm a 10 nm aproximadamente. El genoma, descrito como una hebra de ARN de cadena simple y polaridad positiva, está constituido al menos por 10.700 nucleótidos rodeados por una nucleocápside circular de simetría poliédrica y una envoltura lipídica en la que se entremezclan abundantes glicoproteínas virales (18). El ARN viral, que funciona como ARN mensajero al traducirse directamente en los ribosomas durante el proceso de replicación, se caracteriza por presentar una estructura tipo caperuza - cap I - en el extremo 5' (m⁷GpppAmp) seguido por una secuencia nucleotídica conservada AG. Por su parte, el extremo 3' que carece de segmentos poliadenilados (poly A⁺), termina con una secuencia conservada CU (19, 20).

El genoma del DENV posee un único marco de lectura abierto (ORF, del inglés *Open Read Frame*) flanqueado por regiones no codificantes en ambos extremos (3'UTR/700 nucleótidos y 5'UTR/100 nucleótidos), que varían en tamaño de acuerdo a cada serotipo y contienen

secuencias conservadas que actúan como elementos “*cis*” dirigiendo los procesos de amplificación, traducción y encapsidación del ARN viral (21). La función más significativa del segmento 5'UTR reside en su complementariedad reversa con 3'UTR un evento crucial para dar inicio al proceso de replicación (20).

El ORF codifica para un precursor polipeptídico, el cual tras experimentar sucesivos cortes co y post-traduccionales por proteasas celulares del hospedero y serin-proteasas virales, da origen a tres proteínas estructurales conocidas como proteína de la cápside (C), proteína de membrana (M) y proteína de envoltura (E) localizadas en el extremo aminoterminal del virión maduro y siete proteínas no estructurales ubicadas en el extremo carboxiterminal (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5') (Figura 1). Los virus inmaduros contienen una proteína conocida como pre-membrana (prM), precursor de la proteína M (21, 22).

La ruptura de las uniones C/prM, prM/E, E/NS1 y NS4A/NS4B lo realiza una proteasa del hospedador conocida como signalasa retículo endoplasmica. Las proteínas no estructurales restantes son procesadas por proteasas virales. El corte entre NS2/NS3 es llevado a cabo por la proteinasa NS2-NS3 dependiente de Zn^{+2} de forma autocatalítica. Finalmente, la serinproteasa NS3 produce el corte entre NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B (19, 20).

1.2.1 Proteínas estructurales

1.2.1.1 Proteína C:

Constituye el componente básico de la cápside. Tiene un peso molecular aproximado de 9 kDa a 12 kDa, una elevada carga positiva y múltiples residuos de lisina y arginina que le conceden su carácter básico, además de permitir su interacción con el genoma viral para formar la nucleocápside como unidad estructural (19). La porción central de la proteína contiene dominios hidrofóbicos que interaccionan con membranas celulares, favoreciendo el ensamblaje del virión. Aún cuando la homología de esta proteína entre los Flavivirus es muy baja, en el DENV se ha conservado evolutivamente sin cambios significativos representando el primer polipéptido sintetizado durante la traducción (23). Probablemente, su dominio carboxilo terminal, actúa como transductor de señales a través de la membrana (19).

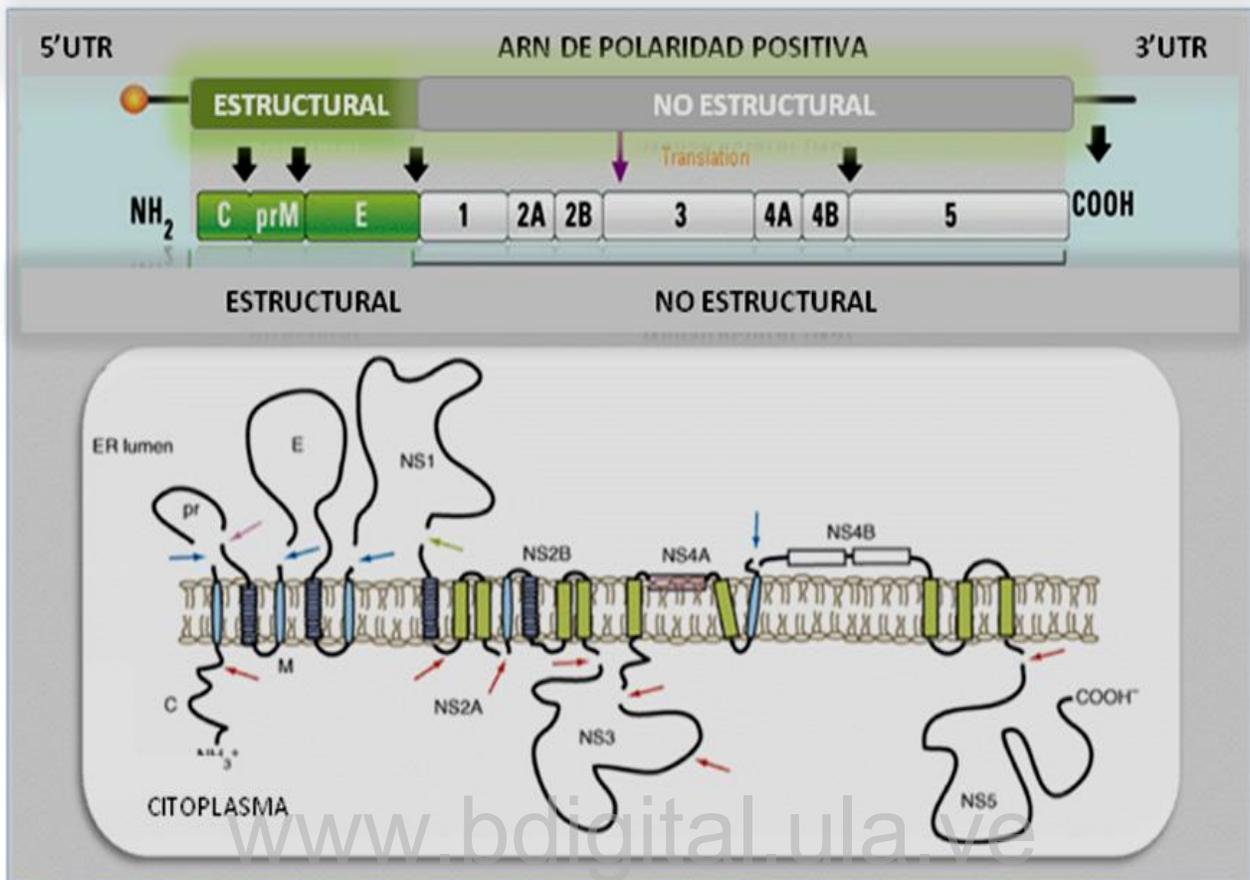


Figura 1. Genoma del DENV. El marco de lectura se encuentra flanqueado por dos regiones no traducidas (5'UTR/3'UTR), que codifica para tres proteínas estructurales: cápside (C), membrana (M), envoltura (E) y siete proteínas no estructurales: NS1 a NS5 (*NS* del inglés *nonstructural*). Modificado de DengueInfo (24); Perera y Khun (18).

1.2.1.2 Proteína prM:

Con un peso molecular de 22 kDa a 26 kDa, es el precursor glicosilado de la proteína M. La separación proteolítica de este precursor por una proteasa del aparato de Golgi durante el desarrollo de la partícula viral, da origen a la formación de la proteína M. Esta escisión parece estar ligada a la liberación del virus, pero no ocurre necesariamente en todas las moléculas proteicas presentes en la membrana viral, ya que en ocasiones la proteína M surge adyacente al precursor prM en el virión maduro (21). Dependiendo de la madurez del virus, se encuentra bajo dos formas: glicosilada asociada a la célula hospedera en los viriones inmaduros, o

heterodimerizada con la proteína E en la partícula viral madura. El segmento aminoterminal de esta proteína es predominantemente hidrofílico; exhibe tres grupos glicanos y seis residuos conservados de cisteína, los cuales a través de puentes disulfuro, le permiten incorporarse a los viriones (25). Antes de la gemación de la partícula viral, su extremo aminoterminal es procesado generando la proteína M no glicosilada conformada por dominios de interacción a membranas (26).

1.2.1.3 Proteína M:

De 7 kDa a 9 kDa, se asocia a la envoltura lipídica del virus creando una estructura de matriz similar a la de los Orthomyxovirus, Paramyxovirus y Rhabdovirus. Su origen deriva de la proteólisis del precursor prM y la eliminación de la porción amino terminal. La formación de esta proteína parece ser crucial en la morfogénesis del virus, lo que implica un incremento en la infectividad y reorganización de la estructura superficial de la partícula viral (19, 21).

1.2.1.4 Proteína E:

Representa un elemento constitutivo de la envoltura viral bajo la forma de una típica proteína transmembranal glicosilada (27). Da origen a estructuras con aspecto de espículas conocidas como plepómeros. Tiene un peso molecular aproximado de 53 kDa, constituyendo la proteína viral de mayor tamaño y la más conservada entre los miembros de la familia *Flaviviridae* (27, 28). Usualmente, esta proteína aparece de forma intracelular como un trimero en los viriones maduros (28).

Estudios de cristalografía muestran que la proteína E, se divide en tres dominios estructurales. El dominio central, corresponde a la región molecular asociada a cambios conformacionales activados por pH ácidos, el dominio de dimerización II, se asocia con la fusión de membranas mediada por el virus y el dominio III localizado hacia el extremo carboxiterminal de la proteína, es quien interactúa con los receptores presentes en la superficie de las células hospederas (28). La proteína estructural E pertenece a la familia de proteínas de fusión clase II, responsables de estabilizar los complejos de internalización viral durante los primeros pasos de la infección celular (29).

1.2.2 Proteínas no estructurales

1.2.2.1 NS1:

Es una glicoproteína con un peso molecular comprendido entre 42 kDa y 50 kDa. Contiene dos señales del tipo Asn-X-Ser/Thr empleadas para la adición de carbohidratos. Se la encuentra bajo dos formas: soluble en el citosol y extracelularmente no asociada al virión. El gen que la codifica no presenta codón de inicio ni de finalización y la estructura molecular generalmente es dimérica. (30). Su función no está muy bien dilucidada; sin embargo, algunos estudios la han asociado a procesos moleculares vitales como el ensamblaje, la maduración y la replicación temprana del ARN viral (31, 32). Es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso (RER) como una proteína monomérica y en un período relativamente corto, tras sobrellevar modificaciones post-traduccionales, se une formando un homodímero; de allí pasa al aparato de Golgi donde sufre cambios conformacionales para finalmente alcanzar la superficie celular y posteriormente el medio extracelular (32).

1.2.2.2 NS2:

Esta proteína se encuentra estructurada por dos fragmentos conocidos como NS2A y NS2B con un peso molecular de 22 kDa y 14 kDa respectivamente. Es un co-factor requerido para la función de la serin-proteasa de NS3. Asimismo, en el dominio central existe una región conservada constituida por 40 aminoácidos requerida para la actividad de la proteasa NS2B-NS3. Ambos fragmentos se han reconocido como proteínas hidrofóbicas, el primero de ellos indispensable para el adecuado procesamiento proteolítico de la región carboxiterminal de NS1 (NS2A) y el segundo (NS2B) capaz de mediar la ruptura proteolítica del complejo E-prM-C (33-35).

1.2.2.3 NS3:

Dentro del genoma del DENV, es la segunda proteína de mayor tamaño con un peso molecular aproximado de 70 kDa. Se piensa que es componente de la maquinaria enzimática de replicación del ARN viral. La comparación de secuencias nucleotídicas sugieren que es trifuncional, con actividad de proteasa, helicasa y ARN trifosfatasa trifosfato formando la estructura cap I en el

extremo 5' (36). Esta proteína asociada a la membrana a través de su interacción con NS2B, posee en el extremo aminoterminal el dominio catalítico de la proteasa NS2B-NS3. Se considera que esta enzima participa en el clivaje de NS2B, NS3, NS4A, NS5 y del extremo carboxiterminal de la proteína C (18). NS2B y la proteína NS3 forman un complejo esencial para el procesamiento de todos los sitios de corte de las proteínas no estructurales y estructurales (37).

1.2.2.4 NS4:

La proteína NS4 da origen a dos fragmentos relativamente pequeños conocidos como NS4A y NS4B ambos hidrofóbicos, con pesos moleculares aproximados de 16 kDa y 27 kDa, respectivamente (38). Teniendo en cuenta la distribución de NS4A y su interacción con la proteína NS1, se sugiere que NS4A participa en la replicación del ARN viral, quizás anclando componentes de la replicasa a la membrana celular (27). Por su parte, el fragmento NS4B que se localiza en sitios de replicación del genoma viral, también aparece diseminado en la membrana citoplasmática y el núcleo. Esta proteína sufre modificaciones post-traduccionales que aún son desconocidas (39).

1.2.2.5 NS5:

www.bdigital.ula.ve

Es la última proteína codificada a lo largo del ORF. Tiene un peso molecular aproximado de 105 kDa, y representa una de las proteínas más conservadas en los Flavivirus. Es una proteína básica caracterizada por tener una importante homología con enzimas metiltransferasas por lo que podría estar involucrada en la metilación de la estructura cap I en el extremo 5' del ARN viral (22). Se cree que funciona como ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRp, del inglés *RNA-dependent RNA-polymerase*), pues posee una región altamente conservada Gly-Asp-Asp característica de este tipo de enzima presente en los virus ARN de cadena positiva (40). La proteína NS5 presenta un conector de 37 aminoácidos con una secuencia de localización nuclear (NLS del inglés *Nuclear Localization Sequence*) reconocida por subunidades del complejo beta importina-NLS16. De forma excepcional, esta región es también sitio de asociación de NS5 con NS3 para formar el complejo replicasa. Este suceso ocurre por una interacción entre la región carboxiterminal de NS3 con la región aminoterminal de NS5. La interacción NS5 y NS3, y su posterior importación al núcleo, podría ser un proceso regulado por reacciones de

hiperfosforilación pues se han encontrado formas libres de NS5 en estado fosforilado a nivel nuclear (20, 40).

1.3 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE

1.3.1 Transmisión y entrada viral

El dengue es una enfermedad de transmisión fundamentalmente vectorial. La infección inicia cuando el vector infectado se alimenta del hospedero e introduce partículas del DENV al espacio subcutáneo. Esta es la principal vía de transmisión de importancia clínico-epidemiológica, pues el dengue no se transmite por vía oral, respiratoria, ni sexual (41). No obstante, se ha descrito la transmisión vertical (42, 43), transfusional (44, 45) y las formas de transmisión inusualmente especificadas por trasplante de órganos (46) y accidentes laborales con agujas contaminadas (47).

Entre los vectores miembros de la familia *Culicidae*, género *Aedes*, se encuentran *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes scutellaris*, *Aedes africanus* y *Aedes luteocephalus* (48). Sin embargo, la especie reconocida como el principal agente transmisor del dengue es *Aedes aegypti*, un mosquito que aun cuando se distribuye frecuentemente entre los 35° de latitud norte y 35° de latitud sur, puede extenderse hasta los 45° norte y hasta los 40° sur. La altitud promedio de localización es por debajo de los 1.200 metros sobre el nivel del mar, aunque se ha registrado en alturas aproximadas de 2.400 metros. En otros países, principalmente asiáticos, además de *Aedes aegypti*, se ha identificado como vector primario y trascendental de la infección a *Aedes albopictus*, responsable de mantener el ciclo evolutivo del virus en ambientes silvestres incluyendo a primates inferiores como importantes reservorios (49).

Aedes aegypti es un vector con hábitos típicamente domiciliarios. Los sitios de cría son fundamentalmente artificiales: urbanos o domésticos y cuando las condiciones son propicias, no suele desplazarse a grandes distancias de los sitios de oviposición, pero, eventualmente bajo condiciones simuladas puede reconocerse un rango de dispersión activa de hasta 1 a 2 kilómetros (50). Por otro lado la dispersión pasiva a través de medios de transporte, es uno de los factores más importantes de diseminación de estos insectos y por ende de las cepas de DENV de una

región a otra. Su ciclo de vida exhibe una metamorfosis completa, es decir, que las formas inmaduras salidas del huevo son completamente diferentes al adulto, las primeras son de vida acuática y las segundas de vida aérea (49).

Solo la hembra adquiere el virus al alimentarse a partir de una persona en período de viremia, pues el macho se nutre de savia de vegetales. El virus se replica en el intestino de *Aedes aegypti* y desde allí migra hacia sus glándulas salivales en las que queda disponible para mantener la cadena epidemiológica. Todo este proceso dependiente de la temperatura ambiente y conocido como período de incubación extrínseca dura entre 8 y 12 días aproximadamente (49).

La transmisión del DENV se produce en ciclos enzoóticos (endémicos) y epizooticos (epidémicos). En el ciclo enzoótico participan vectores selváticos como *Aedes furcifer* y *Aedes luteocephalus* y primates inferiores presentes en los bosques tropicales y lluviosos de Asia y África (51). El ciclo epidémico/urbano que involucra al hombre y al vector, es el de mayor importancia desde el punto de vista de salud pública (51). En América, el DENV persiste en la naturaleza solo mediante un ciclo de transmisión hombre - *Aedes aegypti* - hombre (3).

De forma general, se considera que la primera interacción del virus con las células permisibles, tiene lugar con elementos de unión presentes en la superficie celular, para luego ser transferido a un segundo receptor capaz de internalizarlo. Una vez formada la vacuola endocítica, la proteína estructural E en su dominio II, bajo un pH inferior a 6.5, sufre cambios conformacionales generando trímeros capaces de propiciar la fusión entre las membranas de la vacuola y la envoltura viral, permitiendo la liberación de la nucleocápside hacia el citoplasma de la célula infectada (52, 53). La endocitosis es mediada por la proteína clatrina (54); sin embargo, en algunos casos se ha observado que a pH fisiológico el virus puede ingresar por fusión directa con la membrana plasmática de células de mosquito C6/36 y líneas celulares de mamíferos como BHK-21 provenientes de riñón de hámster, ó a través de balsas lipídicas (55).

Diversos trabajos han identificado los receptores empleados por el DENV para lograr la internalización celular. Algunos lo hacen de forma específica, mientras que otros solo establecen uniones de baja afinidad. Entre ellos se incluye el polisacárido glicosamino-heparán sulfato

(GAGs/HS), una lectina tipo C presente en la matriz extracelular de varias células capaz de interactuar con la proteína estructural E (56, 57).

Entre otros receptores identificados en células de mamífero, se encuentran proteínas susceptibles a tripsina, proteínas de choque térmico (Hsp70/Hsp90) (58), GRP78/BiP (receptor de células endoteliales asociado a respuestas de estrés y regulada por la glucosa) (59), CD14 (proteína de unión al lipopolisacárido en células mielomonocíticas) (60), el receptor de laminina de alta afinidad de 37 kDa/67 kDa (61, 62), receptor de manosa (RM) (63) así como DC-SIGN (del inglés *dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*) ó CD209 (64, 65). De todos estos receptores DC-SIGN, una proteína de membrana tipo-II con un dominio extracelular de lectina tipo C dependiente de Ca^{+} y presente en las células dendríticas (CDs), ha sido el más estudiado, reconociendo su potencial para mediar la infección por los cuatro serotipos del DENV. Esta proteína une carbohidratos con alto contenido de manosa, presentes en la superficie del virus (66).

Otra vía para la internalización del DENV a las células susceptibles, implica el receptor gamma Ila y Iib (Fc γ IlaR, Fc γ IibR) para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas. Se ha sugerido que los anticuerpos no-neutralizantes de la clase IgG, producidos durante una infección primaria, facilitan el ingreso de un serotipo diferente tras la formación de complejos inmunoglobulina G (IgG)-virus y su interacción con los Fc γ R; la propuesta de esta ruta de penetración viral incluye a los monocitos/macrófagos y CDs como principales blancos celulares por su facultad de captar inmunocomplejos; de hecho, esta forma de internalización es asiento de las teorías del desarrollo de cuadros de DS al potenciar la infectividad por el incremento en el acceso de partículas virales a las células diana (67, 68).

Empleando modelos animales y humanos, se ha observado *in vitro*, que el DENV es capaz de infectar numerosas líneas celulares, incluyendo monocitos, macrófagos, células endoteliales y neuronales así como otras células que facilitan su proceso de replicación y propagación. No obstante, existe un consenso general con respecto al hecho de que las CDs (células de Langerhans, células dérmicas intersticiales y células plasmocitoides), son más permisivas a la infección por el DENV que los miembros del linaje fagocito mononuclear reconocidas inicialmente como blanco central durante la infección natural (69-71). Aunque se ha descrito que

los fibroblastos y los linfocitos B pueden infectarse con el DENV *in vitro*, no se conoce aún si estas células son capaces de infectarse *in vivo* (72).

1.3.2 Ciclo replicativo del virus dengue

Sobrevenida la liberación del genoma viral al citoplasma celular, la región 5'UTR conduce el ARN hacia los ribosomas para iniciar la traducción del único marco de lectura y dar origen a una poliproteína procesada co-traducional y post-traducionalmente que dará lugar a las 10 proteínas virales estructurales y no estructurales. La traducción temprana ocurre asociada al RER siendo posible localizar las proteínas del virus en su contexto característico, ya sea luminal, en la membrana del RER o en el citoplasma (73). El factor de iniciación eucariótico 4F (eIF4F) reconoce la estructura cap 5' terminal y moviliza el complejo ribosómico (74). Se ha descrito una forma de traducción independiente de la estructura cap mediante la interacción de los extremos 5'UTR y 3'UTR con diferentes proteínas de las células hospedadoras (eIF1A, La, PTB, YB1, hnRNP A1, hnRNP A2/B1 and hnRNP Q) iniciando así la síntesis del ARN viral, un hecho que refleja probablemente el desarrollo de mecanismos de adaptación a las respuestas antivirales celulares o la manera de replicar el genoma del DENV en diferentes tipos de células con niveles heterogéneos de factores de traducción esenciales (75).

Aproximadamente tres horas después de ocurrida la infección, una vez llevada a cabo la síntesis del genoma viral de forma asimétrica y semi-conservativa, las proteínas NS3 y NS5 forman el complejo de replicasa viral que reconocerá las nuevas moléculas de ARN por una estructura secundaria característica ubicada en el extremo 5'UTR altamente conservada en los Flavivirus (20). En esta región de la secuencia codificadora se encuentran dos horquillas estabilizadoras, una de mayor tamaño que la otra (SLA y SLB del inglés *Stem Loop A/B*, respectivamente) localizadas antes del codón iniciador de la traducción AUG; sin embargo, para que ocurra la replicación del ARN es necesario ubicar el complejo correspondiente a la replicasa viral en el extremo 3'UTR. Para ello se establecen interacciones de ARN-ARN de largo alcance mediadas por secuencias complementarias ubicadas en ambos extremos del genoma; de este modo el material genético del DENV adopta una singular forma circular o de anillo. Es probable que posterior a este hecho, la estructura circular regrese a su configuración lineal por acción de la

actividad helicasa de NS3 (76, 77). Este proceso tiene lugar en la región perinuclear de la célula infectada asociada a membranas lisas del retículo endoplásmico (78).

Por su parte, la proteína NS1, al parecer podría interactuar con una región específica del ARN viral a modo de co-factor durante el proceso de replicación formando parte del complejo de elongación para constituir las formas replicativas del material genético (32). Finalmente, la interacción de NS3-NS5, la cual ocurre entre una región de 37 aminoácidos localizado en la región aminoterminal de NS5 y una porción de 315 aminoácidos del extremo carboxiterminal de NS3, es escindida por acción de un proceso de fosforilación. Esto favorece que NS5 reconozca receptores beta importina generando su localización en el núcleo (79).

De esta forma el ARN viral funciona como molde para la síntesis de cadenas de polaridad negativa las cuales generarán a posteriori copias de ARN de polaridad positiva con tres destinos posibles: servir nuevamente como plantillas transcripcionales, funcionar como mensajeros para la síntesis proteica y ensamblaje de la nucleocápside o transformarse en el material genómico de nuevos viriones (80, 81).

Inicialmente se forman partículas virales inmaduras no infecciosas a nivel del retículo endoplásmico, estructuradas por las proteínas E y prM además de la nucleocápside. La ruptura proteolítica de la proteína de prM ocurre en el aparato de Golgi (vacuolas pre y post-Golgi), dando origen a una partícula viral madura e infecciosa la cual será liberada de la célula hospedadora por exocitosis o efecto citopático a través de rupturas puntuales en la membrana citoplasmática (52, 81, 82).

1.4 CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD

La infección por cualquiera de los cuatro serotipos del DENV da origen a una enfermedad dinámica que puede ser clínicamente inaparente o causar una dolencia de variada intensidad que incluye desde formas febriles con mayor o menor afectación del estado general del paciente, hasta cuadros graves de *shock* sistémico (83). Hasta ahora se ha aceptado que la diferencia principal entre dengue y DS es la extravasación plasmática, especialmente cuando tiene expresión clínica (derrame pleural, pericárdico o ascitis) y repercusión en el paciente (84, 85).

Los signos y síntomas propios de la enfermedad puede variar con el transcurrir de los días por lo que tiene una naturaleza evolutiva impredecible (3).

Luego del período de incubación (de 7 a 14 días), la enfermedad comienza abruptamente y es seguida por tres fases: febril, crítica y de recuperación. La fase febril caracterizada por un aumento repentino de la temperatura corporal (39 - 40°C) es variable en su duración y se vincula claramente con el estatus de viremia. La infección causa un cuadro febril agudo en el 10% al 25% de los casos, pues en la población restante usualmente no se evidencian síntomas clínicos de la enfermedad (86).

Como en otras patologías virales, la evolución hacia la recuperación pasa por la remisión de la fiebre; sin embargo, en otros casos, la disminución de la fiebre coliga con el momento en el cual el paciente pudiera complicarse clínicamente, es decir, la fase febril es la misma en pacientes con dengue y pacientes que cursan con las formas graves de la enfermedad. Por lo tanto, cuando el paciente se encuentra en esta fase, es crucial la vigilancia de signos clínicos y de laboratorio que indiquen la progresión hacia la fase crítica (87).

Generalmente, la primera expresión clínica observada en los pacientes con dengue es la fiebre de intensidad y duración variable (2 a 4 días), aunque puede ser antecedida por diversos pródromos. La fiebre suele estar asociada a cefalea, náuseas, vómitos, mialgias y/o artralgias, erupción cutánea, hemorrágicas inusuales y leucopenia (85). En los niños, es frecuente que la fiebre sea la única manifestación clínica, acompañada en algunos casos con síntomas digestivos (dolor abdominal, diarreas profusas) o respiratorios (tos, rinorrea, coriza, congestión nasal, faringitis e incluso disnea) cuya aparición depende del grado de virulencia y patogenicidad de las cepas del DENV circulantes en la región geográfica (88, 89). Entre el tercer y sexto día para los niños, y entre el cuarto y sexto día en el caso de los adultos, la fiebre desciende, momento en el cual la enfermedad toma dos caminos: se inicia la etapa de recuperación de los casos definido como dengue o aparece dolor abdominal y manifestaciones hemorrágicas de variada intensidad hasta el punto de constatar extravasación plasmática, dando lugar a los cuadros clínicos de DS (85).

La fase crítica coincide con la extravasación de plasma hacia el espacio extravascular. Su expresión más alarmante es el DS, caracterizado fundamentalmente por el deterioro rápido y

progresivo del paciente hasta llegar al colapso vascular, asociado a fallas multiorgánicas (3, 87). La magnitud de la caída de la presión arterial media, el aumento del hematocrito y el estrechamiento de la presión de pulso reflejan finalmente la intensidad de la efusión plasmática.

En la etapa de recuperación, se hace evidente la mejoría del paciente, no obstante, es importante vigilar el desarrollo de infecciones bacterianas sobreagregadas habitualmente pulmonares como neumonías nosocomiales o edemas por la manipulación excesiva de líquidos, así como la aparición de secuelas neurológicas, esencialmente paresia espástica residual y mielitis transversa, si la enfermedad evolucionó hasta las formas clínicas complicadas (90). Algunos pacientes manifiestan durante el proceso de convalecencia un estado de astenia e incluso bradipsiquia que puede persistir por semanas (91).

En ocasiones el DENV afecta órganos internos constituyendo las formas viscerales o atípicas de la enfermedad, en casos puntuales coligadas a una determinada predisposición individual u otra enfermedad previa o coexistente. Estas manifestaciones clínicas descritas desde hace tres décadas, han aumentado significativamente con el transcurrir del tiempo afectando fundamentalmente a la población menor de 15 años de edad hasta alcanzar cifras de mortalidad realmente estremecedoras. Entre ellas, se incluyen manifestaciones gastrointestinales (abdomen agudo, hepatitis, colecistitis alitiásica, pancreatitis) neurológicas (encefalitis o encefalopatía con afectación de la conciencia, convulsiones, síndrome de Guillan-Barré), renales (síndrome hemolítico urémico, glomerulonefritis aguda), cardíacas (miocarditis manifestada en hipocontractibilidad miocárdica con disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y posible fallo cardíaco), pulmonares (neumonitis intersticial), medulares (síndrome hemofagocítico) y musculares (rabdomiolisis) (86, 92).

1.4.1 Clasificación del dengue

La clasificación actualmente recomendada por la OMS establece dos formas clínicas de la enfermedad: dengue, con una subcategorización binaria conocida como *dengue sin signos de alarma* (DSSA) ó *dengue con signos de alarma* (DCSA) y DS (Figura 2) (3). En el término dengue se incluiría la definición de la enfermedad anteriormente conocida como FD, en tanto que el término DS correspondería a las entidades reconocidas como DHF y SSD. La

clasificación inicial aplicada durante tres décadas, fue sustituida por considerarla rígida, dependiente de los resultados de laboratorio, no inclusiva de enfermos con formas atípicas y graves de la enfermedad e ineficaz para el manejo clínico de los pacientes (93).

En el caso del *dengue sin signos de alarma*, la descripción coincide con lo señalado en la fase febril de la enfermedad. En los niños, suele haber exigua expresión de síntomas y la enfermedad puede manifestarse como un “síndrome febril inespecífico”. Por su parte, los signos de alarma son el resultado de un incremento de la permeabilidad capilar y marcan el inicio de la fase crítica. Entre estos signos se reconocen: dolor abdominal intenso y continuo, acumulación de líquido, sangrado de mucosas, letargia o irritabilidad así como aumento del hematocrito acompañado en algunos casos por un cuadro de trombocitopenia, al menos, en dos mediciones, durante el seguimiento del paciente (3, 83).

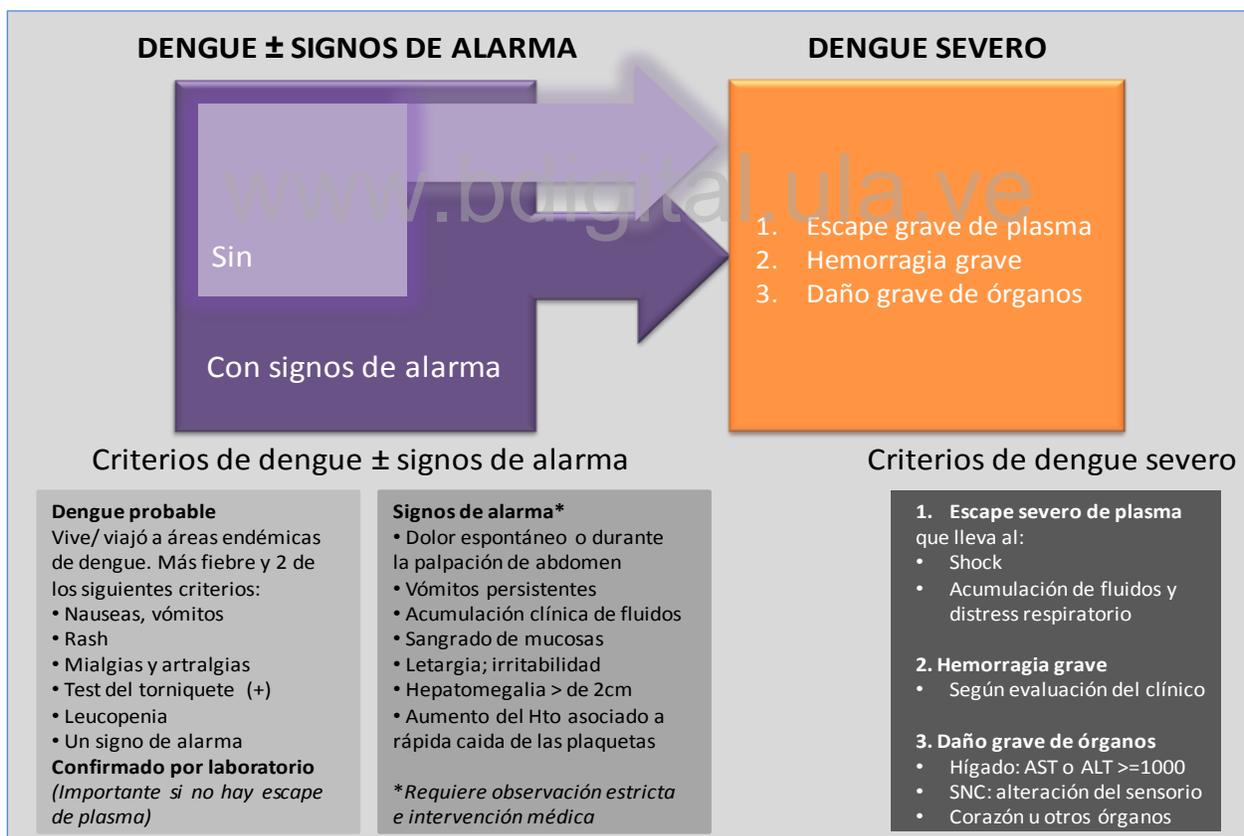


Figura 2. Clasificación clínica del dengue según criterios del Programa de Adiestramiento e Investigación en Enfermedades Transmisibles de la Organización Mundial de la Salud (TDR del inglés *Programme for Research and Training in Tropical Diseases/OMS*) (3).

Finalmente, los criterios de DS son los siguientes: extravasación severa de plasma expresada en choque hipovolémico, y/o dificultad respiratoria debida al exceso de líquidos en el espacio pleural y la cavidad torácica, hemorragias severas según criterio del médico tratante, y afectación de órganos con manifestaciones atípicas como hepatitis, encefalitis y/o miocarditis. Estos criterios de severidad tienen 95% de sensibilidad y 97% de especificidad (94).

1.5 RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE

1.5.1 Respuesta innata

La rápida activación de la respuesta inmune innata sería el paso limitante de la proliferación de la infección por el DENV. Poco después de penetrar la piel, el virus contacta las CDs presentes en la epidermis, conduciendo a su activación con la consecuente expresión de moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH ó MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, interferón tipo I alfa (IFN- α), interferón tipo I beta (IFN- β) e interferon gamma (INF- γ) (4, 95). La activación de estas células es esencial para la generación de la respuesta antiviral y tiene lugar tras el reconocimiento de estructuras virales por parte de los receptores *Toll-like* (TLR del inglés *Toll-like Receptor*) (TLR2-TLR4, TLR7-TLR9) (96); sin embargo, éstas células también contribuyen a la diseminación del virus una vez que migran hacia los ganglios linfáticos. Mientras ello ocurre, los virus que han penetrado la dermis son reconocidos por los macrófagos y neutrófilos allí existentes, quienes producirán óxido nítrico, un importante mediador para la eliminación de las partículas virales fagocitadas (4, 97), así como la mayoría de los intermediarios relacionados con los procesos de respuesta inflamatoria y hemostática. Posterior a este evento, las principales células fagocíticas suelen morir por apoptosis (98). La cantidad de células infectadas y, por consiguiente, el nivel de viremia, podrían ser los determinantes en la relación de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, así como del nivel de otros mediadores inmunes (99).

Diversos Flavivirus inducen sobreexpresión de moléculas del CMH de clase I para evadir la actividad de las células *Natural killer* (NK) (100). Las células NK tienen receptores para la porción Fc de la IgG un hecho que posibilita la unión de anticuerpos específicos hacia componentes virales en una infección secundaria. En la infección por el DENV la activación de

células NK logra eliminar las células infectadas por citólisis directa o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). Adicionalmente, durante las infecciones virales estas células producen IFN- γ uno de los principales componentes de la respuesta antiviral. Curiosamente en la infección por el DENV se ha observado que la disminución de células NK activadas se vincula con el desarrollo de las formas severas de la enfermedad (101).

El complemento representa un importante mecanismo efector para la respuesta inmune innata, a través de la vía alterna y de las lectinas, así como para la respuesta inmune adaptativa interponiendo la vía clásica. En la infección por el DENV son varios los eventos a mencionar con participación del sistema del complemento: durante el periodo de defervescencia (descenso de la fiebre), cuando aumenta la permeabilidad vascular, se detectan niveles plasmáticos elevados de C3a y C5a seguido de una marcada hipocomplementemia en pacientes con DS (102). La proteína viral NS1 se une al componente C4, evento que induce su degradación mediante la proteína reguladora CR1. De este modo, se elude la acumulación de C4b que contribuye a la formación de C3 convertasa (C4b2a) y la formación del complejo de ataque de membrana (CAM) (103). En los pacientes con dengue y DS se ha documentado un descenso significativo de C3, C4 y factor B. Sin embargo, en estudios recientes se ha observado la inducción de altos niveles de properdina-factor B en las células endoteliales infectadas por el DENV (104).

1.5.2 Respuesta adaptativa

La respuesta inmune a los antígenos virales es en gran medida dependiente de los linfocitos TCD4⁺ (LTCD4⁺) y linfocitos TCD8⁺ (LTCD8⁺) y su activación se ratifica desde el momento en el cual aparecen los primeros síntomas. Los LTCD4⁺ son los primeros en activarse, generando una respuesta dirigida contra múltiples proteínas virales, pero predominantemente contra las proteínas NS3, NS1, NS2A, NS5 y C, altamente inmunogénicas (105). Esta respuesta se caracteriza por la producción de INF- γ e interleuquina-2 (IL-2), citoquinas que dirigen su activación y proliferación mediante estimulación autocrina y paracrina (106, 107).

La activación de los LTCD8⁺ que ocurre posteriormente, trae consigo la producción no solo de IFN- γ , sino también de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , del inglés *Tumoral Necrosis*

Factor), además de exhibir una importante actividad citotóxica *in vivo* (108). En las infecciones secundarias es evidente la activación de los linfocitos LTCD8⁺ de memoria con reactividad cruzada entre los diferentes serotipos del DENV, lo cual es consistente con el hecho de que reconocen las proteínas no estructurales más conservadas del virus, particularmente NS5 (109). La presencia de células citotóxicas con reacción cruzada luego de una infección primaria, indica la posibilidad de que los linfocitos T de memoria proliferen y sean activadas en infecciones secundarias por un serotipo heterólogo del virus (110).

En la fase aguda de la infección por el DENV se ha detectado un incremento significativo de linfocitos T reguladores (LTreg), (CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺) con capacidad de suprimir la proliferación de otros linfocitos T, secretar interleuquina-10 (IL-10) y suprimir la producción de citoquinas vasoactivas como TNF- α , IFN- γ e interleuquina-6 (IL-6) (111). No obstante, aunque la población de LTreg se expande y funciona normalmente en la infección aguda, su número resulta insuficiente para contrarrestar la inmunopatogénesis observada en las formas graves de la enfermedad (112).

Al tiempo que ocurre la respuesta mediada por células, la glicoproteína E es el centro de la respuesta inmune humoral contra el virus. Se ha demostrado que los anticuerpos contra esta proteína tienen la capacidad de inhibir la unión del virus a la célula blanco y neutralizar *in vitro* la infectividad viral (113).

1.6 INMUNOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD

Aun cuando los mecanismos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el desarrollo del DS no se conocen con exactitud, particularmente por la ausencia de un modelo animal adecuado que permita reproducir la enfermedad en toda su expresión, se han puntualizado varias hipótesis destinadas a explicar por qué algunos pacientes desarrollan las formas hemorrágicas, mientras que otros exhiben presentaciones relativamente benignas (114, 115). La primera de ellas está relacionada con el desarrollo de respuestas inmunes humorales y celulares homo y heterotípicas aberrantes por el individuo infectado; la segunda se refiere al surgimiento de mecanismos involucrados en daño endotelial y la tercera alude las características del serotipo infectante y el

perfil genético del hospedador (115). El peso particular de cada una de ellas y sus interacciones son motivo de conjetura.

1.6.1 Alteración de la respuesta inmune

1.6.1.1 Amplificación dependiente de anticuerpos (ADA)

La producción de anticuerpos neutralizantes contra el DENV, capaces de proteger al individuo a largo plazo, resulta efectiva en el control de la infección, sin embargo, frente a una infección secundaria con un serotipo diferente, es posible el desarrollo del fenómeno conocido como amplificación dependiente de anticuerpos (ADA). Este fenómeno en el que anticuerpos no neutralizantes generados en una infección primaria presentan reactividad cruzada contra el virus causante de una infección secundaria, favorece la interiorización de partículas virales opsonizadas por el receptor Fc γ RII de la IgG en macrófagos y CDs, logrando no solo un mayor número de células infectadas, sino también la intensificación de la replicación del virus en la célula blanco y, como consecuencia, un incremento en la producción de mediadores responsables del aumento la permeabilidad vascular (116, 117). De hecho, durante una primo-infección cuando el mosquito introduce el DENV al tejido subcutáneo, solo es captado por el 0.01 al 1% de las CDs y macrófagos residentes del lugar, mientras que en presencia de anticuerpos no neutralizantes el 100% de estas células son capaces de fagocitar el virus (118).

Por otro lado, el fenómeno de ADA contribuye a explicar la patogénesis de la infección en recién nacidos producto de madres infectadas por el DENV. Consecuencia de la transferencia transplacentaria de anticuerpos IgG heterotípicos, por un período de tres a seis meses, el neonato queda expuesto al desarrollo de cuadros graves de la enfermedad si contrae la infección por un serotipo viral diferente al que produjo la infección materna. Esta situación de riesgo persiste hasta que los anticuerpos heterotípicos maternos, alcancen en el recién nacido niveles subneutralizantes (119).

El estudio de la estructura viral y la inmunogenicidad del DENV ha demostrado una relación entre el estado de maduración del virión, la infectividad y el reconocimiento por medio de los anticuerpos (120). Se sugiere que coexisten varias poblaciones de virus funcionalmente

diferentes: una población de viriones con gran densidad de la proteína prM la cual debe ser escindida para la correcta maduración del virión y alcanzar propiedades de infectividad, una población de viriones con una densidad intermedia de esta proteína, la cual puede llegar a ser infecciosa, pero eventualmente ser neutralizada por anticuerpos anti-prM y una población de viriones maduros, los cuales son neutralizados solo por anticuerpos dirigidos contra la envoltura viral (121). De este modo, las partículas virales inmaduras también tienen un papel importante en la inmunopotenciación de la infección y podrían contribuir al desarrollo de formas graves de la enfermedad, ya que en una infección secundaria son capaces de infectar células blanco en presencia de anticuerpos no neutralizantes (122).

1.6.1.2 Selección de mutantes de escape a la neutralización

Se reconoce que tras una infección primaria el repertorio de anticuerpos neutralizantes generados es capaz de resolver la infección causada por un serotipo viral diferente en un tiempo aproximado de tres meses, antes que, en los individuos infectados por segunda vez tenga lugar el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa frente el agente viral.

Como resultado del proceso de maduración de la afinidad, los anticuerpos generados durante una primo-infección por un serotipo específico del DENV, son capaces de reconocer determinantes antigénicos comunes en la superficie de las partículas virales correspondientes a los tres serotipos restantes. De esta forma el sistema inmunológico logra eliminar en su mayoría, a los viriones responsables de una infección secundaria; de hecho, los individuos desarrollan cuadros clínicos "benignos" o incluso en muchos casos asintomáticos. Sin embargo, en otros casos, algunas partículas virales escapan a la neutralización, pues en el proceso de síntesis de sus proteínas estructurales, no son expresados aquellos determinantes comunes al serotipo causal de la primo-infección. Por ende, en estos individuos es muy probable observar cuadros clínicos complicados de la enfermedad. En este último caso, los anticuerpos predominantes son inmunoglobulinas que al no neutralizar la infección por medio de su porción Fc, se unen a diferentes líneas celulares donde encuentran los receptores correspondientes generando el fenómeno de ADA (123).

1.6.1.3 Activación del complemento

Se postula que la activación del complemento tiene un papel fundamental en la patogénesis del dengue. Durante la replicación del genoma viral, se liberan al espacio extracelular niveles significativos de la proteína no estructural NS1. Se presume que esta proteína activa directamente el sistema de complemento, además de formar complejos inmunes con anticuerpos no homotípicos, estimulando la vía clásica del complemento (124, 125). La activación de este sistema de proteínas promueve en primer lugar, la formación del complejo C5b-C9 atinando reacciones celulares capaces de estimular la producción de citoquinas pro-inflamatorias y en segundo lugar induce la activación de mecanismos locales y sistémicos implicados en el desarrollo del proceso patológico de coagulación intravascular diseminada (CID), un evento que define la presencia de cuadros graves de DS (126).

1.6.1.4 Respuesta atípica de linfocitos T

Mientras los linfocitos T específicos son esenciales para la eliminación de las infecciones virales, también pueden contribuir a la progresión de la enfermedad a través del daño tisular (127). Durante la infección por el DENV, la reactivación de linfocitos T de memoria que reaccionan frente a serotipos heterólogos, puede proveer inmunidad parcial, sin embargo, también puede ser un factor desencadenante de procesos inmunopatológicos o desviaciones inmunes (cambios en el equilibrio del patrón de LTCD4⁺ Th1/Th2) o ambas, un rasgo propio de los casos graves o complicados de la enfermedad (125, 128).

En el transcurso de la fase aguda de una infección secundaria por un serotipo heterólogo, se activan predominantemente clones de LTCD4⁺ y LTCD8⁺ hiperreactivos, generando una elevada concentración de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ y TNF- α afectando considerablemente la permeabilidad vascular (129). Estas células reaccionan de un modo disímil no solo contra serotipos heterólogos sino también frente a epítopes homólogos. Los linfocitos T pueden inducir fenómenos inmunopatológicos a través de dos mecanismos: la citotoxicidad y/o la liberación de mediadores inmunes. La activación del primero de ellos puede a su vez tomar dos caminos: la liberación de perforinas y granzimas o la interacción Fas/FasL. En la infección por el DENV, estudios *in vitro* muestran que cuando se activa la vía Fas/FasL, la lisis tiene lugar

sobre las células infectadas y las células contiguas no infectadas por el virus, evento conocido como efecto "*bystander*". Este escenario contribuye evidentemente con el complejo desarrollo de la enfermedad. Algunas células de la respuesta inmune así como las células endoteliales, también pueden verse afectadas por este mecanismo. En este contexto puede ocurrir la extravasación plasmática y posteriormente el *shock* sistémico característico del DS (130). En el segundo de los mecanismos, como consecuencia de la activación de los LTCD4⁺ de memoria con reactividad cruzada ante la infección por un serotipo viral heterólogo, hecho conocido como *pecado antigénico original*, las citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , TNF- α y el factor de necrosis tumoral β (TNF- β), fomentan aun más el desarrollo de DS. En relación a la severidad de la enfermedad, se ha establecido una asociación similar para la expresión de marcadores de los LTCD8⁺ y la expansión de poblaciones de estas células destinadas a reconocer epitopes del DENV. Los LTCD8⁺ lisan otras células infectadas con el virus por mecanismos dependientes de perforinas una situación que también afecta notablemente a las células circundantes no infectadas (131, 132).

Es posible que durante una infección heteróloga por el DENV, solo se active una pequeña subpoblación de linfocitos T con reactividad cruzada; este escenario sumado al hecho de que cada ser humano tiene un repertorio de receptores de linfocitos T específico, podría explicar la gran variabilidad en relación a la presentación clínica de la enfermedad posterior a una infección secundaria (82).

Poco se sabe de la respuesta atípica o aberrante de los LTCD4⁺ durante una infección por el DENV. Se admite que durante la etapa inicial de la infección la proteína viral NS5, reduce la expresión de CD4⁺ en la superficie de los linfocitos T, un hecho que podría afectar la función de estas células y potencialmente, dilatar el desarrollo de una respuesta adaptativa efectiva. Asimismo, durante una infección secuencial con diferentes serotipos del DENV, existen evidencias de alteración en la síntesis de citoquinas producidas por los LTCD4⁺ lo que causaría efectos adversos en la respuesta inmune (133).

De esta manera, ante una infección secundaria heteróloga por el DENV, ocurre un incremento en el número de células infectadas por el fenómeno de ADA. Estas células se activan y liberan grandes cantidades de mediadores químicos a la vez que presentan antígenos y estimulan a los

linfocitos de memoria de reactividad cruzada CD4⁺/CD8⁺. Estos linfocitos en ausencia de una respuesta inmune moderadora, inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias y proteínas activadoras del complemento en las células endoteliales con la consecuente pérdida de plasma y aparición de *shock* sistémico. Finalmente, tomando en cuenta los datos epidemiológicos y los estudios realizados en pacientes afectados por el DENV, se puede concluir que las infecciones secundarias constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de DS, evidenciándose de esta forma un marcado carácter inmunopatogénico en este grado de la enfermedad (134).

1.6.1.5 Mediadores de la respuesta inmune

El DS es la expresión clínica más grave de la infección causada por el DENV (135). Se caracteriza básicamente por un aumento importante de la permeabilidad vascular, asociada a hemoconcentración, trombocitopenia, hemorragias y disfunción orgánica múltiple. Aun cuando son numerosos los factores inherentes a la respuesta inmune que pudieran generar cambios en la dinámica microvascular, en casos fatales de dengue, el examen histológico de los vasos sanguíneos no ha revelado destrucción del endotelio vascular, lo que sugiere que la extravasación plasmática es consecuencia de una alteración funcional y no anatómica, razón por la cual se reconoce el papel determinante que en este proceso juega la respuesta inflamatoria mediada por citoquinas como TNF- α , interleuquina-1 (IL-1), IL-6, interleuquina-8 (IL-8) e INF- γ (136). Según esta presunción, la rápida liberación de mediadores inflamatorios por parte de las células mononucleares de sangre periférica, CDs y linfocitos T, activados una vez reconocidos los principales determinantes antigénicos del DENV, promueve la pérdida de líquidos que de no tratarse oportunamente conduce a *shock* hipovolémico. En este sentido, existen evidencias que demuestran un cambio drástico de respuesta Th1 a Th2 en casos complicados de la enfermedad (137, 138).

Los altos niveles de TNF- α se han asociado consistentemente con los diferentes grados de severidad del dengue, representando uno de los principales elementos inmunopatogénicos de este complejo cuadro viral (139). La principal fuente celular del TNF- α son los fagocitos mononucleares activados, aunque también puede ser secretado por los LTCD4⁺ y las células NK quienes a través de la producción de INF- γ aumentan la síntesis de esta citoquina. El TNF- α no solo media el reclutamiento de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y monocitos sino también

incrementa la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 (del inglés *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) e ICAM-1 (del inglés *Intercellular Adhesion Molecule 1*) en la superficie de las células endoteliales (140). Produce aumento de la permeabilidad vascular y puede inducir la apoptosis de las células endoteliales (141). Más aun, se ha descrito que uno de los polimorfismos en el promotor de TNF (-308A) capaz de disminuir los niveles de expresión de este mediador inflamatorio, se relaciona con la susceptibilidad de los individuos de progresar hacia cuadros de DS (142). Sin embargo, el notable aumento de esta citoquina no es suficiente para explicar la instauración de casos graves de la enfermedad.

Bajo ciertas condiciones clínicas de inflamación vascular, VCAM-1 e ICAM-1, se desprenden y circulan como moléculas solubles (84). En la infección por el DENV las evidencias *in vitro* e *in vivo* sugieren que el virus regula de forma directa o indirecta la expresión y liberación de ambas moléculas. Por otro lado, el TNF- α es un potente inductor de IL-6 e IL-8 por parte de las células endoteliales (143).

La IL-6 que promueve la activación de los PMN y su agregación en los sitios de inflamación, opera como elemento de *feed back* para la regulación de TNF- α . Aun cuando esta citoquina induce aumento de la permeabilidad capilar, en los cuadros complicados de dengue los niveles plasmáticos disminuyen considerablemente, quizá debido a la intensa extravasación característica de esta fase crítica de la enfermedad. Por lo tanto, la determinación exclusiva de este mediador soluble de la respuesta inflamatoria no es útil para fines pronóstico. Por otro lado, la IL-8 contribuye ampliamente al daño endotelial a través de la activación del complemento e inducción de apoptosis (144). Constituye uno de los agentes quimiotácticos más potentes y activadores de los PMN. Estudios *in vivo* han asociado los niveles plasmáticos de IL-8 con cuadros de DS en los cuales las manifestaciones hemorrágicas y el *shock* hipovolémico son los signos clínicos sobresalientes (143).

Uno de los hallazgos más notables en pacientes con dengue, es la elevación de los niveles plasmáticos de la fracción soluble del receptor de TNF- α , particularmente la fracción de 75-kDa (sTNFR-II), un evento correlacionado de manera significativa con el grado de efusión plasmática hasta dos días antes de la aparición de los signos de extravasación (145, 146). De igual forma, en la infección por el DENV, la activación temprana de los LTCD4⁺/LTCD8⁺ se legitima

fundamentalmente por la secreción de IL-2 e, IFN- γ , así como la liberación de los receptores solubles CD4⁺ (sCD4), CD8⁺ (sCD8) e IL2 (sIL-2R). Estudios *in vivo* ha demostrado que la concentración plasmática de sIL-2R es mayor en pacientes con las formas hemorrágicas del dengue, razón por la cual se considera un importante marcador de activación linfocitaria y de severidad clínica (147).

1.6.1.6 Autoinmunidad y mimetismo molecular

Existen evidencias que durante la infección por el DENV se producen anticuerpos capaces de reconocer como elementos extraños a estructuras celulares del individuo infectado alterando el estado de tolerancia inmunitaria. Anticuerpos anti-NS1 que reaccionan de forma cruzada con la vimentina, cadena β de la ATP sintetasa, la enzima disulfuro isomerasa y hsp60 de las células endoteliales, pueden inducir en ellas la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, la expresión de moléculas de adhesión celular y estimular una excesiva producción de óxido nítrico, uno de los mediadores con mayor efecto pro-apoptótico (148, 149). Adicionalmente, estos anticuerpos anti-NS1, también interactúan de forma cruzada con estructuras plaquetarias y factores de la cascada de coagulación, específicamente el plasminógeno y su activador (t-PA del inglés: *Tissue Plasminogen Activator*), un hecho que pudiera explicar la marcada trombocitopenia (por destrucción masiva de las plaquetas) y las consecutivas manifestaciones hemorrágicas observadas en los pacientes con DS (150, 151).

El mimetismo molecular entre las plaquetas, células endoteliales, elementos del sistema de la coagulación y fibrinolítico con la región C-terminal (aminoácidos 311-352) de la proteína NS1, es extensible a otros elementos virales como la proteína estructural C, la proteína de prM y la proteína E (152). En este sentido, se ha confirmado que existe una región de 20 aminoácidos de la proteína E del DENV4 que exhibe similitud con una familia de factores inductores del proceso de fibrinólisis (plasminógeno, factor X y protrombina) (153). La actividad de la plasmina, forma activa del plasminógeno, es modulada fisiológicamente por un antagonista (α -2-antiplasmina) que se une a la serina del sitio activo en el complejo plasminógeno/plasmina. Se presume que los anticuerpos producidos ante la infección por DENV4, específicos para la proteína E, reconocen una secuencia similar en el plasminógeno, generando un impedimento estérico que bloquea la unión del antagonista, un escenario que habla a favor de la alteración hemostática en pacientes

con anticuerpos de reactividad cruzada (31, 154). El nivel de anticuerpos IgM/IgG anti-NS1/prM/E es mayor en pacientes que cursan con las expresiones clínicas más graves de la enfermedad (149).

1.6.2 Daño endotelial

1.6.2.1 Vasculopatía

La línea que marca la división entre dengue y DS es la extravasación plasmática puesta de manifiesto por el aumento de la permeabilidad vascular. Aun cuando quedan muchos detalles biológicos y moleculares por dilucidar, se contempla que en este evento participan factores inherentes al virus y al hospedador que median la activación de las células endoteliales, su posterior disfunción y apoptosis (84).

Si bien es factible que un individuo desarrolle DS durante el curso de una infección primaria, uno de los factores determinantes en la aparición de esta entidad clínica es la ocurrencia de infecciones secundarias (155). En este caso, los monocitos infectados en el contexto del fenómeno de ADA y los LTCD4⁺/LTCD8⁺ de memoria sensibilizados durante la infección primaria, se activan liberando citoquinas pro-inflamatorias con efectos adversos sobre el endotelio vascular (115).

El tropismo del DENV por las células endoteliales *in vivo* sigue siendo controversial. Algunos estudios preliminares de biopsias de piel, indican que la microvasculatura localizada en la dermis es el sitio más afectado en el curso de la enfermedad, aunque no se han detectado antígenos virales sobre el endotelio que rodean la microvasculatura. Por el contrario, hay evidencias de la presencia de antígenos virales en la vasculatura endotelial pulmonar (156), a pesar de que esto no necesariamente indique que hay replicación activa del DENV. Al contrario de las células mononucleares, las células endoteliales no tienen receptores Fcγ por lo que en este contexto, no se internalizan complejos inmunes. Así, la presencia del virus en estas células solo se podría explicar por pinocitosis. Estudios *in vitro* han demostrado la replicación de los cuatro serotipos del DENV en las células endoteliales, y la consecuencia de esta infección suele producir daño funcional más que estructural (157, 158). No hay evidencia de que la susceptibilidad al virus

varíe entre los sistemas vasculares, pero se propone que la respuesta de coagulación en una inflamación severa de células endoteliales en diferentes sitios del organismo, no es igual (159). Similarmente, el patrón de infección del DENV en las células de la microvasculatura es distinto, lo que sugiere que los tejidos tienen diferentes patrones de activación (160).

Está demostrado que el aumento de permeabilidad de la microvasculatura periférica ocurre tanto en pacientes con DS como en aquellos que finalmente llegan al *shock* hipovolémico (161). Por lo tanto, las células endoteliales de pulmón y de la vasculatura abdominal, reaccionan de forma única ante la infección por el DENV lo que explica el síndrome de derrame vascular característico de los casos graves de la enfermedad (162). La apoptosis selectiva de las células endoteliales de la microvasculatura es un rasgo común en los casos fatales de la infección por el DENV, un evento que advierte el intenso derrame vascular observado en pleura y cavidades peritoneales (163). Asimismo, es importante recordar que la proteína viral NS1 se une de manera preferencial a las células endoteliales de pulmón e hígado, una situación que en el primer caso, tras la unión con su anticuerpo específico, contribuye al derrame pleural selectivo (30).

Finalmente, en la infección por el DENV, se observa desorganización y fragmentación de las fibras de actina en las células endoteliales, lo que acrecienta significativamente la permeabilidad endotelial (122).

1.6.2.2 Coagulopatía

Entre las causas de la hemorragia advertida en los pacientes con DS, se encuentra la marcada trombocitopenia producto de la disfunción plaquetaria, la lisis inducida a través de los anticuerpos anti-NS1 ó por el efecto directo del DENV sobre la maduración de los megacariocitos en la médula ósea. En esta expresión compleja de la enfermedad, las alteraciones vasculares son frecuentes y a medida que progresa el cuadro clínico, puede ocurrir hemorragia masiva bajo la expresión de CID. Al respecto, en los cuadros de dengue es frecuente observar además de la típica trombocitopenia, alteración de los parámetros del sistema de la coagulación como tiempo parcial de tromboplastina (TPT) entre otros parámetros fibrinolíticos (t-PA y PAI-1 del inglés *Plasminogen Activator Inhibitor-1*). La prolongación del TPT y el aumento en los

niveles de la relación t-PA/PAI-1, en la fase aguda de la infección, se correlaciona con severidad y pueden ser esgrimidos como indicadores tempranos de DS (164).

El TPT y el tiempo de protrombina (TP) son indicadores de las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación, respectivamente. Sólo el TPT, no así el TP, se prolonga en la infección por el DENV, lo que sugiere que ocurre una alteración en la vía intrínseca de la coagulación. Esto puede ser consecuencia de la depreciación en la regulación de la síntesis de factores específicos o por aumento en su consumo. Dado que se ha encontrado hepatitis en diferentes grados de intensidad en pacientes con dengue, un análisis sobre la correlación y regresión lineal entre los niveles de transaminasa glutámico pirúvica y transaminasa glutámico oxaloacética (TGO y TGP respectivamente), así como el TPT, muestran una fuerte asociación entre la elevación de estas enzimas hepáticas y la prolongación de este marcador del sistema de la coagulación en pacientes con DS (165).

1.6.3 Características virales y perfil genético del hospedador

1.6.3.1 Factores virales

A pesar de la asociación directa que existe entre las infecciones secundarias y la consecuente progresión hacia DS, también es cierto que en pacientes con infecciones primarias por el DENV es posible diagnosticar las formas graves de la enfermedad. Por otra parte, las complicaciones clínicas tienen lugar solo en una fracción relativamente pequeña de los individuos con infección secundaria (85). Aunque antes del año 1981 ya circulaban varios serotipos del DENV en América, no fue hasta ese año, durante una epidemia en Cuba, que se describieron los primeros casos de dengue hemorrágico en la región continental e insular. Este hecho, coincidió con la introducción de un nuevo genotipo del DENV2 proveniente del Sudeste de Asia. Epidemias posteriores en Sudamérica también coincidieron con la presencia de cepas virales de Asia Sudoriental (166). Por el contrario, no se encontró evidencia de casos de dengue hemorrágico durante epidemias causadas por DENV1 (167). Estos y otros resultados confieren un papel esencial a la virulencia en la patogénesis de la enfermedad. Las cepas con alto grado de virulencia, podrían originarse en condiciones de hiperendemicidad y circulación concomitante de los cuatro serotipos virales, una situación que advierte mutaciones producto de sucesivas

replicaciones en poblaciones filogenéticamente tan distintas como hombre y artrópodo (mosquito-vector). Adicionalmente, el DENV, como otros virus de ARN, presenta mecanismos de evolución tendentes a presentar altas tasas de mutación por la presencia de polimerasas de ARN intrínsecamente susceptibles de sobrellevar errores (168). De ser así, no sería necesaria una infección previa para desarrollar cuadros clínicos complicados de la enfermedad como DS.

Al respecto, varios estudios han señalado la existencia de diferencias estructurales substanciales entre las cepas DENV2 de origen asiático y americano, diferencias correlacionadas con la virulencia y patogenicidad del serotipo infectante (169). Según éstos estudios, los determinantes responsables de la virulencia y severidad de la enfermedad se encuentran en el aminoácido 390 de la proteína E, cuya conmutación puede afectar la unión a la célula susceptible; entre los nucleótidos 68 al 80 del *loop* en la región 5'UTR, que podrían estar involucrados en la iniciación de la traducción; y en los primeros 300 nucleótidos de la región 3'UTR, que podrían regular la replicación viral mediante la formación de intermediarios replicativos.

Pryor y colaboradores (170), construyeron una cepa recombinante de DENV2 con sustituciones en el residuo 390 de la proteína E. La sustitución de Asn-N (genotipo asiático) por Asp-D (genotipo americano), resultó en una significativa reducción de la capacidad de replicación en monocitos humanos. En este sentido, empleando un clon infeccioso de DENV en el cual se sustituyó el aminoácido 390 de la proteína de envoltura, se observó que el cambio tenía repercusión sobre la replicación viral en monocitos y CDs (171). Por otra parte, determinadas secuencias de infección han sido correlacionadas con el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. La infección secuencial DENV1-DENV2 ó DENV1-DENV3 se han relacionado con epidemias de dengue con manifestaciones hemorrágicas trascendentales (105, 172).

1.6.3.2 Carga viral

Otro factor a considerar es la carga viral. Según Vaughn y colaboradores (173), hay una correlación directa entre la carga viral en sangre periférica y la aparición de casos graves de la enfermedad. El aumento de la carga viral en sangre puede explicarse por diferentes eventos moleculares no excluyentes entre sí, algunos de ellos debidos a eventos inmunopatogénicos y otros a la patogénesis viral (105, 174).

1.6.3.3 Factores de riesgo individual

Componentes como el estado nutricional, la edad, el género, la raza así como la presencia de comorbilidad (asma, síndrome metabólico, diabetes y alteraciones hematológicas), hacen de ciertos grupos poblacionales, individuos más susceptibles al desarrollo de dengue (175-177). Adicionalmente, la pequeña proporción de pacientes que tras una infección secundaria heterotípica, progresan hacia la forma grave de la enfermedad, evidencian que la individualidad juega un papel crucial en la patogenia de esta infección viral (175).

1.6.3.3.1 Estado nutricional

Se ha descrito que los niños que padecen desnutrición proteica, no desarrollan cuadros graves de dengue (178, 179). En este grupo poblacional, hay supresión de la respuesta inmune tanto por el déficit de proteínas como de micronutrientes (vitamina A, retinoides, hierro) y si la característica fundamental del DS es el desarrollo de una respuesta inmune intensa y descontrolada, será poco probable observar esta entidad clínica en niños con esta condición nutricional (177, 180). Por otra parte dentro de la población pediátrica hay dos grupos de niños susceptibles al desarrollo de *shock* por dengue, el primero se refiere a los niños que cursan con desnutrición severa en cuyo caso se exhibe un menor volumen plasmático y fluido extracelular, y el segundo se refiere a los niños obesos en quienes es difícil manejar el fluido de soluciones intravenosas para mantener la volemia central y por ende la estabilidad hemodinámica (178).

1.6.3.3.2 Edad

El compromiso de la respuesta inmune en los primeros años de vida por inmadurez funcional de los elementos que la activan, puede ser la causa de respuestas ineficientes que propicien cuadros de dengue grave (179). Desde la epidemia de dengue hemorrágico acaecida en Cuba en el año 1981, se ha documentado que los niños son un grupo especial de riesgo de enfermedad grave y muerte. Se presume que una mayor permeabilidad capilar en este grupo etario respecto a los adultos sería el mecanismo fisiopatológico que favorecería la extravasación plasmática y, por ende, las formas graves de la enfermedad relacionada a ésta (181). En el adulto mayor, el aumento de la fragilidad capilar y la tendencia a descompensaciones hemodinámicas, puede

hacerlos particularmente susceptibles al desarrollo de cuadros clínicos complicados producidos por el DENV (182).

1.6.3.3.3 Género

En relación a la distribución de la enfermedad por género, la literatura muestra resultados controvertidos. Los estudios sobre epidemias en Cuba, refieren que el género femenino es más propenso a las formas graves de la enfermedad y estudios más recientes en Colombia coinciden con esta observación (183). Existen evidencias de que la respuesta inmune femenina en ciertas condiciones clínicas es más eficiente que la masculina lo que puede resultar en una mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias (184, 185). En este sentido, desde la década de los años 70, Halstead expuso que el género femenino es más propenso a cuadros complicados de dengue por la capacidad de respuesta frente al virus (186). Además el sistema de capilares en las mujeres es más propenso a aumentar la permeabilidad en contraste con los hombres (187). Varios autores han descrito por el contrario, mayor incidencia de las formas graves de dengue en el género masculino, fundamentalmente en países de Sudamérica y Sudeste Asiático (188); sin embargo, aun es necesario evaluar los factores que determinan la frecuencia de la enfermedad en ambos grupos desarrollando un número mayor de estudios.

1.6.3.3.4 Comorbilidad

El asma bronquial, la anemia falciforme, y la diabetes mellitus, son patologías crónicas reconocidas como importantes factores de riesgo para el desarrollo de cuadros complicados de dengue (189). Guzmán y colaboradores reportaron mayor intensificación de la infección por el fenómeno de ADA en pacientes asmáticos frente a un grupo control (190). Por otra parte, Limonta y colaboradores, indicaron que la frecuencia de casos de dengue con manifestaciones hemorrágicas es mayor en pacientes con diabetes y anemia falciforme, como consecuencia de la patología vascular característica de ambas entidades clínicas (191, 192).

1.6.3.4 Factores genéticos:

Representan una de las áreas de mayor prioridad en el estudio de la inmunopatogenia del dengue.

1.6.3.4.1 HLA clase I

Existen varios estudios sobre la asociación de las diferentes variantes polimórficas de los genes HLA clase I con el riesgo o protección frente a cuadros graves de dengue. Chiewsilp y colaboradores, fueron los primeros en describir asociación entre los genes HLA clase I y la severidad a la infección por el DENV, al mostrar una correlación positiva para HLA-A2 y negativa para HLA-B blanco (193). El segundo reporte más importante de la literatura médica, corresponde al análisis de la epidemia cubana de dengue hemorrágico ocurrida en el año 1981, a partir de cuyo estudio Paradoa y colaboradores, determinaron la frecuencia de antígenos HLA en 82 pacientes. Los antígenos HLA-A1, HLA-B blanco, HLA-Cw1 y HLA-A29 mostraron una frecuencia significativamente mayor en el grupo de los pacientes con dengue comparado con el grupo control (194).

En este sentido, Thi Phuong y Hirayama (195), sumaron a la lista de genes HLA clase I, un amplio rango de moléculas entre las que figuran HLA-A*0203, HLA-A*0207 y HLA-DQ1 como factores de riesgo para el desarrollo de dengue y DS incluidos casos de *shock* por dengue en población tailandesa y brasileña con infecciones secundarias por DENV1, DENV2 y DENV3, así como HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*0901 y HLA-DRB1*04 como factores de resistencia a las formas graves de la enfermedad en población mexicana, vietnamita y cubana respectivamente con infecciones primarias y secundarias por DENV2.

1.6.3.4.2 HLA clase II

A diferencia de la asociación descrita entre los alelos HLA clase I y las formas graves de la enfermedad causada por el DENV, los alelos HLA clase II en su mayoría parecen estar restringidos a condiciones de resistencia o protección. Estudios llevados a cabo en México en pacientes con dengue, mostraron que individuos homocigotos para HLA-DBB1*04, eran 11.6 veces menos susceptibles a desarrollar dengue hemorrágico en contraste con los individuos que no presentaban ese alelo (196). Loke y colaboradores no encontraron asociación del alelo HLA-DRB1 con la presentación de cuadros graves de dengue en población vietnamita (197). Sin embargo, otro estudio, de 14 especificidades para HLA-DR y 4 para HLA-DQ en población

brasileña mostró una correlación positiva de HLA-DQ1 con el desarrollo de formas similares a DS (198).

1.6.3.4.3 HLA clase III

Los genes en la región HLA clase III codifican para un número de proteínas incluyendo proteínas del complemento (C4a, C4b, C2 y Bf), TNF- α , TNF- β y proteínas de choque térmico (199). Loke y colaboradores no encontraron asociación alguna de polimorfismo en el gen codificador para TNF- α y el desarrollo de cuadros complicados de dengue en población vietnamita (197). En contraste Fernández-Mestre y colaboradores estudiaron el polimorfismo de un único nucleótido de TNF- α , INF- γ , TGF- β e IL-10 en pacientes con infección por el DENV y reportaron predominio de un alelo TNF-308A en pacientes con DS cuyas manifestaciones clínicas más relevante fue el derrames en cavidades serosas (142).

1.6.3.5 Factores genéticos no HLA

Existen algunos estudios sobre la asociación entre dengue severo y genes polimórficos no HLA. Loke y colaboradores encontraron un número significativamente menor de casos de dengue hemorrágico en personas homocigotas para la variante Arg-R en la posición 131 del gen Fc γ RIIA (200). Adicionalmente, estos autores describieron asociación de la variante timina (T) en la posición 352 del receptor de vitamina D asociado a un estatus de protección frente a cuadros complicados y severos de dengue (200).

La molécula DC-SIGN1 es un receptor de unión al DENV, esencial para la infección productiva de CDs (64). Sakuntabhai y colaboradores reportaron una asociación entre el alelo G de la variante DC-SIGN1-336 y protección frente a casos de dengue en tres cohortes diferentes de la población tailandesa (201). Por otro lado, la variante TNF-308A del gen que codifica para TNF- α , ha mostrado un nivel de asociación significativo con casos de dengue grave en grupos de individuos venezolanos (142), mientras que la variante alélica 665THR/ALA del gen que codifica para la molécula TAP2, involucrada en el procesamiento antigénico por vía endógena, se ha asociado a la ocurrencia de casos complicados de dengue con manifestaciones hemorrágicas (202).

1.6.3.6 Factor racial

Existen evidencias epidemiológicas en Cuba que sugieren una mayor incidencia de casos de DS en individuos caucásicos con respecto a individuos de la raza negra (203). Estas observaciones tienen un interés epidemiológico significativo, pues las diferencias en la susceptibilidad a casos complicados de dengue entre los diferentes grupos raciales en Cuba coincide con la reportada en África y poblaciones negras del Caribe (204). Aunque el dengue ha sido identificado en 19 países africanos existen solo reportes clínicos esporádicos, en poblaciones no indígenas (205). Además, la incidencia de dengue con manifestaciones hemorrágicas es baja en países del Caribe donde la población negra es mayoritaria. Las observaciones epidemiológicas acerca del reducido riesgo de individuos negros de progresar a cuadros graves de dengue, comparado con individuos blancos en la población cubana, ha tenido escaso fundamento experimental. Sin embargo, se han publicado teorías que sugieren la existencia de genes que modulan las manifestaciones clínicas en la infección por el DENV en individuos que desde el punto de vista genético se relacionan con poblaciones africanas (136). Consecuentemente, la presencia de genes africanos en Cuba y las poblaciones negras del Caribe pudiera determinar la baja incidencia de dengue grave en estos individuos (203). En 2006, Sierra y colaboradores reportaron un estudio en el que examinaron la respuesta de LTCD4⁺ de memoria en 80 individuos cubanos pertenecientes a diferentes grupos étnicos, previamente infectados con DENV1 y DENV2 durante las epidemias acaecidas en los años 1977 y 1981. Las personas blancas de raza caucásica expresaron mayor proliferación de LTCD4⁺ de memoria de reactividad cruzada, así como altos niveles de IFN- γ (206). La variación observada en la respuesta de linfocitos T de los grupos étnicos estudiados estaría relacionada con la inmunopatogénesis del dengue lo que explicaría parcialmente, en este caso, las evidencias epidemiológicas ampliamente observadas.

1.7 GENETICA EVOLUTIVA DEL VIRUS DENGUE

1.7.1 Origen del virus dengue

La hipótesis más aceptada es la que identifica al continente africano como sitio originario del DENV. Recientemente, se ha cuestionado esta teoría y ha direccionado su mirada a Asia como posible lugar de origen, basado en el hecho de que este virus es aislado tanto de primates en

estado salvaje, como a partir de humanos en diferentes regiones del continente asiático (207). Se han realizado observaciones puntuales en este sentido orientadas a conocer la identificación de ciclos de transmisión selvática en Asia y África occidental, que involucra a primates inferiores y, la ubicación de cepas salvajes específicamente DENV2 y DENV4 en la base de árboles contruidos con aislamientos provenientes de humanos (208). De aquí se derivan fuertes evidencias sobre el hecho de que el DENV es un virus originalmente de primates y que la transmisión a humanos ha ocurrido de manera autónoma para los cuatro serotipos. Claramente, para determinar con mayor exactitud el origen de este virus, se requiere de un muestreo más amplio de cepas selváticas y estudios filogenéticos moleculares más precisos (209).

1.7.2 Variabilidad genética del virus dengue

En el DENV la variabilidad genética se manifiesta indiscutiblemente, en la existencia de cuatro serotipos. Ricco-Hesse y colaboradores demostraron la variación intra-serotipo estudiando un fragmento de 240 pb correspondientes a la región de unión de los genes E/NS1, el cual permitió determinar la diversidad genética existente para DENV1 y DENV2 (210). Mediante dicho análisis se estableció la existencia de "genotipos" definidos arbitrariamente como "*un grupo de DENV que tenían menos del 6% de divergencia en sus secuencias nucleotídicas*".

Actualmente, los estudios genotípicos se han extendido considerablemente, empleando como marcador filogenético la secuencia del gen E (aproximadamente 1485 pb). Un aspecto a considerar es si la diferencia en cuanto a la distribución geográfica de cada uno de los genotipos del DENV tiene alguna base selectiva y examinar si algunos genotipos tienen mayor o menor potencial virulento agravando los brotes epidémicos. Un claro ejemplo de selección positiva esporádica para DENV1, DENV3 y en menor proporción para DENV2, fue presentado por Twiddy y colaboradores evaluando la secuencia de la proteína E (211).

Las variaciones a gran escala de los tamaños poblacionales del vector también podrían significar que las derivas genéticas juegan un papel importante en la evolución del DENV; por tanto el destino de un virus en la población no siempre refleja su adecuación. Cualquiera sea el mecanismo, es probable que la extinción de cepas virales corresponda a una circunstancia

regular en la evolución viral, especialmente en momentos donde la densidad poblacional de hospedadores humanos susceptibles y vectores es circunstancialmente baja (212).

Con el conocimiento de que el vector *Aedes aegypti* es capaz de tener múltiples eventos de alimentación, unido a las evidencias existentes de infecciones mixtas, no es inverosímil que exista recombinación para el DENV (213, 214). La recombinación parece ocurrir, a través de un mecanismo de *copy-choice*, en el cual la polimerasa cambia de una molécula parenteral a otra durante el proceso de replicación viral (215). Aunque este fenómeno ha sido documentado para los cuatro serotipos, no se ha encontrado recombinación inter-serotipo, como es de esperar de acuerdo a su extensa diversidad genética (216, 217). Aunque la recombinación contribuye a la eliminación de alelos letales, los niveles de recombinación relativamente bajos, observados hasta la fecha, sugieren que este fenómeno ocurre de forma esporádica, a expensas de circunstancias ecológicas y no a un rasgo selectivamente determinado que incrementa la adecuación viral (212).

1.8 DIAGNOSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE

El conocimiento sobre la cinética de los diferentes marcadores virales e inmunes durante la infección por el DENV, es de vital importancia para el diagnóstico precoz de la enfermedad y prevenir las complicaciones clínicas propias de esta entidad infecciosa. El diagnóstico viral en el laboratorio incluye:

A. Técnicas directas destinadas a la detección de la partícula viral, antígenos virales o su genoma

1. Ensayos a través de los cuales es posible visualizar la partícula viral o su efecto citopático. Entre ellas se encuentran las tinciones para microscopía de luz, la microscopía electrónica y el cultivo o aislamiento viral (los más empleados son cultivos primarios, cepas de células diploides y líneas celulares) (218).

2. Pruebas para la detección de antígenos virales que permiten revelar la presencia del agente infeccioso en cultivos celulares cuando aun no hay evidencia de efectos citopáticos, o en aquellos casos en los cuales el virus se debe reconocer por otras propiedades o características: hemadsorción, inmunofluorescencia directa (IFD), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo

ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* o EIA del inglés *Enzyme immunoassay*) y las pruebas de látex (219, 220).

Recientemente, se ha implementado la determinación de la proteína viral NS1 como indicador temprano de la infección por el DENV, es decir, un indicador que puede ser detectado durante los primeros cuatro días de iniciado el cuadro febril, y según la literatura médica incluso hasta 9 días después de registrado el aumento de la temperatura corporal. La detección de esta proteína utilizando métodos de ELISA y/o cromatografía, permite realizar el diagnóstico de la infección antes de la seroconversión (221, 222).

3. Pruebas que evidencian el material genético viral conservado y replicable (activo o latente) en fluidos biológicos, células o tejidos: ensayos de amplificación genética (PCR del inglés *Polymerase Chain Reaction*, en sus variantes cualitativas o cuantitativas; LCR del inglés *Ligase Chain Reaction*, Sistema QB replicasa, ADN ramificado (*branched*) e hibridización con sondas) (223).

Para la técnica del aislamiento viral, se debe obtener una muestra de suero tan pronto sea posible o dentro de los 4 a 5 días después del inicio de los síntomas (224), momento que coincide con el mayor pico de viremia. Es una técnica útil y sensible más aún si la muestra es colectada antes de la remisión del periodo febril (225). Entre las técnicas de aislamiento viral se encuentran:

Aislamiento viral en ratones: la inoculación intracerebral en ratones de 1 a 2 días de nacido, es el método tradicional pero menos sensible para lograr el aislamiento del DENV (226).

Aislamiento en células de cultivos y mosquitos: las técnicas de cultivo celular para el aislamiento del DENV han aumentado considerablemente su eficacia, sin embargo, aún no se ha encontrado una línea celular de mamíferos o mosquitos donde todas las cepas del virus produzcan efectos citopáticos (227).

En este sentido, se han empleado líneas celulares de mamíferos con diversos grados de sensibilidad, no obstante, las células que expresan mayor grado de permisibilidad a la infección por el DENV son las células provenientes de mosquitos, calificadas por ser menos exigentes en su manutención y tolerar la temperatura ambiente en caso de realizar trabajos de campo,

actividad en la que es frecuente inocularlas directamente con el suero de aquellos pacientes que presentan un cuadro clínico compatible con dengue. Entre las líneas celulares de mosquitos recomendadas para el aislamiento viral, se encuentran AP61, C6/36, Tra284 y CLA-1 (226).

Por ello, aun cuando la inoculación de mosquitos adultos como *Aedes albopictus* y *Toxorinchites splendens*, representa desde el punto de vista técnico el método más sensible para el aislamiento viral, analizando la limitada factibilidad de su realización, el cultivo de líneas celulares como C6/36 a través del cual se logra recuperar un alto porcentaje de viriones, constituye un método menos laborioso que no requiere procedimientos de cierta destreza además de la manutención de insectarios e instalaciones relativamente costosas (219).

B. Técnicas indirectas para la detección de anticuerpos

Estos ensayos se clasifican en tres grupos en base a la reacción antígeno-anticuerpo (218):

1. Los ensayos que dependen de la capacidad de unión del anticuerpo al antígeno para ejercer alguna función no relacionada con el virus, por ejemplo: la fijación del complemento (FC), hemaglutinación indirecta (HI) y la aglutinación por látex .
2. Las técnicas que miden la capacidad de los anticuerpos para bloquear la función viral específica como la neutralización, la inhibición de la hemaglutinación (IH), la inhibición de la neuraminidasa (que mide la capacidad de los anticuerpos para bloquear la infectividad viral), la hemaglutinación viral y la actividad de neuraminidasa.
3. Las pruebas que miden directamente la interacción antígeno-anticuerpo como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el RIA, ELISA, Inmunoblot y Western blot.

Para el diagnóstico serológico, se requiere una muestra de suero obtenida en la etapa convaleciente de la enfermedad, es decir, al menos 5 ó 6 días después de la fecha de presentación del primer síntoma. En la infección primaria los anticuerpos de la clase IgM se detectan en el 95% de los casos a partir del quinto día de la enfermedad, mientras que los anticuerpos de la clase IgG se detectan entre el séptimo 7 y decimo día luego del cuadro febril. Por su parte, en la infección secundaria se observa un rápido incremento de los anticuerpos IgG con títulos muy

elevados incluso a partir del segundo día de detectado el episodio febril y solo en algunos casos no se detectan anticuerpos IgM (227).

El estudio serológico para IgM no debe indicarse antes del quinto día de detectada la fiebre. No constituye, por tanto, una ayuda para el clínico al momento de decidir conductas terapéuticas, pues el paciente puede agravar a partir del cuarto o quinto día de evolución. Sin embargo, es primordial indicar ensayos serológicos de tipo IgM/IgG, pues el resultado de laboratorio completa la triada diagnóstica junto con la clínica y la epidemiología (218, 227).

1.9 VACUNAS CONTRA EL DENGUE: CARACTERÍSTICAS ESENCIALES

La ausencia de un modelo animal que desarrolle la enfermedad de forma similar a como se presenta en el hombre y la dificultad en lograr una respuesta inmune equilibrada frente a los cuatro serotipos del DENV son algunos de los obstáculos afrontados durante el desarrollo de una vacuna eficaz que actúe contra la infección (228).

De una manera general, los esfuerzos actuales que se han hecho en el desarrollo de vacunas contra el dengue, se han enfocado esencialmente en los modelos de vacunas vivas atenuadas, inactivadas y sub-unidades. Si bien la patogenia de la enfermedad aún no se ha dilucidado totalmente, y pareciera que la etiología del dengue con manifestaciones hemorrágicas tiene causas multifactoriales, una de las teorías que ha intentado explicar *in vitro* el mecanismo de los cuadros severos, posteriores a infecciones secundarias, es el fenómeno de ADA, por lo que el riesgo de progresar a cuadros de dengue grave empleando vacunas tetravalentes es muy alto.

La experiencia en el desarrollo de vacunas vivas atenuadas obtenida hasta la fecha, ha demostrado su capacidad de inducir una adecuada respuesta humoral y celular así como una apropiada atenuación de la replicación viral sin producir enfermedad. Las vacunas atenuadas de reciente generación, permiten una modificación genética específica y mejor controlada que la atenuación clásica mediante pasajes sucesivos en cultivos celulares, lo que le confiere una mayor estabilidad genética al producto recombinante. Esto ha sido posible gracias al proceso de quimerización. Hoy en día se tienen varios modelos de vacunas quiméricas contra el dengue. La primera de ellas fue reportada por Bray y Lay, científicos del Instituto Nacional de Salud de

Estados Unidos (229). Al respecto, el proyecto que se encuentra en etapa avanzada es el relacionado con la quimerización del virus vacunal atenuado contra la fiebre amarilla (cepa 17D), al cual se le insertan genes que codifican proteínas del virus salvaje del dengue. Esta vacuna fue desarrollada por Guirakhoo y colaboradores en Acambis plc, compañía propiedad actual de Sanofi Pasteur (230). Esta vacuna quimérica tetravalente, exhibe una alta estabilidad genotípica y fenotípica en cultivos celulares tanto en las etapas de desarrollo como de producción (231). Estudios *in vitro* demostraron que los virus quiméricos de esta vacuna, tienen una cinética de crecimiento similar a la de los DENV parentales salvajes y a la de la cepa 17D del virus vacunal contra la fiebre amarilla. Además, la infección de CDs se acompaña de una producción limitada de citoquinas pro-inflamatorias y una expresión equilibrada de IFN-I. Durante los estudios pre-clínicos, esta vacuna tetravalente indujo en primates inferiores una respuesta de anticuerpos protectora contra los serotipos salvajes del DENV. Actualmente, esta vacuna completó la fase I de investigación clínica en Estados Unidos, Australia, Asia y América Latina y se están llevando a cabo diversos estudios de fase II en poblaciones endémicas con edades comprendidas entre los 12 meses a los 45 años de edad, distribuidas en diversos países de Asia y América Latina, con un esquema de 3 dosis por vía subcutánea (232).

Si bien las vacunas inactivadas ofrecen la ventaja de su seguridad, haciendo posible el empleo en personas con compromisos inmunológicos, pueden no llegar a ser tan inmunogénicas probablemente al no producir una respuesta Th1 adecuada, ameritando la adición de un adyuvante en su formulación y/o la necesidad de múltiples dosis para proveer una inmunidad perdurable, en particular para individuos no expuestos a Flavivirus o viviendo en regiones no endémicas (233). No obstante, el Instituto de Investigaciones de la Armada - Walter Reed y el Centro de Investigaciones Médico-Naval de Estados Unidos, están ensayando estrategias de primo-vacunación con diferentes modelos de vacunas: inactivas, sub-unidades, vivas atenuadas, en administración secuencial o concomitantemente, logrando en ensayos pre-clínicos con primates inferiores, respuestas inmunes frente a los cuatro serotipos, con un significativo aumento de anticuerpos luego del esquema de refuerzo (234). La aplicabilidad de estos esquemas combinando o alternando diferentes diseños de vacunas puede resultar compleja y propensa a errores logísticos al momento de su aplicación en el terreno, en la secuencia de aplicación o combinación correcta de diferentes vacunas contra el DENV, con particular dificultad al tratar de

adaptarlas dentro de los calendarios actuales de vacunación en poblaciones pediátricas (228, 235).

Otro de los interesantes y novedosos diseños de vacunas contra el dengue, son las vacunas por replicación incompetente o pseudo-infecciosas. Estas vacunas replican muy bien en células Vero, lo que las hace adecuadas para producción a gran escala, sin embargo, no llegan a inducir niveles elevados de anticuerpos. Aún no están disponibles formulaciones tetravalentes y el prototipo monovalente (RepliVax D2.2) se encuentra en etapa pre-clínica, demostrado ser inmunogénica en ratones (236).

Hawaii Biotech, Inc., ha desarrollado una vacuna de sub-unidades recombinantes que contiene el 80% de la región amino terminal de la proteína E del DENV2, denominada r80E y producida en células de *Drosophila melanogaster*. Ya que las vacunas a sub-unidades por sí mismas no producen una respuesta inmune óptima, es necesario agregarles adyuvante. Por esta razón, se han estudiado en modelos animales, diferentes formulaciones de dos dosis de vacuna contra el DENV2 a base de sales de aluminio, o combinando aluminio con saponinas (QS1) o el MPL (Monofosforil Lípido A), (llamados ASO4, ASO5, o ASO8, dependiendo de la combinación de adyuvantes). Estas formulaciones se encuentran en etapa pre-clínica y han mostrado capacidad inmunogénica en experimentos con primates inferiores (237). Este tipo de sub-unidades recombinantes son difíciles de producir a gran escala y la elaboración de formulaciones tetravalentes resulta muy costosa. Además de la vacuna candidata de Hawaii Biotech, Inc., el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana, Cuba, han desarrollado vacunas a sub-unidades.

Las vacunas de ADN consisten en plásmidos que contienen la secuencia genérica específica de proteínas o epítopes del DENV. Los primeros diseños de este tipo de vacunas se ensayaron en animales a finales de la década de 1990 (238) y continúa en fase pre-clínica en primates inferiores, proyecto desarrollado por el Centro de Investigaciones Médico-Naval de Estados Unidos (239). Para mejorar la respuesta inmune se necesita de adyuvantes u otras estrategias también innovadoras de entrega del antígeno, como la electroporación (240). Esta estrategia en la producción de vacunas de ADN, se ha probado en ratones con resultados preliminares interesantes frente a los cuatro serotipos del DENV, sin embargo, la factibilidad del uso de estos

sistemas complejos de entrega del antígeno y los controles adecuados para verificar su funcionamiento aún necesitan ser definidos (228).

www.bdigital.ula.ve

1.10 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Teniendo en cuenta que la interacción entre el DENV, el vector y el hospedador en un ecosistema definido es en última instancia lo que determina la dinámica de la transmisión y define los mecanismos inmunopatogénicos característicos del dengue, es necesario realizar investigaciones que permitan lograr un mayor conocimiento de cada uno de estos factores con el objetivo de reducir la morbilidad y la mortalidad causada por esta entidad infecciosa (11).

En el marco de este panorama, lo primero que se debe reconocer es que el diagnóstico temprano de la infección causada por el DENV, constituye una herramienta fundamental para la instauración de medidas terapéuticas, orientadas a prevenir la aparición de las complicaciones clínicas propias de la enfermedad. Actualmente, con la incorporación de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), es posible detectar la presencia del virus, sus serotipos y cuantificar la carga viral incluso desde el primer día de iniciado el cuadro febril, superando las dificultades del cultivo celular considerado el método de referencia para la detección viral (241).

Por otra parte, la importancia de los estudios de evolución molecular en dengue radican en el hecho de que a través del conocimiento de los serotipos circulantes, podría inferirse la procedencia de aislados virales, reconstruyendo las vías de introducción y desplazamiento del virus dentro del país, así como el origen geográfico de los mismos (242). Esta información podría constituirse en marcadores epidemiológicos precoces para la toma de medidas de control por parte de las autoridades competentes, así como para conocer si los serotipos circulantes se asocian o no a mayor riesgo de padecer DS en poblaciones determinadas.

Con la presencia de casos de dengue hemorrágico en la epidemia que inició a finales del año 1989, se hace un corte histórico de esta patología en Venezuela. A partir de esa fecha se han presentado epidemias recurrentes en el país donde el registro de mortalidad por esta causa, es prácticamente constante. Por otro lado, en Venezuela los indicadores de presencia del vector *Aedes aegypti* en los centros urbanos son elevados y la circulación de los cuatro serotipos del

DEVN desde el año 1992 ha representado uno de los mayores riesgos para el desarrollo de las formas graves de la enfermedad (243).

En el Estado Mérida no se conocen con exactitud las características de los serotipos del DENV circulantes y su patrón de expansión en los diferentes municipios de la entidad federal. De igual forma, no se han realizado estudios que permitan establecer algún nivel de asociación entre las características virales de los serotipos infectantes con la aparición de una respuesta inmune que explique la progresión de los cuadros de dengue a DS. Este hecho, constituye una debilidad considerable para la vigilancia y control de la infección.

En este momento el Estado Mérida se encuentra en un estado de hiperendemia que desde el brote de dengue suscitado el año 2007, no pareciera cambiar desde el punto de vista epidemiológico. Determinar oportunamente características virales (serotipos, carga viral y evolución molecular), clínico-epidemiológicas e inmunológicas permitirán establecer marcadores tempranos indicadores de la aparición de casos complicados de dengue. En este sentido, la importancia del reconocimiento oportuno de los casos de dengue, así como las características de las cepas virales infectantes y los patrones clínicos expresados por los pacientes, no solo beneficia a los individuos sino también a la comunidad donde reside ya que permite activar los mecanismos de control del vector y el reforzamiento en el área de prevención con medidas que finalmente tendrán impacto sobre la enfermedad.

El desarrollo de la presente investigación estuvo enmarcado en los objetivos y actividades propuestos en los proyectos de investigación: FONACIT-G-2005000821: "*Asociación entre los Marcadores de Activación de Linfocitos y de Disfunción Endotelial en Pacientes con Fiebre Dengue y Dengue Hemorrágico Febril en el Estado Mérida. Estudio de Tamizaje Tipo Caso-Control*" y CDCHT-ULA M-841-05-07-A denominado: "*Aislamiento y Caracterización de los Serotipos Virales del virus Dengue y su asociación con fiebre Dengue y dengue Hemorrágico Febril en el Estado Mérida*" con su proyecto satélite CDCHT-ULA M-842-05-07-C denominado: "*Asociación entre los Marcadores de Disfunción endotelial en Pacientes con Fiebre Dengue y dengue Hemorrágico Febril*".

1.11 OBJETIVOS

1.11.1 Objetivo general

Determinar características virales (serotipos, carga viral y evolución molecular), clínico-epidemiológicas y de respuesta inmune vascular y linfocitaria que permitan establecer marcadores tempranos indicadores de la aparición de casos complicados de DS.

1.11.2 Objetivos específicos

1. Analizar la eficiencia de amplificación de tres regiones genómicas del virus dengue por la técnica de amplificación de PCR en tiempo real (qPCR).
2. Determinar los serotipos del DENV prevalentes y su evolución sistemática epidémica e inter-epidémica en el Estado Mérida.
3. Conocer la epidemiología molecular de cepas del DENV provenientes del Estado Mérida y otras regiones de Venezuela, a través de análisis filogenéticos.
4. Evaluar los cambios dinámicos de citoquinas pro-inflamatorias (IL-8, TNF- α), moléculas de adhesión intercelular solubles (sICAM-1, sVCAM-1) y marcadores de activación linfocitaria solubles (sIL-2R, sTNF-Rp75) como indicadores tempranos de severidad en pacientes con dengue.

CAPITULO 2

ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN DE TRES REGIONES GENÓMICAS DEL VIRUS DENGUE POR LA TECNICA DE AMPLIFICACION DE PCR EN TIEMPO REAL

www.bdigital.ula.ve

2.1 INTRODUCCIÓN

El diagnóstico confirmatorio de la infección por cualquiera de los cuatro serotipos del DENV a través de pruebas de laboratorio, está dirigido esencialmente a la vigilancia epidemiológica, sin embargo, es imprescindible contar con métodos sensibles, específicos y rápidos que permitan el reconocimiento precoz de la enfermedad y en consecuencia, la toma de medidas y decisiones terapéuticas adecuadas para el manejo y control clínico del paciente. Aun cuando el aislamiento viral es considerado el método de referencia o *gold standard* para el diagnóstico de la infección, su costo, así como el tiempo y los recursos humanos necesarios para la obtención de un resultado, limitan la implementación de este método solo a laboratorios de referencia (244, 245).

En este sentido, los ensayos serológicos basados en la detección de anticuerpos IgM/IgG anti-dengue, son una excelente herramienta confirmatoria, pero no pueden indicarse antes de los cinco días de iniciado el cuadro febril y en determinados casos se requiere la evaluación de una segunda muestra de suero convaleciente con el propósito de evidenciar el estatus de seroconversión (244). Para subsanar esta desventaja, la detección de antígenos virales como la proteína NS1, mediante ensayos básicos de inmunocromatografía o ELISA, permiten la detección del DENV en los primeros cuatro ó cinco días de la infección, pero no admiten el reconocimiento de los serotipos virales (246).

Por ello, en aras de mejorar el diagnóstico de la infección por el DENV, empleando métodos sensibles y específicos, que de forma precoz permitan detectar e identificar los serotipos infectantes, se han descrito un número importante de pruebas moleculares que con el transcurrir del tiempo se han hecho cada vez más accesibles a los laboratorios de diagnóstico especializado en enfermedades infecciosas. Entre los ensayos empleados con mayor frecuencia se encuentra la técnica de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) desarrollada por Lanciotti y colaboradores (247). De hecho, aun son muchos los laboratorios que para el diagnóstico de la infección por el DENV recurren a este ensayo bajo el formato de PCR "*hemi-nested*" ó PCR semianidada. Una variante de la RT-PCR es la RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) caracterizada por su rapidez, alta sensibilidad, especificidad y capacidad de cuantificar de forma absoluta o relativa el producto de la amplificación. Esta notable ventaja frente a otros ensayos moleculares, ha hecho de la RT-qPCR el ensayo de elección para el diagnóstico avanzado y oportuno del dengue,

pues además de conocer el serotipo responsable de la infección en un tiempo aproximado de dos horas, es posible determinar la carga viral en el paciente afectado.

Al respecto, en los últimos 10 años, se han desarrollado ensayos de RT-qPCR para la detección de los cuatro serotipos del DENV bajo la modalidad de formato *uniplex* o *multiplex*, empleando diferentes regiones del genoma viral (248-250). Sin embargo, la continua evolución de este agente infeccioso, proclive a presentar altas tasas de mutación, dificulta la elección de secuencias genómicas consenso identificadas como blanco de amplificación en los ensayos moleculares.

El propósito de este objetivo fue realizar la detección y serotipificación del DENV en muestras de suero provenientes de pacientes con cuadros clínicos compatibles con dengue, mediante ensayos de RT-qPCR desarrollados localmente. Para la detección viral se propuso en primer lugar evaluar la eficiencia de amplificación de una región altamente conservada del virus y posiblemente región consenso correspondiente a la proteína no-estructural-5 (NS5), versus dos regiones tradicionalmente empleadas para el diagnóstico de la infección, la región cápside/pre-membrana (C-prM), y la región no codificante-3' (3'UTR); y en segundo lugar, validar el ensayo en muestras clínicas. En ambos casos se diseñaron ensayos de RT-qPCR en un solo paso fundamentados en la química de SYBR Green I®.

Para la serotipificación viral en muestras clínicas, se propuso evaluar la sensibilidad de un ensayo de RT-qPCR con tecnología TaqMan® uniplex/multiplex amplificando la región NS5, versus la región C-prM usualmente empleada para la serotipificación del DENV empleando para ello un ensayo de RT-qPCR en un solo paso, basado de igual forma en la química de SYBR Green I®.

2.2. MATERIALES Y METODOS

2.2.1 Cepas virales

Se emplearon cepas referenciales autóctonas de los cuatro serotipos del DENV (*DENV1/23644-07/16007-06*, *DENV2/24344-04/16681-06*, *DENV3/21429-04/1728-06* y *DENV4/8887-07/10377-06*) gentilmente cedidas por el Dr. Guillermo Comach (Laboratorio Regional para el Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales, LARDIDEV, Maracay, Estado Aragua, Venezuela). Los virus se cultivaron en líneas celulares del mosquito *Aedes albopictus* clon C6/36HT (Depositorio del CVCM No. 4242) a 30°C en medio mínimo esencial - *Eagle* (MEM del inglés *Minimum Essential Medium - Eagle*) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% y antibiótico (Gentamicina 240 ug/mL) según lo describe Gubler y colaboradores (251). Una vez alcanzado el 75% - 100% de confluencia celular, se adicionaron 50 uL del sobrenadante a monocapas de C6/36HT crecidas en tubos de vidrio con 500 uL de MEM. Se incubaron a 30°C por 4 días. La presencia del virus se determinó por IFI con anticuerpos monoclonales específicos (252).

2.2.2 Titulación viral

La titulación de las cepas virales se realizó preparando diluciones seriadas de cada serotipo en MEM - *Eagle* suplementado con SBF al 2%, para ser colocadas por triplicado en placas de 24 pozos con monocapas confluentes de células BHK-21 clon 15 (Depositorio del CVCM No. 626). Las placas se incubaron en un ambiente con 5% de CO₂, a 37°C por 5 días para luego ser teñidas con azul negro de naftol.

A continuación, se contabilizaron las estructuras celulares líticas producidas sobre las células BHK-21 para determinar el título viral expresado en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL). Se midió el diámetro de las placas en milímetros de lisis producidas tras la replicación viral, considerando placas grandes, medianas y/o pequeñas, aquellas que tuvieran un eje de ≥ 5 mm, 2-4 mm y ≤ 1 mm, respectivamente (253, 254). Finalmente, el sobrenadante de las células infectadas, fue colectado para preparar alícuotas y almacenarlas a -70°C hasta ser utilizadas en ensayos posteriores.

2.2.3 Muestras clínicas

Para el cumplimiento de este objetivo, enmarcado en un estudio experimental de corte transversal, se incluyeron 167 pacientes con edades comprendidas entre los 45 días de nacido y 80 años de edad, valorados en diferentes centros asistenciales del Estado Mérida, por presentar un cuadro febril agudo compatible con dengue según criterios epidemiológicos y clínicos establecidos por la OMS (3) y de acuerdo a lo previsto por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Regional. Los datos de identificación personal, socio-demográficos, paraclínicos y clínicos referidos por el médico tratante, fueron recolectados en un formato diseñado *ad hoc* por el Laboratorio de Microbiología y Salud Pública del Estado Mérida (LSPeM), aprobado por el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR), ente rector del Sistema Nacional para la Prevención, Vigilancia y control de la salud en Venezuela.

Al momento de la consulta médica, se tomaron muestras de sangre venosa periférica en tubos vacutainer estériles sin anticoagulante; 3 mL en pacientes pediátricos y hasta 5 mL en adultos. Una vez identificadas, las muestras fueron trasladadas al LSPeM a 4°C y el suero separado en alícuotas para realizar el ensayo serológico respectivo y el aislamiento inmediato del ARN viral.

2.2.3.1 Criterios de exclusión

Fueron excluidos los pacientes que por valoración física, interrogatorio y/o exámenes de laboratorio manifestaron la presencia de enfermedades infecciosas concomitantes, patologías de origen inmune, oncológicas, metabólicas, neurológicas, mentales o trastornos psicológicos, mujeres en estado de gestación así como los pacientes o representantes legales en el caso de los menores de edad, que por diferentes motivos no autorizaron su participación en el estudio.

2.2.4 Normas bioéticas

Previo a la toma de muestras, se le comunicó al grupo de pacientes o representantes legales la naturaleza e importancia del estudio, con el propósito de obtener su autorización a través de un consentimiento informado evaluado y avalado por la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, con lo cual quedara certificación de su participación en el proyecto. El consentimiento escrito y firmado por los participantes en el estudio, autorizó además de la toma

de muestras, la utilización de la información médica confidencial con fines estadísticos. El estudio se desarrolló siguiendo los principios establecidos por la Declaración de Helsinki para investigaciones médicas en seres humanos (255).

2.2.5 Extracción y cuantificación del ARN viral

Para la extracción del ARN viral a partir del sobrenadante de cultivos celulares y muestras de suero, se empleó el estuche comercial de extracción de QIAGEN® (QIAamp-Viral RNA Mini Kit, Hilden, Germany). Para tal fin, 140 uL de las muestras fueron tratadas en condiciones desnaturizantes con 560 uL de una solución de lisis viral (AVL/RNA-Carrier) durante 10 minutos y diluidas con alcohol (96% - 100%). A continuación, las muestras se centrifugaron sobre columnas de sílica de alta afinidad y los contaminantes eliminados con sucesivos lavados. Finalmente, el ARN fue eluido de la columna con 60 uL del amortiguador AVL y almacenado a -70°C hasta su uso en el ensayo de RT-qPCR. Una vez purificado el material genético, se cuantificó y midió el grado de pureza (A_{260}/A_{280} Ratio 1.8-2.1) utilizando para ello el fotómetro V1101/1101T (Biotech, Cambridge, UK).

2.2.6 Curva estándar

Para la cuantificación de la carga viral, se generaron curvas estándar a partir de cepas referenciales del DENV previamente tituladas en el LARDIDEV. Se prepararon diluciones seriadas (1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 y 1×10^0) de los cuatro serotipos hasta obtener cinco puntos expresados en UFP/mL. Cada dilución se procesó por triplicado y el valor de la regresión lineal y la pendiente se obtuvieron uniendo los puntos de corte generados durante la elaboración de la ecuación de la recta. La curva estándar fue calculada a partir de los valores Ct promedio versus \log_{10} de las diluciones del ARN viral referencial. Los títulos virales inicialmente determinados por el LARDIDEV fueron: DENV1/8x10³ UFP/mL; DENV2/7.8x10⁶ UFP/mL; DENV3/ 5.8x10³ UFP/mL y DENV4/ 84x10³ UFP/mL.

2.2.7 Oligonucleotidos y procesamiento bioinformático

Para la detección del DENV empleando un ensayo de RT-qPCR con química SYBR Green I®, se contrastaron tres pares de oligonucleotidos seleccionados por alineación de las regiones

homólogas de diferentes cepas virales registradas en el NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) - GenBank. El proceso de alineación y validación de las regiones genómicas se realizó aplicando el algoritmo Clustal X del programa MegaAlign - DNA Star software (Perkin, Elmer, Connecticut, USA) y la base de datos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Wisconsin, USA) (256). A partir del alineamiento se analizaron los oligonucleótidos verificando los siguientes parámetros: ubicación del codón en el nucleótido del extremo 3' respecto al OFR de la poliproteína; la frecuencia de cada polimorfismo en el conjunto total de secuencias analizadas; la temperatura de fusión o *melting* (Tm); característica de las estructuras secundarias y especificidad de la secuencia. Así, el primer par de oligonucleótidos se ajustó a secuencias de la región C-prM (mD1/D2), y los dos restantes a la región del genoma que codifica para la proteína no estructural NS5 y 3'UTR (DUNS5_F/DUNS5_Rv y 3'NC_F/3'NC_Rv, respectivamente) (250, 257, 258) (Tabla 1).

La serotipificación viral se llevo a cabo utilizando un ensayo de RT-qPCR con química SYBR Green I[®] y tecnología TaqMan[®]. Para el ensayo con SYBR Green I[®] se emplearon oligonucleótidos correspondientes a la región C-prM (mD1 como secuencia iniciadora consenso para los cuatro serotipos del DENV y secuencias reversas específicas de serotipo DENV1/rTS1-Rv, DENV2/mTS2-Rv, DENV3/TS3-Rv y DENV4/rTS4-Rv) (250). Por su parte para el ensayo TaqMan[®] se emplearon como oligonucleotidos iniciador y de reversa, secuencias consenso de Flavivirus (mFU1/CFD2) acompañadas de sondas específicas para cada serotipo marcadas con un fluoróforo para el formato *uniplex* (D1P-FAM, D2P-FAM, D3P-FAM, D4P-FAM) y cuatro fluoróforos para el formato *multiplex* (D1P-FAM, D2P-VIC, D3P-NED, D4P-JOE) previamente modificados, en reciprocidad con el sistema de calibración empleado para tal fin (250) (Tabla 1) .

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la detección y serotipificación del DENV por RT-qPCR.

Ensayo de detección por RT-qPCR SYBR Green I®		
Región genómica	Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
C-prM	mD1_F	TCA-ATA-TGC-TGA-AAC-GCG-AGA-GAA-ACC-G
	D2_Rv	TTG-CAC-CAA-CAG-TCA-ATG-TCT-TCA-GT-TC
NS5	DUNS5_F	GGT-TAG-AGG-AGA-CCC-CTC
	DUNS5_Rv	GAG-ACA-GCA-GGA-TCT-CTG
3'UTR	3'NC_F	TTG-AGT-AAA-CYR-TGC-TGC-CTG-TAG-CTC
	3'NC_Rv	GGG-TCT-CCT-CTA-ACC-TCT-AGT-CCT
Ensayo de serotipificación por RT-qPCR SYBR Green I®		
Región genómica	Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
C-prM	rTS1_Rv	CCC-GTA-ACA-CTT-TGA-TCG-CT
C-prM	mTS2_Rv	CGC-CAC-AAG-GGC-CAT-GAA-CAG-TT
C-prM	TS3_Rv	TAA-CAT-CAT-CAT-GAG-ACA-GAG-C
C-prM	rTS4_Rv	TTC-TCC-CGT-TCA-GGA-TGT-TC
Ensayo de serotipificación por RT-qPCR TaqMan®		
Región genómica	Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
NS5	mFU1_F	TAC-AAC-ATG-ATG-GGA-AAG-CGA-GAG-AAA-AA
	CFD2_Rv	GTG-TCC-CAG-CCG-GCG-GTG-TCA-TCA-GC
NS5	DENV1_p*	FAM -TCA-GAG-ACA-TAT-CAA-AGA-TTC-CAG-GGG-G-BHQ1
NS5	DENV2_p*	VIC -AAG-AGA-CGT-GAG-CAG-GAA-GGA-AGG-GGG-AGC-BHQ1
NS5	DENV3_p*	NED -TGA-GAG-ATA-TTT-CCA-AGA-TAC-CCG-GAG-GAG-BHQ1
NS5	DENV4_p*	JOE -TGG-AGG-AGA-TAG-ACA-AGA-AGG-ATG-GAG-ACC-BHQ1

C-prM: Cápside-pre-membrana; NS5: del inglés *Non-structural 5 protein* (Proteína no estructural 5); 3'UTR: del inglés 3' *Untranslated region* (Región no-codificante 3'). p* Sondas modificadas a partir de las secuencias de Chien y colaboradores, 2006.

2.2.8 RT-qPCR - SYBR Green I[®]

La detección y serotipificación del DENV por RT-qPCR empleando la química SYBR Green I[®] se desarrolló bajo los sistemas ABI 7500 (Applied Biosystems[®] California, USA) y CFX96 (Bio-Rad Laboratories[®], California, USA). Las reacciones de transcripción reversa y amplificación se realizaron en un solo paso utilizando un estuche comercial de la compañía QIAGEN[®] (*2X QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix*, Hamburg, Germany), con un volumen final de 25 µL/pozo, en microplacas de 96 pozos (*MicroAmp-Applied Biosystems[®]/Low profile plates Bio-Rad[®]*) conteniendo 12.5 uL de *SYBR Green Master Mix 2X*, 0.6 uL de cada oligonucleótido a una concentración óptima de 20 pmol/uL, 0.25 uL de *QuantiFast Reverse Transcriptase Mix*, 6.05 uL de agua y 5 uL de ARN ajustado a un rango de concentración ≤ 100 ng/reacción. Luego de la transcripción reversa a 50°C por 10 minutos, se inició la activación de la HotStart Taq ADN polimerasa a 95°C por 5 minutos. A continuación se programaron 36 ciclos de amplificación a 95°C por 10 segundos (desnaturalización) y 60°C por 31 segundos (hibridación/extensión). Al finalizar la amplificación, se inició el análisis de la curva de fusión con un perfil térmico que incluyó ciclos de calentamiento de 78°C a 94°C y lecturas cada 0.1°C por 10 segundos a fin de discriminar señales de fluorescencia inespecífica.

2.2.9 RT-qPCR - TaqMan[®]

La serotipificación del DENV por RT-qPCR empleando la tecnología TaqMan[®] en formato *uniplex* y *multiplex*, se desarrolló operando los sistemas ABI 7500 (Applied Biosystems[®] California, USA) y CFX96 (Bio-Rad Laboratories[®], California, USA). En ambos casos se utilizaron estuches comerciales de la compañía QIAGEN[®] (*QuantiFast[®] Probe RT-PCR Kit QIAGEN*, Hamburg, Germany). Para el ensayo *uniplex*, el volumen final de reacción fue de 25 uL/pozo en microplacas de 96 pozos (*MicroAmp-Applied Biosystems[®]/Low profile plates Bio-Rad[®]*) conteniendo 12.5 uL de *Quanti-fast Probe Master Mix 2X*, 0.6 uL de cada oligonucleótido a una concentración óptima de 100 pmol/uL, 0.8 uL de cada sonda, 0.25 uL de *QuantiFast Reverse Transcriptase Mix*, 5.25 uL de agua y 5 uL de ARN ajustado a un rango de concentración ≤ 100 ng/reacción.

Por su parte, el ensayo *multiplex* con un volumen final de reacción de 25 uL/pozo, contenía 12.5 uL de *Quanti-fast Probe Master Mix 2X*, 0.6 uL de cada oligonucleótido a una concentración óptima de 100 pmol/uL, 0.8 uL de cada sonda, 0.25 uL de *QuantiFast Reverse Transcriptase Mix*, 2.85 uL de agua y 5 uL de ARN ajustado a un rango de concentración ≤ 100 ng/reacción.

2.2.10 Detección de anticuerpos IgM anti-dengue por ELISA

Se determinó la presencia de anticuerpos IgM anti-dengue mediante un ensayo de ultra micro ELISA tipo Captura (*UMELISA*[®] Dengue IgMPlus, La Habana, Cuba) (259). En placas revestidas con anti-IgM humana, se colocaron 10 uL de las muestras de suero previamente diluidas. Se incubaron por un periodo de 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Luego de realizar los respectivos lavados, se adicionaron 10 uL del antígeno para incubar nuevamente durante 30 minutos a 37°C bajo las mismas condiciones de humedad. Posteriormente, se adicionaron anticuerpos biotinilados anti-dengue además de un conjugado marcado con estreptavidina. Finalmente, se adicionaron 10 uL de sustrato a cada pozo para incubar la placa a temperatura ambiente por 30 minutos. La lectura en absorbancia se realizó a 450 nm en un lector de ELISA (TECNOSUMA, La Habana, Cuba) y el valor del punto de corte se calculó como el promedio de las cifras de densidad óptica de los controles negativos ± 2 desviaciones estándar.

2.2.11 Análisis estadístico

Se utilizó el programa EPI Info 2012, versión 7.0 (CDC, Atlanta, USA) para el análisis estadístico descriptivo de los resultados. El análisis estadístico inferencial y la definición de asociaciones significativas se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher cuando los números absolutos en las casillas de tablas de contingencia fueron menores a cinco. El nivel de significancia aceptado fue $p > 0.05$ y los valores del índice *kappa* según Landis y Koch expresado en cinco niveles de fuerza de concordancia definida como: < 0 - 0.18 pobre; 0.19 - 0.40 débil; 0.41 - 0.60 moderada; 0.61 - 0.80 buena y 0.81 - 1.00 excelente, bajo un intervalo de confianza (IC) de 95%.

2.3. RESULTADOS

2.3.1 RT-qPCR - SYBR Green I[®]

El ARN de los cuatro serotipos virales amplificó empleando los tres pares de oligonucleótidos correspondientes a las regiones genómicas C-prM, NS5 y 3'UTR. Los ensayos fueron normalizados utilizando perfiles térmicos y análisis post-amplificación idénticos. Las curvas estándar presentaron valores de pendientes entre - 3.2 y - 4.2, y aun cuando las tres regiones genómicas tuvieron gráficas de amplificación (Ct/Tm) y coeficientes de correlación similares en el orden de 0.987 - 0.999, la región NS5 mostró la mayor eficiencia de amplificación para cada uno de los serotipos (DENV1/100%, DENV2/98%, DENV3/99.1% y DENV4/99.8%) en relación a las regiones C-prM y 3'UTR. No se observó pendiente alguna en el control negativo (agua) y la curva de disociación fue única en los diversos serotipos, con ausencia de amplificadores inespecíficos o dímeros entre los oligonucleótidos. Se determinó el límite de detección (LDD) preparando diluciones seriadas del ARN viral obtenido a partir de cepas de DENV cuantificadas. La sensibilidad de detección fue mayor para DENV2 y DENV4 al utilizar la región NS5 (Tabla 2). El umbral de amplificación para las regiones C-prM, NS5 y 3'UTR fue en promedio 0.05, 0.07 y 0.09 respectivamente. Esto permitió establecer automáticamente el punto de corte y el origen de positividad en las muestras de ARN viral minimizando las variaciones inter-ensayo.

Tabla 2. Evaluación de las eficiencias de amplificación de las regiones genómicas del DENV C-prM, NS5 y 3'UTR a través del ensayo RT-qPCR SYBR Green I®.

VIRUS	REGION GENOMICA								
	C-prM			NS5			3'UTR		
	Ct (Tm)	E (%) -C	LDD (UFP/mL)	Ct (Tm)	E (%) -C	LDD (UFP/mL)	Ct (Tm)	E (%) -C	LDD (UFP/mL)
DENV1	31.5 (83.6°C±0.26)	45.2 - 0.991	0.01	23.8 (84.9°C±0.31)	100.0 - 0.996	0.01	27.6 (83.9°C±0.61)	86.2 -0.993	0.1
DENV2	15.1 (83.3°C±0.29)	46.0 - 0.987	0.1	14.0 (84.6°C±0.27)	98.0 - 0.999	0.001	19.7 (82.6°C±0.34)	85.0 -0.981	0.01
DENV3	13.7 (83.9°C±0.63)	53.1 - 0.998	0.1	14.0 (86.2°C±0.33)	99.1 - 0.998	0.1	18.6 (84.2°C±0.28)	85.0 -0.996	0.1
DENV4	24.1 (82.9°C±0.25)	47.3 - 0.997	0.1	24.6 (85.2°C±0.44)	99.8 - 0.999	0.001	27.2 (83.6°C±0.26)	92.1 -0.989	0.1

C-prM, capsid/proteína pre-membrana; **NS5**, proteína no-estructural 5; **3'UTR** región no codificante 3' (del inglés *untranslated region*).

Ct: valor de corte.

Tm: Temperatura de fusión (del inglés *Temperature of melting*).

E : Eficiencia de amplificación calculada en base a la pendiente del valor de corte expresada en porcentaje (%).

C: Coeficiente de correlación calculada en base a la ecuación de regresión lineal R^2 .

LDD: Limite de detección expresado en UFP/mL.

2.3.1.1 Validación de casos febriles

Se analizaron 167 muestras de suero provenientes de pacientes con un cuadro febril agudo y sospecha clínica de infección por el DENV. De estos 167 casos febriles, 108 pacientes acudieron a la consulta médica con menos de cuatro días de inicio del cuadro febril, y los 59 pacientes restantes con más de cuatro días de haber iniciado los síntomas. Entre los pacientes que concurren a los diferentes centros asistenciales con menos de cuatro días de iniciado el cuadro febril, 50.9% (55/108) fueron clasificados como DSSA, 48.1% (52/108) como DCSA y 0.9% (1/108) como DS. Por su parte, del grupo de individuos que solicitaron atención médica con más de cuatro días de iniciado el cuadro febril, 32.2% (19/59) fueron identificados como pacientes con DSSA, 64.4% (38/59) con DCSA y tan solo 3.38% (2/59) de este grupo clasificados como DS (Figura 3) (Tabla 3).

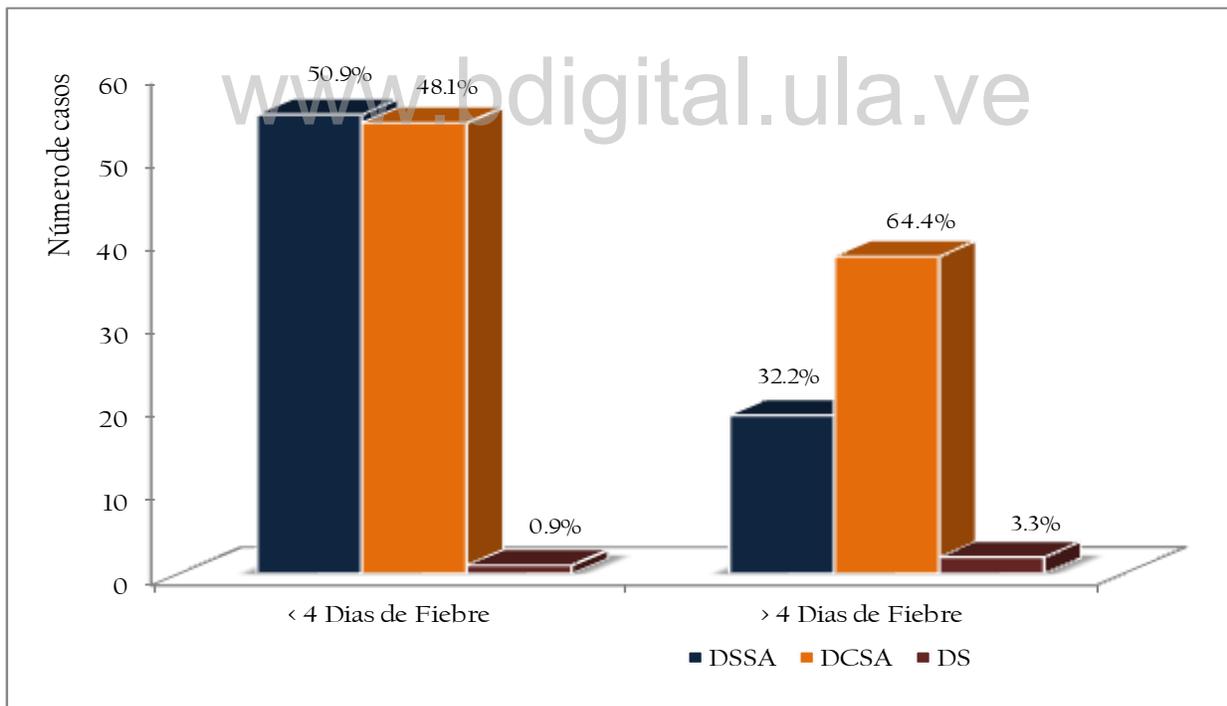


Figura 3. Distribución de los pacientes según el día de inicio del cuadro febril y entidad clínica reconocida. DSSA: dengue sin signos de alarma; DCSA: dengue con signos de alarma; DS: dengue severo.

A todos los pacientes se les prescribió la realización de pruebas serológicas al momento de ingresar al estudio. Al respecto, los resultados señalaron que 57.4% (96/167) de ellos tenían anticuerpos IgM anti-dengue detectables por ELISA.

De los pacientes que ingresaron con menos de cuatro días de iniciados los síntomas, 36.1% (39/108) advirtieron amplificación del ARN viral empleando al menos dos de las regiones genómicas seleccionadas para la detección universal del DENV, y aun cuando indicaron tener fiebre de 3 ó 4 días de evolución al momento de tomar la muestra de sangre venosa, 64.1% (25/39) de este grupo de pacientes, también eran portadores de IgM anti-dengue. En este sentido, solo 12.9% (14/39) de los pacientes positivos para dengue por RT-qPCR no manifestaron la presencia de IgM anti-dengue. En cuanto a los pacientes que ingresaron con más de cuatro días de iniciado el cuadro febril, 47.4% (28/59) amplificaron el ARN viral empleando al menos dos de las regiones genómicas seleccionadas para tal fin. De manera notable, en 92.8% (26/28) de este grupo de pacientes, se detectó simultáneamente la presencia de IgM anti-dengue por lo que 7.14% (2/28) de ellos tuvieron resultados negativos por pruebas serológicas (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de las muestras procesadas según el día de inicio del cuadro febril, clasificación clínica de la enfermedad y pruebas confirmatorias de laboratorio (RT-qPCR SYBR Green I[®]/ELISA IgM anti-dengue).

167 PACIENTES CON DIAGNOSTICO PROBABLE DE DENGUE							
1 - 4 Días de inicio de la fiebre n=108			> de 4 días de inicio de la fiebre n=59				
DSSA	DCSA	DS	DSSA	DCSA	DS		
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
55 (50.9)	52 (48.1)	1 (0.90)	19 (32.2)	38 (64.4)	2 (3.38)		
DIAGNOSTICO CONFIRMATORIO DE LABORATORIO							
RT-qPCR		IgM		RT-qPCR		IgM	
Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
39 (36.1)	69 (63.8)	42 (38.8)	69 (63.8)	28 (47.4)	31 (52.5)	54 (91.5)	2 (3.3)

DSSA: dengue sin signos de alarma; DCSA: dengue con signos de alarma; DS: dengue severo. OMS (2009).

Entre los datos demográficos de importancia, en el grupo de pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue por pruebas virológicas y/o serológicas, la población menor de 15 años ocupó el 50% (18/36) de los casos de DSSA, mientras que los adultos jóvenes y mayores de 40 años cifraron el 50% (18/36) restante. En el caso de los pacientes clasificados como DCSA y DS, la población menor de 15 años ocupó el 64.3% (47/73) y 66.6% (2/3) respectivamente, mientras que los adultos jóvenes y mayores de 40 años alcanzaron el 35.6% (26/73) y el 33.3% (1/3) comparativamente (Figura 4).

El análisis de la distribución por género, reveló que en el caso de los pacientes con DSSA, el 38.8% (14/36) correspondió al sexo femenino y 61.1% (22/36) al sexo masculino; mientras que en los casos clasificados como DCSA, el predominio fue del sexo femenino con un 53.4% (39/73) seguido del sexo masculino con 46.5% (34/73). Finalmente, entre los casos con DS se identificaron dos infantes masculinos ocupando el 66,6% (2/3) y un paciente adulto del género femenino con el 33.3% (1/3) restante (Figura 5).

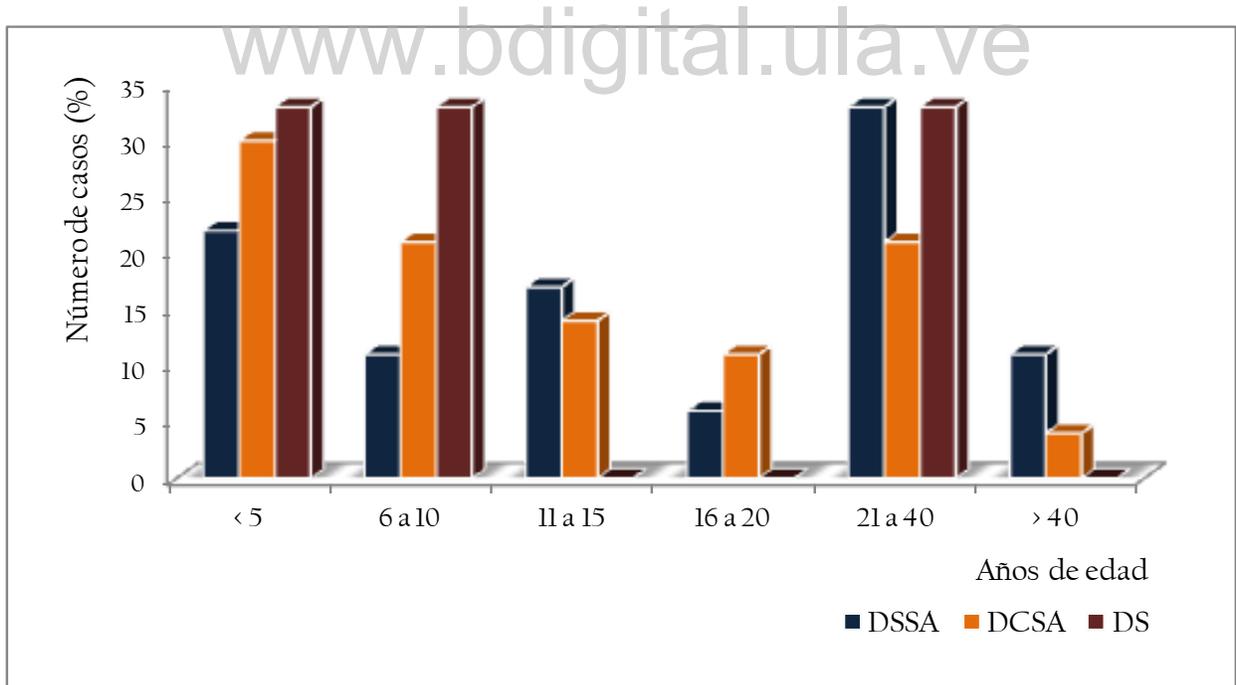


Figura 4. Distribución de los pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue por grupos etarios y entidad clínica de la enfermedad. DSSA: dengue sin signos de alarma; DCSA: dengue con signos de alarma; DS: dengue severo.

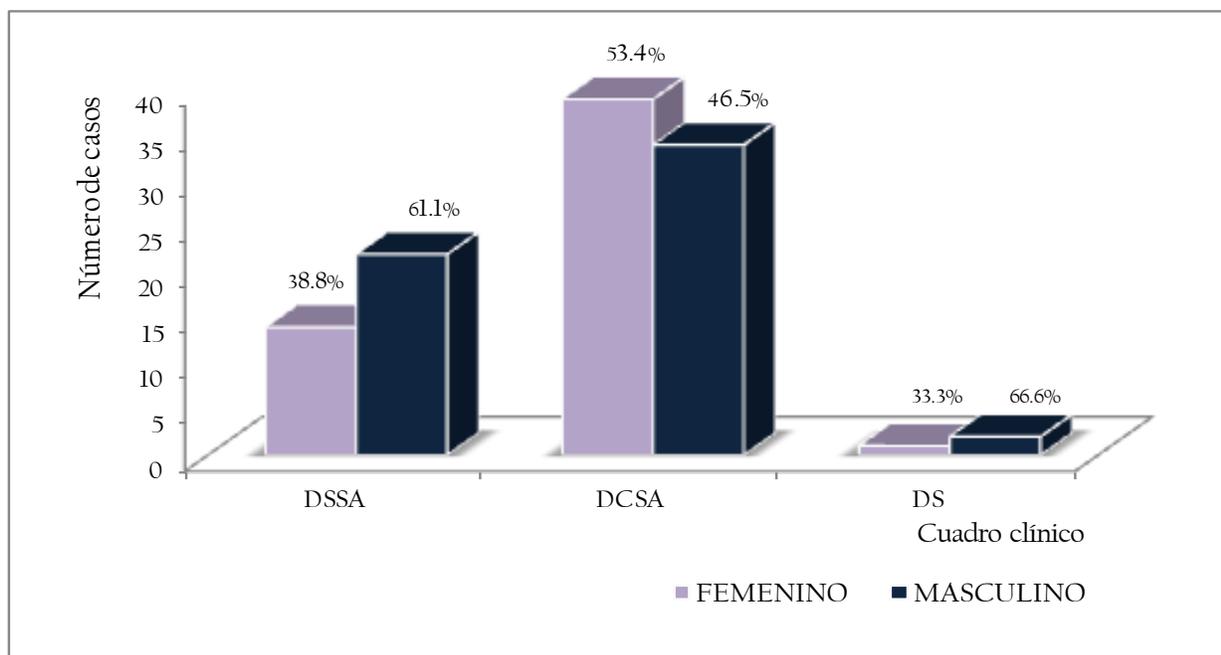


Figura 5. Distribución de los pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue por género y entidad clínica de la enfermedad. DSSA: dengue sin signos de alarma; DCSA: dengue con signos de alarma; DS: dengue severo.

www.bdigital.ula.ve

2.3.1.1.1 Manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio

El análisis de los pacientes admitidos en el estudio, basado en las manifestaciones clínicas y datos de laboratorio más relevantes, se resumen en la Figura 6, Figura 7 y Tabla 4. Entre los casos que cursaban con DSSA, las manifestaciones más frecuentes fueron fiebre (100%), cefalea (83.3%), artralgias (75%), mialgia (69.4%), náuseas (72.2%), dolor abdominal (25%) y diarrea (11.1%). Algunos pacientes cursaron con síntomas respiratorios tales como tos y disfagia (47.2% y 27.7% respectivamente). La erupción cutánea, signo que define el final de la fase aguda de la enfermedad, se observó en el 36.1% de los pacientes. En lo que respecta a signos hemorrágicos, el 44.4% (16/36) de los casos manifestaron esta condición y las expresiones clínicas más frecuentes fueron la epistaxis (22.2%), gingivorragia (19.4%), petequias (25%), fragilidad capilar (5.5%) y como eventos de mayor complejidad se advirtió la presencia de melena (5.5%) y derrame pleural unilateral (2.7%).

Por su parte, en el grupo definido como DCSA, las manifestaciones clínicas más relevantes fueron fiebre (100%), cefalea (86.3%), mialgias (82.1%), artralgias (78%), dolor abdominal (89%), náuseas (87.6%), erupción (47.9%) y diarrea (30.1%). Los síntomas respiratorios más acentuados fueron tos (45.2%) y disfagia (32.8%). Igualmente resalta un mayor porcentaje de manifestaciones hemorrágicas como epistaxis (32.8%), gingivorragia (27.3%), petequias (31.5%), fragilidad capilar (12.3%), melena (5.4%) y derrames de tipo pleural y abdominal (8.2%).

Finalmente, en los pacientes con DS, se evidenció la presencia de fiebre (100%), cefalea (33.3%), mialgia (66.6%), artralgia (66.6%), dolor abdominal (33.3%), náuseas (66.6%) y erupción (66.6%). Como único síntoma respiratorio se observó la presencia de tos (33.3%). Entre las manifestaciones hemorrágicas más relevantes a contrastar con el grupo de pacientes definidos como DSSA y DCSA, se evidencio la presencia de gingivorragia (33.3%), petequias (66.6%), fragilidad capilar (33.3%), melena (33.3%) y derrame pleural bilateral (66.6%). En lo que respecta a los parámetros hematológicos para este grupo de pacientes se advirtió un aumento significativo del hematocrito ($X=50\%$, $DE=13,6$), una relación hematocrito/hemoglobina (Hto/Hb) > 3 y trombocitopenia severa ($X=16.000/mm^3$, $DE= 8.38$).

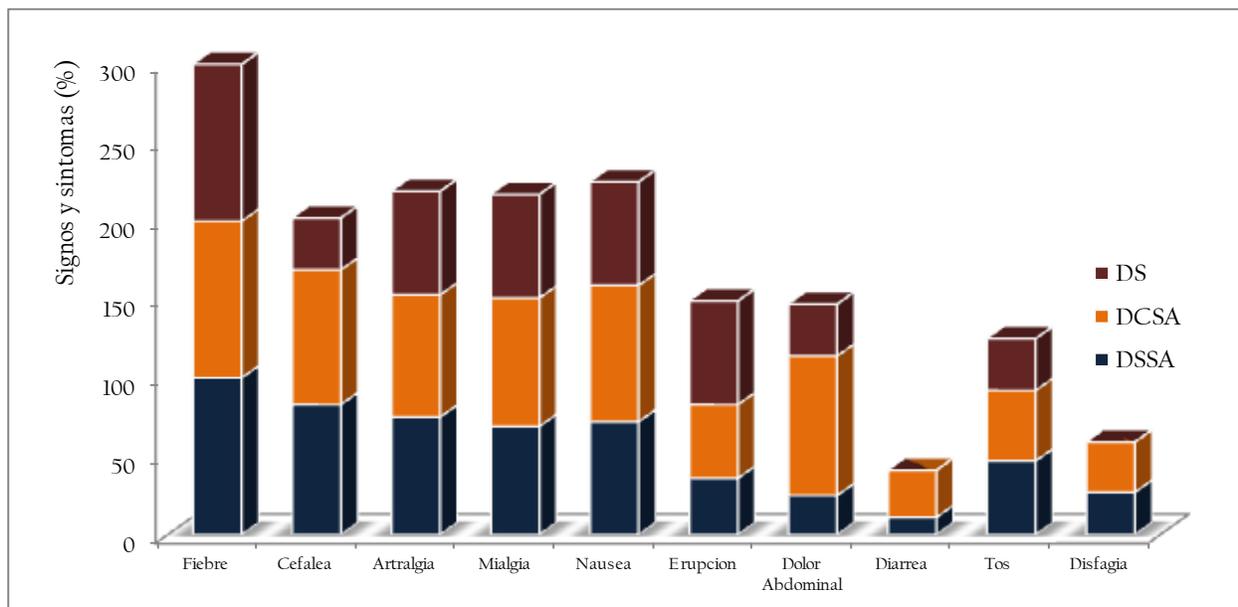


Figura 6. Distribución de los principales signos y síntomas según el cuadro clínico de la enfermedad. DSSA: dengue sin signos de alarma; DCSA: dengue con signos de alarma; DS: dengue severo.

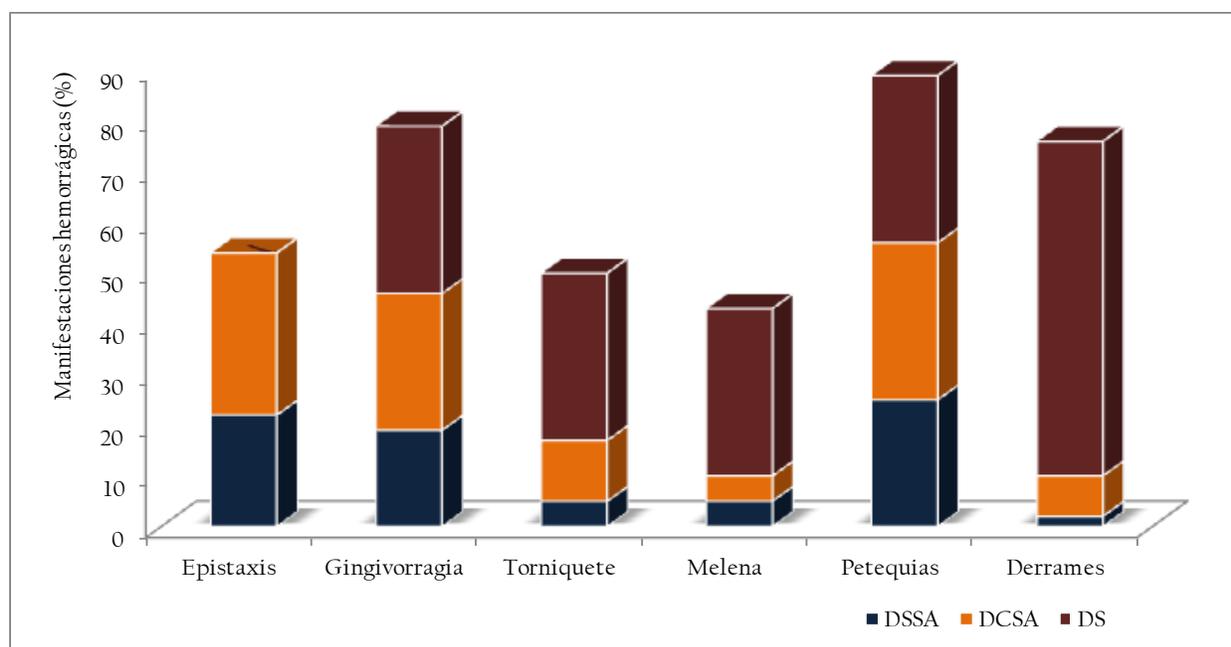


Figura 7. Distribución de las manifestaciones hemorrágicas según el cuadro clínico de la enfermedad. DSSA: dengue sin signos de alarma; DCSA: dengue con signos de alarma; DS: dengue severo.

Tabla 4. Promedio de los valores hematológicos y químicos de los pacientes con diagnóstico confirmatorio de infección por el DENV.

PARAMETROS	DSSA X (DE)	DCSA X (DE)	DS X (DE)
Hemoglobina (gr/dL)	14.0 (1.5)	13.5 (1.8)	14.2 (3.9)
Hematocrito (%)	41.8 (4.4)	39.6 (7.1)	41.4 (13.2)
Hb/Hto	2.9 (0.1)	3.4 (0.1)	3.7 (0.1)
Leucocitos (1000 x mL)	4.9 (2.3)	4.4 (2.5)	7.1 (6.7)
Linfocitos (%)	32.7 (15.8)	33.3 (16.3)	38.1 (14.2)
Neutrófilos (%)	57.4 (19.1)	53.7 (16.4)	47.4 (14.8)
Plaquetas (1000 x mL)	120 (63.8)	108 (78.5)	16 (10.8)
TP (Segundos)	13.2 (1.2)	12.6 (1.6)	15.0 (3.4)
TPT (Segundos)	39.3 (22.9)	35.6 (12.2)	51.2 (10.3)
TGO (UI/mL)	82.2 (69.7)	115.5 (76.8)	797.3 (554.6)
TGP (UI/mL)	62.8 (51.9)	69.8 (54.4)	910.3 (691.6)

DSSA: dengue sin signos de alarma; DCSA: dengue con signos de alarma; DS: dengue severo; X: Promedio; DE: Desviación estándar.

2.3.1.2 Nivel de concordancia entre las regiones genómicas C-prM/NS5/3'UTR

El nivel de concordancia entre las regiones genómicas C-prM/NS5/3'UTR se evaluó empleando las 67 muestras de suero que amplificaron el genoma del DENV. La concordancia derivada al entrecruzar el resultado de los ensayos RT-qPCR - SYBR Green I[®] regiones NS5/C-prM y NS5/3'UTR, fue 59.7% y 97% respectivamente. El coeficiente kappa mostró un grado concordancia débil entre la región NS5/C-prM ($k=0.109$; IC 95%) y moderada entre la región NS5/3'UTR ($k=0.489$; IC 95%). El análisis estadístico entre los parámetros evaluados, no evidenció asociación significativa de amplificación entre NS5/C-prM ($p=0.263$), sin embargo, se observó mejor correlación entre la región NS5/3'UTR ($p=0.0001$) (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación del nivel de concordancia entre las regiones genómicas C-prM, NS5 y 3'UTR del DENV empleando el ensayo RT-qPCR SYBR Green I[®].

REGIÓN GENÓMICA		NS5/SYBR Green I [®]		
DENV		Positivo/n (%)	Negativo/n (%)	TOTAL/n (%)
C-prM/SYBR Green I [®]	Positivo/n (%)	37 (55.2)	0 (0.0)	37 (55.2)
	Negativo/n (%)	27 (43.2)	3 (4.4)	30 (44.7)
	TOTAL/n (%)	64 (95.5)	3 (4.4)	67 (100)
3'UTR/SYBR Green I [®]	Positivo/n (%)	64 (95.5)	0 (0.0)	64 (95.5)
	Negativo/n (%)	2 (2.9)	1 (1.4)	3 (4.4)
	TOTAL/n (%)	66 (98.5)	1 (1.4)	67 (100)

C-prM: región capsida/proteína pre-membrana; NS5: proteína no-estructural 5. Correlación SYBR Green I[®] Ensayos: NS5/C-prM= 59.7%, $\kappa=0.109$; CI 95%, $p=0.263$; NS5/3'UTR= 97%, $\kappa=0.489$; IC 95%, $p<0.0001$.

2.3.1.3 Serotipos virales amplificados por el ensayo RT-qPCR - SYBR Green I[®]

Una vez confirmada la presencia del ARN viral en 59.8% (67/112) de las muestras de suero positivas para dengue, se procedió a determinar el serotipo causante de la infección, empleando el ensayo de RT-qPCR fundamentado en la química SYBR Green I[®] amplificando la región C-prM. Para ello se emplearon aislados virales como controles positivos de la reacción,

obteniendo valores promedios de Ct/Tm de 22.5/81.9°C para DENV1; 22.5/80.3°C para DENV2; 22.5/83.8°C para DENV3 y 16/83.2°C para DENV4.

En este sentido, en el grupo de pacientes con DSSA se observó predominio del serotipo DENV2 (54.5%), seguido de DENV4 (18.1%), DENV1 (13.6%) y DENV3 (9%). En 4.5% (1/22) de los pacientes hubo amplificación combinada de serotipos (DENV1/DENV2). En el grupo de pacientes con DCSA se observó igualmente predominio del serotipo DENV2 (37.2%), seguido de DENV1 (23.2%), DENV3 (18.6%) y DENV4 (9.3%). En 11.6% (5/43) de los pacientes se confirmó la amplificación simultánea de más de un serotipo (DENV1/DENV2; DENV1/DENV4; DENV2/DENV3 y DENV2/DENV4).

Finalmente, en el grupo de pacientes con DS, se identificaron dos pacientes, un neonato de 45 días de nacido, producto de una madre con anticuerpos IgM anti-dengue y un infante de 6 años de edad, ambos fallecidos tras la instauración de un cuadro de CID, en quienes se identificó la presencia de DENV2 como único serotipo causante de la infección (Figura 8 y 9).

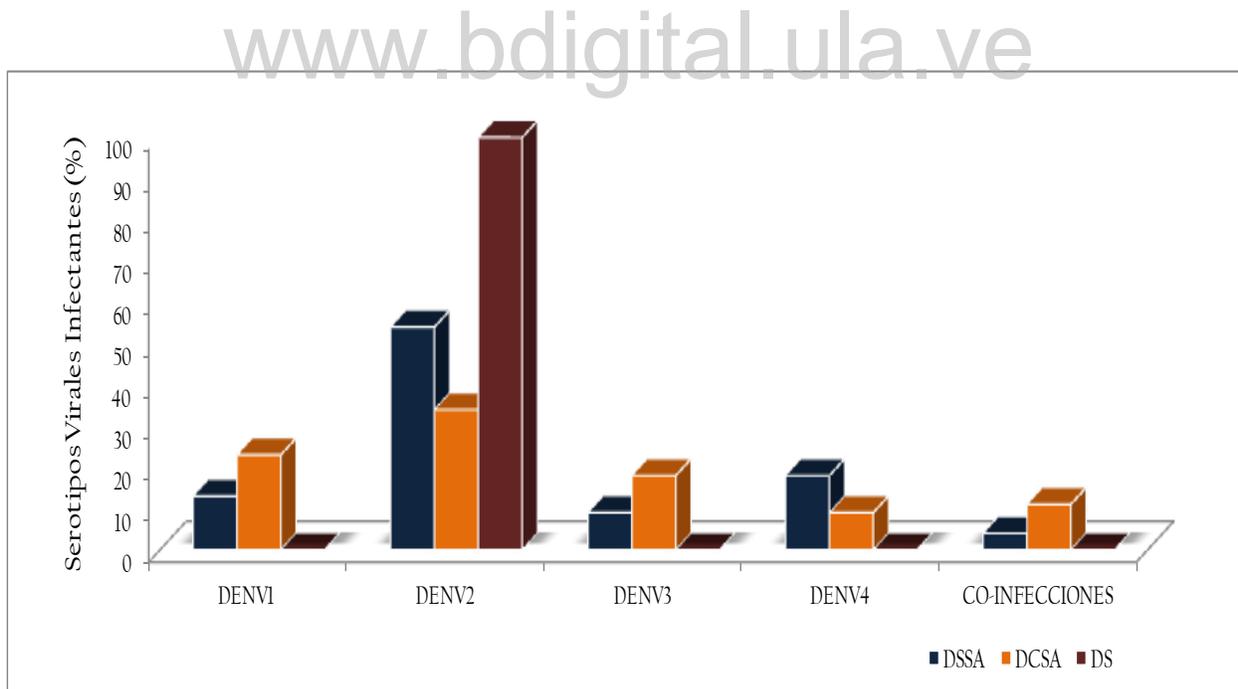


Figura 8. Distribución de los serotipos del DENV según la entidad clínica de la enfermedad. DSSA: dengue sin signos de alarma; DCSA: dengue con signos de alarma; DS: dengue severo. Co-infecciones: DENV1/DENV2; DENV1/DENV4; DENV2/DENV3 y DENV2/DENV4.

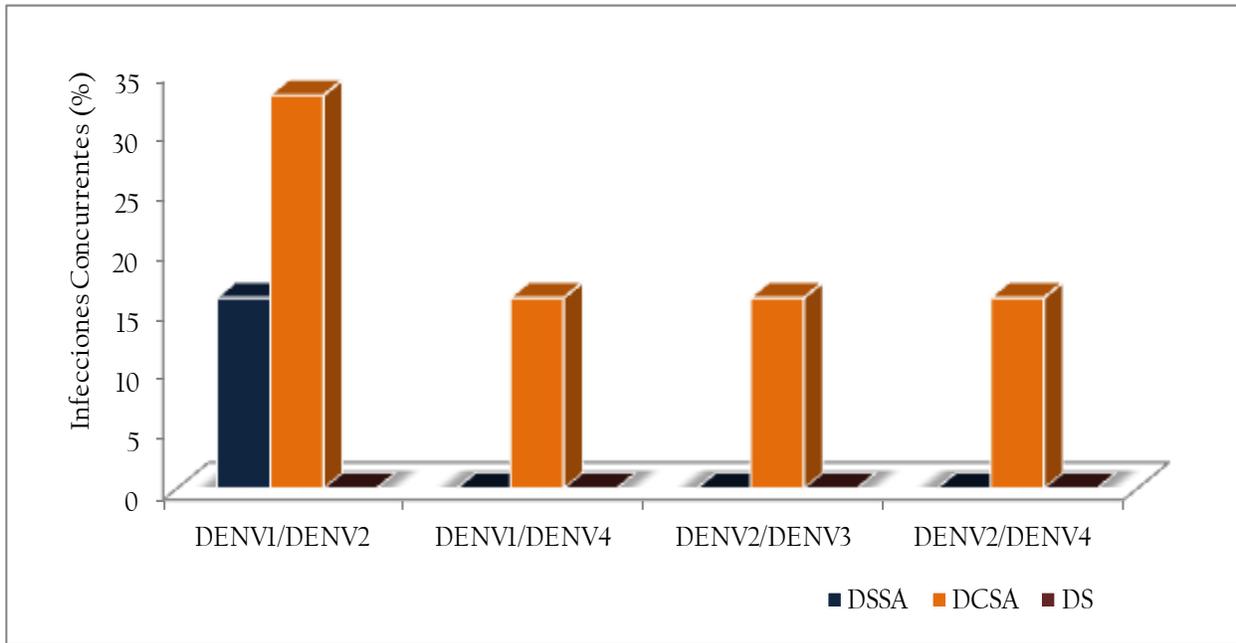


Figura 9. Distribución de las infecciones concurrentes según el cuadro clínico de la enfermedad. DSSA: dengue sin signos de alarma; DCSA: dengue con signos de alarma; DS: dengue severo.

2.3.1.4 Determinación de la carga viral

Posterior al ensayo de serotipificación, se determinó la carga viral de cada uno de los serotipos detectados. Cada muestra fue procesada por duplicado y la carga viral deducida por interpolación del valor Ct promedio con la curva estándar expresada en UFP/mL.

En relación a los pacientes con infecciones únicas por cualquiera de los cuatro serotipos, la carga viral según la entidad clínica mostró un valor promedio en el grupo con DSSA de 1.38×10^2 UFP/mL para DENV1, 1.83×10^2 UFP/ml para DENV2, 7.20×10^2 UFP/mL para DENV3 y 9.80×10^2 UFP/mL para DENV4. Por su parte los pacientes con DCSA como cifras promedio de carga viral 1.83×10^2 UFP/mL para DENV1, 1.93×10^2 UFP/mL para DENV2, 1.60×10^2 UFP/mL para DENV3 y 2.65×10^2 UFP/mL para DENV4. En el caso de los pacientes con DS solo se detectó la presencia de DENV2 con una carga viral absoluta de 17.4×10^2 UFP/mL (Figura 10) (Tabla 6).

Adicionalmente, la determinación de la carga viral en los casos de infecciones concurrentes, mostró en el grupo de pacientes con DCSA que la presencia simultánea de DENV2/DENV4 alcanzó un valor promedio de 2.35×10^2 UFP/mL, seguida de DENV2/DENV3 con una carga viral absoluta de 1.7×10^2 UFP/mL, DENV1/DENV2 con un valor de 1.67×10^2 UFP/mL y finalmente, DENV1/DENV4 con un valor de 1.41×10^2 UFP/mL. En los pacientes con DSSA solo se identificó como infección mixta la presencia DENV1/DENV2 con una carga viral promedio de 27.1×10^1 UFP/mL (Tabla 6).

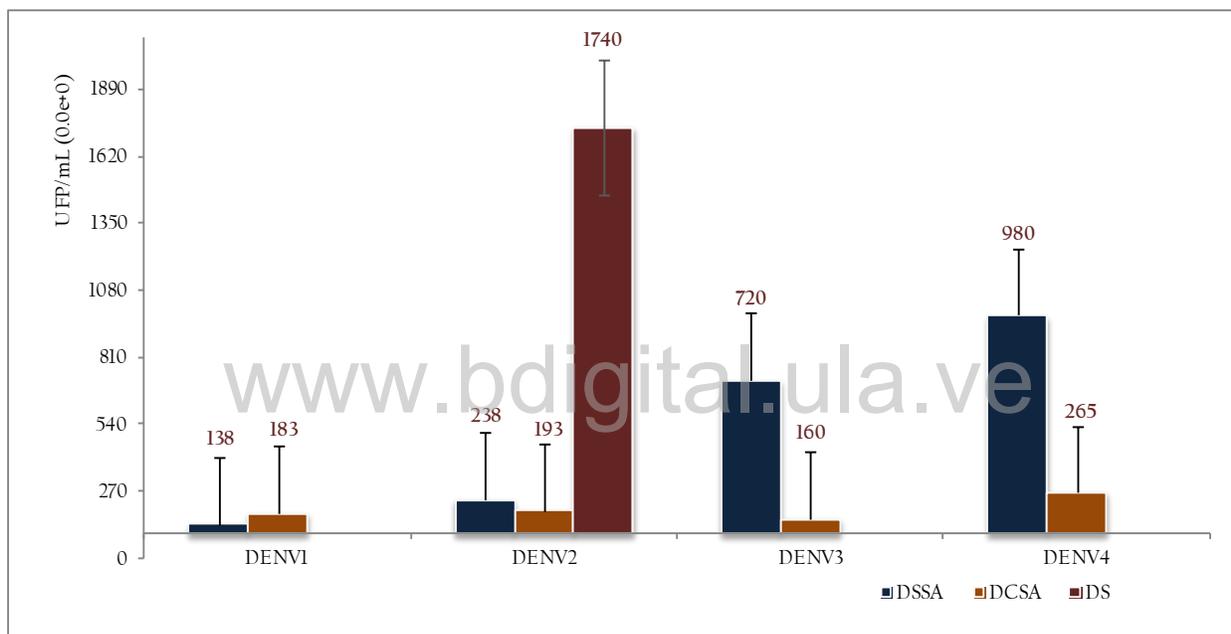


Figura 10. Carga viral en pacientes con infecciones por el DENV distribuidos según la entidad clínica de la enfermedad y serotipos infectantes. DSSA: dengue sin signos de alarma, DCSA: dengue con signos de alarma y DS: dengue severo. El rectángulo representa la desviación estándar (DE), la línea que se extiende a partir del rectángulo el valor superior y las cifras en rojo el valor promedio de la carga viral expresada en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL).

2.3.1.5 Análisis de muestras de suero y ARN virales por un Laboratorio de Referencia Externo

Un total de 92 muestras de suero, seleccionadas al azar y provenientes de pacientes con un cuadro febril agudo de cuatro días de evolución, fueron enviadas al Laboratorio de Biología de

Virus del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Altos de Pipe, Estado Miranda, Venezuela, para realizar procedimientos de evaluación externa. Los protocolos aplicados se fundamentaron en cultivos celulares empleando el sistema de células C6/36HT, y amplificación del genoma viral por RT-PCR convencional en formato *hemi-nested* descrito por Lanciotti y colaboradores (247). Los resultados obtenidos luego de analizar las muestras de forma simultánea en el LSPEM y el IVIC se observan en la Tabla 7.

Tabla 6. Distribución de los casos de dengue de acuerdo a la entidad clínica, carga viral, serotipo viral infectante e infecciones concurrentes.

ENTIDAD CLINICA	CARGA VIRAL - UFP/mL			
	INFECCIONES UNICAS			
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
DSSA	1.38x10 ²	2.38x10 ²	7.20x10 ²	9.80x10 ²
DCSA	1.83x10 ²	1.93x10 ²	1.60x10 ²	2.65x10 ²
DS	-	17.4x10 ²	-	-
	INFECCIONES CONCURRENTES			
	DENV1/DENV2	DENV1/DENV4	DENV2/DENV3	DENV2/DENV4
DSSA	27.1x10 ¹	-	-	-
DCSA	1.67x10 ²	1.41x10 ²	1.70x10 ²	2.35x10 ²
DS	-	-	-	-

DSSA: dengue sin signos de alarma; DCSA: dengue con signos de alarma; DS: dengue severo. UFP/mL: unidades formadoras de placas por mililitro.

La amplificación del DENV ocurrió en el 69.5% (64/92) de las muestras procesadas en el LSPEM y en 61.9% (57/92) de las muestras enviadas al IVIC. En relación a la serotipificación, el LSPEM identificó 17.1% (11/64) de las cepas como DENV1, 45.3% (29/64) de DENV2, 15.6% (10/64) de DENV3, 12.5% (8/64) de DENV4 y 9.3% (6/64) como infecciones concurrentes o mixtas (DENV1/DENV2; DENV1/DENV4; DENV2/DENV3; DENV2/DENV4). Por su parte, del total de muestras positivas para dengue por RT-PCR convencional, en el IVIC se identificaron 17.5% (10/57) como DENV1, 45.6% (26/57) como DENV2, 15.7% (9/57) como

DENV3, 14% (8/57) como DENV4 y solo 7.01% (4/57) como infecciones concurrentes (DENV1/DENV2; DENV1/DENV3; DENV1/DENV4; DENV1/DENV2; DENV2/DENV3).

Con respecto al cultivo celular, de las 92 muestras de suero enviadas al IVIC, hubo posibilidad de evaluar 38 de ellas logrando aislamiento viral solo en 39.4% (15/38) de los especímenes. Así, 20% (3/15) de los aislados correspondieron a DENV1, 6.6% (1/15) a DENV2, 6.6% (1/15) a DENV3 y 46.6% (7/15) a DENV4. Igualmente, en 20% (3/15) de las muestras de suero se advirtió la presencia de más de un serotipo de forma simultánea (DENV1/DENV2; DENV1/DENV DENV1/DENV4; DENV2/DENV3; DENV2/DENV4).

Tabla 7. Evaluación externa del ensayo de RT-qPCR con química SYBR Green I[®] para la detección universal y serotipificación del DENV.

	LSPeM		IVIC
ENSAYO DE DETECCION	RT-qPCR/NS5 n=92 (%)	RT-PCR/C-prM n=92 (%)	CULTIVO/C6/36* n=38 (%)
Positivo	64 (69.5)	57 (61.9)	15 (39.4)
Negativo	28 (30.4)	35 (38.0)	23 (60.5)
SEROTIPIFICACIÓN	RT-qPCR/C-prM n=64 (%)	RT-PCR/C-prM n=57 (%)	CULTIVO/C6/36* n=15 (%)
DENV1	11 (17.1)	10 (17.5)	3 (20)
DENV2	29 (45.3)	26 (45.6)	1 (6.6)
DENV3	10 (15.6)	9 (15.7)	1 (6.6)
DENV4	8 (12.5)	8 (14.0)	7 (46.6)
INFECCIONES CONCURRENTES	6 (9.3)	4 (7.01)	3 (20)

LSPeM: Laboratorio de Salud Pública del Estado Mérida; IVIC: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. NS5: proteína no-estructural 5; C-prM: región capsida/proteína pre-membrana. C6/36* Línea celular C6/36HT.

2.3.2 RT-qPCR - TaqMan[®]

El ensayo TaqMan[®] *uniplex* empleando la región NS5 como blanco de amplificación, generó curvas para los cuatro serotipos del DENV, con valores Ct promedio de 22.9, 25.0, 19.5 y 24.6

para DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4 respectivamente. Sin embargo, al combinar los oligonucleótidos y sondas para la detección simultánea de los cuatro serotipos virales en un ensayo *multiplex*, no hubo amplificación del genoma de DENV1 y DENV4. No se observaron curvas en el control negativo (agua) y las muestras para el ensayo cualitativo fueron procesadas por duplicado.

Para la cuantificación de la carga viral, se generaron curvas estándar a partir del ARN de cepas referenciales del DENV previamente tituladas en el LARDIDEV. La eficiencia y regresión lineal (R^2) de amplificación del ensayo TaqMan[®] *uniplex* calculada a partir de concentraciones conocida de cada serotipo fue 84.7 ($R^2=0.996$) para DENV1, 76.0 ($R^2=0.989$) para DENV2, 73.1 ($R^2=0.990$) para DENV3 y 92.2 ($R^2=0.997$) para DENV4, mientras que la eficiencia de amplificación del ensayo TaqMan[®] *multiplex* se ubicó entre 44% - 67% para los diferentes serotipos. Con respecto a la sensibilidad de ambos ensayos, la capacidad de detección de la prueba TaqMan[®] *uniplex* fue mayor con respecto al ensayo TaqMan[®] *multiplex* (100% y 50% respectivamente). Asimismo, la cuantificación de la carga viral con el ensayo, TaqMan[®] *uniplex* tuvo un rango de $0.33 - 1.44 \times 10^2$ UFP/mL para DENV1, $0.28 - 0.78 \times 10^2$ UFP/mL para DENV2, $0.52 - 0.81 \times 10^2$ UFP/mL para DENV3 y $1.12 - 1.19 \times 10^2$ UFP/mL para DENV4.

2.3.2.1 Validación de casos febriles

Un total de 67 muestras de suero, evaluadas inicialmente por el ensayo de RT-qPCR basado en la química SYBR Green I[®], fueron nuevamente procesadas por el ensayo de RT-qPCR empleando tecnología TaqMan[®] en formato *uniplex*, con el propósito de examinar el nivel de concordancia entre la región C-prM y NS5 al momento de serotipificar al DENV. Para el ensayo RT-qPCR - SYBR Green I[®]/C-prM, DENV1 ocupó el 17.9% (12/67) de los amplificados, DENV2 el 31.3% (21/67), DENV3 11.9% (8/67) mientras que DENV4 y las infecciones concurrentes (DENV1/DENV2, DENV1/DENV4, DENV2/DENV3, DENV2/DENV4) el 7.46% (5/67), en tanto que 23.8% (16/67) del total de los especímenes evaluados no fueron tipificados por este ensayo. Por su parte, para el ensayo RT-qPCR - TaqMan[®]/NS5, DENV1 constituyó el 19.4% (13/67) de los amplificados, DENV2 el 44.7% (30/67), DENV3 el 14.9% (10/67) y DENV4 el 11.9% (8/67). En relación a las infecciones concurrentes (DENV1/DENV2, DENV1/DENV4, DENV2/DENV3, DENV2/DENV4) este ensayo identificó 8.9% de las

asociaciones virales. De acuerdo a estos datos, el nivel de concordancia para la serotipificación entre ambos ensayos fue 85% para DENV1, 70% para DENV2, 80% DENV3 y 57.1% y 83.3% para DENV4 e infecciones concurrentes respectivamente. En este sentido al aplicar el coeficiente kappa para comparar los resultados de las dos pruebas de RT-qPCR, se observó un nivel de concordancia bueno a excelente ($k=0.790 - 1.000$; IC 95%) (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis comparativo de los ensayos RT-qPCR SYBR Green I[®]/C-prM y RT-qPCR TaqMan[®]/NS5 para la serotipificación del DENV.

VIRUS	RT-qPCR		CONCORDANCIA % - (DE)
	SYBR Green I [®] /C-prM n=67 (%)	TaqMan [®] /NS5 n=67 (%)	
DENV1	12/67 (17.9)	13/67 (19.4)	85 (0.985)
DENV2	21/67 (31.3)	30/67 (44.7)	70 (0.819)
DENV3	8/67 (11.9)	10/67 (14.9)	80 (0.945)
DENV4	5/67 (7.46)	8/67 (11.9)	57.1 (0.383)
INFECCIONES CONCURRENTES	5/67 (7.46)	6/67 (8.9)	83.3 (0.980)
NO TIPIFICADAS	16/67 (23.8)	-	-
TOTAL	67/67 (100)	67/67 (100)	-

C-prM: (región capsida/pre-membrana), NS5 (proteína no estructural NS5). Concordancia entre los ensayos RT-qPCR SYBR Green[®] I/C-prM y TaqMan[®]/NS5 $\kappa= 0.790 - 1.000$; CI 95%. Infecciones concurrentes identificadas DENV1/DENV2; DENV2/DENV4.

2.4 DISCUSIÓN

El diagnóstico precoz de la infección por el DENV, es factor determinante para la instauración de medidas terapéuticas tempranas, que eviten en buena medida las complicaciones clínicas propias de la enfermedad así como para establecer estrategias epidemiológicas de control que resguarden la salud pública (260). Al respecto, en la última década se han desarrollado pruebas moleculares como la qPCR, un ensayo con dos características esenciales, la capacidad de disminuir significativamente la posibilidad de contaminación y cuantificar el producto amplificado (261). Estos ensayos han estado dirigidos a amplificar áreas genómicas del DENV correspondientes a diferentes proteínas estructurales y no-estructurales (E, prM, NS3, NS5 y 3'UTR) (250, 262-265).

Una de las mayores dificultades en el diseño de los ensayos de RT-qPCR para la detección y serotipificación del DENV, es la variabilidad genética que caracteriza a este virus, producto de la ausencia de actividad correctora por parte de la ARN polimerasa durante el proceso de replicación viral. Esta condición da origen a poblaciones de alta diversidad genética o cuasiespecies cuya capacidad de adaptación a los cambios en presiones selectivas es realmente notable (266). No obstante, una de las estrategias implementadas para solventar inconvenientes durante la amplificación, es el empleo de oligonucleótidos degenerados con el propósito de cubrir un margen aceptable de posibles mutaciones puntuales (247).

El interés de este primer capítulo, fue contrastar y evaluar la eficiencia de amplificación de una de las regiones más conservadas del DENV, la proteína NS5, frente a dos regiones tradicionalmente empleadas para la detección universal y serotipificación del virus en muestras clínicas, la región C-prM y 3'UTR. Emplear como blanco de amplificación proteínas con secuencias conservadas dentro del genoma viral, permite detectar la presencia del DENV con un importante margen de especificidad; tal es el caso de la proteína NS5 cuya actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN, es indispensable para la ciclación del genoma e inicio del proceso de replicación. Dentro de esta región, el grado de variabilidad genética es sustancialmente bajo (267, 268). En este sentido, los ensayos en los que se han empleado la región NS5 para la detección y serotipificación del DENV a partir de muestras clínicas o mosquitos vectores, han mostrado índices de especificidad y sensibilidad aceptables para el

diagnóstico confirmatorio de la infección (257, 258, 269). Por esta razón, un ensayo basado en la amplificación de secuencias específicas de la región NS5, garantiza un diagnóstico rápido y precoz del dengue.

En el presente estudio, los resultados mostraron que la región C-prM tuvo una eficiencia de amplificación relativamente baja (< 60%) para los cuatro serotipos del DENV, en contraste con la eficiencia exhibida por la región NS5, una situación similar a la reportada por otros autores (249, 250). La naturaleza de la variabilidad genética del DENV, es esencialmente atribuida al fenómeno de degeneración de varios codones ubicados en la región genómica que codifican para la cápside viral, las proteínas prM y de envoltura (264). Mutaciones impredecibles en las regiones C-prM pueden dar origen a resultados equívocos al momento de emplear ensayos moleculares como la RT-qPCR, más aún si se trata de aislados virales de diferentes orígenes geográficos (264, 270). Por su parte, el ensayo de RT-qPCR basado en la química SYBR Green I[®], empleando la región 3'UTR, mostró una mejor eficiencia de amplificación (> 80%) que la región C-prM para los cuatro serotipos del DENV y un índice de concordancia moderada en contraste con la región NS5. La secuencia de la región 3'UTR seleccionada para el ensayo, se extiende desde el nucleótido 10418 al 10564, incluyendo al menos 52 nucleótidos conservados dentro de la región distal que permite distinguir a los cuatro serotipos del DENV entre otros Flavivirus. Estos resultados son consistentes con los datos presentados en trabajos previos (250, 264, 270).

La existencia de múltiples pares de oligonucleótidos, capaces de amplificar y detectar la presencia del DENV en muestras clínicas, lleva obviamente a la interrogante de cuál de ellos resulta mejor al momento de realizar los ensayos de RT-qPCR, sin embargo, bajo las condiciones establecidas en el LSPem y, lógicamente bajo las circunstancias epidemiológicas regionales, la proteína NS5 resultó seleccionada como la región genómica más óptima al momento de realizar la detección universal y el diagnóstico confirmatorio de la infección por el DENV, con una eficiencia de amplificación superior al 90% y una especificidad de ensayo del 100%, seguida de la región 3'UTR.

El ensayo de RT-qPCR con química SYBR Green I[®] empleando la región NS5, logró detectar la presencia de ARN viral en muestras de suero provenientes de pacientes con títulos apreciables de

IgM anti-dengue durante la fase crítica de la enfermedad, es decir, con más de cuatro días de haber iniciado el cuadro febril. Si bien es cierto, en el ámbito de los mecanismos inmunopatogénicos descritos para el dengue, que los anticuerpos IgM neutralizan al virus reduciendo subsecuentemente el proceso de la replicación, en este trabajo se evaluaron muestras de suero en fase aguda de la enfermedad con viremia y respuesta inmune detectable (IgM anti-dengue). Resultados similares fueron descritos por Yong y colaboradores (271). Este hecho pudiera ser explicado por dos razones, en primer lugar los pacientes no indicaron con certeza el día de inicio de los síntomas, o las condiciones locales de hiperendemicidad con la circulación de los cuatro serotipos del DENV y las infecciones secuenciales, inducen una mayor cinética en la producción de anticuerpos IgM con títulos detectados incluso a partir del segundo día de iniciados los síntomas.

Por otro lado, la sensibilidad del ensayo de RT-qPCR con química SYBR Green I[®] empleando la región NS5, fue mayor para DENV2 y DENV4 (0.001 UFP/mL) seguida de DENV1 y DENV3 (0.01 - 0.1 UFP/mL). Estas diferencias pudieran ser resultado del grado de infección (carga viral), presencia de complejos inmunes y tasa de replicación viral (272).

En relación al ensayo de RT-qPCR con tecnología TaqMan[®], diseñado para amplificar la región NS5 y contrastar su sensibilidad con la prueba de RT-qPCR - SYBR Green I[®] al momento de serotipificar al DENV, se observó que aun cuando el ensayo *multiplex* ofrecería la ventaja de determinar en una sola reacción los serotipos virales infectantes, en el presente estudio no fue posible amplificar el genoma de los cuatro virus simultáneamente. Cabe mencionar que esta dificultad ha sido señalada por otros autores (250, 262). En este caso, la amplificación pudiera verse afectada por un fenómeno de competición entre los diferentes serotipos, oligonucleótidos y sondas presentes en la misma muestra o a la pérdida de secuencias nucleotídicas conservadas, un hecho inicialmente descrito por Laue y colaboradores (272). Por su parte, Jhonson y colaboradores, desarrollaron en el año 2005 un ensayo de RT-qPCR - TaqMan[®] en formato *multiplex* para la serotipificación del DENV, sin embargo, a pesar de haber logrado resultados alentadores, las sondas empleadas no reconocieron regiones consenso del genoma viral, lo cual eventualmente dificultó la identificación de los cuatro serotipos a partir de muestras clínicas provenientes de diferentes áreas geográficas (263).

A diferencia de las dificultades encontradas con el ensayo de RT-qPCR - TaqMan[®] en formato *multiplex*, la figura del ensayo *uniplex* empleando la región NS5 como blanco de amplificación, exhibió mayor sensibilidad al momento de serotipificar al DENV en contraste al ensayo SYBR Green I[®] usando la región C-prM.

Finalmente, los resultados de este estudio, sustentan la hipótesis de que la porción distal de la proteína NS5, representa una secuencia conservada y específica capaz de amplificar el genoma viral de cepas de DENV que circulan en América, específicamente en Venezuela como se evidenció al lograr la amplificación de cepas autóctonas del Estado Mérida y cepas provenientes del LARDIDEV, laboratorio de referencia nacional e internacional para el diagnóstico de la infección por el DENV. La recomendación puntual es iniciar el proceso de detección o tamizaje de la infección empleando el ensayo RT-qPCR - SYBR Green I[®]/NS5 y subsecuentemente serotipificar empleando el ensayo RT-qPCR TaqMan[®]/NS5 en formato *uniplex*. Este protocolo representa una excelente opción como herramienta para el diagnóstico precoz de la infección y evaluar consecuentemente la relación entre la carga viral y la severidad de la enfermedad en diferentes áreas endémicas para el dengue.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO 3

SEROTIPOS VIRALES PREVALENTES Y SU EVOLUCIÓN EPIDEMICA E INTER-EPIDÉMICA EN EL ESTADO MERIDA

www.bdigital.ula.ve

3.1 INTRODUCCIÓN

Actualmente, las epidemias por dengue representan uno de los problemas de salud pública más trascendentales en las comunidades urbanas, peri-urbanas y rurales de los países concentrados alrededor de la línea ecuatorial del planeta (51). La distribución mundial de la enfermedad, ha cambiado significativamente en los últimos años, sin embargo, persisten zonas invariablemente afectadas por el DENV consideradas áreas endémicas, que superan las áreas epidémicas, es decir, los espacios en los que se verifica la transmisión de la infección viral de forma eventual y explosiva.

Tradicionalmente, se piensa que dichas epidemias inician cuando una persona infectada por cualquiera de los cuatro serotipos del DENV, ingresa a una comunidad en la que se encuentra una gran proporción de individuos susceptibles, expandiéndose en tiempo y espacio hasta que el nivel de infectados e inmunizados limita su transmisión, con lo que sobreviene una declinación progresiva de la enfermedad, hasta su eventual extinción (273).

Sin embargo, en zonas permanentemente infestadas por mosquitos vectores del dengue, esencialmente *Aedes aegypti*, es factible suponer que las epidemias surjan a partir de reservorios naturales dentro de la propia comunidad, como resultado de cambios bruscos en la dinámica poblacional del ser humano, de los vectores o del virus, independientemente del riesgo de introducción de la infección desde otras localidades (274). De esta manera, es posible afirmar que existen regiones donde el dengue ha adquirido un equilibrio endémico excepcional, caracterizado por una continua propagación de baja intensidad, que podría ser desestimada por los sistemas de vigilancia epidemiológica tradicionales, más aún si se tiene en cuenta que un alto porcentaje de individuos infectados cursan asintomáticos, o su sintomatología es tan leve que no requiere atención médica, una condición que no los exime de participar en los eventos de transmisión de este agente infeccioso (275).

En tales circunstancias, la estimación de la incidencia real del dengue se debe fundamentar en estudios activos probabilísticos, con seguimiento de cohortes, más que en la captación pasiva de casos clínicos que acuden a la consulta, como habitualmente se lleva a cabo en los programas de vigilancia epidemiológica (276). A pesar de la extensa literatura sobre la epidemiología del dengue, son limitados los estudios orientados a la determinación de su incidencia en forma

prospectiva y, en los existentes, no se analizan de forma simultánea las características demográficas o clínicas que permitan la identificación de grupos poblacionales con mayor probabilidad de adquirir la infección y padecer las complicaciones clínicas propias de la enfermedad, motivo por el cual los factores de riesgo conocidos hasta la fecha, como la edad, la raza, la existencia de patologías previas así como el nivel socioeconómico, se han basado en encuestas pasivas y retrospectivas (276-278).

Por otro lado, en las zonas endémicas es imprescindible definir qué tan confiable es la sintomatología sugestiva de dengue expresada en los criterios clínicos de la clasificación propuesta por el Programa de Adiestramiento e Investigación en Enfermedades Transmisibles (TDR del inglés *Programme for Research and Training in Tropical Diseases*) de la OMS, cuando no hay evidencias de epidemia manifiesta, con el fin de validar estrategias de vigilancia epidemiológica para lo cual es necesario llevar a cabo estudios serológicos y moleculares permanentes de los casos sospechosos señalados por la comunidad, y no simplemente de los casos captados por los servicios médicos (276, 279).

Al respecto, durante tres décadas la OMS estimó que el dengue se manifestaba a través de tres síndromes definidos como: dengue clásico, DHF y SSD. Esta clasificación fue desestimada por varios autores al no incluir a pacientes con formas graves de la enfermedad, tales como la afectación particular del sistema nervioso central, cardíaco o hepático. Tampoco parecía conveniente para regir la atención clínica de los enfermos. Por ello, la OMS a través de su alianza con el TDR, auspició un estudio internacional llamado Dengue Control (DENCO) que tuvo como resultado la propuesta de una clasificación binaria de la enfermedad: dengue y DS (280). Los criterios de dengue severo fueron: a) extravasación de plasma expresada en *shock* hipovolémico, b) hemorragias profusas según criterio del médico tratante, y c) la afectación de órganos. El estudio DENCO también permitió identificar signos y síntomas presentes en los enfermos un día antes de complicarse el cuadro clínico. Estos signos de alarma permiten identificar pacientes que con convicción evolucionarán a DS así como iniciar de manera precoz el tratamiento que garantice la estabilidad hemodinámica del enfermo. Esta nueva clasificación tiene un riguroso soporte científico y coincide, a grandes rasgos, con los criterios de los clínicos expertos en dengue, pero necesita ser validada en la práctica en situaciones de endemidad y

durante epidemias de la enfermedad, tanto en hospitales como en unidades de atención primaria de salud (281).

En Venezuela la tasa de infección por el DENV ha aumentado en los últimos 13 años, manteniendo cifras constantes desde el año 2002, ocupando los primeros lugares en América Latina. Para el año 2010, el estado Mérida, una región caracterizada por exhibir altos índices aélicos, ocupó el segundo lugar de endemidad en el país, dentro de un escenario de emergencia epidemiológica definida por un acumulado anual de 124.931 casos de dengue, la cifra más alta de la enfermedad registrada en los últimos 20 años. Esta situación recrudeció pues tres años después, Mérida, una entidad en la cual nunca se habían documentado con certeza los serotipos virales circulantes, ocupó el primer lugar del país con mayor número de individuos afectados por esta patología infecciosa.

En este sentido, al ser el dengue una enfermedad reemergente de creciente importancia para la salud global, el conocimiento de patrones espaciales de la infección, es esencial para comprender la dinámica de transmisión y orientar estrategias eficaces de control. Además de la eliminación total del mosquito transmisor, hoy prácticamente improbable, se cree que una buena alternativa para mejorar este problema es la integración de programas gubernamentales articulados entre las autoridades sanitarias y las comunidades afectadas. Este enlace es viable y representa la optimización de recursos al evitar la duplicación de acciones y permitir mayor participación de la población en la prevención de la enfermedad.

Por esta razón, con el propósito de contribuir al fortalecimiento de estrategias de vigilancia epidemiológica frente a la infección por el DENV, se planteó en primera instancia contrastar la clasificación del dengue propuesta por el TDR/OMS/2009 respecto a la categorización de la enfermedad empleada anteriormente por la OMS/2007, para luego determinar el desplazamiento de los cuatro serotipos virales en el estado Mérida por Municipios durante el periodo 2006 - 2010, tiempo en el cual se registraron las dos epidemias más importantes de dengue en todo el territorio nacional. Una vez recaudada y procesada la información, proponer la incorporación de esta práctica al Sistema Regional de Vigilancia Epidemiológica para el seguimiento y control del dengue en el estado.

3.2 MATERIALES Y METODOS:

3.2.1 Universo de trabajo:

El Estado Mérida conformado por 6 regiones político-administrativas, 23 municipios y 86 parroquias dentro de una área geográfica de 11,300 km², se ubica en la parte central de la Cordillera Andina Venezolana, en una amplia terraza entre la Sierra Nevada por el sur-este y la Sierra La Culata por el norte-oeste. La vegetación en el interior de la ciudad está integrada por árboles de copa media a alta y helechos (*Pteridophyte*), ubicados principalmente en torno a la cuenca del río Albarregas. En la periferia de Mérida, se divisan zonas no urbanizadas, donde predominan formas de vegetación características de sub-montaña y selva estacional.

Por otro lado, se extienden por el sur vastos bosques de coníferas. Hacia el norte y el este, se localiza a su vez la *Selva nublada*. Posee un clima subtropical con temperaturas moderadas debido a la situación geográfica y su gran altitud. En las zonas y montañas circundantes, por encima de los 1.800 metros de altura el clima es templado de montaña. Aunque la polución ha generado un aumento en la temperatura, ésta se ha mantenido más baja (en términos relativos) que en las otras ciudades importantes del país, con registros que oscilan entre los 13°C y los 24°C, determinando un promedio general de 18°C. Las precipitaciones son de intensidad media durante las épocas de lluvia, desde el mes de abril hasta el mes de noviembre. La temperatura de la ciudad varía de norte a sur según la altitud. El norte de la ciudad se encuentra más alto, a unos 1.700 metros sobre el nivel del mar manteniendo una temperatura promedio de 4°C. El sur posee un clima más cálido por encontrarse a unos 1.300 metros sobre el nivel del mar, teniendo una temperatura promedio de 21°C.

Venezuela se sitúa en una zona intertropical, por lo que la amplitud térmica intra-anual, tomando valores en el curso de un mismo año, es poco significativa. Esta situación también es atribuible a Mérida que, durante el mes de agosto, suele registrar temperaturas comparables a las que pueden medirse, bajo condiciones análogas, a pleno día en el mes de enero.

3.2.2 Muestras clínicas

Para el desarrollo de este objetivo, se analizó de forma descriptiva, una cohorte de 187 pacientes

con diagnóstico clínico y confirmatorio de dengue por ensayos moleculares y serológicos, valorados y tratados en diferentes centros asistenciales del Estado Mérida en un período de cinco años (2006 - 2010) con edades comprendidas entre los seis meses y 84 años de edad. Los datos de identificación personal, socio-demográficos, paraclínicos y clínicos referidos por el médico tratante, fueron recolectados en un formato diseñado *ad hoc* por LSPEM, aprobado por el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR), ente rector del Sistema Nacional para la Prevención, Vigilancia y control de la salud en Venezuela.

Al momento de la consulta médica, se colectaron 5 mL y 3 mL de sangre venosa periférica en tubos vacuotainer estériles sin anticoagulante; a los pacientes adultos y pediátricos respectivamente. Una vez identificadas las muestras, fueron trasladadas al LSPEM a 4°C y el suero separado en alícuotas para realizar el aislamiento inmediato del ARN viral para la detección y serotipificación del DENV por RT-qPCR así como los ensayos serológicos respectivos correspondiente a la determinación de IgM anti-dengue por ELISA.

3.2.3 Criterios de exclusión

Fueron excluidos los pacientes que por valoración física, interrogatorio y/o exámenes de laboratorio manifestaron la presencia de enfermedades infecciosas concomitantes, patologías de origen inmune, oncológicas, metabólicas, neurológicas, mentales o trastornos psicológicos, mujeres en estado de gestación así como los pacientes o representantes legales en el caso de los menores de edad, que por diferentes motivos no autorizaron su participación en el estudio.

3.2.4 Normas bioéticas

Previo a la toma de muestras, se le comunicó al grupo de pacientes o sus representantes legales la naturaleza e importancia del estudio, con el propósito de obtener su autorización a través de un consentimiento informado evaluado y avalado por la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, con lo cual quedara certificación de su participación en el proyecto. El consentimiento escrito y firmado por los participantes en el estudio, autorizó además de la toma de muestras, la utilización de la información médica confidencial con fines estadísticos. El estudio se desarrolló siguiendo los principios establecidos por la Declaración de Helsinki para investigaciones médicas en seres humanos (255).

3.2.5 Análisis estadístico

Se utilizó el programa EPI Info 2012, versión 7.0 (CDC, Atlanta, USA) para el análisis estadístico descriptivo de los resultados, basado en la distribución de frecuencia de las variables estudiadas y porcentajes absolutos.

www.bdigital.ula.ve

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análisis comparativo de la clasificación clínica del dengue y serotipos circulantes

Para fines de este estudio, se conservó la clasificación clínica de la infección sintomática por el DENV propuesta por la OMS/2007, pues esta categorización estaba vigente al momento de la recolección de datos y procesamiento de las muestras. Sin embargo, para realizar un análisis comparativo de la evolución temporal de los cuatro serotipos del DENV en los tres períodos previstos: 2006-2007, 2008-2009 y 2010, se distribuyó nuevamente el total de pacientes de acuerdo a la clasificación sugerida por el TDR/OMS/2009.

La distribución de los pacientes de acuerdo al grupo etario y evolución temporal de la enfermedad, se observa en las Figuras 11, 12 y 13. Al respecto, se advirtió predominio de los grupos menores de 15 años de edad en los períodos 2006-2007, 2008-2009 para luego predominar el grupo de jóvenes adultos en el período 2010.

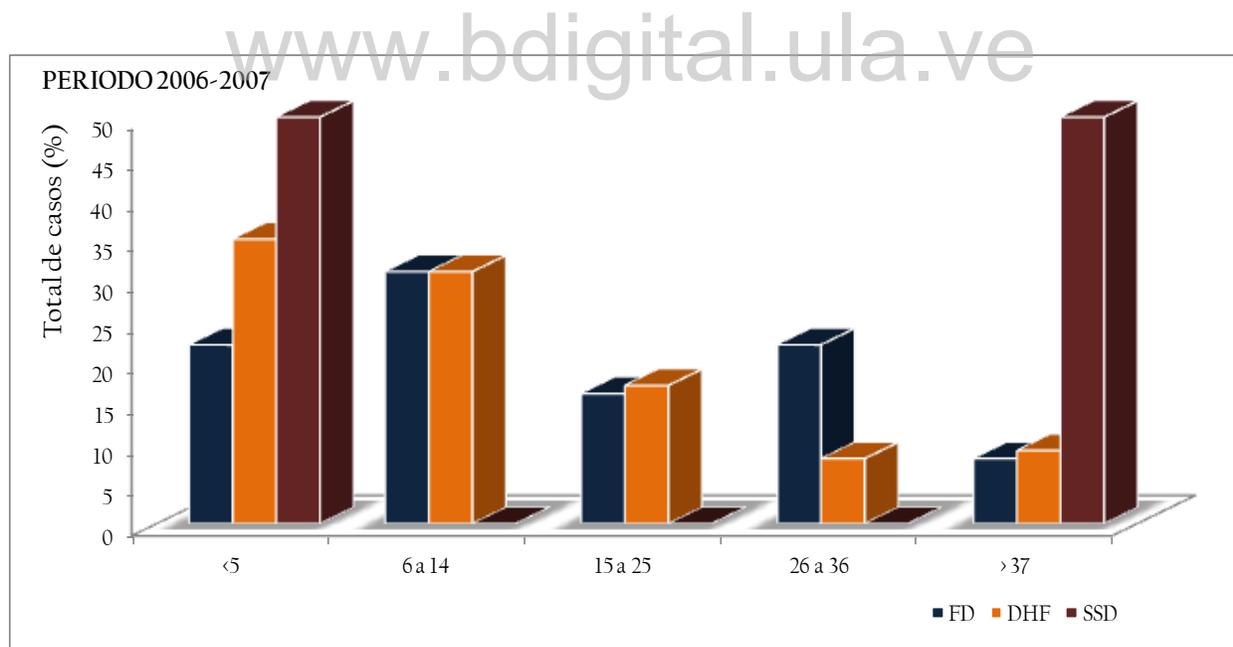


Figura 11. Distribución de los casos de dengue según el cuadro clínico establecido por la OMS/2007 y grupos etarios para el período 2006-2007.

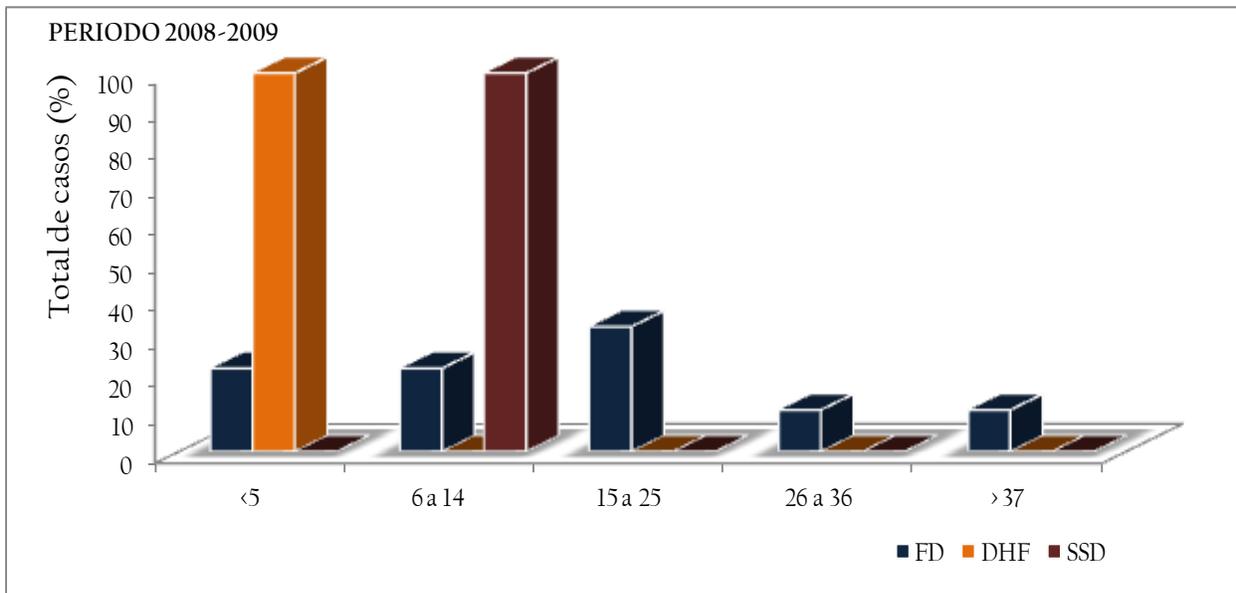


Figura 12. Distribución de los casos de dengue según el cuadro clínico establecido por la OMS/2007 y grupos etarios para el período 2008-2009.

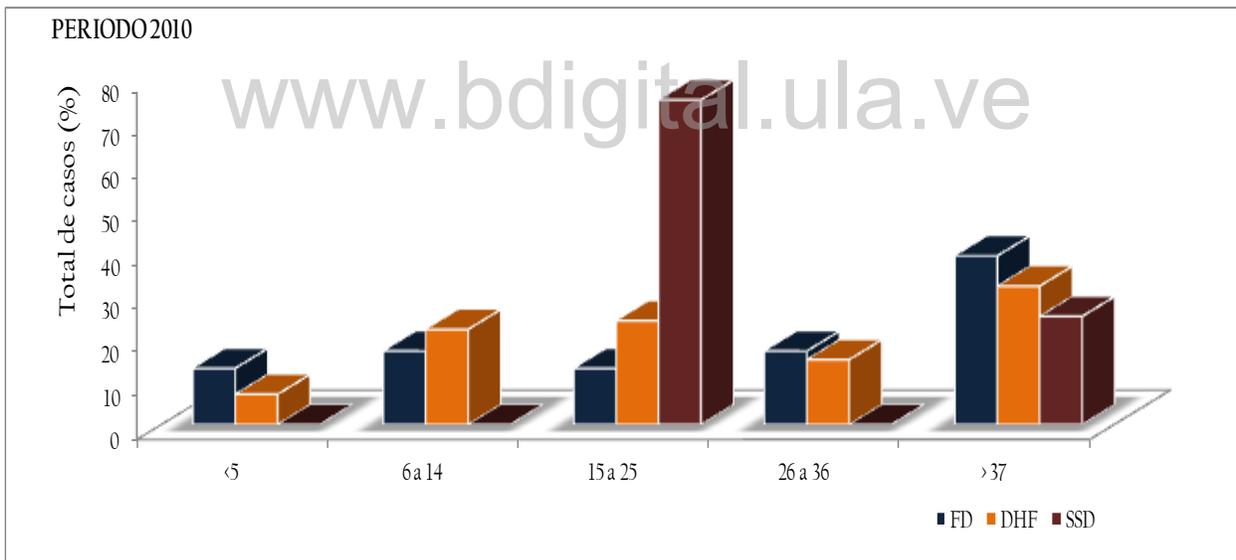


Figura 13. Distribución de los casos de dengue según el cuadro clínico establecido por la OMS/2007 y grupos etarios para el período 2010.

Por su parte, el análisis comparativo de la clasificación del cuadro clínico de acuerdo a los criterios de OMS/2007, versus las pautas de la nueva tipificación del TDR/OMS/2009 en los periodos anuales del 2006-2007, 2008-2009 y 2010, se observan en la Figura 14.

Para el periodo 2006-2007, la proporción de casos identificados como de FD, DHF y SSD abarcaron un 50%, 48% y 2% respectivamente. Al evaluar los parámetros clínicos y de laboratorio según los criterios del TDR/OMS/2009, estas cifras varían confiriendo el mayor porcentaje de casos al grupo identificado como DCSA (84%) seguido por los grupos de DSSA y DS (16%). Con respecto al periodo 2008-2009, los pacientes con FD representaron un 79% de los casos evaluados seguido del grupo de pacientes con DHF (21%) sin identificar casos de SSD, no obstante, al aplicar los criterios clínicos establecidos por el TDR/OMS/2009, estas proporciones se reducen a 74% para el grupo descrito como DCSA y 24% para los pacientes con DSSA, registrando 2% de pacientes con DS. Finalmente, para el periodo 2010, los pacientes con FD alcanzaron un 44% del total de individuos evaluados, seguido por los pacientes con DHF y SSD (52% y 4% respectivamente), sin embargo considerando los criterios del TDR/OMS/2009, esta proporción aumenta con respecto al grupo de pacientes con DCSA (64%), disminuye para los pacientes con DSSA (32%) y se mantiene para los pacientes con las formas clínicas complicadas de la enfermedad o DS (4%).

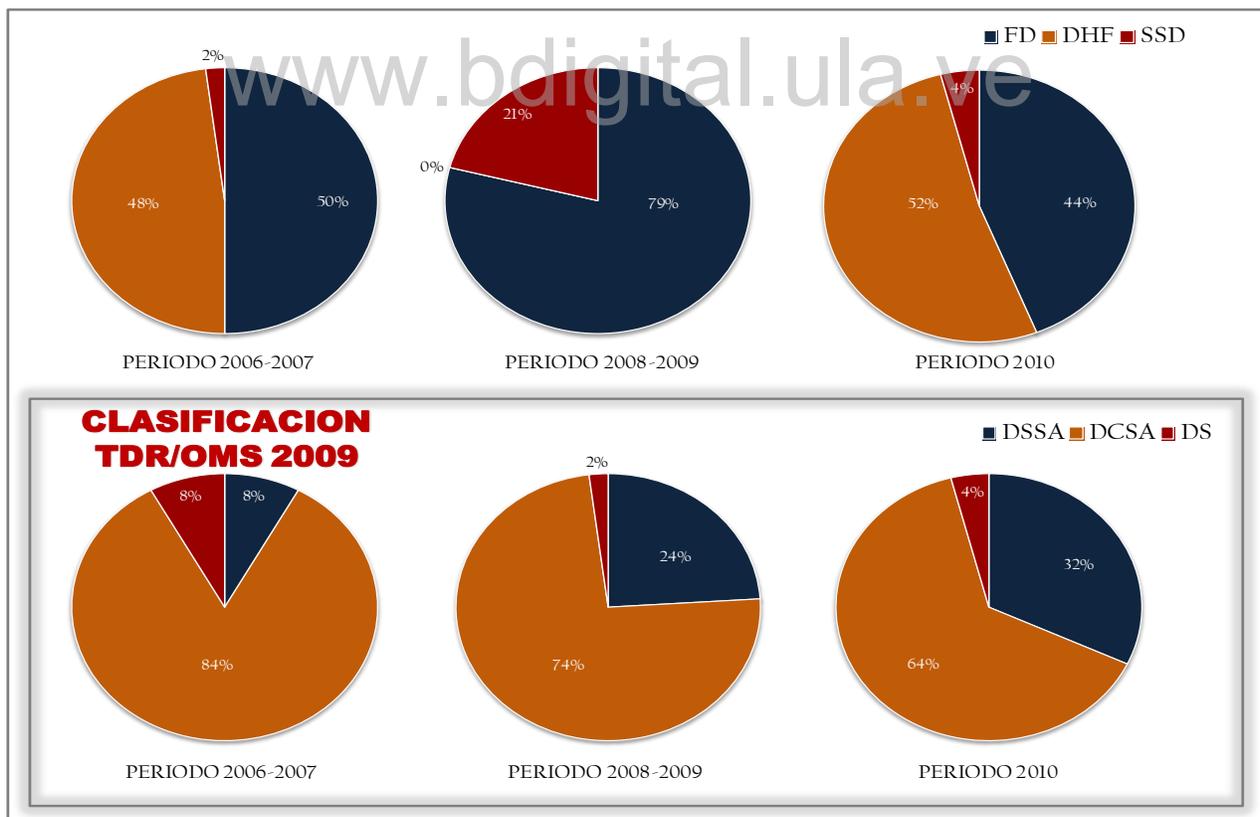


Figura 14. Comparación de los casos de acuerdo a la clasificación clínica del dengue según los criterios OMS/2007 y TDR/OMS 2009.

La distribución temporal del DENV, reveló la presencia y circulación de los cuatro serotipos en el período comprendido entre los años 2006-2007 y 2010 (Figuras 15 y 17). Es importante resaltar que en ambos intervalos de tiempo, el comportamiento epidemiológico de la infección fue descrito como "brotes epidémicos", con predominio de DENV2 en el primero de ellos y DENV2/DENV4 en el segundo. En el período 2008-2009 (Figura 16) hubo una disminución elocuente del número de casos, y por tanto, el total de pacientes captados durante la fase aguda de la enfermedad se redujo considerablemente.

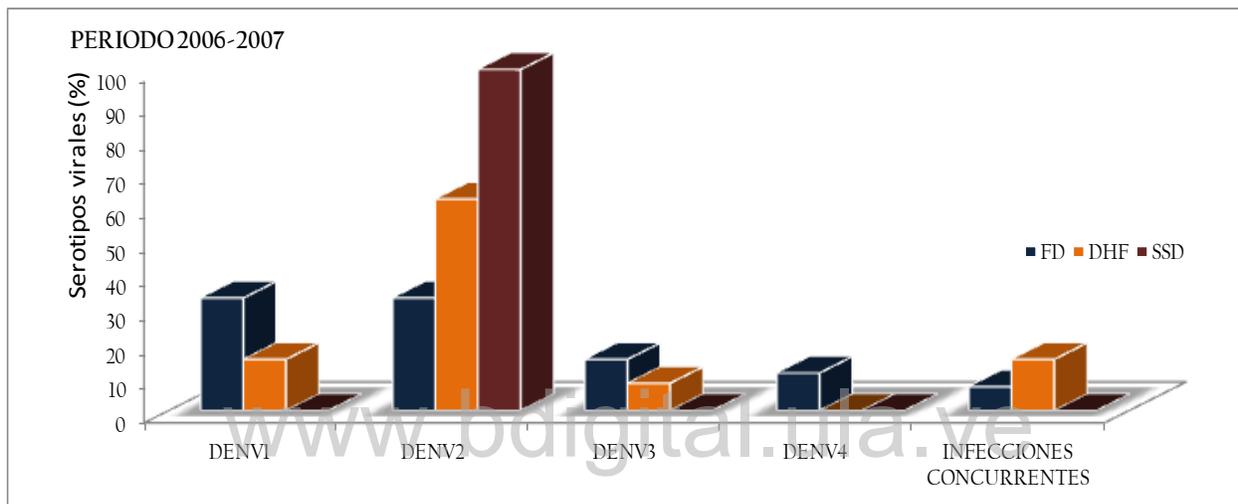


Figura 15. Distribución de los serotipos del DENV en el período 2006-2007. Infecciones concurrentes en FD: DENV1/DENV2, DENV1/DENV4; DHF: DENV1/DENV2, DENV2/DENV3, DENV2/DENV4.

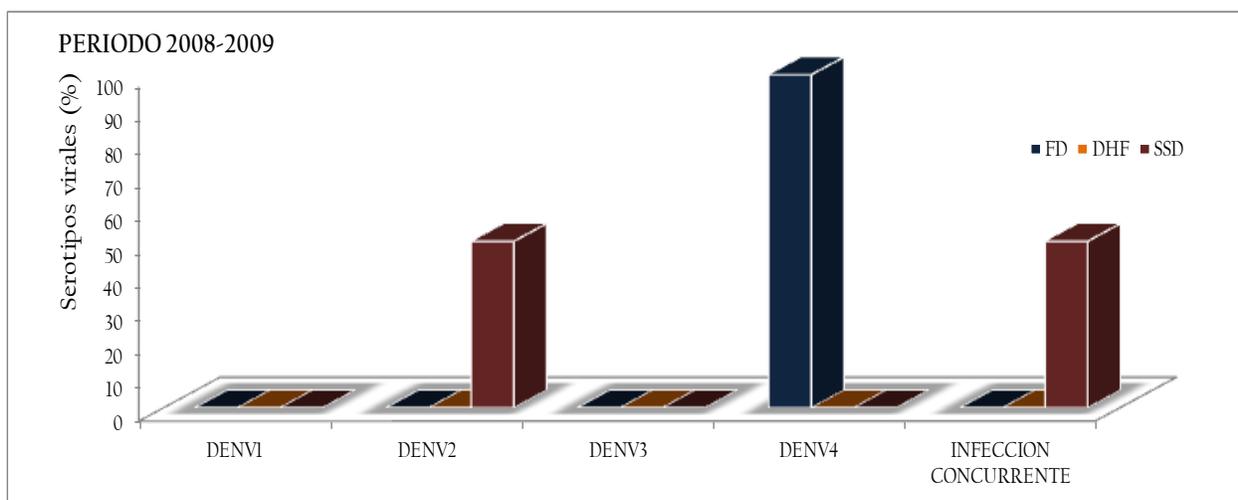


Figura 16. Distribución de los serotipos del DENV en el período 2008-2009. Infección concurrente en SSD: DENV2/DENV4.

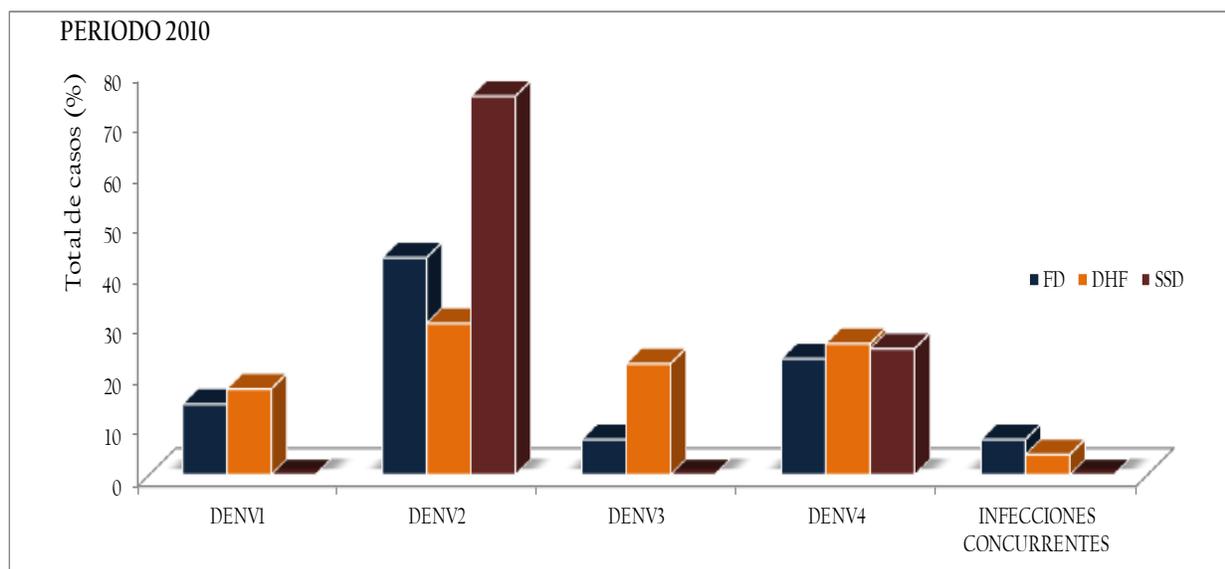


Figura 17. Distribución temporal de los serotipos del DENV en el período 2010. FD: fiebre dengue; DHF: dengue hemorrágico febril; SSD: síndrome de *shock* por dengue. Infección concurrente: FD: DENV2/DENV4; DHF: DENV1/DENV4.

www.bdigital.ula.ve

El porcentaje de mortalidad en los pacientes diagnosticados con SSD a lo largo de los tres periodos se presenta en la Figura 18. Del total de pacientes incluidos en esta etapa del estudio, 2.6% (5/187) fallecieron como consecuencia de las complicaciones clínicas distintivas de la enfermedad.

Si observamos el lapso 2006-2007, encontramos dos defunciones representando un 1.9% (2/103) del total de pacientes incorporados al estudio durante ese año, distinguiendo a DENV2 como serotipo responsable de la infección en ambos casos. Con respecto al periodo 2008-2009, se reconocieron igualmente dos defunciones constituyendo el 16.6% (2/12) del total de pacientes admitidos durante este intervalo de tiempo, encontrando como serotipos responsables del cuadro clínico a DENV2 y una asociación entre DENV2/DENV4. Finalmente, en el periodo 2010, se registró un fallecimiento totalizando un 1.3% (1/72) del universo de pacientes evaluados durante ese año. En este último periodo de tiempo se identificó como serotipo responsable de la infección y eventual deceso a DENV2.

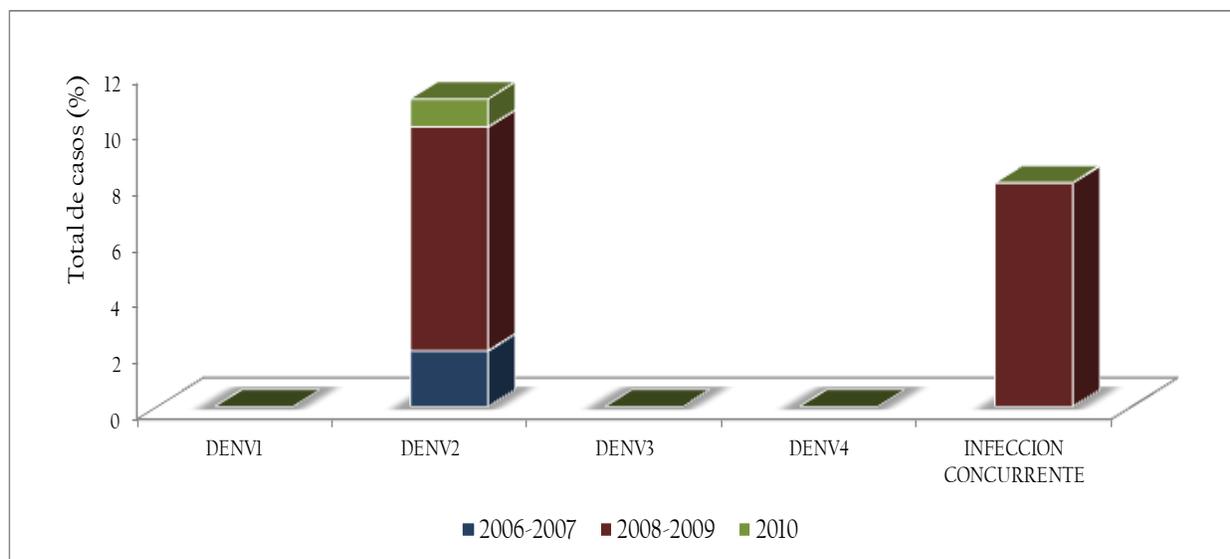


Figura 18. Distribución de los serotipos del DENV identificados en los casos de pacientes fallecidos según el periodo de estudio. Infección concurrente en el Periodo 2008-2009: DENV2/DENV4.

3.3.2 Distribución geo-espacial de los serotipos del DENV en el Estado Mérida

La distribución temporal de los serotipos del DENV y entidades clínicas de acuerdo al municipio de procedencia se puede observar en la Tabla 9, Figuras 19, 20 y 21. El Municipio Libertador fue la entidad con el mayor número de muestras representado el 50.2% (94/187) de los casos de dengue independientemente del cuadro clínico, seguido de los Municipios Campo Elías, Alberto Adriani y Sucre (16.5.3%, 10.1% y 7.4% respectivamente).

Para el periodo 2006-2007, el municipio con mayor proporción de casos de FD fue el Municipio Libertador con 61.2% (30/49), seguido por el Municipio Campo Elías 16.3% (8/49), Municipio Alberto Adriani con 10.2% (5/49), Municipio Sucre con 6.1% (3/49) y los Municipios Antonio Pinto Salinas, Justo Briceño y Tovar con 2% (1/49). Con respecto a los casos de DHF, el municipio con mayor número de casos fue nuevamente el Municipio Libertador con 26.9% (14/52), seguido por los Municipios Alberto Adriani con 25% (13/52), Campo Elías con 17.3% (9/52), Tulio Febres Cordero con 9.6% (5/52), Obispo Ramos de Lora y Sucre con 5.7% (3/52), Tovar con 3.8% (2/52) y Arzobispo Chacón, Caracciolo Parra y Pinto Salinas con 1.9% (1/52). En relación a los casos de SSD, el Municipio Libertador y Antonio Pinto Salinas mostraron la misma proporción con 50% (1/2) cada uno. Para este periodo el serotipo más frecuente en el total

de Municipios fue DENV2, seguido de DENV1, DENV3 y DENV4. En relación a las infecciones concurrentes las más frecuentes fueron DENV1/DENV2.

Para el periodo 2008-2009, el municipio con mayor proporción de casos de FD fue el Municipio Libertador con 77.7% (7/9), seguido por el Municipio Caracciolo Parra y Tovar ambos con 11.1% (1/9). Con respecto a los casos de DHF, se registró una proporción significativamente menor en contraste con el periodo 2006-2007 registrando solo un caso con un valor porcentual de 100 (1/1). Por su parte los casos de SSD presentaron una proporción similar de 50% (1/2) en los Municipios Alberto Adriani y Campo Elías. En este intervalo de tiempo, el serotipo predominante en el total de municipios fue DENV4 seguido de DENV2, DENV1 y como infección concurrente DENV2/DENV4.

Por último, para el periodo 2010, el municipio que registró el número más elevado de de casos de FD fue el Municipio Libertador con 56.5% (13/23), seguido por los Municipios Campo Elías y Sucre con 17.3% (4/23) y los Municipios Santos Marquina y Tovar con 4.3% (1/23). En relación a los casos de DHF el Municipio que ocupó el primer lugar fue nuevamente el Municipio Libertador con 60.8% (28/46) seguido por el Municipio Campo Elías con 19.5% (9/46), Sucre con 8.6% (4/46), los Municipios Tovar y Zea con 4.3% (2/46) y el Municipio Pinto Salinas con 2.17% (1/46). En último lugar, en relación a los casos de SSD, el Municipio Libertador ocupó la totalidad de eventos con 100% (3/3). Finalmente, en este periodo el serotipo sobresaliente en el contexto del total de municipios fue DENV2, seguido de DENV4, DENV3 y DENV1 y como infecciones concurrentes DENV1/DENV4 y DENV2/DENV4.

Tabla 9. Distribución temporal de los serotipos del DENV por Municipios del Estado Mérida - Venezuela.

MUNICIPIOS	PERIODO 2006-2007					PERIODO 2008-2009					PERIODO 2010				
	DENV1 n (%)	DENV2 n (%)	DENV3 n (%)	DENV4 n (%)	*IC n (%)	DENV1 n (%)	DENV2 n (%)	DENV3 n (%)	DENV4 n (%)	*IC n (%)	DENV1 n (%)	DENV2 n (%)	DENV3 n (%)	DENV4 n (%)	*IC n (%)
Alberto Adriani	-	8 (80)	1 (10)	-	1 (10)	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-
Arzobispo Chacón	1 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Campo Elías	4 (40)	3 (30)	-	-	3 (30)	-	-	-	-	1 (100)	3 (33.3)	2 (33.3)	2 (33.3)	-	-
Caracciolo Parra	-	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Justo Briceño	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Libertador	8 (30.7)	9 (34.6)	4 (15.3)	4 (15.3)	1 (3.8)	1 (33.3)	-	-	2 (66.6)	-	2 (12.5)	9 (37.5)	4 (16.6)	7 (29.1)	1 (4.1)
Pinto Salinas	-	3 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Obispo Ramos de Lora	-	1 (50)	-	-	1 (50)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Santos Marquina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (100)	-
Sucre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (16.6)	2 (33.3)	-	2 (33.3)	1 (16.6)
Tovar	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (100)	-	-	1 (50)	-	1 (50)	-
Tulio Febres	-	2 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*IC: Infecciones concurrentes

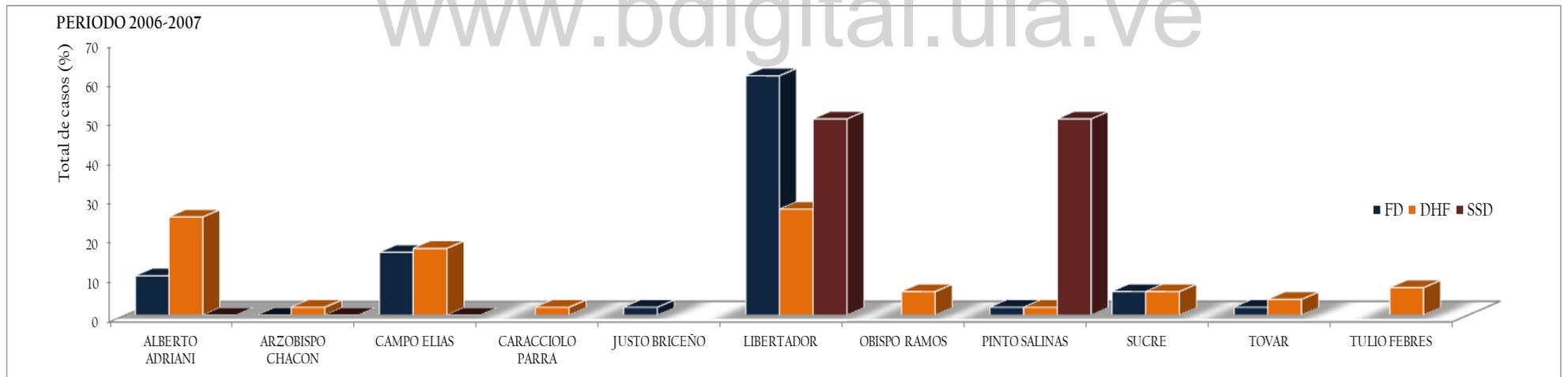


Figura 19. Distribución de los casos confirmados de dengue según entidad clínica y Municipios del Estado Mérida durante el periodo 2006-2007. FD: fiebre dengue; DHF: dengue hemorrágico febril; SSD: síndrome de *shock* por dengue.

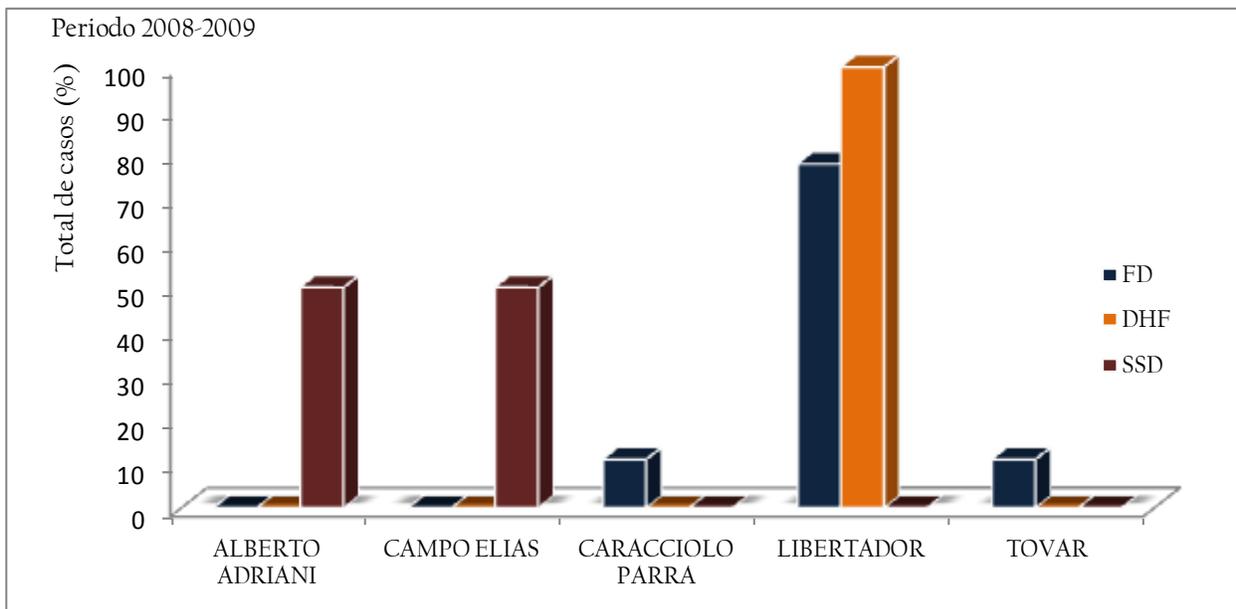


Figura 20. Distribución de los casos confirmados de dengue según entidad clínica y Municipios del Estado Mérida durante el periodo 2008-2009. FD: fiebre dengue; DHF: dengue hemorrágico febril; SSD: síndrome de *shock* por dengue.

www.bdigital.ula.ve

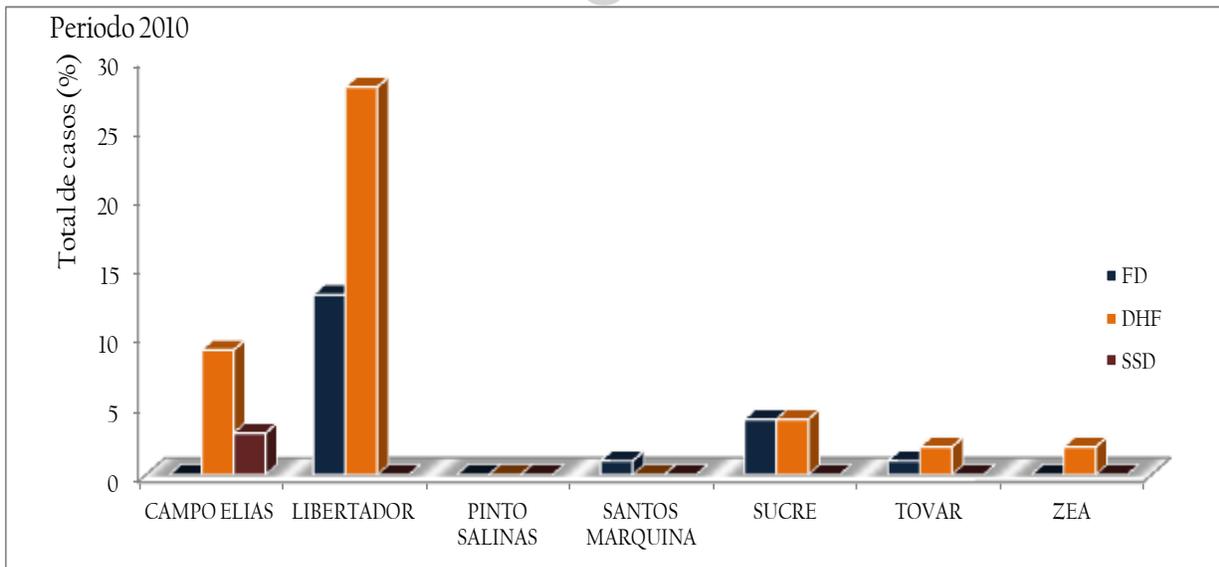


Figura 21. Distribución de los casos confirmados de dengue según entidad clínica y Municipios del Estado Mérida durante el periodo 2010. FD: fiebre dengue; DHF: dengue hemorrágico febril; SSD: síndrome de *shock* por dengue.

El porcentaje de pacientes fallecidos por complicaciones clínicas del dengue en los tres periodos de estudio, distribuidos por municipios en el Estado Mérida se presenta en la Figura 22. Si observamos el lapso 2006-2007, encontramos dos defunciones, una en el Municipio Libertador representando el 2.2% (1/45) del total de pacientes provenientes de la localidad y otra en el Municipio Pinto Salinas con el 33.3% (1/3) del grupo de pacientes residentes de esta jurisdicción.

Con respecto al periodo 2008-2009, dos pacientes provenientes de los Municipio Alberto Adriani y Campo Elias fallecieron por SSD, por lo que ocuparon el 100% (1/1) de los decesos en las respectivas localidades. Finalmente, en el periodo 2010, se registraron tres decesos solo en el Municipio Libertador representando el 6.8% (3/44) del conglomerado de pacientes provenientes de esta zona del Estado Mérida.

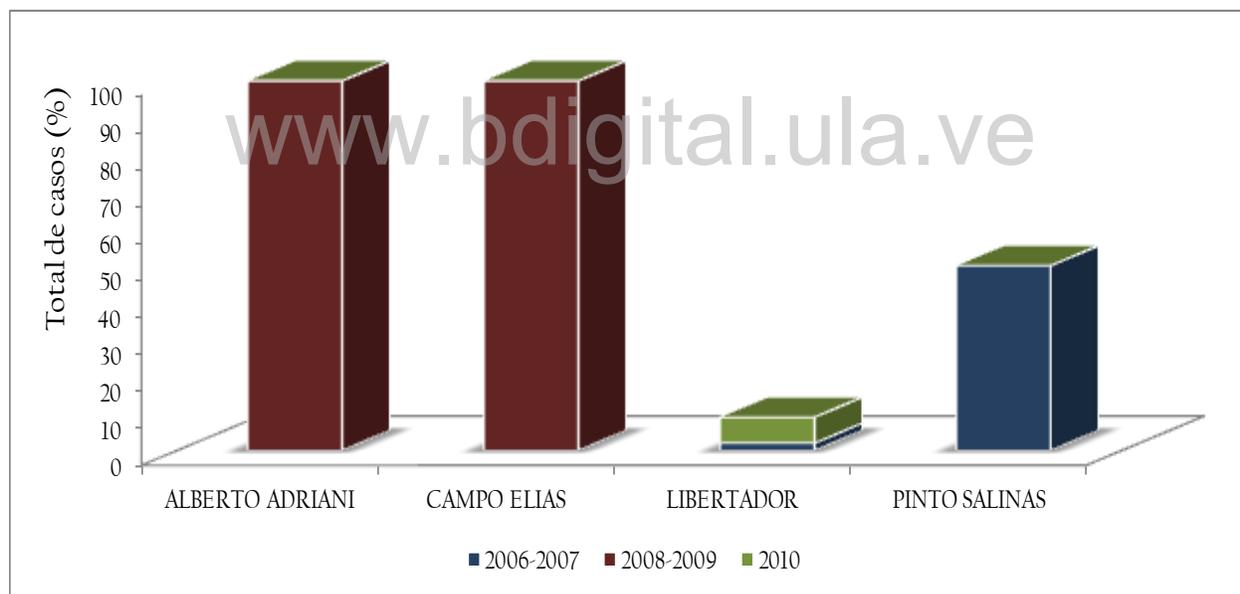


Figura 22. Distribución del porcentaje de pacientes fallecidos por municipios del Estado en los periodos 2006-2007, 2008-2009 y 2010.

3.4 DISCUSIÓN

El dengue como infección viral transmitida por el mosquito *Aedes aegypti* es capaz de afectar a la población originando una enfermedad de curso autolimitado y temporalmente incapacitante. En el año 2007 la OMS clasificó los casos clínicos de esta entidad patológica como: FD, DHF y SSD, siendo estas últimas las formas graves de la enfermedad. Sin embargo, en el año 2009 expertos en dengue adscritos al grupo del TDR/OMS, establecieron una nueva clasificación con el propósito de garantizar el manejo integral del paciente mediante algoritmos clínico-terapéuticos con el apoyo del laboratorio no solo en la confirmación de la infección sino también en el seguimiento y evaluación pronóstica de la enfermedad.

En la nueva clasificación del dengue, el diagnóstico está íntimamente relacionado con el manejo terapéutico no porque se trate de una infección primaria o secundaria, sino porque valora la evolución del paciente de forma exhaustiva. Esta clasificación presenta una categorización binaria de la enfermedad: dengue y DS, subdividiendo la primera de ellas en DSSA y DCSA. Desde el punto de vista clínico, se identifica como DSSA, a los casos que cursen con fiebre y dos o más síntomas, como: náuseas y vómitos, erupción cutánea, dolores articulares, prueba del torniquete positiva y leucopenia. Entre los signos de alarma más importantes destacan: dolor abdominal y vómitos persistentes, edema, letargo, agitación, hepatomegalia visible y palpable en más de dos centímetros así como el aumento del hematocrito y trombocitopenia característica tras dos valoraciones consecutivas de laboratorio.

En este estudio, contrastando ambas clasificaciones, la consideración de algunos signos y síntomas como elementos de alarma, logró incluir a pacientes inicialmente identificados como FD ó dengue clásico dentro del grupo de DCSA. Una ligera discrepancia observada durante el periodo 2008-2009 entre los grupos de pacientes con SSD y DCSA, podría ser consecuencia de clasificar los casos clínicos solo en base a las pruebas de laboratorio, una de las objeciones más importantes realizadas a la clasificación del dengue propuesta por la OMS hace aproximadamente una década. El valor clínico de la clasificación actual del dengue, indudablemente abre el universo de pacientes con riesgo a desarrollar cuadros complicados de la enfermedad, un hecho que orienta a tomar las decisiones terapéuticas más acertadas.

En relación a la dinámica de circulación del DENV, los resultados obtenidos en los tres periodos de investigación, confirman el movimiento de los cuatro serotipos en el Estado Mérida. Su distribución por municipios permitió reconocer las áreas geográficas en las que era posible identificar casos complicados de la enfermedad al confirmar en ellos la presencia simultánea de dos o más serotipos. El Municipio Libertador tiene el mayor índice poblacional con respecto a otros municipios del Estado. Por su particularidad, presenta un alto grado de migración de individuos provenientes de otras localidades de la Entidad Federal incluso nacional. De hecho, este es un importante factor de riesgo para la transmisión del virus.

Las referencias describen al dengue como una enfermedad epidémica asociada a factores climatológicos como: temperatura, precipitación pluvial abundante y una altitud sobre el nivel del mar menor a los 1.200 metros. Estos elementos deben considerarse para definir las zonas de mayor riesgo de infección tanto en el Estado como el resto del país principalmente durante la época de lluvias. Hoy tras el calentamiento global, se registra un importante aumento tanto de la temperatura como de precipitaciones; con ello se ha extendido el hábitat de *Aedes aegypti* lo que unido a factores sociales como crecimiento poblacional y urbanización desorganizada representan condiciones favorables para un incremento significativo del número de casos de dengue. La altura en la que el mosquito tradicionalmente se desarrolla es de 100 metros sobre el nivel del mar pero actualmente, las epidemias de dengue pueden desarrollarse a los 1.600 o incluso 2.800 metros sobre el nivel del mar. Muchos vectores han hecho presencia en regiones antes frías que hoy se encuentran en condiciones climáticas adecuadas para su desarrollo; ya no afecta sólo a las áreas urbanas tropicales del mundo, sino también a las regiones altas y templadas.

La dispersión geográfica del DENV en el Estado Mérida, indica que los factores de riesgo sean del virus, del huésped o del vector, se encuentran en 57% del territorio, ya que se han identificado casos de dengue en 13 municipios de la entidad federal. El dengue ha tomado espacios considerados como inadecuados para su desarrollo. La limitación del vector para adaptarse a regiones sobre los 1.200 metros sobre el nivel del mar, ha sido superada así como su presencia en zonas exclusivamente urbanas.

En lo que respecta al dengue, la perspectiva para el futuro sugiere que son más las condiciones imperantes respecto del incremento en la transmisión del virus que las que contribuyen a su descenso, a menos que se adopten estrategias de prevención que se sostengan más allá de lo coyuntural. En relación a los factores de riesgo para la transmisión del dengue, hay evidencias de la amplia distribución del vector, la circulación de los diferentes serotipos en vastas zonas del Estado Mérida y una amplia población asentada en áreas urbanas con insuficientes servicios públicos.

La aparición de epidemias de dengue en el Estado Mérida, así como la mortalidad asociada a la infección, ha hecho de la enfermedad una entidad patológica con estatus de emergencia sanitaria de primer orden. Por ello, en lo inmediato los desafíos giran en torno a la acción mancomunada y anticipada de la vigilancia y control epidemiológico. Es imperativo unir esfuerzos para la identificación de casos sospechosos y el reconocimiento oportuno de los serotipos circulantes. Por ello, la comunicación y notificación inmediata de esta información debe conducir a la instrumentación de acciones de control que sólo tendrán resultado positivo si se realizan antes de que ocurra la transmisión.

El apoyo para consolidar el diagnóstico a nivel local, figura como una prioridad indispensable para mejorar la vigilancia epidemiológica. El uso eficiente de los recursos financieros y humanos demanda que se orienten hacia la prevención para contener la transmisión de dengue en el país, ya que las experiencias en el control emergente de una epidemia han demostrado ser más costosas y de efecto transitorio.

El panorama epidemiológico proporciona una oportunidad para fortalecer los servicios de atención por medio de la capacitación intensiva en el diagnóstico y manejo adecuado de los casos, en especial los más severos, atendiendo los criterios establecidos por el estudio DENCO del TDR/OMS. Asimismo, es necesario articular una red de laboratorios estatales que responda con celeridad a las demandas del diagnóstico clínico y permita identificar los serotipos circulantes, incrementar el esfuerzo para la búsqueda intencionada de casos sustentada en la realidad entomológica, promover la participación de la comunidad como un elemento medular en la estrategia de control, y finalmente, fortalecer a los municipios más vulnerables a través de campañas de limpieza y dotación de servicios públicos.

CAPITULO 4

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR Y ANALISIS FILOGENETICO DE CEPAS DEL DENV PROVENIENTES DEL ESTADO MERIDA Y OTRAS REGIONES DE VENEZUELA

www.bdigital.ula.ve

4.1 INTRODUCCIÓN

La variabilidad genética juega un papel fundamental en los procesos evolutivos, y su origen radica en los eventos de mutación y recombinación a través de los cuales se generan nuevas variantes genéticas o combinaciones de ellas contrastando diversidad genotípica a las futuras generaciones. La evolución es por tanto un evento ineludible en poblaciones de entidades que se replican y exhiben variaciones heredables en su genotipo. En este sentido, el DENV que se replica de manera autónoma exteriorizando profundos matices de variación genotípica, está subordinado a las leyes de la evolución (212).

Uno de los factores determinantes de la patogénesis del dengue, es el grado de virulencia de los serotipos implicados en la infección (282). Es evidente que la enfermedad ha sufrido cambios en relación a su expresión clínica, hecho evidenciado en la década del año 1980 con la emergencia de las formas hemorrágicas severas de la enfermedad, convirtiéndose desde entonces en un grave problema de salud pública (85). Por ello, los esfuerzos para limitar la expansión del dengue dependen no solo del conocimiento que exista sobre su dinámica de transmisión, sino también de la comprensión de la virulencia de las cepas del DENV que se encuentran circulando.

Debido a la ausencia de modelos *in vivo* o *in vitro* que mimeticen la enfermedad grave del dengue en su totalidad, una alternativa es la realización de análisis filogenéticos y epidemiológicos moleculares, que asocien un arquetipo genético del DENV con la presencia de brotes epidémicos y así detectar la presencia de cepas con un significativo incremento de la virulencia.

Al respecto, fue Ricco-Hesse quien identificó por primera vez, a principios de la década pasada, las relaciones filogenéticas entre DENV1 y DENV2. Posteriormente y a través del desarrollo de técnicas de secuenciación más eficientes, ha sido posible disponer de una importante cantidad de secuencias completas del genoma viral de todos los serotipos. Así, se ha establecido dentro de cada uno de ellos, hasta la fecha, 5 genotipos para DENV1 (I/*Sudeste Asiático, China, Este de África*; II/*Tailandia*; III/*cepas selváticas aisladas en Malasia*; IV/*Islas del Oeste del Pacífico y Australia*; V/*América, Oeste de África y Asia*), 5 para DENV2 (*Americano/América Latina, Caribe, India e Islas del Pacífico*; Asiático 1/*Malasia y*

Tailandia; Asiático 2/Vietnam, China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas; Americano/Asiático/Tailandia, Vietnam, América; Cosmopolita/amplia distribución), 4 para DENV3 (I/Indonesia, Malasia, Caribe, India e Islas del Pacífico; II/Tailandia, Vietnam, Bangladesh; III/Sri Lanka, África, India, Samoa, IV/Puerto Rico, América Central, América Latina, Tahití) y 4 para DENV4 (I/Tailandia, Sri Lanka, Filipinas, Japón; II/Indonesia, Malasia, Tahití, Caribe, América; III/Tailandia; IV/cepas selváticas) (212, 283).

Comparaciones de genomas completos del DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4, muestran una similitud del 62% al 69%, exponiendo una amplia diversidad de los serotipos en diferentes áreas geográficas del mundo. A pesar de que aun no se han determinado marcadores genéticos que estén relacionados con la virulencia del DENV, se han detectado al menos seis posiciones dentro del genoma viral entre las que se incluyen la región prM y las proteínas E, NS4 y NS5, donde el cambio puntual de ciertos aminoácidos (28, 390, 17 y 645/676/800 respectivamente), se correlaciona con las formas graves de la enfermedad (169).

En Venezuela, son pocos los estudios realizados para conocer los genotipos del DENV circulantes. Salas y colaboradores, fueron los primeros en describir la epidemiología molecular de los aislados virales detectados en el país entre 1990 y 1997, reportando circulación simultánea de DENV1, DENV2 y DENV4 (284). Estos autores sugieren por primera vez, la posibilidad de que el incremento en el número de casos severos vistos en el país desde 1989, sea el resultado de la introducción del genotipo asiático en sustitución del genotipo autóctono caribeño (Americano). Por su parte, Goncalvez y colaboradores, estudiaron la evolución del DENV1 en el país y compararon estos aislados con otras secuencias publicadas provenientes de varias localidades alrededor del mundo. Estos autores reportaron también la circulación en nuestro país del genotipo americano (V) asociado a la aparición de formas benignas y complicadas de dengue (285).

Posteriormente, se publicaron estudios sobre la epidemiología molecular de DENV2 y DENV3 en Venezuela. En este sentido, se demostró que los aislados de DENV2 que han circulado en el país son de origen asiático, lo cual queda demostrado por el hecho de poseer la sustitución de ácido aspártico (D) por asparagina (N) en la posición E390, un evento observado en cepas del DENV asiáticas y que las relaciona con el desarrollo de cuadros graves de dengue

hemorrágico. Para estos autores, los aislados venezolanos de DENV2 evolucionaron *in situ*, siendo posible diferenciar un número de linajes distintos co-circulantes, más que introducción repetida de cepas procedentes de otras localidades (286). En relación a DENV3, este serotipo circuló en Venezuela durante la década del año 1960 y 1970, identificando a los aislados como cepas virales del genotipo V. Luego, se extinguió para ser re-introducido en el año 2000 como cepas del genotipo III, responsables de epidemias de dengue grave con consecuencias fatales no solo en Venezuela sino también en Centroamérica en el año 1994, desde donde se habría diseminado a otros países del continente y cuyo origen pudo haber sido Sri Lanka e India. Se ha demostrado que al igual que DENV2, DENV3 ha evolucionado *in situ* en nuestro país (242).

Recientemente, Camacho y colaboradores, publicaron un estudio en el cual muestran los resultados de diversos trabajos relacionados con la epidemiología molecular del DENV en diferentes zonas del mundo, y de forma particular en Venezuela, identificando los diferentes genotipos asociados a situaciones epidemiológicas específicas así como analizando los cambios en algunos sitios nucleotídicos asociados a propiedades biológicas de las cepas virales. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos realizados, no resultan contundentes los estudios de genotipificación más que para establecer por los momentos, origen viral, introducción en determinadas zonas geográficas y posible impacto epidémico.

Con estos antecedentes se fundamenta este objetivo, buscando establecer la filogenia de aislados del DENV que circulan en el Estado Mérida, origen geográfico y determinar su relación con cepas virales asociadas a cuadros clínicos complicados de dengue.

4.2 MATERIALES Y METODOS

4.2.1 Aislados virales

Se analizaron dos cepas del DENV (DENV1 y DENV4), aisladas a partir de las muestras de suero de dos pacientes de 13 y 12 años de edad respectivamente, provenientes del Estado Mérida y valorados en los centros asistenciales de salud por presentar un cuadro febril agudo de cuatro días de evolución compatible desde el punto de vista clínico con un cuadro de DCSA. Las muestras fueron colectadas en junio y septiembre del año 2007 y enviadas a través del Sistema de Vigilancia Epidemiológica al Laboratorio de Salud Pública para su confirmación.

4.2.2 Extracción del ARN viral

Para la extracción del ARN viral a partir de las muestras de suero, se empleó un estuche comercial de purificación de QIAGEN® (*QIAamp-Viral RNA Mini Kit*, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. El material genético extraído se almacenó a -70°C hasta su posterior uso.

4.2.3 Ensayos de qPCR-RT:

Para la detección y serotipificación del DENV, se realizaron dos ensayos de qPCR-RT fundamentados en la química SYBR Green I® y tecnología TaMan® en formato *uniplex*, empleando como blanco de amplificación la proteína NS5 del genoma viral (Figura 23). Los ensayos desarrollados en los sistemas ABI 7500 (Applied Biosystems® California, USA) y CFX96 (Bio-Rad Laboratories®, California, USA), se ejecutaron en un solo paso utilizando estuches comerciales de la compañía QIAGEN® (*2X QuantiFast SYBR® Green I RT-qPCR Master Mix* y *QuantiFast® Probe RT-PCR Kit QIAGEN*, Hamburg, Germany), con un volumen final de reacción de 25 µL en microplacas de 96 pozos (*MicroAmp-Applied Biosystems®/Low profile plates Bio-Rad®*).

4.2.4 Secuenciación del genoma completo:

La secuenciación del genoma viral completo de las cepas de DENV1 y DENV4 se realizó en el Broad Institute, Cambridge, Massachusetts (USA), siguiendo un protocolo estándar diseñado por el grupo de investigadores asociados al proyecto internacional: *Dengue Virus Genome*. Brevemente, el ARN viral extraído a partir de las muestras de suero, fue amplificado mediante PCR-RT con oligonucleótidos específicos para producir 12 amplicones solapados de 1.5 - 2 kb. Seguidamente, dichos amplicones se mezclaron para realizar la reacción de secuenciación con 96 pares de oligonucleótidos específicos que dieron lugar a la amplificación de un número equivalente de regiones entre 500 a 700 pb. La reacción de secuenciación se realizó en un equipo ABI3730 mediante el método de Sanger. Finalmente, se procedió a ensamblar las secuencias consenso obtenidas para ser depositadas y registradas en el GenBank bajo los códigos GQ199877 (DENV1) y GQ199876 (DENV4).

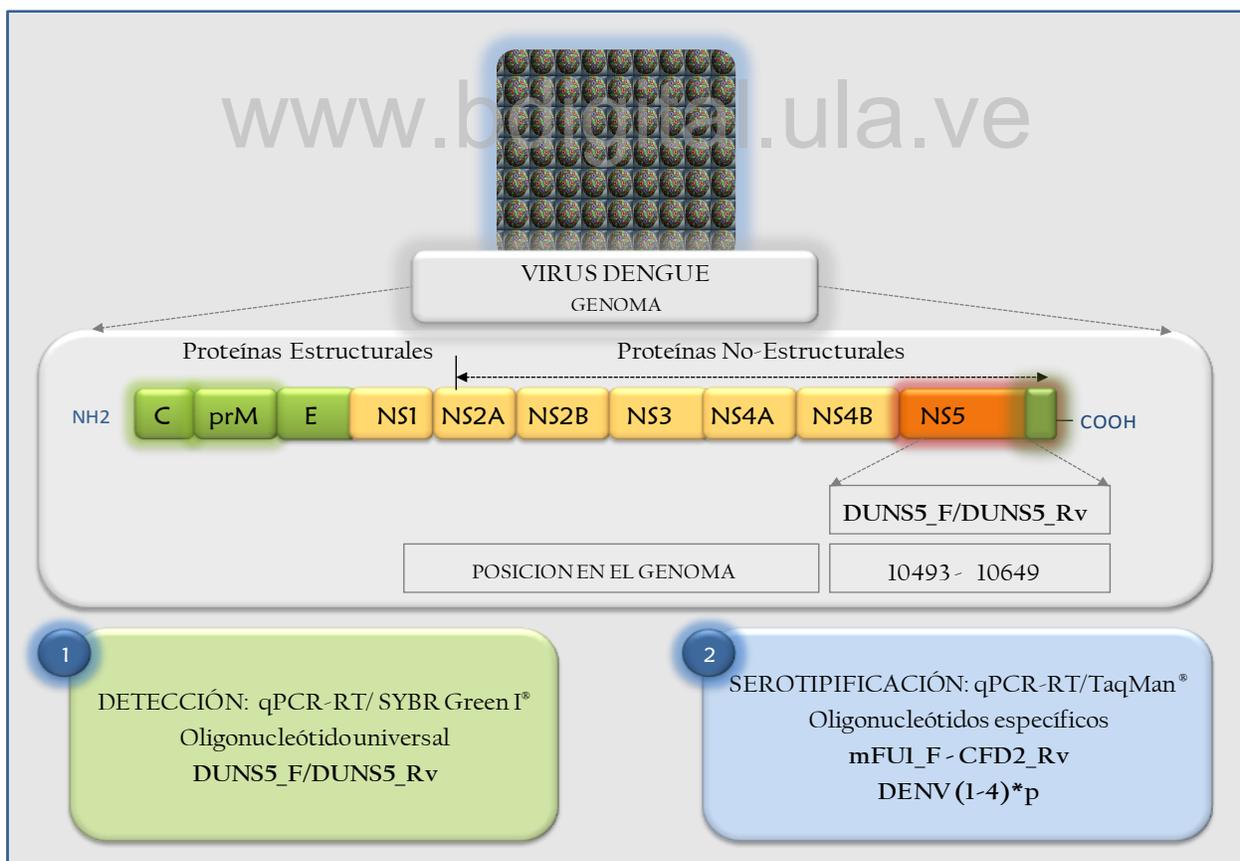


Figura 23. Región genómica y oligonucleótidos empleados para la detección y serotipificación del DENV por qPCR-RT.

4.2.5 Evaluación filogenética del genoma completo de DENV2 y DENV3

Con el propósito de establecer la relación filogenética de las cepas de DENV2 y DENV3 circulantes en Venezuela durante los periodos 1997-2007 y 2000-2007 respectivamente, se alinearon secuencias nucleotídicas de ambos serotipos, gentilmente cedidas por el Dr. Guillermo Comach (LARDIDEV, Maracay, Estado Aragua, Venezuela) con una selección global de secuencias provenientes de Sudamérica y el Caribe depositadas en la base de datos del Genbank.

4.2.6 Análisis filogenético:

Las secuencias nucleotídicas pertenecientes al genoma completo de DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4, se alinearon empleando el programa Clustal X (287) y para determinar el modelo evolutivo óptimo se empleó el software MEGA4 (288). Una vez seleccionado el modelo *Tamura-Nei*, se estimó la composición de bases y las distancias evolutivas. Con estos parámetros se generaron árboles filogenéticos mediante la matriz de sustitución de máxima verosimilitud (*Maximun Composite Likelihood*). Finalmente, los árboles filogenéticos óptimos fueron generados mediante el método *Neighbor-Joining* (NJ) y su significancia estadística evaluada a través de un análisis de re-muestreo o prueba de Bootstrap con 1000 (MLP) repeticiones, seguido de rondas sucesivas de cambios de rama mediante el método de TBR, (del inglés *Tree Bisection-Reconnection*), identificando los parámetros de sustitución de máxima verosimilitud en cada paso, hasta que se encontró el árbol de mayor probabilidad. Las secuencias empleadas para enraizar los árboles correspondieron a cepas depositadas en la base de datos del Genbank.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 DENV1

La Figura 24, corresponde al árbol filogenético derivado del alineamiento de las secuencias completas de aislados de DENV1 en Venezuela durante el periodo 1997-2008. El árbol generado muestra la existencia de cuatro grupos correspondientes a los genotipos descritos como I, II, III, V y V. Los aislados virales de las Américas incluida Venezuela, se ubicaron en el genotipo V. Se advierte la división en dos clados, del genotipo V: el primero constituido por virus aislados en Puerto Rico y en Guyana Francesa, y el segundo conformado por aislados virales de Argentina, Brasil, Nicaragua y Venezuela entre las que se incluye la a cepa GQ199877 proveniente del Estado Mérida. Los virus venezolanos, están distribuidos en dos linajes: un linaje conformado por algunas cepas aisladas en 2006, que comparten un ancestro común con el virus aislado en Brasil (2008) y otro linaje conformado por cepas relacionadas con aislados provenientes de Nicaragua (2005-2006).

4.3.2 DENV2

La Figura 25, corresponde al árbol filogenético derivado del alineamiento de las secuencias completas de DENV2 durante el periodo 1987-2008. Las cepas del genotipo DENV2 se subdividen en cinco grupos: Asiático con cepas de Vietnam, Tailandia y Nueva Guinea; Cosmopolita con cepas de Taiwán, Australia, Indonesia y Singapur; Americano con cepas representativas de Puerto Rico, Tonga, Venezuela, Colombia, Perú y México y finalmente, Sureste de Asia-América con cepas de China, Jamaica, Cuba, Martinica y Nicaragua. Las relaciones filogenéticas bajo el criterio de máxima verosimilitud, señalan que las cepas aisladas en Venezuela se agrupan con DENV2 provenientes de Colombia, Brasil y México previamente clasificadas y relacionadas con el genotipo Americano.

4.3.3 DENV3

La Figura 26, corresponde al árbol filogenético derivado del alineamiento de las secuencias completas de DENV3 durante el periodo 2000-2007. El análisis de las muestras secuenciadas indica que los aislados venezolanos pertenecen al genotipo III o genotipo Asiático inicialmente

descrito por Lanciotti y colaboradores (289) mostrando una estrecha relación con las cepas provenientes de Puerto Rico (1998-2000), Ecuador (2000) y Perú (2002). Al respecto, las cepas Latinoamericanas, se ubican en un grupo independiente con un 100% de soporte por el análisis Bootstrap o re-muestreo. Es posible definir una clara separación en el tiempo al advertir que los aislados más antiguos (Filipinas/1956 y Tailandia/1973) se ubican en la base del árbol.

4.3.4 DENV4

La Figura 27, corresponde al árbol filogenético derivado del alineamiento de las secuencias completas de DENV4 en Venezuela durante el periodo 1998-2007. El árbol generado advierte la ubicación de los aislados provenientes de Venezuela en el genotipo II (IIB), compartiendo un ancestro común con las cepas originarias de Puerto Rico (1986-1998) y Trinidad y Tobago (1999). De igual forma, la cepa GQ199876 proveniente del Estado Mérida, exhibe una significativa relación filogenética con los aislados de Aragua (2007). En un segundo clado, constituido por cepas provenientes de Colombia, Ecuador, El Salvador y República Dominicana, se establece la posibilidad de una importante conexión con los aislados venezolanos.

www.bdigital.ula.ve

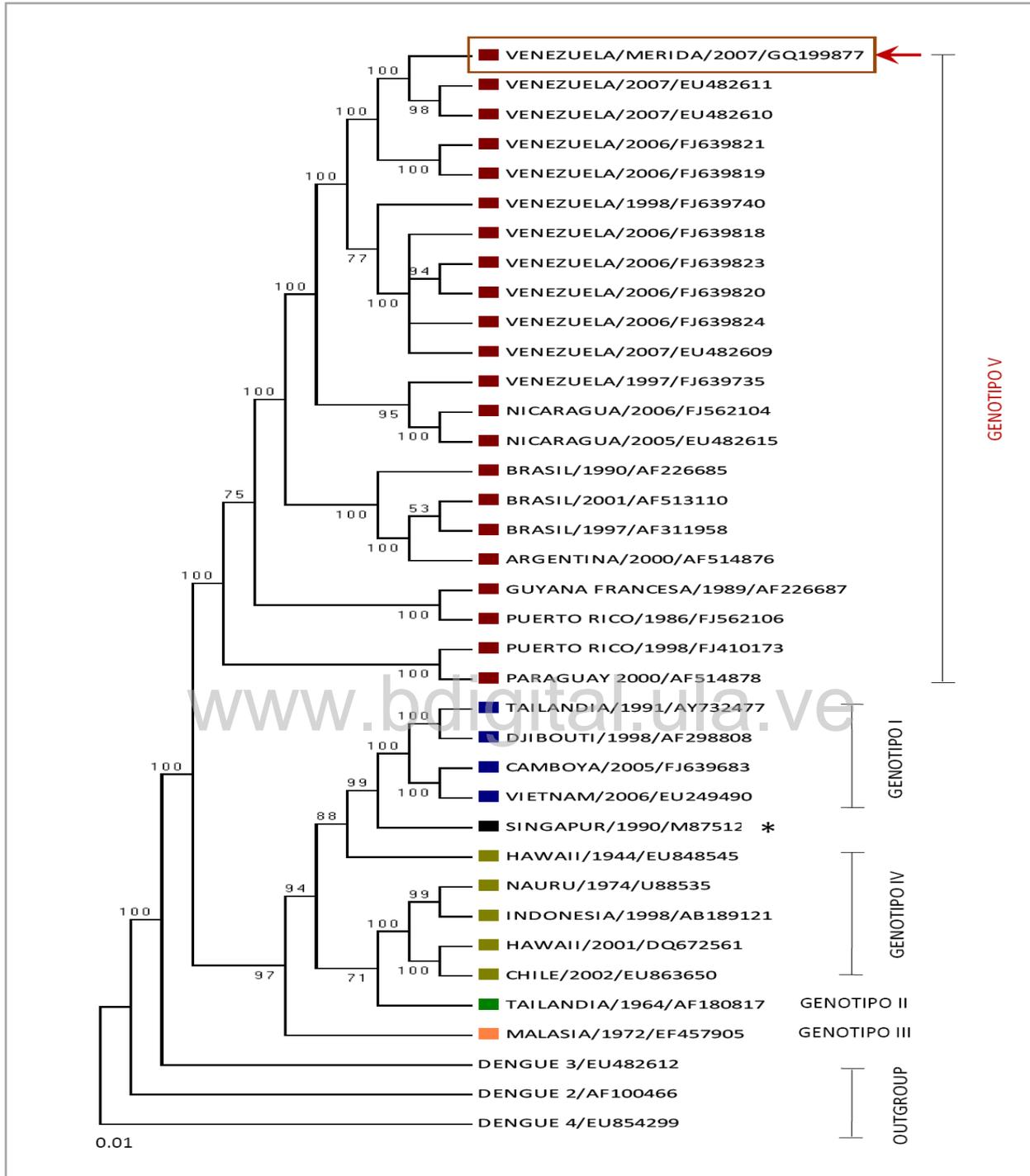


Figura 24. Árbol filogenético derivado de secuencias nucleotídicas del genoma completo del DENV1. El árbol fue generado mediante el método algorítmico Neighbor-Joining y las distancias evolutivas calculadas mediante el método Tamura-Nei (Programa MEGA 4.0) con *Bootstrapping* de 1000 replicas. Se seleccionaron secuencias de referencia de DENV2, DENV3 y DENV4 como grupos externos (*Outgroups*).

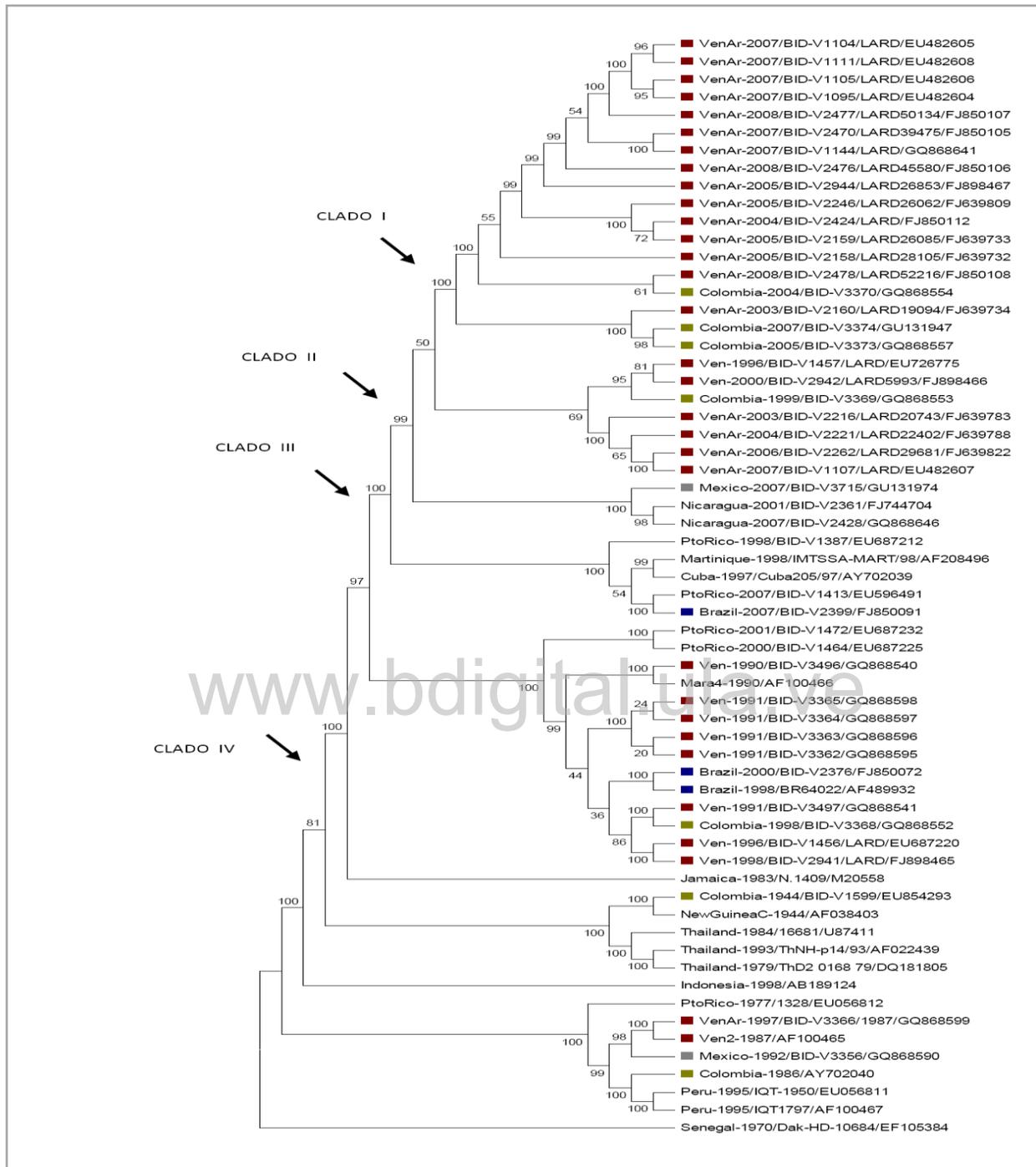


Figura 25. Árbol filogenético derivado de secuencias nucleotídicas del genoma completo de DENV2. El árbol fue generado mediante el método algorítmico Neighbor-Joining y las distancias evolutivas calculadas mediante el método Tamura-Nei (Programa MEGA 4.0) con *Bootstrapping* de 1000 replicas. Se seleccionaron secuencias de referencia de DENV1, DENV3 y DENV4 como grupos externos (*Outgroups*).

4.4 DISCUSION

En numerosos países de América Latina incluida Venezuela, las epidemias de DSSA/DCSA han sido substituidas por las de DS. Así, la variabilidad genética de los DENV circulantes en el territorio nacional entre 1987 y 1995 sugieren que la emergencia de las epidemias de DS estuvieron asociadas a la introducción de DENV2 originario del Sudeste Asiático, el cual desplazo gradualmente al DENV2 autóctono perteneciente al genotipo Americano agente causal de los primeros brotes de DSSA/DCSA (168). Desde el punto de vista filogenético, la identificación de variantes genéticas del DENV está asociada a la aparición de cuadros clínicos del dengue de variada severidad. Determinar oportunamente los serotipos circulantes permite a los componentes del programa estatal de vigilancia epidemiológica, diseñar y ejecutar estrategias adecuadas para bloquear con suficiente anticipación la transmisión de la enfermedad y su posterior diseminación al resto de la población en áreas endémicas.

Estos resultados resaltan la importancia de los estudios filogenéticos del DENV para determinar la diversidad genética tanto geográfica como temporal de los serotipos circulantes y la posible asociación entre la emergencia de clados y la magnitud de los brotes epidémicos en términos de morbilidad o severidad de los casos. Estudios previos del DENV en cepas atenuadas y selváticas, han sugerido que las diferencias genéticas entre aislados de los cuatro serotipos, están asociadas al desarrollo de DSSA/DCSA y DS. A pesar de que se han identificado variaciones en el número de nucleótidos y aminoácidos, que aparentemente están relacionados con la gravedad de la enfermedad, hasta el momento no existen marcadores claros para esta relación, aun cuando los genotipos Asiático y Americano/Asiático se han asociado en mayor proporción con la progresión a casos de DS.

Diferentes trabajos empleado construcciones clonadas así como virus con pases sucesivos en cultivo celulares y diversos grados de atenuación, han identificado posibles marcadores genéticos; sin embargo, el resultado no es consistente en cada uno de los laboratorios enfocados en la epidemiología molecular del DENV, lo que hace pensar que en realidad es un conjunto de cambios en el genoma viral lo que determina su patogenicidad (290). Aunque la tasa de variación genética del DENV en la naturaleza parece ser menor al compararlo con otros virus de ARN, algunos procesos de la evolución viral no solo se realizan por mutaciones

puntuales, sino a partir de otros intercambios genéticos tales como la recombinación y arreglos de segmentos genómicos. Esto genera durante la replicación viral, altas tasas de mutación dando como resultado poblaciones con una elevada variabilidad en sus genomas (168).

De hecho, a través de estudios filogenéticos se han identificado un número elevado de cepas recombinantes del DENV, un evento demostrado al comparar las secuencias de cepas virales que cumplen al menos con tres requisitos: 1) que la región recombinante sea lo suficientemente larga para permitir su análisis; 2) que la región secuenciada muestre una divergencia entre las cepas parenterales y la recombinante y 3) que el patrón recombinante sea mantenido en una evolución posterior al proceso post-recombinante (217). Inicialmente, se reconoció que en el DENV solo ocurría acumulación de mutaciones en su genoma, lo que generaba cambios que más tarde darían como resultado cepas virales con un menor o mayor grado de virulencia, además de la supeditada aparición de nuevos genotipos. No obstante, estudios recientes han revelado que además de los cambios por mutaciones, también se presentan fenómenos de recombinación homóloga en los cuatro serotipos (242).

Para que la recombinación sea identificada, deben cumplirse varias condiciones, entre otras que, tanto el vector como el hospedador se infecten con más de un serotipo, que ocurra la co-circulación de diferentes cepas virales en una región geográfica y la realización de muestreos geográficos y temporales secuenciales (216)

Las cepas de DENV1 aisladas en Venezuela durante el periodo 1997-2008, se disponen en dos clados: el primero conformado las cepas aisladas en 2006, que comparten un ancestro común con el virus aislado en Brasil y el segundo conformado por cepas relacionadas con aislados provenientes de Nicaragua responsable de casos de DSF en el año 2006. Por su parte la cepa de DENV1/GQ199877, aislada en el Estado Mérida, se relaciona con los aislados de Aragua asociados con la aparición de casos clínicos de DS. Tal como había sido reportado previamente para otros autores, en Venezuela las cepas de DENV1 se agrupan dentro del genotipo V, desarrollando un marcado proceso de cladogénesis, considerado así por la separación evolutiva de los genotipos en ramas más pequeñas (285).

El serotipo DENV2 es uno de los más estudiados, hecho que probablemente se deba a su elevada diseminación, así como a su potencial de causar epidemias asociadas en muchas oportunidades a la presencia de casos graves de la enfermedad.

En este trabajo, uno de los hallazgos más relevantes es la estrecha relación observada entre las cepas de DENV2 aisladas en Venezuela, con cepas del sureste asiático tales como Vietnam y Tailandia, así como con cepas de Jamaica que se cree representan la expansión de las cepas cubanas que generaron la aparición de cuadros graves de dengue en América durante el año 1981.

El estudio pionero de la epidemiología molecular del DENV2 en Venezuela, fue realizado por Rico-Hesse y colaboradores en el año 1997, cuando también se analizaron cepas de diferentes orígenes geográficos, incluyendo 16 aislados obtenidos de pacientes con DSSA/DCSA y/o DS. El análisis de la región nucleotídica correspondiente a la unión E/NS1 mostró idéntica secuencia para algunos virus agrupándolos en genotipos Americanos y Asiáticos. Específicamente, los aislados del periodo 1990-1995 se distribuyeron entre grupos genotípicos del sudeste asiático, dejando ver un progenitor común que sugirió una ruta de transmisión desde el sudeste de Asia hasta las Américas. Estos hallazgos mostraron gran variabilidad genética de las cepas de DENV2 venezolanas, lo que alude las características de transmisión descritas para Tailandia en años anteriores. Esta investigación mostró la asociación directa entre la introducción de cepas importadas y la gravedad de la enfermedad, y la identificación del sudeste Asiático como fuente de nuevos genotipos virales para las Américas (291).

Se ha demostrado que el genotipo de DENV2 proveniente del sureste asiático, tiene el potencial de generar casos de DS, además de tener una alta tasa de transmisión en poblaciones naturales de *Aedes aegypti*. En Venezuela y las regiones insulares del Caribe, este virus desplazó rápidamente al genotipo Americano.

En este trabajo al caracterizar los aislados de DENV2 recuperados a partir de pacientes con cuadros de DCSA y DS provenientes de diferentes regiones del país, fundamentalmente del Estado Aragua, parecen ser descendientes del genotipo Americano/Asiático representado por los aislados de Tailandia (Thailand-1984/16681/U87411; Thailand-1993/ThNH-p14/93

AF022439; Thailand/1979/ThD2016879/DQ181805) introducidos en América Latina a principios de la década del año 1980.

En el caso del DENV3, el análisis filogenético de las cepas venezolanas aisladas entre el año 2000 y 2007 mostró que guardan relación con las cepas aisladas en Puerto Rico, Ecuador y Perú responsables de los brotes de DSSA/DCSA acaecidos en el año 1998 y 2000.

DENV3 fue detectado por primera vez en las Américas en 1963 y aislado en 1977 (292). Este serotipo se consideró ausente hasta el año 1994 cuando se aisló en Nicaragua y Panamá en 1994. Posteriormente, circuló en países de América Central y el Caribe causando brotes de DSSA/DCSA con algunos casos severos. En el año 2000, se detectó en países suramericanos (Brasil, Ecuador, Venezuela y Perú) (293) reconocido como la causa de epidemias de DS en Colombia y Venezuela, así como en Paraguay, Argentina y Bolivia.

La cepa de DENV4/GQ199876 proveniente del Estado Mérida, exhibe una significativa relación filogenética con los aislados de Aragua asociados con cuadros de DS durante el brote epidémico ocurrido en el país el año 2007. Desde que este serotipo se introdujo en el hemisferio occidental en 1981, ha estado circulando de forma continua en el Caribe y al norte de Sudamérica, con escasas evidencias de diseminación y asociación a un número significativo de casos de DS (276). La variación entre cepas de DENV4 fue reportada en 1986 por Henchal y colaboradores, quienes diferenciaron aislados caribeños de la cepa prototipo H-241 (Filipinas/1956). Posteriormente, aislados de DENV4 se agruparon en tan solo un genotipo asociado a epidemias de DSSA/DCSA (294).

Este análisis filogenético, evidencia la complejidad de los mecanismos de evolución del DENV así como, la necesidad de investigar las consecuencias de este evento biológico sobre la patogenia viral. Los conocimientos emanados de este objetivo, constituyen un punto de partida conveniente para la profundización sobre el papel que juegan los factores virales en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. No obstante, es imprescindible considerar un análisis multifactorial, pues ni los factores dependientes del hospedador, ni las condiciones epidemiológicas pueden ser ignorados.

Asimismo, de gran impacto epidemiológico sería la incorporación observaciones moleculares filogenéticas en el marco de los sistemas de vigilancia epidemiológica de las regiones afectadas por la circulación del DENV.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO 5

CAMBIOS DINÁMICOS DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS, MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y MARCADORES DE ACTIVACIÓN LINFOCÍTICA COMO INDICADORES TEMPRANOS DE SEVERIDAD EN PACIENTES CON DENGUE

www.bdigital.ula.ve

5.1 INTRODUCCIÓN

Muchos esfuerzos se han realizado para entender la fisiopatogenia del dengue y su evolución hacia DS. A pesar de que esta entidad clínica tiene a las manifestaciones hemorrágicas como los signos más notables de la enfermedad, el criterio universal es que la morbi-mortalidad característica de esta infección se asocia a eventos de extravasación plasmática y la potencial aparición de colapso circulatorio. En concordancia con estas observaciones, está el hecho de que la adecuada reposición de líquidos ha probado ser una estrategia altamente efectiva en el tratamiento de cuadros graves de dengue, reduciendo la tasa de mortalidad a menos del 1%.

En la patogénesis del DS varios factores juegan un papel crucial en la evolución del cuadro clínico (115). El primero de ellos son los relacionados directamente con las características de los virus circulantes, como la ocurrencia de infecciones secundarias, el serotipo del DENV implicado en la epidemia, la carga viral y las diferencias genotípicas vinculadas directamente con el grado de virulencia del virus. Por otro lado, existen factores inherentes al hospedador; entre ellos se citan el tipo de respuesta inmune desarrollada contra el virus y las diferencias genéticas establecidas por los genes HLA cada individuo expresa frente a un patógeno (194).

Sin embargo, a pesar de todos los estudios centrados en la caracterización viral y su relación con la aparición de cuadros de DS, no se han encontrado evidencias de que el virus sea absolutamente responsable de las lesiones causadas en el endotelio y de la subsiguiente aparición de necrosis y muerte celular. En este sentido, Rothman y colaboradores, postularon que el origen de la extravasación plasmática durante la infección por el DENV es el tipo de interacciones que ocurren entre la célula infectada y la respuesta inmune secundaria contra el virus (136). Por un parte, se encuentra el sistema humoral que media la aparición de anticuerpos heterotípicos subneutralizantes que lleva a un aumento de la infectividad viral mediada por anticuerpos; y por otro lado, la respuesta celular heterotípica que tiene un efecto citotóxico e inflamatorio mediado por citoquinas, tanto a nivel vascular como tisular (295).

Una de las hipótesis que representa un papel central en la inmunopatogénesis del DS es el incremento de la infectividad viral explicada por el fenómeno de ADA, que ocurre durante la infección primaria por el DENV. Esta hipótesis fue formulada para explicar la ocurrencia de casos graves de dengue en pacientes pediátricos durante infecciones secundarias. En ellos, fue

un hallazgo común la presencia de anticuerpos que reaccionaban de manera heterotípica contra otros serotipos del virus. Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que estos anticuerpos en lugar de cumplir una función neutralizante aumentan el ingreso del virus a los monocitos como consecuencia de la opsonización viral e internalización por parte de los receptores Fc- γ (Fc γ R) de la superficie celular (296). Sin embargo, la asociación entre el desarrollo de DS y la presencia de anticuerpos contra otros serotipos del DENV, por sí mismo no explica la patogenia, ni los mecanismos moleculares de las manifestaciones clínicas observadas en esta entidad clínica (135).

Dentro del proceso inherente a la respuesta inmune frente al DENV, es importante mencionar que la activación masiva de células infectadas en pacientes con DS, sobrelleva un cambio en el patrón de citoquinas Th1 a Th2, generando disfunción endotelial, incremento de la permeabilidad vascular y finalmente efectos adversos sobre las células del endotelio vascular (125).

Independientemente del mecanismo que predomine en la respuesta inmune frente al DENV, un hecho frecuente en la aparición de las diferentes entidades clínicas a las que da origen, es el incremento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, un escenario que media la ocurrencia de daño endotelial e incrementa la permeabilidad vascular induciendo la aparición de DS. En este sentido, uno de los mecanismos propuestos para explicar la evolución de DSSA/DCSA a DS es el incremento en los niveles séricos de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, factor transformador del crecimiento beta 1 (TGF- β 1, del inglés *Transforming Growth Factor*) y el factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF, del inglés *Macrophage Migration Inhibitory Factor*) asociados con la severidad del cuadro clínico (297).

Varias de estas citoquinas llevan a la expresión celular y liberación de receptores asociados con la activación y daño vascular incluyendo a moléculas de adhesión intercelular como VCAM-1, ICAM-1, TNFR-II, IL-2R y CD8, cada uno de ellos circulando bajo una forma soluble. En la infección por el DENV, las evidencias *in vitro* e *in vivo* sugieren que el virus regula, directa o indirectamente la expresión y liberación de citoquinas así como moléculas de adhesión intercelular (162). Este efecto es más sobresaliente en pacientes con DS aunque es posible observarlo en menor grado incluso en pacientes con DSSA.

Pocos estudios han correlacionado los niveles de citoquinas con las fases clínicas de la enfermedad (298-300). Al respecto, tomando en cuenta que el dengue es una entidad infecciosa que en un periodo relativamente corto puede evolucionar rápidamente a formas clínicamente muy complejas, es pertinente evaluar el cambio de ciertos marcadores biológicos en el contexto de las diferentes fases de la enfermedad como elementos pronóstico de activación linfocitaria y endotelial. Por ello, el objetivo final de este trabajo fue determinar los cambios cinéticos de mediadores inflamatorios (IL-8, TNF- α), marcadores soluble de activación linfocítica temprana (sIL-2R, sTNF-Rp75) y fracciones solubles de moléculas de adhesión celular (sICAM-1, sVCAM-1) como marcadores tempranos de severidad en pacientes con dengue.

www.bdigital.ula.ve

5.2 MATERIALES Y METODOS

5.2.1 Muestras clínicas

A partir de 50 pacientes con diagnóstico clínico de dengue, confirmado por pruebas virológicas (RT-qPCR) y serológicas (ELISA/IgM anti-dengue), se colectaron muestras pareadas de 5 mL de sangre venosa. Las muestras fueron tomadas durante la fase aguda (1-3 días después del inicio del cuadro febril en la etapa de viremia) y crítica (4-7 días después del inicio del cuadro febril) de la enfermedad.

La fase crítica es definida por la OMS como el periodo de defervescencia en el cual la temperatura corporal desciende a 38°C - 37.5°C , usualmente entre el día 3-7 de la enfermedad. En este momento, es posible observar un significativo incremento en los niveles del hematocrito como resultado de cambios en la permeabilidad endotelial, signo que puede ir acompañado de extravasación plasmática, por lo general, en un lapso de 24 - 48 horas, así como leucopenia y trombocitopenia progresiva. Si el paciente no manifiesta incremento de la permeabilidad capilar, el pronóstico clínico es totalmente favorable, sin embargo, aquellos pacientes que tienen un comportamiento contrario, evolucionaran desfavorablemente tras la pérdida del volumen plasmático. Estos criterios fueron empleados en el estudio para seleccionar el tiempo de división en las fases de la enfermedad durante el análisis de los marcadores inmunes.

Para el estudio, se incluyeron como controles, 7 individuos aparentemente sanos, sin fiebre y sin presentar enfermedades infecciosas concomitantes o de base.

El suero fue obtenido por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos, fraccionado y almacenado a -20°C hasta su posterior uso. Desde el momento de colección de la primera muestra, hasta la recuperación del paciente, se llevo a cabo tanto la recopilación de los datos clínicos y para-clínicos, como evaluaciones físicas exhaustivas. Previo a la toma de las muestras, se le comunicó al grupo de pacientes o sus representantes legales la naturaleza e importancia del estudio, con el propósito de obtener su autorización a través de un consentimiento informado evaluado y avalado por la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, con lo cual quedara certificación de su participación en el proyecto. El consentimiento escrito y firmado por los

participantes en el estudio, autorizó además de la toma de muestras, la utilización de la información médica confidencial con fines estadísticos. El estudio se desarrolló siguiendo los principios establecidos por la Declaración de Helsinki para investigaciones médicas en seres humanos (255). Fueron excluidos del estudio, los pacientes que por valoración física, interrogatorio y/o exámenes de laboratorio manifestaron además del dengue, la presencia de enfermedades infecciosas concomitantes, patologías de de origen inmune, oncológicas, metabólicas, neurológicas, mentales o trastornos psicológicos, mujeres en estado de gestación así como los pacientes o representantes legales en el caso de los menores de edad, que por diferentes motivos no autorizaron su participación en el estudio.

5.2.2 Determinación de IL-8, TNF- α , sVCAM-1 e sICAM-1

Los niveles séricos de IL-8 (ng/mL - Chemichon InternacionalTM Inc., CA, USA), TNF- α (pg/mL - Biosource International Inc., CA, USA), sICAM-1 y sVCAM-1 (ng/mL - Chemichon InternationalTM Inc., CA, USA), sIL-2R y sTNF-RII (p75) (ng/mL - Biosource International Inc., CA, USA), se determinaron mediante la prueba de enzimo-inmunsayo siguiendo las indicaciones de las casas fabricantes. Brevemente, se estableció el número de tiras necesarias para realizar el ensayo. Se diluyeron todas las muestras con un solución diluyente del estándar. A continuación se adicionaron 50 uL de los estándares, muestras o controles más 100 uL de la solución de anticuerpos específicos para cada citoquina y marcador inmunológico excepto al blanco cromógeno. Como tiempo promedio, se incubó la placa a temperatura ambiente por 2 horas y transcurrido el tiempo, se decantó el líquido para lavar 4X con 400 uL de solución de lavado durante 15 a 30 segundos. Se dejó secar la placa sobre una hoja de papel absorbente para adicionar a cada pozo 100 uL de la solución de trabajo estreptavidina-HRP. Nuevamente, se incubó la placa a temperatura ambiente por 30 minutos, se lavó 4X y se adicionó 100 uL del cromógeno estabilizado. La solución en los pozos comenzó a tornarse de color azul. El tiempo de incubación exacto, fue determinado por el lector de ELISA (Bio-Tek ELx800, Germany). Finalmente, se adicionaron a cada pozo 100 uL de la solución *stop* para leer a 450 nm.

5.2.3 Análisis de los datos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa EPI InfoTM versión 3.5 (CDC, USA 2006). Los resultados se presentaron con su respectiva media y desviación estándar ($X \pm DE$). La comparación entre los grupos se realizó aplicando la prueba T de *Student* no pareada y análisis

de varianza (ANOVA) con la respectiva corrección de Bonferroni en el caso de las comparaciones múltiples. Se consideró estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

www.bdigital.ula.ve

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Hallazgos clínicos y de laboratorio en los pacientes con dengue

De los 50 pacientes con infección confirmada por el DENV, 54% (27/50) correspondieron al género femenino y 46% (23/50) al masculino con una edad promedio de 26 años ($DE \pm 18.20$). Desde el punto de vista clínico, 40% (20/50) de los casos fueron clasificados como DSSA/DCSA y 60% (30/50) reconocidos como DS. Dentro de los casos descritos como DSSA/DCSA, el rango de edad fue de 3 a 52 años ($X=26.4$), de ellos 40% (8/20) eran pacientes pediátricos con edades comprendidas entre los 3 a 11 años ($X=7.1$; $DE \pm 3.6$) mientras que el 60% restante (12/20) eran adultos con un rango de edad entre los 18 a 53 años ($X=39.2$; $DE \pm 12.3$). Por su parte, dentro del grupo de pacientes con diagnóstico de DS, la edad se ubicó entre los 5 meses a 68 años ($X=23.2$), donde 50% (15/30) fueron identificados como pacientes pediátricos con una edad mínima de 5 meses y máxima de 16 años ($X=7$; $DE \pm 4.7$) en tanto que el 50% restante (15/30) eran adultos con una escala de edad entre los 19 a 68 años ($X=33.5$; $DE \pm 15.3$) (Tabla 10).

Al momento de la evaluación clínica, 85% (17/20) de los pacientes con DSSA/DCSA y 90% de los pacientes con DS presentaban fiebre superior a los 38°C. La presencia de erupción y manifestaciones hemorrágicas (epistaxis, gingivorragia, melenas, petequias y derrames cavitarios), fue un hallazgo trascendental en los pacientes con DS (66% y 83% respectivamente). Por otra parte, el aumento en los niveles del hematocrito ($>20\%$ sobre el nivel basal), se registró en 96% (29/30) de los pacientes con DS ($p < 0.001$). En relación al grado de trombocitopenia, todos los pacientes incluidos en el estudio exhibieron valores inferiores a 150.000 plaquetas/mm³ llegando incluso a 66.000 plaquetas/mm³ en el grupo de pacientes con DS (Tabla 10).

Durante la fase aguda de la enfermedad, la viremia fue detectada en 45% (9/20) de los pacientes con DSSA/DCSA y 36% (11/30) de los pacientes con DS. Con respecto a la fase crítica, se detectó la presencia de IgM anti-dengue en 65% (13/20) de los pacientes con DSSA/DCSA y en la totalidad del grupo de pacientes con DS (100%). Al realizar los ensayos de serotipificación en los pacientes con pruebas virológicas (RT-qPCR) positivas, DENV2 fue el serotipo predominante en ambos grupos, DSSA/DCSA y DS (66.6% y 45.5%

respectivamente). En este sentido, en los pacientes con DS se detectaron los cuatro serotipos, mientras que DENV1 no fue hallado en los pacientes con DSSA/DCSA (Tabla 9).

Tabla 10. Hallazgos clínicos y de laboratorio en pacientes con dengue al momento de ser admitidos en el estudio.

PACIENTES	DSSA/DCSA n (X de Edad años - DE)	DS n (X de Edad años - DE)	Valor p
Pediátricos	8 (7.1 - 3.6)	15 (7.0 - 4.7)	0.68
Adultos	12 (39.2 - 12.3)	15 (33.5 - 15.3)	
HALLAZGOS CLINICOS	DSSA/DCSA n=20 (%)	DS n=30 (%)	Valor p
Fiebre (>38°C)	17 (85)	27 (90)	0.83
Erupción	7 (35)	20 (66)	0.04**
Hemorragias	3 (15)	25(83)	<0.001**
DETERMINACIONES DE LABORATORIO			
PARAMETROS	DSSA/DCSA n=20 (%)	DS n=30 (%)	Valor p
Hemoglobina (<11g/dL)	4 (20)	13 (43)	0.12
Incremento del hematocrito* (3 (15)	29 (96)	<0.001*
Leucocitos (>4000xmm ³)	12 (60)	17 (56)	0.78
Neutrófilos (>40%)	8 (40)	15 (50)	0.43
Linfocitos (>20%)	5 (25)	7 (23)	0.83
Plaquetas (Media)	149.000/mm ³	66.000/mm ³	<0.001*
PRUEBAS CONFIRMATORIAS (*)			
RT-qPCR - UNIVERSAL	9 (45.0)	11 (36.6)	
SEROTIPIFICACION			
DENV1	0 (0.0)	2(18.1)	NA
DENV2	6 (66.6)	5 (45.4)	NA
DENV3	3 (33.3)	3 (27.2)	NA
DENV4	0 (0.0)	1 (9)	NA
ELISA IgM anti-dengue	13 (65)	30 (100)	NA

DSSA/DCSA: dengue sin signos de alarma/dengue con signos de alarma; DS: dengue severo. *Dos pacientes tuvieron resultados positivos para ambas pruebas confirmatorias, RT-qPCR e IgM anti-dengue.

5.3.2 Niveles de IL-8 y TNF- α

Las citoquinas pro-inflamatorias fueron determinadas en 17 pacientes, 41.2% (7/17) con DSSA/DCSA y 58.8% (10/17) con DS. Los niveles de estos marcadores inmunes fueron analizados y distribuidos de acuerdo al curso y severidad de la enfermedad. Así, los niveles de IL-8 fueron similares en pacientes con DSSA/DCSA durante la fase aguda y crítica de la enfermedad ($X=0.19$ ng/mL y $X=0.30$ ng/mL respectivamente). En pacientes con DS, se observó un incremento significativo de IL-8 hacia la fase crítica de la enfermedad ($X=0.53$ ng/mL) comparado con la fase aguda (0.25 ng/mL; $p=0.013$) (Figura 28a).

Respecto a la determinación de los niveles de TNF- α , durante la fase aguda de la enfermedad los pacientes con DS mostraron niveles más bajos de este mediador inflamatorio comparado con los pacientes identificados con cuadros de DSSA/DCSA y el grupo control ($X=8.9$ pg/mL y $X=28.8$ pg/mL respectivamente; $p=0.159$). Durante la fase crítica de la enfermedad, los niveles de TNF- α fueron más altos en pacientes con DS en contraste con el grupo de pacientes clasificados como DSSA/DCSA ($X=80.2$ pg/mL y $X=8.9$ pg/mL respectivamente; $p=0.042$). No hubo diferencias en los niveles de TNF- α entre los pacientes con DSSA/DCSA y el grupo control durante la fase crítica de la enfermedad (Figura 28b).

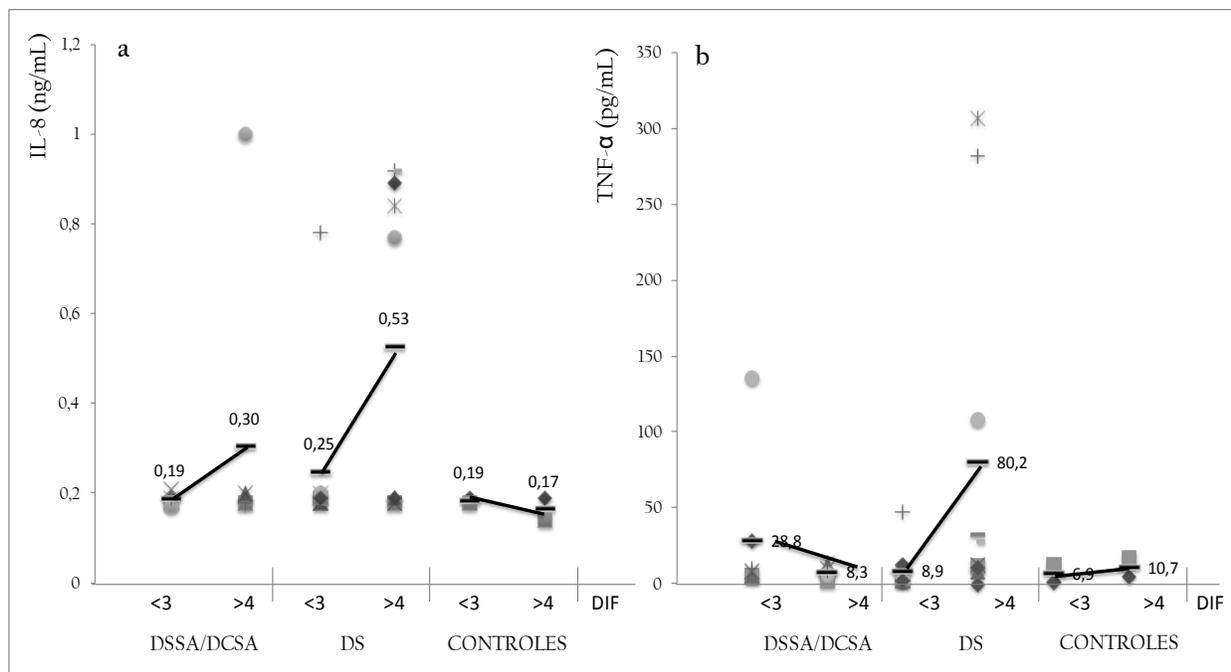


Figura 28. Niveles de IL-8 (ng/mL) (a) y TNF- α (pg/mL) (b) en pacientes con dengue sin signos de alarma/dengue con signos de alarma (DSSA/DCSA) y dengue severo (DS) determinados durante el curso de la enfermedad y ajustados según el día de inicio de la fiebre (DIF). Las muestras fueron procesadas por triplicado y los cuadros negros indican el valor promedio de cada grupo.

5.3.3 Niveles de sICAM-1 y sVCAM-1

Las moléculas de adhesión intercelular solubles ICAM-1 y VCAM-1 fueron determinadas en 17 pacientes, 41.2% (7/17) con DSSA/DCSA y 58.8% con DS. Los niveles de estos marcadores de activación endotelial fueron analizados y distribuidos de acuerdo al curso y severidad de la enfermedad. Los niveles de sICAM-1 fueron significativamente más altos en pacientes con DSSA/DCSA y DS comparado con el grupo control durante las fases aguda ($X=48.1$ ng/mL, $X=46.5$ ng/mL y $X=17.1$ ng/mL respectivamente; $p=0.001$) y crítica de la enfermedad ($X=50.1$ ng/mL, $X=92.0$ ng/mL y $X=12.4$ ng/mL respectivamente; $p<0.001$). Sin embargo, durante la fase crítica de la enfermedad, los pacientes con DS mostraron niveles más altos de sICAM-1 comparado con los pacientes diagnosticados con DSSA/DCSA ($X=50.1$ ng/mL y $X=92.0$ ng/mL respectivamente; $p=0.002$) (Figura 29a). Por su parte, los niveles de sVCAM-1, fueron significativamente más altos ($p=0.012$) en pacientes con DS durante la fase aguda de la enfermedad ($X=96.5$ ng/mL) comparado con los pacientes identificados con las

entidades clínicas de DSSA/DCSA ($X=43.4$ ng/mL); en tanto que durante la fase crítica de la enfermedad fueron similares entre ambos grupos de pacientes ($p=0.268$) (Figura 29b).

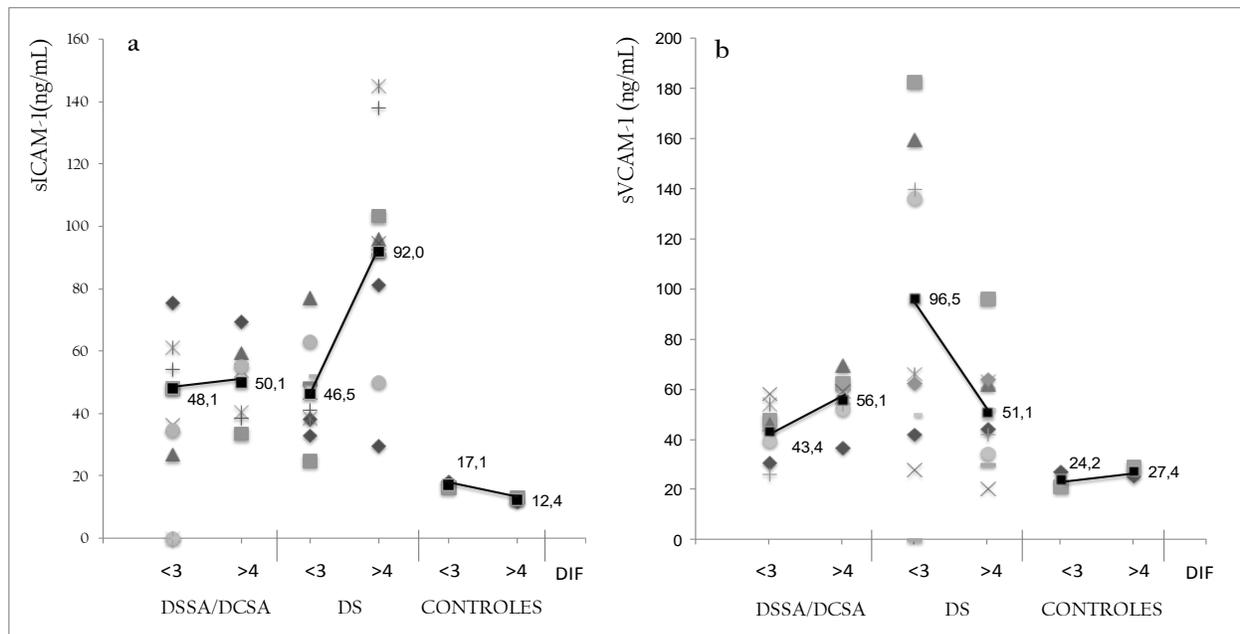


Figura 29. Niveles de sICAM-1 (ng/mL) (a) y sVCAM-1 (ng/mL) (b) en pacientes con dengue sin signos de alarma/dengue con signos de alarma (DSSA/DCSA) y dengue severo (DS) determinados durante el curso de la enfermedad y ajustados según el día de inicio de la fiebre (DIF). Las muestras fueron procesadas por triplicado y los cuadros negros indican el valor promedio de cada grupo.

5.3.4 Niveles de sIL-2R y sTNF-Rp75

Las muestras de suero de 33 pacientes con diagnóstico de dengue en la fase aguda y crítica de la enfermedad, fueron empleadas para determinar los valores de sIL-2R y sTNF-Rp75. De este grupo de pacientes, 39.4% (13/33) fueron clasificados desde el punto de vista clínico como DSSA/DCSA y 60.6% (20/33) como DS. En la fase aguda de la enfermedad, los niveles de sIL-2R fueron significativamente más altos en el grupo de pacientes con DS comparado con el conjunto de pacientes reconocidos como DSSA/DCSA ($X=501.0$ ng/mL y $X=298.7$ ng/mL respectivamente; $p=0.016$). Sin embargo, en la fase crítica, los niveles de sIL-2R fueron más elevados en pacientes con DSSA/DCSA en contraste con los pacientes clínicamente conocidos como DS ($X=483.0$ ng/mL y $X=312.4$ ng/mL respectivamente; $p=0.022$), en quienes los niveles de este marcador de activación linfocítica mostró una significativa disminución (Figura 30a). En relación a la forma soluble del receptor de TNF (sTNF-Rp75), los niveles fueron más

altos en pacientes con DSSA/DCSA y DS durante la fase crítica de la enfermedad en comparación con la fase aguda donde se observaron niveles similares entre ambos grupos de pacientes ($X=25.4$ ng/mL y $X=29.4$ ng/mL respectivamente).

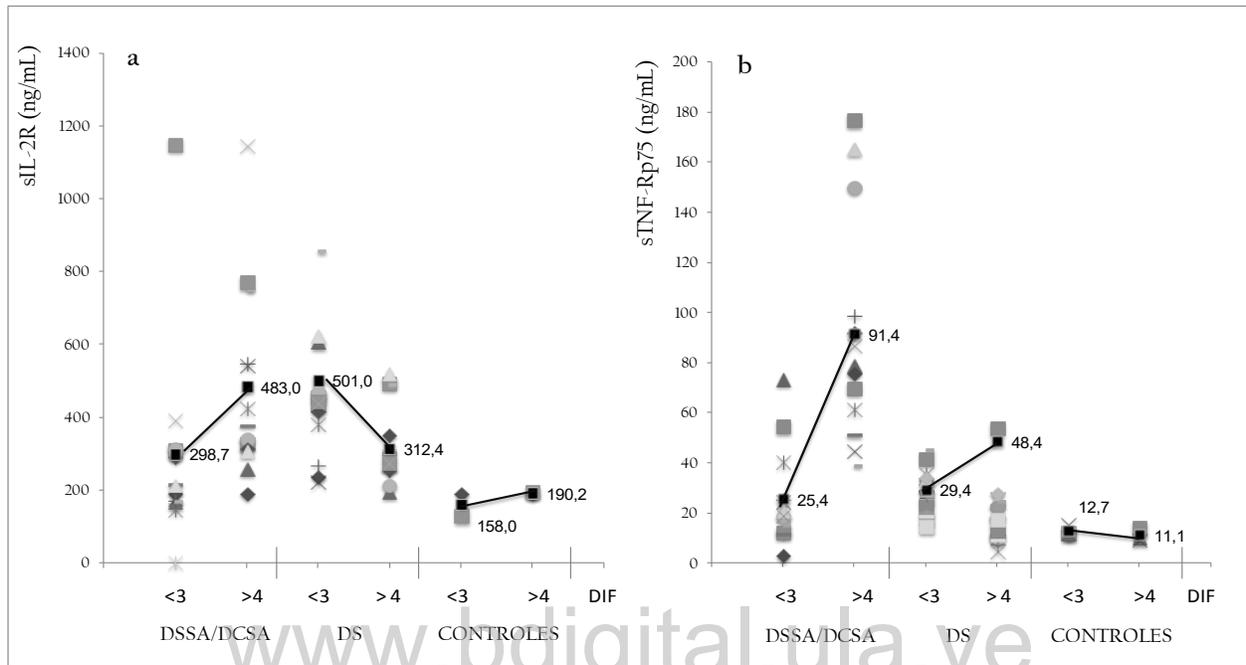


Figura 30. Niveles de sIL-2R (ng/mL) (a) y sTNF-Rp75 (ng/mL) (b) en pacientes con dengue sin signos de alarma/dengue con signos de alarma (DSSA/DCSA) y dengue severo (DS) determinados durante el curso de la enfermedad y ajustados según el día de inicio de la fiebre (DIF). Las muestras fueron procesadas por triplicado y los cuadros negros indican el valor promedio de cada grupo.

Por su parte, durante la fase crítica de la enfermedad, los pacientes cursando con cuadros de DSSA/DCSA mostraron un significativo incremento de este marcador soluble al contrastarlo con el grupo de pacientes diagnosticados con DS ($X= 91.4$ ng/mL y $X= 48.4$ ng/mL respectivamente; $p<0.001$) (Figura 30b).

5.4 DISCUSION

Varios son los mecanismos involucrados en la patogénesis del DENV, sin embargo, uno de los más estudiados ha sido la identificación de factores solubles capaces de inducir cambios en la funcionalidad de las células endoteliales y con ello generar un significativo incremento de la permeabilidad capilar, una condición característica de las formas graves de la enfermedad (301). Al respecto, se han observado resultados contradictorios, esencialmente al analizar marcadores inmunes pronóstico en la infección por el DENV, debido básicamente a diferencias en el diseño experimental de los estudios y el periodo de la enfermedad en el cual se toman las muestras biológicas, un escenario que en conjunto conduce a resultados divergentes (82).

El TNF- α , es un potente mediador pro-inflamatorio, una citoquina con importantes propiedades pleiotropicas como el efecto antiviral que ejerce sobre algunos virus, entre otras (302). El incremento de esta citoquina, se ha descrito en pacientes con DS en contraste con pacientes a quienes se les ha diagnosticado cuadros de DSSA/DCSA, asociando sus altos niveles séricos, a episodios de trombocitopenia, activación de células endoteliales y manifestaciones hemorrágicas (162, 303), sumado al hecho de que altos niveles de TNF- α , no afectan la replicación viral del DENV e inhiben los mecanismos intracelulares de subsistencia celular induciendo apoptosis (304). En vista de que el TNF- α tiene una vida media muy corta en circulación sanguínea, en este estudio se determinaron los niveles de este mediador soluble de acuerdo a la fase clínica de la enfermedad. Al respecto, se observó incremento de TNF- α en las formas no severas del dengue (DSSA/DCSA) durante la fase aguda de la enfermedad disminuyendo hacia la fase crítica. No obstante, se advirtió un significativo incremento en la fase crítica de la enfermedad pero en pacientes con cuadro clínico de DS.

La mayoría de los modelos celulares y animales que tratan de explicar la inmunopatogenia del DENV, han revelado que el TNF- α , es liberado a partir de un conjunto de células de la respuesta inmune (sistema monocito-macrófago, linfocitos T y B) responsables de regular los altos niveles circulantes de esta citoquina, que pueden a su vez, inducir la patogénesis viral y actuando de una manera autocrina o paracrina modular la replicación del virus en las células infectadas (305). De hecho, en la infección por el DENV, el daño tisular y celular es mediado

por el TNF- α y este efecto puede ser bloqueado tras la adición de anticuerpos anti- TNF- α (302).

Por ende, altas concentraciones de TNF- α en pacientes con DS durante la fase crítica de la enfermedad, es responsable en buena medida de la activación de células endoteliales, aumento de la permeabilidad capilar, extravasación plasmática, activación del sistema fibrinolítico y apoptosis de linfocitos T y células de la vasculatura endotelial (82).

A pesar de los reportes sobre el incremento sustancial del TNF- α y sus receptores solubles en pacientes con dengue, la dinámica de este mediador inmune en las fases clínicas de la enfermedad aún no se conoce con exactitud (306). Considerando la importancia fisiopatológica del sTNF-Rp75 en la regulación de la biodisponibilidad del TNF- α , en este estudio se determinaron los niveles de este receptor en pacientes con DSSA/DCSA y DS. En este sentido, se observó un significativo incremento en los niveles del sTNF-Rp75 durante la fase crítica de la enfermedad en pacientes con las formas clínicas no complicadas del dengue en contraste con los pacientes que cursaban con DS.

Si bien las formas solubles de los dos receptores del TNF (sTNF-Rp55 y sTNF-Rp75) pueden reducir la actividad biológica de esta citoquina, también logran mejorar su función estabilizando el oligómero activo (306). Wang y colaboradores hallaron que los bajos niveles en la expresión de una de las formas del receptor de TNF asociados a membranas (mTNFR1), se correlacionan elocuentemente con pacientes que progresan hacia DS, en contraposición a lo descrito para los diferentes niveles de TNF- α , sus receptores solubles u otros receptores de membrana. Por ende, una rápida disminución del mTNFR1 sobre la superficie celular y su posterior desprendimiento de la membrana proporcionando un mecanismo de inhibición de la actividad del TNF- α circulante (140). Fernández-Mestre y colaboradores, encontraron un revelador incremento del alelo TNF-308A en pacientes con DS a diferencia de los pacientes con DSSA/DCSA, por consiguiente, los pacientes que exhiban esta condición, están genéticamente predispuestos a expresar altos niveles del TNF- α (142). El desprendimiento del mTNFR1, contribuiría a bloquear los altos niveles del TNF- α tras la activación de los monocito/macrófagos durante las fases iniciales de la enfermedad y de este modo proteger las células endoteliales del daño celular propio de la fase crítica en pacientes con DS (306).

Realizar otros estudios de polimorfismo del TNF- α en Venezuela, dilucidaría el papel de esta citoquina pro-inflamatoria en nuestra población frente a múltiples escenarios de hiperendemicidad por dengue.

La IL-8 es una quemoquina producida de forma masiva por los monocitos, células endoteliales y hepatocitos. La hepatitis y el daño causado por el DENV a las células endoteliales, conduce definitivamente un incremento de este mediador pro-inflamatorio. Es conocido que la IL-8 tiene un efecto sobre la expresión de moléculas de adhesión y proteínas de unión intracelular, además de contribuir a generar un estado pro-coagulante durante la infección por el DENV(144). En este estudio, se observó aumento de los niveles de IL-8 sólo durante la etapa crítica de la enfermedad, en correlación con la gravedad de la enfermedad.

La regulación positiva de IL-8 por las células endoteliales, acoplada a otras citoquinas pro-inflamatorias, se correlaciona con varios fenómeno durante la infección por el DENV, incluyendo la replicación de fragmentos del genoma viral (NS4b/NS5) y la estimulación en su producción por anticuerpos anti-NS1 (150, 307).

Priyadarshini y colaboradores, hallaron variaciones en los niveles de IL-8 entre el día 2-5 de la enfermedad preferentemente en pacientes con manifestaciones hemorrágicas comparado con las formas no complicadas del dengue (300). Por lo tanto, la diversificación en el momento de la colección de muestras biológicas según las fases de la enfermedad explicaría la rápida liberación de IL-8 durante la evolución del cuadro clínico. Se necesitan más estudios para dilucidar la estructura genética relacionada con el perfil de citoquinas y las poblaciones. Además, los niveles séricos de IL-8 se asocian a la gravedad de la enfermedad y tienen el mayor impacto durante la etapa crítica momento en el cual se produce el mayor daño a las células de la vasculatura endotelial.

Citoquinas como el TNF- α y la IL-8, tiene un efecto trascendental sobre la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales. En este estudio, la circulación de la forma soluble de ICAM-1 (sICAM-1), fue perceptiblemente más elevada en pacientes con DS, mientras que en los casos de DSSA/DCSA los niveles de esta molécula soluble aumentaron solo durante la fase crítica de la enfermedad. Curiosamente, se

observaron niveles altos de VCAM-1 soluble (sVCAM-1) en los tres primeros días de la enfermedad (fase aguda) en pacientes con DS.

Cardier y colaboradores encontraron que los sueros de pacientes en la fase aguda de la enfermedad inducían un aumento de ICAM-1 sobre células endoteliales (HMEC-1). Este efecto no fue reproducible en su totalidad si se empleaba suero de pacientes que se encontrasen en la fase convaleciente de la enfermedad (162). Asimismo, observaron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de sICAM-1 y sVCAM-1 en pacientes con formas graves de dengue (84). Por su parte, Koraka y colaboradores, encontraron en niños con infección por el DENV, niveles elevados de VCAM-1 en la fase aguda de la enfermedad un evento asociado a la severidad del cuadro clínico (308). De esta manera, sVCAM-1 sería un importante marcador temprano para predecir la ocurrencia de casos graves de dengue.

La IL-2 se considera un importante marcador de activación del sistema inmune y proliferación de celular, con la capacidad de inducir la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ y TNF- α con lo cual se potencia la activación y el daño a las células endoteliales. Después de la activación de células mononucleares, una forma soluble de la cadena alfa del IL-2R (sIL-2Ra o CD25) es liberado por escisión proteolítica en la superficie celular (309).

Se ha demostrado que el sIL-2R está presente en proporciones más altas en el suero de individuos afectados por diversas condiciones patológicas, como enfermedades neoplásicas, autoinmunidad así como enfermedades infecciosas de tipo viral (VIH/SIDA, sarampión y hepatitis) y parasitarias (309). Valero y colaboradores, encontraron un aumento en los niveles de sIL-2R e sICAM en pacientes con formas leves de dengue así como en casos complicados de la enfermedad, relacionándolos particularmente con diferentes grados de severidad del dengue (147).

En contraste, en este estudio, se observó aumento en los niveles de sIL-2R en pacientes con dengue en comparación con el control; sin embargo, hubo una significativa liberación de este receptor soluble en las primeras etapas de la enfermedad en pacientes con DS en contraste con pacientes los pacientes con DSSA/DCSA en quienes se observaron altos niveles de sIL-2R solo durante la fase crítica de la enfermedad. En Tailandia, Kurane y colaboradores encontraron en poblaciones pediátricas con dengue, niveles más elevados de sIL-2R, sCD4 y

sCD8 en las formas graves de la enfermedad a diferencia de las formas clásicas del dengue, fundamentalmente durante los días 3 y 4 después del inicio del cuadro febril, iniciando la etapa crítica de esta patología viral. Estos autores no encontraron diferencias en los niveles de linfoquinas entre los pacientes con dengue leve o complicado; no obstante, la mayoría de los pacientes admitidos en el estudio, ingresaron cuando los síntomas ya eran graves cursando incluso con una respuesta inmune notablemente decrecida (310).

En nuestra cohorte de pacientes, los niveles de sIL-2R fueron significativamente mayores durante los días 1-3 luego de la aparición del cuadro febril, previo a la etapa crítica, extravasación plasmática e instauración de casos graves de dengue. Las infecciones por otros virus como el VIH, Hepatitis B, Epstein Barr y sarampión, han revelado un aumento en los niveles de sIL-2R en las primeras etapas de la enfermedad, incluso antes de la aparición de los síntomas; sin embargo, sólo en la infección por el VIH se ha visto una importante correlación entre los niveles de este receptor soluble y la progresión hacia la etapa de SIDA (309). Por lo tanto, altos niveles de sIL-2R, reflejan la activación temprana del sistema inmune con la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y la activación de células endoteliales, un evento que podría ser considerado como marcador predictivo del inicio de las formas graves del dengue. Al respecto, es necesario realizar estudios adicionales incluyendo un universo poblacional más grande, pues en este estudio la capacidad del tamaño de muestreo para los múltiples análisis fue limitado en buena medida por el volumen de evaluaciones a realizar a cada paciente (RT-qPCR, serología IgM anti-dengue, determinación de citoquinas y hemogramas entre otros).

En conclusión, aquí destacamos conocimientos inherentes a factores solubles (citoquinas y receptores) asociados a la disfunción endotelial, indicio de la pérdida de plasma una condición característica de las formas graves del dengue. Se observó aumento de sIL-2R y sVCAM-1 en las fases iniciales de la enfermedad un hecho asociado significativamente a las formas graves del dengue, lo que podría operar como marcadores de severidad en pacientes que evolucionan hacia DS. Las citoquinas como TNF- α e IL-8 tiene un importante efecto sobre la expresión de moléculas de adhesión celular por lo que una elevación en los niveles de sTNF-Rp75 durante la etapa crítica de los pacientes con formas no complicadas de la infección, no así en las formas graves, aumenta su contribución para bloquear los altos niveles del TNF- α secretado tras la activación del sistema monocito-macrófago durante la etapa inicial de la enfermedad así

como lograr la protección de las células endoteliales durante las etapas críticas. Finalmente, el perfil de citoquinas identificado en pacientes con dengue representa una herramienta valiosa para la caracterización de grupos en riesgo de desarrollar las formas más graves y complicadas de esta entidad infecciosa.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO 6

RECOMENDACIONES, PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES

www.bdigital.ula.ve

Muchos países y las principales organizaciones internacionales han establecido estrategias para enfrentar la reemergencia del dengue. Las investigaciones relacionadas con el virus, el hospedador, el vector y su interacción en un ecosistema determinado pueden ayudar a controlar esta enfermedad. La estrategia general promovida por la OMS desde 1995 hasta la fecha, para prevenir y controlar el dengue comprende cinco elementos básicos: 1) El control del vector con la participación de la comunidad y de todos los sectores de la sociedad; 2) La vigilancia activa de la enfermedad, basada en la vigilancia clínica (con el apoyo de laboratorios capaces de detectar tempranamente las epidemias) y la vigilancia del nivel de infestación del vector (que permite monitorear y evaluar los programas de control); 3) La preparación para las emergencias, mediante planes de contingencia que contemplen la preparación del personal médico para situaciones urgentes, la hospitalización, la atención y el tratamiento de los enfermos y el control del vector; 4) El entrenamiento y el fortalecimiento de la capacidad nacional para la vigilancia, el diagnóstico de laboratorio, el cuidado y el tratamiento de los casos, así como para el control del vector y 5) La investigación sobre todos los temas relacionados con el control del vector.

La voluntad política, la participación de la comunidad y la aplicación de la legislación sanitaria son principios básicos para lograr el control de esta enfermedad. Según esas guías, cada país debe desarrollar su propia estrategia para la prevención, basada en un plan de control del vector con la participación de toda la comunidad. La vigilancia clínica y epidemiológica con apoyo del laboratorio y la vigilancia entomológica, que abarca el estudio de la resistencia del vector a insecticidas, deben ser los pilares principales de esa estrategia. El objetivo de la vigilancia es detectar tempranamente la introducción del virus en el país o el aumento de su circulación para poner en marcha rápidamente las medidas de control necesarias

En los últimos 10 años se ha avanzado notablemente en el conocimiento del dengue, en particular en el desarrollo de vacunas y en la caracterización de la respuesta inmunitaria y de las propiedades moleculares del virus. Por otro lado, los países han adquirido una mayor conciencia del peligro que representa esta enfermedad y del riesgo que corren nuestras poblaciones durante los próximos 20 a 30 años. No obstante, todavía hay muchos aspectos que se deben investigar. Al respecto, este trabajo aspectos fundamentales de las prioridades a investigar en dengue: a) Llevó a cabo investigaciones básicas para conocer mejor el virus así

como la dinámica de la transmisión viral; b) Perfeccionó nuevas técnicas y tecnologías de diagnóstico eficaces para el diagnóstico precoz de la enfermedad; c) Propuso estudios filogenéticos y de epidemiología molecular para mejorar el conocimiento sobre el origen y circulación de los cuatro serotipos del DENV y d) Dentro del conocimiento de la inmunopatogenia de la enfermedad, planteó posibles marcadores biológicos como elementos predictores del desarrollo de casos complicados o graves de dengue.

En la actualidad no se cuenta con otros medios para el control del dengue y de su forma más grave, que el control de su vector. La OMS y ha llamado a todos los países a adoptar las medidas necesarias que contribuyan a disminuir la carga de la enfermedad y su impacto médico y socioeconómico. Se espera que una respuesta internacional coordinada y eficaz y el desarrollo de investigaciones epidemiológicas, clínicas y virológicas en las que se conjuguen los más avanzados métodos y técnicas permitan revertir la tendencia epidemiológica ascendente del dengue y coadyuven a su control.

En conclusión los principales aportes de esta tesis en la investigación sobre el dengue fueron:

- 1.- La estandarización y validación de una técnica de amplificación por la tecnología qPCR, a partir de tres regiones genómicas del DENV, para la identificación y serotipificación temprana del virus en humanos.
- 2.- Exaltar que el diagnóstico temprano de la infección por la técnica de RT-qPCR es un paso fundamental tanto para el manejo clínico de cada individuo afectado, como para el establecimiento de estrategias que minimicen el impacto de la enfermedad en la salud pública.
- 3.- Proponer la incorporación de la técnica de RT-qPCR para los estudios epidemiológicos rutinarios en los diversos distritos del Estado Mérida y así establecer mapas situacionales que identifiquen los serotipos virales circulantes en cada Municipio. Estos parámetros de hiperendemicidad son fundamentales para prever la ocurrencia de formas severas del dengue.
- 4.- El aislamiento del genoma viral completo permitió conocer la epidemiología molecular y análisis filogenético de las cepas virales circulantes en el Estado Mérida.

5.- La identificación de marcadores inmunológicos (sVCAM-1 y sIL2-R) como elementos predictores trascendentales de la evolución de casos de DSSA/DCSA a casos severos del dengue durante la fase aguda de la enfermedad. Estos marcadores pudieran emplearse para advertir al médico durante las etapas epidémicas, sobre la presentación de casos clínicos de dengue con un alto grado de severidad. Al respecto, estudios futuros dirigidos hacia el mejor conocimiento de la inmunopatogenia del dengue en nuestra población, permitirán predecir la capacidad de inmunorespuesta protectora para el desarrollo de vacunas contra el dengue.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO 7

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

www.bdigital.ula.ve

1. Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, and Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(2):200-7.
2. Ooi EE, Goh KT, and Gubler DJ. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(6):887-93.
3. Organization WH. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition*. Geneva; 2009.
4. Back AT, and Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infection ecology & epidemiology*. 2013;3(
5. Mangold KA, and Reynolds SL. A review of dengue fever: a resurging tropical disease. *Pediatric emergency care*. 2013;29(5):665-9; quiz 70-1.
6. Gubler DJ. In: Gubler DJ, and Kuno G eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: CAB International*. 1997:1-22.
7. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1952;1(1):30-50.
8. Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*. 1998;27(2):227-34.
9. Kouri G. [Dengue, a growing problem of health in the Americas]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2006;19(3):143-5.
10. Rodriguez-Roche R, and Gould EA. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *BioMed research international*. 2013;2013(690835).
11. Guzman MG, Garcia G, and Kouri G. [Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2006;19(3):204-15.
12. Gubler DJ, Reiter P, Ebi KL, Yap W, Nasci R, and Patz JA. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environmental health perspectives*. 2001;109 Suppl 2(223-33).
13. Guzman MG, Kouri G, Martinez E, Bravo J, Riveron R, Soler M, Vazquez S, and Morier L. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1987;21(3):270-9.
14. Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Soler M, Morier L, Vazquez S, Diaz A, Fernandez R, Ruiz A, Ramos A, et al. [Dengue in Cuba: history of an epidemic]. *Revista cubana de medicina tropical*. 1988;40(2):29-49.
15. Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Soler M, and Martinez E. Sequential infection as risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) during the 1981 dengue hemorrhagic Cuban epidemic. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1991;86(3):367.
16. Guzman MG, Triana C, Bravo J, and Kouri G. [The estimation of the economic damages caused as a consequence of the epidemic of hemorrhagic dengue in Cuba in 1981]. *Revista cubana de medicina tropical*. 1992;44(1):13-7.
17. Anez G, Balza R, Valero N, and Larreal Y. [Economic impact of dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Zulia, Venezuela, 1997-2003]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2006;19(5):314-20.
18. Perera R, and Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology*. 2008;11(4):369-77.
19. Alvarez DE, Lodeiro MF, Filomatori CV, Fucito S, Mondotte JA, and Gamarnik AV. Structural and functional analysis of dengue virus RNA. *Novartis Foundation symposium*. 2006;277(120-32; discussion 32-5, 251-3).
20. Filomatori CV, Lodeiro MF, Alvarez DE, Samsa MM, Pietrasanta L, and Gamarnik AV. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes & development*. 2006;20(16):2238-49.
21. Condit RC. *Principles of Virology*. London-New York-Tokio: Lippincott William & Wilkins; 2001.
22. Gebhard LG, Filomatori CV, and Gamarnik AV. Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*. 2011;3(9):1739-56.

23. Iglesias NG, and Gamarnik AV. Dynamic RNA structures in the dengue virus genome. *RNA biology*. 2011;8(2):249-57.
24. resources DA wptdi. www.dengueinfo.org; 2007.
25. Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, and Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*. 2008;319(5871):1834-7.
26. Yu L, Nomaguchi M, Padmanabhan R, and Markoff L. Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology*. 2008;374(1):170-85.
27. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, and Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual review of microbiology*. 1990;44(649-88).
28. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002;108(5):717-25.
29. Klein DE, Choi JL, and Harrison SC. Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. *Journal of virology*. 2013;87(4):2287-93.
30. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, Atkinson JP, and Diamond MS. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS pathogens*. 2007;3(11):e183.
31. Chuang YC, Wang SY, Lin YS, Chen HR, and Yeh TM. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *Journal of biomedical science*. 2013;20(42).
32. Muller DA, and Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral research*. 2013;98(2):192-208.
33. Shafee N, and AbuBakar S. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 8):2191-5.
34. Amberg SM, and Rice CM. Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing. *Journal of virology*. 1999;73(10):8083-94.
35. Wu CF, Wang SH, Sun CM, Hu ST, and Syu WJ. Activation of dengue protease autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *Journal of virological methods*. 2003;114(1):45-54.
36. Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, Coutard B, Decroly E, de Lamballerie X, Gould EA, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral research*. 2010;87(2):125-48.
37. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, and Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of virology*. 1991;65(5):2467-75.
38. Preugschat F, and Strauss JH. Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology*. 1991;185(2):689-97.
39. Zhang L, Mohan PM, and Padmanabhan R. Processing and localization of Dengue virus type 2 polyprotein precursor NS3-NS4A-NS4B-NS5. *Journal of virology*. 1992;66(12):7549-54.
40. Rawlinson SM, Pryor MJ, Wright PJ, and Jans DA. Dengue virus RNA polymerase NS5: a potential therapeutic target? *Current drug targets*. 2006;7(12):1623-38.
41. Wiwanitkit V. Unusual mode of transmission of dengue. *Journal of infection in developing countries*. 2010;4(1):51-4.
42. Berberian G, Farina D, Rosanova MT, Hidalgo S, Enria D, Mitchenko A, Moreno J, and Sanchez Soto I. [Perinatal dengue infection]. *Archivos argentinos de pediatria*. 2011;109(3):232-6.
43. Pouliot SH, Xiong X, Harville E, Paz-Soldan V, Tomashek KM, Breart G, and Buekens P. Maternal dengue and pregnancy outcomes: a systematic review. *Obstetrical & gynecological survey*. 2010;65(2):107-18.

44. Tomashek KM, and Margolis HS. Dengue: a potential transfusion-transmitted disease. *Transfusion*. 2011;51(8):1654-60.
45. Dias LL, Amarilla AA, Poloni TR, Covas DT, Aquino VH, and Figueiredo LT. Detection of dengue virus in sera of Brazilian blood donors. *Transfusion*. 2012;52(8):1667-71.
46. Saigal S, Choudhary NS, Saraf N, Kataria S, Mohanka R, and Soin AS. Transmission of dengue virus from a donor to a recipient after living donor liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2013;19(12):1413-4.
47. Wagner D, de With K, Huzly D, Hufert F, Weidmann M, Breisinger S, Eppinger S, Kern WV, and Bauer TM. Nosocomial acquisition of dengue. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(10):1872-3.
48. Higa Y, Yen NT, Kawada H, Son TH, Hoa NT, and Takagi M. Geographic distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* collected from used tires in Vietnam. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2010;26(1):1-9.
49. Jansen CC, and Beebe NW. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2010;12(4):272-9.
50. Thirion J. *El mosquito Aedes aegypti y el Dengue en Mexico*. Mexico; 2003.
51. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(3):480-96.
52. Zhang L, and Padmanabhan R. Role of protein conformation in the processing of dengue virus type 2 nonstructural polyprotein precursor. *Gene*. 1993;129(2):197-205.
53. Modis Y, Ogata S, Clements D, and Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004;427(6972):313-9.
54. Acosta EG, Castilla V, and Damonte EB. Differential requirements in endocytic trafficking for penetration of dengue virus. *PloS one*. 2012;7(9):e44835.
55. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, and Smit JM. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS pathogens*. 2008;4(12):e1000244.
56. Lee E, Wright PJ, Davidson A, and Lobigs M. Virulence attenuation of Dengue virus due to augmented glycosaminoglycan-binding affinity and restriction in extraneural dissemination. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 10):2791-801.
57. Kato D, Era S, Watanabe I, Arihara M, Sugiura N, Kimata K, Suzuki Y, Morita K, Hidari KI, and Suzuki T. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. *Antiviral research*. 2010;88(2):236-43.
58. Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, and Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *Journal of virology*. 2005;79(8):4557-67.
59. Jindadamrongwech S, Thepparit C, and Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Archives of virology*. 2004;149(5):915-27.
60. Chen YC, Wang SY, and King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *Journal of virology*. 1999;73(4):2650-7.
61. Tio PH, Jong WW, and Cardoso MJ. Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMR1) interaction with dengue virus serotypes 1, 2 and 3. *Virology journal*. 2005;2(25).
62. Thepparit C, and Smith DR. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *Journal of virology*. 2004;78(22):12647-56.
63. Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, and Gordon S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS pathogens*. 2008;4(2):e17.
64. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, and Despres P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO reports*. 2003;4(7):723-8.

65. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(7):823-9.
66. Alen MM, Dallmeier K, Balzarini J, Neyts J, and Schols D. Crucial role of the N-glycans on the viral E-envelope glycoprotein in DC-SIGN-mediated dengue virus infection. *Antiviral research*. 2012;96(3):280-7.
67. Guzman MG, Alvarez M, and Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of virology*. 2013;158(7):1445-59.
68. Chan KR, Zhang SL, Tan HC, Chan YK, Chow A, Lim AP, Vasudevan SG, Hanson BJ, and Ooi EE. Ligation of Fc gamma receptor IIB inhibits antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(30):12479-84.
69. Matsuda T, Almasan A, Tomita M, Tamaki K, Saito M, Tadano M, Yagita H, Ohta T, and Mori N. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of general virology*. 2005;86(Pt 4):1055-65.
70. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature medicine*. 2000;6(7):816-20.
71. Navarro-Sanchez E, Despres P, and Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Archives of medical research*. 2005;36(5):425-35.
72. Kurane I, Janus J, and Ennis FA. Dengue virus infection of human skin fibroblasts in vitro production of IFN-beta, IL-6 and GM-CSF. *Archives of virology*. 1992;124(1-2):21-30.
73. Rice CM. *Principles of Virology*. 1996.
74. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, and Sonenberg N. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & development*. 1999;13(11):1422-37.
75. Edgil D, Polacek C, and Harris E. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *Journal of virology*. 2006;80(6):2976-86.
76. Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, and Gamarnik AV. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*. 2005;339(2):200-12.
77. Alvarez DE, Lodeiro MF, Luduena SJ, Pietrasanta LI, and Gamarnik AV. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *Journal of virology*. 2005;79(11):6631-43.
78. Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, and Khromykh AA. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *Journal of virology*. 1997;71(9):6650-61.
79. Bartenschlager R, and Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future microbiology*. 2008;3(2):155-65.
80. Edgil D, Diamond MS, Holden KL, Paranjape SM, and Harris E. Translation efficiency determines differences in cellular infection among dengue virus type 2 strains. *Virology*. 2003;317(2):275-90.
81. Diamond MS. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunology and cell biology*. 2003;81(3):196-206.
82. Martina BE, Koraka P, and Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(4):564-81.
83. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, and Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgraduate medical journal*. 2004;80(948):588-601.
84. Cardier JE, Rivas B, Romano E, Rothman AL, Perez-Perez C, Ochoa M, Caceres AM, Cardier M, Guevara N, and Giovannetti R. Evidence of vascular damage in dengue disease: demonstration of high levels of soluble cell adhesion molecules and circulating endothelial cells. *Endothelium : journal of endothelial cell research*. 2006;13(5):335-40.

85. Guzman MG, and Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet infectious diseases*. 2002;2(1):33-42.
86. Pizarro D. Dengue, Dengue hemorrágico. *Acta pediátr costarric*. 2009;21(1):8-17.
87. Chatterjee TK, Nayak K, Som S, Chatterjee S, Chaudhuri N, and Mukherjee B. Serological aspects of Dengue fever and its correlation with clinical features in a recent febrile outbreak. *Indian journal of public health*. 2007;51(2):130-1.
88. Comach G, Blair PJ, Sierra G, Guzman D, Soler M, de Quintana MC, Bracho-Labadie M, Camacho D, Russell KL, Olson JG, et al. Dengue virus infections in a cohort of schoolchildren from Maracay, Venezuela: a 2-year prospective study. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2009;9(1):87-92.
89. Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2006;20(6):407-15.
90. Kankirawatana P, Chokephaibulkit K, Puthavathana P, Yoksan S, Apintanapong S, and Pongthapisit V. Dengue infection presenting with central nervous system manifestation. *Journal of child neurology*. 2000;15(8):544-7.
91. Premaratna R, Pathmeswaran A, Amarasekara ND, Motha MB, Perera KV, and de Silva HJ. A clinical guide for early detection of dengue fever and timing of investigations to detect patients likely to develop complications. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103(2):127-31.
92. Mendez A, and Gonzalez G. [Abnormal clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in children]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2006;26(1):61-70.
93. Martinez E. Dengue. *Estudos Avançados*. 2008;22(64):33-52.
94. Gupta N, Kulkarni AV, Sinha N, Jhamb R, and Gulati S. Dengue hemorrhagic fever complicated with encephalopathy and myocarditis. *The Journal of communicable diseases*. 2010;42(4):297-9.
95. Martins Sde T, Silveira GF, Alves LR, Duarte dos Santos CN, and Bordignon J. Dendritic cell apoptosis and the pathogenesis of dengue. *Viruses*. 2012;4(11):2736-53.
96. Torres S, Hernandez JC, Giraldo D, Arboleda M, Rojas M, Smit JM, and Urcuqui-Inchima S. Differential expression of Toll-like receptors in dendritic cells of patients with dengue during early and late acute phases of the disease. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(2):e2060.
97. Charnsilpa W, Takhampanya R, Endy TP, Mammen MP, Jr., Libraty DH, and Ubol S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. *Journal of medical virology*. 2005;77(1):89-95.
98. Espina LM, Valero NJ, Hernandez JM, and Mosquera JA. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;68(1):48-53.
99. Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, Balmaseda A, and Harris E. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 2008;376(2):429-35.
100. Lobigs M, Mullbacher A, and Lee E. Evidence that a mechanism for efficient flavivirus budding upregulates MHC class I. *Immunology and cell biology*. 2004;82(2):184-8.
101. Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, and Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clinical and experimental immunology*. 2006;143(2):345-56.
102. Nielsen DG. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virology journal*. 2009;6(211).
103. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, and Atkinson JP. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(4):793-806.
104. Dalrymple NA, and Mackow ER. Endothelial cells elicit immune-enhancing responses to dengue virus infection. *Journal of virology*. 2012;86(12):6408-15.
105. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(7):946-51.

106. Kurane I, and Ennis FA. Cytotoxic T lymphocytes in dengue virus infection. *Current topics in microbiology and immunology*. 1994;189(93-108).
107. Kurane I, Rothman AL, Livingston PG, Green S, Gagnon SJ, Janus J, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, and Ennis FA. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Archives of virology Supplementum*. 1994;9(59-64).
108. Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, Prestwood TR, Sette A, and Shresta S. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *Journal of immunology*. 2009;182(8):4865-73.
109. Friberg H, Bashyam H, Toyosaki-Maeda T, Potts JA, Greenough T, Kalayanaroj S, Gibbons RV, Nisalak A, Srikiatkachorn A, Green S, et al. Cross-reactivity and expansion of dengue-specific T cells during acute primary and secondary infections in humans. *Scientific reports*. 2011;1(51).
110. Beaumier CM, and Rothman AL. Cross-reactive memory CD4+ T cells alter the CD8+ T-cell response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. *Viral immunology*. 2009;22(3):215-9.
111. Luhn K, Simmons CP, Moran E, Dung NT, Chau TN, Quyen NT, Thao le TT, Van Ngoc T, Dung NM, Wills B, et al. Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(5):979-85.
112. Chaturvedi UC, Shrivastava R, Tripathi RK, and Nagar R. Dengue virus-specific suppressor T cells: current perspectives. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2007;50(3):285-99.
113. Schieffelin JS, Costin JM, Nicholson CO, Orgeron NM, Fontaine KA, Isern S, Michael SF, and Robinson JE. Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. *Virology journal*. 2010;7(28).
114. Noisakran S, and Perng GC. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Experimental biology and medicine*. 2008;233(4):401-8.
115. Rothman AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Advances in virus research*. 2003;60(397-419).
116. Halstead SB, Nimmannitya S, and Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *The Yale journal of biology and medicine*. 1970;42(5):311-28.
117. Burke DS, and Kliks S. Antibody-dependent enhancement in dengue virus infections. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(4):601-3; author reply 3-4.
118. Halstead SB, O'Rourke EJ, and Allison AC. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *The Journal of experimental medicine*. 1977;146(1):218-29.
119. Mathew A, and Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological reviews*. 2008;225(300-13).
120. Schmidt AC. Response to dengue fever--the good, the bad, and the ugly? *The New England journal of medicine*. 2010;363(5):484-7.
121. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, Puttikhunt C, Edwards C, Duangchinda T, Supasa S, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*. 2010;328(5979):745-8.
122. Corrales-Aguilar E, and Hun-Opfer L. Nuevas perspectivas sobre la patogénesis del dengue: New Perspectives on Dengue Pathogenesis. *Acta méd costarric*. 2012;54(2):75-85.
123. Guzman MG, Kouri G, and Halstead SB. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? *Lancet*. 2000;355(9218):1902-3.
124. Kurosu T, Chaichana P, Yamate M, Anantapreecha S, and Ikuta K. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;362(4):1051-6.
125. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Jairungsri A, Kanlaya R, Tangthawornchaikul N, Puttikhunt C, et al. Vascular leakage in severe dengue virus

infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(8):1078-88.

126. Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, and Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends in immunology*. 2007;28(4):184-92.

127. Aichele P, Brduscha-Riem K, Oehen S, Odermatt B, Zinkernagel RM, Hengartner H, and Pircher H. Peptide antigen treatment of naive and virus-immune mice: antigen-specific tolerance versus immunopathology. *Immunity*. 1997;6(5):519-29.

128. Selin LK, Cornberg M, Brehm MA, Kim SK, Calcagno C, Ghersi D, Puzone R, Celada F, and Welsh RM. CD8 memory T cells: cross-reactivity and heterologous immunity. *Seminars in immunology*. 2004;16(5):335-47.

129. Dong T, Moran E, Vinh Chau N, Simmons C, Luhn K, Peng Y, Wills B, Phuong Dung N, Thi Thu Thao L, Hien TT, et al. High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. *PloS one*. 2007;2(12):e1192.

130. Gagnon SJ, Ennis FA, and Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *Journal of virology*. 1999;73(5):3623-9.

131. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature medicine*. 2003;9(7):921-7.

132. Zompi S, and Harris E. Original antigenic sin in dengue revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(22):8761-2.

133. Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, Green S, Ennis FA, and Rothman AL. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185(12):1697-703.

134. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, Laferte J, Delgado J, and Cabrera MV. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerging infectious diseases*. 1998;4(1):89-92.

135. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, and Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *Journal of biomedical science*. 2001;8(5):377-88.

136. Rothman AL, and Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology*. 1999;257(1):1-6.

137. Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, and Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2000;28(3):183-8.

138. Chaturvedi U, Raghupathy R, Pacsa A, Elbishbishi E, Agarwal R, Nagar R, Misra A, Kapoor S, Mathur A, Khan M, et al. Shift from a th1-type response to th2-type in dengue haemorrhagic fever. *J Curr Sci* 1999;76(63-9).

139. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, Lew R, Innis BL, Kurane I, Rothman AL, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(4):755-62.

140. Wang L, Chen RF, Liu JW, Yu HR, Kuo HC, and Yang KD. Implications of dynamic changes among tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), membrane TNF receptor, and soluble TNF receptor levels in regard to the severity of dengue infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007;77(2):297-302.

141. Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, and Wu-Hsieh BA. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *Journal of virology*. 2007;81(11):5518-26.

142. Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, and Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue antigens*. 2004;64(4):469-72.
143. Bosch I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke RV, Fournier MV, Ennis FA, and Rothman AL. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *Journal of virology*. 2002;76(11):5588-97.
144. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, and Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 7):1801-13.
145. Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignacio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, and Kubelka CF. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96(2):229-32.
146. Pinto LM, Oliveira SA, Braga EL, Nogueira RM, and Kubelka CF. Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94(3):387-94.
147. Valero N, Larreal Y, Espina LM, Reyes I, Maldonado M, and Mosquera J. Elevated levels of interleukin-2 receptor and intercellular adhesion molecule 1 in sera from a venezuelan cohort of patients with dengue. *Archives of virology*. 2008;153(1):199-203.
148. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Chiu SC, and Lin YS. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *Journal of immunology*. 2002;169(2):657-64.
149. Wan SW, Lin CF, Yeh TM, Liu CC, Liu HS, Wang S, Ling P, Anderson R, Lei HY, and Lin YS. Autoimmunity in dengue pathogenesis. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2013;112(1):3-11.
150. Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *Journal of immunology*. 2005;174(1):395-403.
151. Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, Yu CC, and Chang HH. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5(11):2291-9.
152. Lin YS, Yeh TM, Lin CF, Wan SW, Chuang YC, Hsu TK, Liu HS, Liu CC, Anderson R, and Lei HY. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Experimental biology and medicine*. 2011;236(5):515-23.
153. Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Archives of virology*. 1997;142(5):897-916.
154. Chuang YC, Lin YS, Liu CC, Liu HS, Liao SH, Shi MD, Lei HY, and Yeh TM. Factors contributing to the disturbance of coagulation and fibrinolysis in dengue virus infection. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2013;112(1):12-7.
155. Guzman MG, and Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102(6):522-3.
156. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, and Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(8):1411-8.
157. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, and Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *Journal of immunology*. 1998;161(11):6338-46.

158. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, and Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2000;63(1-2):71-5.
159. Rosenberg RD. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states: clinical utility of activation peptide assays in predicting thrombotic events in different clinical populations. *Thrombosis and haemostasis*. 2001;86(1):41-50.
160. Peyrefitte CN, Pastorino B, Grau GE, Lou J, Tolou H, and Couissinier-Paris P. Dengue virus infection of human microvascular endothelial cells from different vascular beds promotes both common and specific functional changes. *Journal of medical virology*. 2006;78(2):229-42.
161. Bethell DB, Gamble J, Pham PL, Nguyen MD, Tran TH, Ha TH, Tran TN, Dong TH, Gartside IB, White NJ, et al. Noninvasive measurement of microvascular leakage in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001;32(2):243-53.
162. Cardier JE, Marino E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, and Rothman AL. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine*. 2005;30(6):359-65.
163. Limonta D, Capo V, Torres G, Perez AB, and Guzman MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007;40(1):50-4.
164. Huang YH, Liu CC, Wang ST, Lei HY, Liu HL, Lin YS, Wu HL, and Yeh TM. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *Journal of medical virology*. 2001;63(3):247-51.
165. Lei H-Y, Huang K-J, Lin Y-S, Yeh T-M, Liu H-S, and Liu C-C. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Infect Dis*. 2008.;4(1):1-9.
166. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, and da Rosa AT. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997;230(2):244-51.
167. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, and Halstead SB. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1999;354(9188):1431-4.
168. Añez G. Evolución molecular del virus dengue: un área de investigación prioritaria. . *Invest clín* 2007;48(3).
169. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, Ramos C, and Rico-Hesse R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of virology*. 1999;73(6):4738-47.
170. Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, and Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;65(5):427-34.
171. Cologna R, and Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *Journal of virology*. 2003;77(7):3929-38.
172. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, Castro O, Kouri G, Halstead SB, and Guzman MG. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(6):1113-7.
173. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of infectious diseases*. 2000;181(1):2-9.
174. Marcos E, and López C. Dengue: patogénesis y estado actual del desarrollo de vacunas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2009;40(3):203-13.

175. Tantawichien T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever in adolescents and adults. *Paediatrics and international child health*. 2012;32 Suppl 1(22-7).
176. Bravo JR, Guzman MG, and Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;81(5):816-20.
177. Tantracheewathorn T, and Tantracheewathorn S. Risk factors of dengue shock syndrome in children. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2007;90(2):272-7.
178. Kalayanarooj S, and Nimmannitya S. Is dengue severity related to nutritional status? *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2005;36(2):378-84.
179. Pawitan JA. Dengue virus infection: predictors for severe dengue. *Acta medica Indonesiana*. 2011;43(2):129-35.
180. Beck MA, Handy J, and Levander OA. Host nutritional status: the neglected virulence factor. *Trends in microbiology*. 2004;12(9):417-23.
181. Gamble J, Bethell D, Day NP, Loc PP, Phu NH, Gartside IB, Farrar JF, and White NJ. Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock? *Clinical science*. 2000;98(2):211-6.
182. Garcia-Rivera EJ, and Rigau-Perez JG. Dengue severity in the elderly in Puerto Rico. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2003;13(6):362-8.
183. Salgado DM, Rodriguez JA, Garzon M, Cifuentes G, Ibarra M, Vega MR, and Castro D. [Clinical and epidemiological characterisation of dengue haemorrhagic fever in Neiva, Colombia, 2004]. *Revista de salud publica*. 2007;9(1):53-63.
184. Angele MK, Frantz MC, and Chaudry IH. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. *Clinics*. 2006;61(5):479-88.
185. Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, and Chaudry IH. Gender differences in sepsis: Cardiovascular and immunological aspects. *Virulence*. 2013;5(1).
186. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever—a public health problem and a field for research. *Bulletin of the World Health Organization*. 1980;58(1):1-21.
187. Brown E, and Wasson V. Capillary fragility in girls. *The Journal of Pediatrics*. 1999;30(4):355-8.
188. Potts JA, and Rothman AL. Clinical and laboratory features that distinguish dengue from other febrile illnesses in endemic populations. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2008;13(11):1328-40.
189. Valdes L, Guzman MG, Kouri G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, Rosario D, and Vazquez S. [Epidemiology of dengue and hemorrhagic dengue in Santiago, Cuba 1997]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 1999;6(1):16-25.
190. Guzman MG, Kouri G, Soler M, Bravo J, Rodriguez de La Vega A, and Vazquez S. Dengue 2 virus enhancement in asthmatic and non-asthmatic individual. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;84(5):559-64.
191. Limonta D, Gonzalez D, Capo V, Torres G, Perez AB, Rosario D, Roche-Rodriguez R, Alvarez M, and Guzman MG. Fatal severe dengue and cell death in sickle cell disease during the 2001-2002 Havana dengue epidemic. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2009;13(2):e77-8.
192. Limonta D, Torres G, Capo V, and Guzman MG. Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*. 2008;5(3):213-4.
193. Chiewsilp P, Scott RM, and Bhamarapravati N. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1981;30(5):1100-5.
194. Paradoja M, Trujillo Y, and Basanta P. Association of dengue hemorrhagic fever with the HLA system. *Haematologia*. 1987;20(2):83-7.
195. Lan NT, and Hirayama K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Tropical medicine and health*. 2011;39(4 Suppl):73-81.
196. LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales J, Villarreal-Garza C, Higuera L, Hernandez-Pacheco G, Cutino-Moguel T, Rangel H, Figueroa R, et al. HLA-DR antigen frequencies in

- Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Human immunology*. 2002;63(11):1039-44.
197. Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, Schneider J, White NJ, Day NP, Farrar J, and Hill AV. Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *The Journal of infectious diseases*. 2001;184(11):1369-73.
198. Polizel JR, Bueno D, Visentainer JE, Sell AM, Borelli SD, Tsuneto LT, Dalalio MM, Coimbra MT, and Moliterno RA. Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(6):559-62.
199. Cooke GS, and Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nature reviews Genetics*. 2001;2(12):967-77.
200. Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, and Hill A. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;67(1):102-6.
201. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, Kalayanaroj SM, Tangnararatchakit K, Tangthawornchaikul N, Vasanawathana S, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nature genetics*. 2005;37(5):507-13.
202. Soundravally R, and Hoti SL. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. *Human immunology*. 2007;68(12):973-9.
203. de la CSB, Kouri G, and Guzman MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Archives of virology*. 2007;152(3):533-42.
204. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, Kanesa-Thanan N, Hayes CG, and Watts DM. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;65(3):180-3.
205. Zeller HG. [Dengue, arbovirus and migrations in the Indian Ocean]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique*. 1998;91(1):56-60.
206. de la CSB, Garcia G, Perez AB, Morier L, Alvarez M, Kouri G, and Guzman MG. Ethnicity and difference in dengue virus-specific memory T cell responses in Cuban individuals. *Viral immunology*. 2006;19(4):662-8.
207. Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro MT, Braga C, de Souza WV, Marques ET, and Cummings DA. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(1):e935.
208. Ong SH, Yip JT, Chen YL, Liu W, Harun S, Lystiyaningsih E, Heriyanto B, Beckett CG, Mitchell WP, Hibberd ML, et al. Periodic re-emergence of endemic strains with strong epidemic potential—a proposed explanation for the 2004 Indonesian dengue epidemic. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2008;8(2):191-204.
209. Holmes EC, Tio PH, Perera D, Muhi J, and Cardoso J. Importation and co-circulation of multiple serotypes of dengue virus in Sarawak, Malaysia. *Virus research*. 2009;143(1):1-5.
210. Ricco-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue virus serotype 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990;174(2):479-93.
211. Twiddy SS, Woelk CH, and Holmes EC. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 7):1679-89.
212. Holmes EC, and Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2003;3(1):19-28.
213. Bharaj P, Chahar HS, Pandey A, Diddi K, Dar L, Guleria R, Kabra SK, and Broor S. Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. *Virology journal*. 2008;5(1).
214. Lorono-Pino MA, Cropp CB, Farfan JA, Vorndam AV, Rodriguez-Angulo EM, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Beaty BJ, and Gubler DJ. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999;61(5):725-30.

215. Lai MM. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological reviews*. 1992;56(1):61-79.
216. Twiddy SS, and Holmes EC. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 2):429-40.
217. Tolou HJ, Couissinier-Paris P, Durand JP, Mercier V, de Pina JJ, de Micco P, Billoir F, Charrel RN, and de Lamballerie X. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 6):1283-90.
218. Tang KF, and Ooi EE. Diagnosis of dengue: an update. *Expert review of anti-infective therapy*. 2012;10(8):895-907.
219. Acosta-Bas C, and Gómez-Cordero I. Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomed*. 2005 16(113-37).
220. Malergue F, and Chungue E. Rapid and sensitive streptavidin-biotin amplified fluorogenic enzyme-linked immunosorbent-assay for direct detection and identification of dengue viral antigens in serum. *Journal of medical virology*. 1995;47(1):43-7.
221. Alcon-LePoder S, Sivard P, Drouet MT, Talarmin A, Rice C, and Flamand M. Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis. *Novartis Foundation symposium*. 2006;277(233-47; discussion 47-53).
222. Gowri Sankar S, Dhananjeyan KJ, Paramasivan R, Thenmozhi V, Tyagi BK, and John Vennison S. Evaluation and use of NS1 IgM antibody detection for acute dengue virus diagnosis: report from an outbreak investigation. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(1):E8-10.
223. Wu SJ, Lee EM, Putvatana R, Shurtliff RN, Porter KR, Suharyono W, Watts DM, King CC, Murphy GS, Hayes CG, et al. Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(8):2794-8.
224. Venezuela. Gdcnplpycdde. <http://www.reinaldogodoyeditor.com/subpaginas/>; 2004.
225. Yamada K, Takasaki T, Nawa M, and Kurane I. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2002;24(3):203-9.
226. Guzman MG, and Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1996;3(6):621-7.
227. Guzman MG, and Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2004;8(2):69-80.
228. Wan SW, Lin CF, Wang S, Chen YH, Yeh TM, Liu HS, Anderson R, and Lin YS. Current progress in dengue vaccines. *Journal of biomedical science*. 2013;20(37).
229. Bray M, and Lai CJ. Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(22):10342-6.
230. Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers TJ, Zhang ZX, Soike K, Ratterree M, Arroyo J, Georgakopoulos K, Catalan J, and Monath TP. Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *Journal of virology*. 2000;74(12):5477-85.
231. Guy B, Saville M, and Lang J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Human vaccines*. 2010;6(9).
232. Lang J. Recent progress on sanofi pasteur's dengue vaccine candidate. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;46 Suppl 2(S20-4).
233. Webster DP, Farrar J, and Rowland-Jones S. Progress towards a dengue vaccine. *The Lancet infectious diseases*. 2009;9(11):678-87.
234. Simmons M, Burgess T, Lynch J, and Putnak R. Protection against dengue virus by non-replicating and live attenuated vaccines used together in a prime boost vaccination strategy. *Virology*. 2010;396(2):280-8.

235. Zambrano-Mora B. Estado actual de las vacunas contra el Dengue. Perspectivas. *Rev Biomed* 2010;21(197-211).
236. Suzuki R, Winkelmann ER, and Mason PW. Construction and characterization of a single-cycle chimeric flavivirus vaccine candidate that protects mice against lethal challenge with dengue virus type 2. *Journal of virology*. 2009;83(4):1870-80.
237. Robert Putnak J, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, Bignami G, Hough HS, Chen RC, Barvir DA, et al. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine*. 2005;23(35):4442-52.
238. Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K, and Hayes C. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 1997;15(5):547-52.
239. Blair PJ, Kochel TJ, Raviprakash K, Guevara C, Salazar M, Wu SJ, Olson JG, and Porter KR. Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in *Aotus nancymae* monkeys. *Vaccine*. 2006;24(9):1427-32.
240. Ramanathan MP, Kuo YC, Selling BH, Li Q, Sardesai NY, Kim JJ, and Weiner DB. Development of a novel DNA SynCon tetravalent dengue vaccine that elicits immune responses against four serotypes. *Vaccine*. 2009;27(46):6444-53.
241. Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, Ballesteros G, Pierro AM, Gaibani P, Guo FP, et al. Single-reaction, multiplex, real-time rt-PCR for the detection, quantitation, and serotyping of dengue viruses. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(4):e2116.
242. Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M, Sierra G, Cuello de Uzcategui R, James WS, Turner S, et al. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 6):1569-75.
243. Oletta J. Dengue en América Latina y Venezuela. *Med Interna (Caracas)*. 2006;22(4):247-58.
244. Shu PY, and Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004;11(4):642-50.
245. Organization WH. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva, Switzerland; 1997.
246. Ramirez AH, Moros Z, Comach G, Zambrano J, Bravo L, Pinto B, Vielma S, Cardier J, and Liprandi F. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with dengue virus in Venezuela. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009;65(3):247-53.
247. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, and Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(3):545-51.
248. Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, and Gunther S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(7):2323-30.
249. Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, Lin TH, and Huang JH. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(6):2408-16.
250. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, and Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(4):1295-304.
251. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, and Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1984;33(1):158-65.
252. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, and Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1982;31(4):830-6.

253. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, and 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. *Journal of clinical microbiology*. 1985;22(2):250-4.
254. Halstead SB, and Marchette NJ. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;69(6 Suppl):5-11.
255. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Journal of postgraduate medicine*. 2002;48(3):206-8.
256. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-8.
257. McAvin JC, Bowles DE, Swaby JA, Blount KW, Blow JA, Quintana M, Hickman JR, Atchley DH, and Niemeyer DM. Identification of *Aedes aegypti* and its respective life stages by real-time polymerase chain reaction. *Military medicine*. 2005;170(12):1060-5.
258. McAvin JC, Powers MD, Blow JA, Putnam JL, Huff WB, and Swaby JA. Deployable, field-sustainable, reverse transcription-polymerase chain reaction assays for rapid screening and serotype identification of dengue virus in mosquitoes. *Military medicine*. 2007;172(3):329-34.
259. Herrera R, Acosta C, Melchor A, Alonso V, Solís R, and Vázquez S. UltramicroELISA para la detección de IgM anti dengue con reactivos listos para el uso. *Rev Biomed* 2005;16(1-13).
260. Beatty ME, Stone A, Fitzsimons DW, Hanna JN, Lam SK, Vong S, Guzman MG, Mendez-Galvan JF, Halstead SB, Letson GW, et al. Best practices in dengue surveillance: a report from the Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(11):e890.
261. Anwar A, Wan G, Chua KB, August JT, and Too HP. Evaluation of pre-analytical variables in the quantification of dengue virus by real-time polymerase chain reaction. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2009;11(6):537-42.
262. Callahan JD, Wu SJ, Dion-Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, Porter KR, Murphy GR, Suharyono W, King CC, et al. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(11):4119-24.
263. Johnson BW, Russell BJ, and Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(10):4977-83.
264. Houngh HS, Chung-Ming Chen R, Vaughn DW, and 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. *Journal of virological methods*. 2001;95(1-2):19-32.
265. Ito M, Takasaki T, Yamada K, Nerome R, Tajima S, and Kurane I. Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(12):5935-7.
266. Wang WK, Lin SR, Lee CM, King CC, and Chang SC. Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *Journal of virology*. 2002;76(9):4662-5.
267. Lim SP, Bodenreider C, and Shi PY. Detection and quantification of flavivirus NS5 methyltransferase activities. *Methods in molecular biology*. 2013;1030(249-68).
268. Odreman-Macchioli M, Vielma S, Atchley D, Comach G, Ramirez A, Perez S, Tellez L, Quintero B, Hernandez E, Munoz M, et al. Analysis of real time PCR amplification efficiencies from three genomic region of dengue virus. *Investigacion clinica*. 2013;54(1):5-19.
269. McAvin JC, Escamilla EM, Blow JA, Turell MJ, Quintana M, Bowles DE, Swaby JA, Barnes WJ, Huff WB, Lohman KL, et al. Rapid identification of dengue virus by reverse transcription-polymerase chain reaction using field-deployable instrumentation. *Military medicine*. 2005;170(12):1053-9.
270. Houngh HH, Hritz D, and Kanesa-thasan N. Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence. *Journal of virological methods*. 2000;86(1):1-11.

271. Yong YK, Thayan R, Chong HT, Tan CT, and Sekaran SD. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore medical journal*. 2007;48(7):662-8.
272. Laue T, Emmerich P, and Schmitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(8):2543-7.
273. Kuno G. Review of the factors modulating dengue transmission. *Epidemiologic reviews*. 1995;17(2):321-35.
274. Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, Vaughn DW, Endy TP, Holmes EC, and Aaskov JG. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology*. 2002;301(1):148-56.
275. Rigau-Perez JG, Ayala-Lopez A, Vorndam AV, and Clark GG. Dengue activity in Puerto Rico during an interepidemic period (1995-1997). *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;64(1-2):75-83.
276. Bennett SN, Drummond AJ, Kapan DD, Suchard MA, Munoz-Jordan JL, Pybus OG, Holmes EC, and Gubler DJ. Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. *Molecular biology and evolution*. 2010;27(4):811-8.
277. Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG, Laksono I, Ma'roef C, Erlin, Sutaryo, Porter KR, and Halstead SB. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. studies in 1995-1996. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999;61(3):412-9.
278. Gubler DJ. [Active surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever]. *Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana Pan American Sanitary Bureau*. 1989;107(1):22-30.
279. Condon R, Taleo G, Stewart T, Sweeney T, and Kiedrzyński T. Dengue surveillance in the Pacific Islands. *Pacific health dialog*. 2000;7(2):122-6.
280. Hadinegoro SR. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? *Paediatrics and international child health*. 2012;32 Suppl 1(33-8).
281. Kalayanarooj S. Dengue classification: current WHO vs. the newly suggested classification for better clinical application? *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet*. 2011;94 Suppl 3(S74-84).
282. Rico-Hesse R. Dengue virus evolution and virulence models. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(11):1462-6.
283. Camacho DE, Alvarez M, Rodriguez-Henriquez F, de Quintana M, Soler M, Chiarello A, Sierra G, and Comach G. [Laboratory diagnosis of dengue virus infections in Aragua State, Venezuela: October 1997-December 1998]. *Investigacion clinica*. 2003;44(2):91-103.
284. Salas RA, Tovar D, Barreto A, de Miller E, Leitmeyer K, and Rico-Hesse R. [Serotypes and genotypes of dengue virus circulating in Venezuela, 1990-1997]. *Acta cientifica venezolana*. 1998;49 Suppl 1(33-7).
285. Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, and Liprandi F. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*. 2002;303(1):110-9.
286. Uzcategui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcategui R, Holmes EC, and Gould EA. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 12):2945-53.
287. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, and Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*. 1997;25(24):4876-82.
288. Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*. 2007;24(8):1596-9.
289. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, and Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *The Journal of general virology*. 1994;75 (Pt 1)(65-75).

290. Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapravati N, and Gubler DJ. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology*. 1997;230(2):300-8.
291. Trent DW, Grant JA, Monath TP, Manske CL, Corina M, and Fox GE. Genetic variation and microevolution of dengue 2 virus in Southeast Asia. *Virology*. 1989;172(2):523-35.
292. Pinheiro FP, and Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World health statistics quarterly Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales*. 1997;50(3-4):161-9.
293. Kochel T, Aguilar P, Felices V, Comach G, Cruz C, Alava A, Vargas J, Olson J, and Blair P. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Northern South America: 2000--2005. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2008;8(5):682-8.
294. Henchal EA, Repik PM, McCown JM, and Brandt WE. Identification of an antigenic and genetic variant of dengue-4 virus from the Caribbean. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1986;35(2):393-400.
295. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Montes T, Vazquez S, Morier L, Alvarez A, Gould EA, Kouri G, et al. Neutralizing antibodies after infection with dengue 1 virus. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(2):282-6.
296. Simmons CP, Dong T, Chau NV, Dung NT, Chau TN, Thao le TT, Dung NT, Hien TT, Rowland-Jones S, and Farrar J. Early T-cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. *Journal of virology*. 2005;79(9):5665-75.
297. Gagnon SJ, Mori M, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Ennis FA, and Rothman AL. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. *Journal of medical virology*. 2002;67(1):41-6.
298. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, Imbert P, Pecarere JL, Vergez-Pascal R, Wattré P, 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1993;48(3):324-31.
299. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, Kapoor S, Misra A, Mathur A, Nusrat H, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *Journal of medical virology*. 1998;56(3):280-5.
300. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, Mokashi N, Vaidya D, Shah PS, and Cecilia D. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS one*. 2010;5(1):e8709.
301. Basuki PS, Budiyo, Puspitasari D, Husada D, Darmowandowo W, Ismoedijanto, Soegijanto S, and Yamanaka A. Application of revised dengue classification criteria as a severity marker of dengue viral infection in Indonesia. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2010;41(5):1088-94.
302. Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, and Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2003;35(1):33-42.
303. Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R, Raghupathy R, Nagar R, Tandon R, Pacsa AS, Younis OI, and Azizieh F. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *Journal of medical virology*. 1999;59(3):335-40.
304. Wati S, Rawlinson SM, Ivanov RA, Dorstyn L, Beard MR, Jans DA, Pitson SM, Burrell CJ, Li P, and Carr JM. Tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) stimulation of cells with established dengue virus type 2 infection induces cell death that is accompanied by a reduced ability of TNF-alpha to activate nuclear factor kappaB and reduced sphingosine kinase-1 activity. *The Journal of general virology*. 2011;92(Pt 4):807-18.

305. Wati S, Li P, Burrell CJ, and Carr JM. Dengue virus (DV) replication in monocyte-derived macrophages is not affected by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), and DV infection induces altered responsiveness to TNF-alpha stimulation. *Journal of virology*. 2007;81(18):10161-71.
306. Hober D, Delannoy AS, Benyoucef S, De Groot D, and Wattré P. High levels of sTNFR p75 and TNF alpha in dengue-infected patients. *Microbiology and immunology*. 1996;40(8):569-73.
307. Kelley JF, Kaufusi PH, Volper EM, and Nerurkar VR. Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines. *Virology*. 2011;418(1):27-39.
308. Koraka P, Murgue B, Deparis X, Van Gorp EC, Setiati TE, Osterhaus AD, and Groen J. Elevation of soluble VCAM-1 plasma levels in children with acute dengue virus infection of varying severity. *Journal of medical virology*. 2004;72(3):445-50.
309. Caruso C, Candore G, Cigna D, Colucci AT, and Modica MA. Biological significance of soluble IL-2 receptor. *Mediators of inflammation*. 1993;2(1):3-21.
310. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, and Ennis FA. 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. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(5):1473-80.

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

www.bdigital.ula.ve