UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

UNIDAD I + D ASOCIADA AL CNB-CSIC

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA INFLAMATORIA EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE Y SU SIGNIFICANCIA CLÍNICA

TESIS DOCTORAL

Julia Del Carmen Arias Puentes

ALCALÁ DE HENARES, 2011

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

UNIDAD I+D ASOCIADA AL CNB-CSIC

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA INFLAMATORIA EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE Y SU SIGNIFICANCIA CLÍNICA

TESIS DOCTORAL

Julia del Carmen Arias Puentes

DIRECTORES DE TESIS

Melchor Álvarez de Mon Soto,
Catedrático de Medicina,
Universidad de Alcalá.

Nereida Josefina Valero Cedeño
Catedrático de Medicina,
Universidad del Zulia.

Eduardo Reyes Martín,
Profesor Asociado de Inmunología,
del Departamento de Medicina de la
Universidad de Alcalá.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios Todopoderoso por darme salud, sabiduría y fortaleza para seguir formándome profesionalmente.
- Al Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” por mantener las puertas abiertas en pro de la investigación científica.
- A las Universidades de Alcalá y del Zulia por darme la oportunidad de crecer profesionalmente
- A la Dra. Nereida Valero, mi amiga Nere, por brindarme siempre su apoyo humano, optimismo, paciencia y ayuda profesional.
- Al Dr. Jesús Mosquera quien con sus amplios conocimientos y ayuda incondicional contribuyó al desarrollo y finalización de esta investigación.
- Al Dr. Melchor Álvarez de Mon, por consolidar y mantener las bases para que este programa de Doctorado sea una realidad en nuestra Alma Mater, por la oportunidad brindada, apoyo y confianza en nuestro trabajo.
- Al Dr. Eduardo Reyes por su valiosa ayuda, amplitud, academicismo y excelente aporte.
- A mis queridas amigas Yraima Larreal y Milagros Montiel por hacerme cambiar a positivo mis situaciones difíciles, su gran apoyo y colaboración incondicional.
- A mi compañera de trabajo por siempre mi jefa Elieth Pozo y a Jenndy Carrero por su apoyo y espíritu de colaboración
- Al personal y pacientes del Hospital General del Sur “Dr. Pedro Iturbe” por su esfuerzo y cooperación en la fase de obtención de las diferentes muestras estudiadas en este trabajo.

- A las Lcdas. Ada, Neidelma, Cecilia, Desiree, Julia Chourio en si, a todo el personal del laboratorio clínico del Hospital General del Sur “Dr. Pedro Iturbe” por su ayuda incondicional, sin ustedes no hubiese sido posible llegar y aportar este producto que nos enorgullece hoy en día.
- A mis estudiantes, por su colaboración y paciencia prestada cuando más lo necesite
- A todo el personal del Instituto de Investigaciones clínicas, principalmente el de la Sección de Virología Eddy, Angelo, Jhon, Josue, Shiley, Alegría, Mery, Luz Marina por brindarme su apoyo y colaboración.
- A Maribel Mingo por su paciencia y siempre valiosa colaboración.
- A mi bella familia Eudo, Carlos, Andrés; a mis padres Eligia y Jesús; a mis queridos hermanos Zora, Yane, Mario, Jesús y sobrinos por su amor, comprensión y apoyo moral que recibí en todo momento.
- Al Vice Rectorado Académico y al Consejo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (LUZ-CONDES), por el apoyo financiero
- A mis compañeras de estudio especialmente a Diana y María por su incondicional ayuda cuando estuve lejos de mi gente.
- A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en el desarrollo de este trabajo y que en este momento se me escapan de mi memoria.

Muchísimas Gracias!

JULIA

DEDICATORIA

A ti Dios Todopoderoso
A mi Rey, Eudo Medina
A mis adorados hijos
Carlos y Andrés Enrique
A mis queridos padres,
hermanos y sobrinos.

ÍNDICE

CONTENIDO

Página

Abreviaturas

Summary

I.- Introducción

I.1.- Dengue 1

I.2.- Agente etiológico 1

I.2.1.- Infección con el virus del dengue 3

I.2.2.- Ciclo evolutivo del virus dengue 5

I.3.- Epidemiología 6

I.3.1.- El vector 8

I.3.1.1.- Ciclo biológico del vector 9

I.3.2.- Ciclos de transmisión del virus dengue 10

I.3.3.- Factores de riesgo del dengue 11

I.4.- Manifestaciones clínicas 12

I.4.1.- Fases evolutivas del dengue 15

I.5.- Diagnóstico de laboratorio de la infección por virus dengue 19

I.5.1.- Diagnóstico virológico 20

I.5.2.- Diagnóstico serológico 22

I.6.- Patogénesis 25

I.6.1.- Factores virales 25

I.6.2.- Factores del huésped 27

I.6.2.1.- Observaciones epidemiológicas 27

I.6.2.2.- El DENV induce producción de auto-anticuerpos 31

I.6.2.3.- Efecto del DENV sobre células endoteliales 32

I.6.2.3.1.- Vasculopatía 32

I.6.2.3.2.- Coagulopatía 34

I.7.- Citoquinas 36

I.7.1.- Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNFα) 37

I.7.2.- Interleucina 1 beta (IL-1β) 38

I.7.3.- Interleucina 6 (IL-6) 39
I.7.4.- Interleucina 12 (IL-12) 40
I.7.5.- Interleucina 17 (IL-17) 41
I.7.6.- Receptores solubles del TNFα 41
I.7.7.- Proteína 1 tipo receptor de interleucina-1 (IL-1RL1/ST2) 42
I.7.8.- Ligando Inductor de Apoptosis relacionado al TNF (TRAIL) 43
I.8.- Apoptosis 45
I.8.1.- Fases de la apoptosis 46
I.8.2.- Inducción de la apoptosis 47
I.8.2.1.- Vía intrínseca o mitocondrial 49
I.8.2.2.- Vía Extrínseca 49
I.8.3.- Apoptosis y virus 50
II.- Hipótesis y Objetivos 52
III.- Materiales y Métodos 56
III.1.- Población objeto de estudio 57
III.1.1.- Pacientes con dengue en fase aguda 57
III.1.1.1.- Criterios de inclusión 57
III.1.1.2.- Criterios de exclusión 58
III.1.1.3.- Clasificación según severidad clínica 58
III.1.3.1.- Dengue sin signos de alarma (DSSA) 58
III.1.3.2.- Dengue con signos de alarma (DCSA) 59
III.1.3.3.- Dengue grave (DG) 59
III.1.1.4.- Clasificación según tipo de infección 59
III.1.2.- Grupos Controles 59
III.2.1.- Controles sanos (control) 59
III.2.2.- Control con otra infección viral febril (OIVF) 60
III.2.- Toma de muestras 60
III.3.- Aislamiento viral e identificación por inmunofluorescencia indirecta 61
III.4.- Detección de anticuerpos específicos anti-dengue 62
III.4.1.- ELISA de captura para detección de IgM anti dengue 62

III.4.2.- ELISA indirecto para detección de IgG anti dengue 63
III.4.3.- Inmunocromatografía para la detección de NS1 y/o IgM/IgG anti dengue 64
III.5.- Aislamiento y cultivo de monocitos de sangre periférica 65
III.6.- Determinación de citoquinas en suero y sobrenadantes de cultivo de monocitos 66
III.6.1.- Cuantificación de TNFα, IL-1β, IL-6 e IL-12 67
III.6.2.- Cuantificación de IL-17, IL-1RL1/sST2, sTNF-RI, sTNF-RII y sTRAIL 67
III.7.- Determinación de proteína 68
III.8.- Detección de Apoptosis 68
III.9.- Análisis estadístico 69
IV.- Resultados 70
IV.1.- Datos clínicos 71
IV.2.- Determinación de citoquinas en pacientes con dengue 74
IV.2.1.- Concentración sérica de citoquinas proinflamatorias (TNFα, IL-6, IL-12, IL-17, IL-1β) 75
IV.2.1.1.- Citoquinas proinflamatorias según fases evolutivas de la enfermedad 75
IV.2.1.2.- Citoquinas proinflamatorias según severidad de afectación 79
IV.2.1.3.- Citoquinas proinflamatorias según serotipo viral infectante 87
IV.2.1.4.- Citoquinas proinflamatorias según tipo de infección 91
IV.2.1.5.- Área bajo la curva (AUC) de citoquinas pro-inflamatorias 93
IV.2.2.- Concentración sérica de citoquinas anti-inflamatorias sTNF-RI, sTNF-RII y IL-1RL1/sST2 94
IV.2.2.1.- Citoquinas anti-inflamatorias según fases evolutivas de 94

la enfermedad
IV.2.2.2.- Citoquinas anti-inflamatorias según severidad de afectación 97
IV.2.2.3.- Citoquinas anti-inflamatorias según serotipo viral infectante 102
IV.2.2.4.- Citoquinas anti-inflamatorias según tipo de infección 105
IV.2.2.5.- AUC de citoquinas anti-inflamatorias 107
IV.2.3.- Concentración sérica del marcador de apoptosis sTRAIL 108
IV.2.3.1.- sTRAIL según fases evolutivas de la enfermedad 108
IV.2.3.2.- sTRAIL según severidad de afectación 109
IV.2.3.3.- sTRAIL según serotipo viral infectante 112
IV.2.3.4.- sTRAIL según tipo de infección 113
IV.2.3.5.- AUC del marcador de apoptosis sTRAIL. 114
IV.3.- Análisis del efecto del DENV sobre la producción de citoquinas en cultivo de monocitos de sangre periférica de pacientes con dengue, estimulados o no con LPS 115
IV.3.1.- Concentraciones de las citoquinas proinflamatorias TNFα, IL-6, IL-12 e IL-1β. 115
IV.3.2.- Concentraciones IL-1RL1/sST2 119
IV.3.3.- Concentraciones del marcador de apoptosis sTRAIL 120
IV.4.- Efecto inductor/modulador del DENV sobre la apoptosis en monocitos humanos 121
IV.4.1.- Apoptosis en cultivo de monocitos de pacientes con dengue tratados o no con LPS 121
IV.4.2.- Apoptosis en cultivo de monocitos infectados con los serotipos del virus dengue a diferentes días post-infección 123
V.- Discusión 125

V.1.- Respuesta inflamatoria sistémica en pacientes con dengue. Asociaciones clínicas. 126

V.1.1.- Citoquinas pro-inflamatorias 126

V.1.2.- Citoquinas anti-inflamatorias 134

V.1.3.- Marcador de apoptosis: TRAIL 137

V.2.- Efecto directo del DENV sobre la producción de citoquinas en cultivo de monocitos de sangre periférica de pacientes con dengue 139

V.3- Efecto inductor/modulador del DENV sobre la apoptosis de monocitos de sangre periférica de pacientes con dengue 140

VI.- Conclusiones 143

VII.- Bibliografía 146

ABREVIATURAS

ALT: Alanino aminotransferasa

AST: Aspartato amino transferasa

AUC: Área bajo la curva

CMN: Células mononucleares

DCSA: Dengue con signos de alarma

DEN: Dengue

DENV: Virus Dengue

DG: Dengue Grave

DSSA: Dengue sin signos de alarma

ELISA: Ensayo inmunoenzimático

FA: Fase aguda

FRP: Fase de recuperación precoz

FRT: Fase de recuperación tardia

GRP78: Proteína reguladora de glucosa 78 kDa

H_2O_2: Peróxido de Hidrógeno

HUVECs: Células endoteliales de vena umbilical humana

IFNγ: Interferón gamma

IL: Interleucina

IL-12: Interleucina-12

IL-17: Interleucina -17

IL-1β: Interleucina -1 beta

IL-6: Interleucina -6

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IP: Infección Primaria

IS: Infección Secundaria

LPS: Lipopolisacárido bacteriano

OMS: Organización mundial de la salud

OPS: Organización panamericana de la salud

SCD: Síndrome del Choque por Dengue

SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema Nervioso Central

TMB: Tetrametilbencidina

TNFα: Factor de Necrosis Tumoral-alfa

NS1: Proteína no estructural 1

SUMMARY

ANALYSIS OF THE INFLAMMATORY IMMUNE RESPONSE IN DENGUE VIRUS INFECTION AND ITS CLINICAL SIGNIFICANCE

Dengue is a viral disease, of endemic-epidemic character, is the most important arbovirus diseases worldwide in terms of morbidity, mortality and economic impact. Cytokines and apoptosis play an important role in the immune response against dengue virus (DENV), yet its presence in the severe form of the disease is not completely understood. The aim of this study was to evaluate the cytokine pattern proinflammatory/anti-inflammatory and TRAIL apoptosis marker in patients with dengue and its clinical significance, with emphasis on developmental stages, severity, viral serotype and type of infection. In addition, we examined the effect of DENV on cytokine production in cultured PBMC and apoptosis in monocytes from patients with dengue and infected at different days with the dengue virus. In this regard, we determined the concentration of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-α [TNF], interleukin 6 [IL-6], IL-1β, IL-12 and IL-17, anti-inflammatory (receptor 1 soluble TNF [sTNF-RI], sTNF-RII, and protein 1 type receptor of interleukin-1 [IL1RL1/sST2]) and the apoptosis marker related apoptosis-inducing ligand and tumor necrosis factor [sTRAIL] in thirty patients with dengue in the acute phase, early recovery phase and late recovery phase. These patients were classified according to the severity of the disease by the WHO criteria for dengue no warning signs, dengue warning signs and severe dengue and the type of infection in primary infection (PI) and secondary infection (SI). We included two control groups, ten healthy subjects (control) and eight with other febrile viral infection (OIVF). Circulating levels of cytokines were determined by ELISA and apoptosis by TUNEL method. PBMC cultures were stimulated or not with LPS for 24 hours. Our results showed a significant increase in most of the cytokines pro-and anti-inflammatory (TNF, IL-6, IL-12, IL-17, sTNF-RI, sTNF-RII, IL1RL1/sST2) and sTRAIL in serum of patients with dengue in the acute phase of the disease respect to the control group. Increased IL-6, sTNF-RI, sTNF-RII and IL1RL1/sST2 was associated with the severity of the disease, while IL-12 did not change during severe illness. The increase of sTRAIL was evident in the primary infection. The pattern of secretion of cytokines TNF and IL-1β in infected monocytes

was similar when comparing the concentrations with the control group without stimulation. Furthermore, levels of IL-6 and IL-12 similar to the control group were enrolled. Monocytes from patients with dengue without LPS showed increased apoptotic cells ($p<0.001$) compared to the control. This increase in cytokine and apoptosis during the illness evidence participation of DENV in the activation and death of monocyte in vivo.

***Key words**: Dengue, cytokines, apoptosis, immune response*

I. INTRODUCCIÓN

I.1.- Dengue

El dengue (DEN) es una enfermedad viral, de carácter endemo-epidémico, transmitida por la picadura de mosquitos hembras del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* (*A. aegypti*). Actualmente es la arbovirosis de mayor relevancia a nivel mundial en términos de morbilidad, mortalidad y afectación económica **(Guzmán et al., 2006; Añez G. et al., 2006; Martínez E., 2008; Ooi E. et al., 2008; Shepard D. et al., 2011)**.

I.2.- Agente etiológico

El virus dengue (DENV), está constituido por ARN genómico de sentido positivo, con una cadena sencilla de aproximadamente 10,7 kb de longitud, rodeado por una nucleocápside de simetría icosahédrica, de 30 nm de diámetro, la cual está constituida por una proteína C (cápside) de 11 kd. Esta estructura se encuentra rodeada por una bicapa lipídica de 10 nm de grosor; en la que se encuentran insertadas las proteínas estructurales E que conforma la envoltura y M que forma la membrana del virus, dando lugar a proyecciones que sobresalen de la superficie de los viriones. El virión completo mide alrededor de 50 nm de diámetro, y tiene forma esférica. El ARN de las partículas virales maduras codifica para una poliproteína, que es posteriormente procesada por enzimas tanto del virus como del hospedador, dando lugar a tres proteínas estructurales (prM/M, E y C) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (**Rice CM., 1996; Chambers et al., 1990; Holmes EC., 2006**) **(Figura 1).**

.

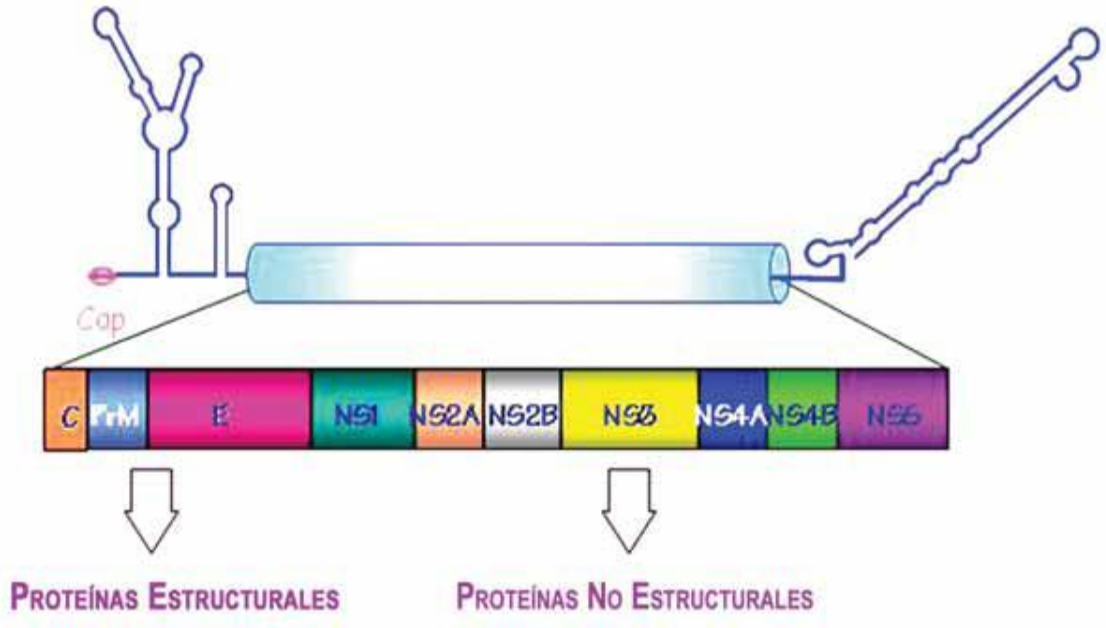


Figura 1. **Esquema del genoma del virus dengue**
Fuente: http://www.mex.ops-oms.org/documentos/dengue/entrada.pdf

Posee cuatro serotipos antigénicamente relacionados (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) los cuales exhiben secuencias de aminoácidos idénticas en aproximadamente 70%. Pertenece a la familia *Flaviviridae,* del género *Flavivirus* (del latín *flavus*, amarillo), recibe este nombre por tener como miembro característico de la familia al virus de la fiebre amarilla; incluye un grupo de más de 68 agentes virales transmitidos por artrópodos y de los cuales por lo menos 55% están asociados con alguna enfermedad en el hombre (**Monath et al., 1996**; **Tsai TF., 2000; Cruz et al., 2002; Holmes EC., 2006).**

Mediante estudios filogenéticos del DENV, utilizando técnicas de secuenciación eficientes se han establecido dentro de cada uno de sus serotipos, 3 genotipos para DENV-1 (I, II y III), aunque algunos autores incluyen dos genotipos mas denominados IV y V **(Rico-Hesse R., 1990; Golcálvez AP., et al., 2002**), 6 para DENV-2

(Americano, Asiático/Americano, Asiático I, Asiático II y Selvático, el cual es exclusivo de primates no humanos), 4 para DENV-3 (I, II, III, IV); algunas clasificaciones incluyen el genotipo V **(Uzcátegui NY., 2003),** y 4 para DENV-4 (I, II, III, y Selvático, también exclusivo de primates) **(Holmes EC., 2006).** La diversidad genética del virus DENV puede ocasionar la aparición de cepas con mayor capacidad de replicación, severidad clínica y de más fácil transmisión o más virulentas **(Guzmán MG. et al., 2006).**

I.2.1.- Infección con el virus dengue

La interacción del DENV con la célula blanco, ocurre por endocitosis mediada por receptores. Utiliza múltiples proteínas transmembranales de la célula del huésped, las cuales tienen alta afinidad por la glicoproteína E del virus **(Kielian et al., 2006).** Estudios *in vitro* han demostrado que el DENV puede infectar una variedad de células de diferente origen. No obstante, *in vivo*, son pocos los tipos celulares que se han identificado como permisibles a la infección **(Matsuda et al., 2005).** Para que se lleve a cabo la infección se necesita de una o algunas moléculas que funcionen como receptores para el virus, entre éstas se ha reportado el sulfato de heparán (HS) presente en la superficie celular de diversas células el cual se une con gran afinidad a la glicoproteína E **(Chen Y. et al., 1997; Germi R. et al., 2002).** Se ha sugerido que esta molécula sirve más como un factor inicial de fijación que concentra las partículas virales en la superficie de la célula blanco para interactuar seguidamente con otra molécula receptora **(Reyes et al., 2005).** El HS está involucrado en la entrada del DENV en células Hep-G2 y HUH-7, líneas celulares hepáticas humanas que han

demostrado ser susceptibles a la infección por DENV-1 y DENV-2 **(Talarico RB. et al., 2007; Smith D. et al., 2005),** sugiriendo que dicha infección puede ser causante de la disfunción hepática observada en los pacientes con dengue.

Varias proteínas relacionadas con el estrés, incluyendo la proteína reguladora de glucosa 78 kDa (GRP78) en monocitos y macrófagos y el complejo receptor de proteínas de choque térmico 70 y 90 kDa (HSP70/90) en células del hígado, han sido implicadas como receptores del DENV. Recientemente, se confirmó el papel propuesto a la GRP78 como receptor de DENV-2, mientras que el complejo HSP70/90 no interviene en la internalización del virus a las células hepáticas **(Cabrera-Hernández A. et al., 2007).**

En las células dendríticas, células blanco iniciales para el DENV, el contacto virus-célula ocurre entre una lectina de unión a ICAM-3 (CD-50), DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesión molecule-3 (ICAM3)-Grabbing Non–integrin) o CD209, y los residuos de manosa de la asparagina 67 (Asn 67) de la proteína E viral, particularmente en las células dendríticas inmaduras, dado que presentan altos niveles de DC-SIGN las cuales facilitan la unión viral inicial y la entrada (**Navarro-Sánchez E. *et al.* 2003; Tassaneetrithep *et al.* 2003; Lozach PY. *et al.* 2005; Green S. et al., 2006).** Las proteínas de membrana 27, 45, 67, 87 kDa de macrófagos humanos son posibles receptores celulares del DENV **(Moreno B. et al., 2002).**

Otra vía para la internalización del DENV a la célula implica el receptor gamma IIa y IIb (FcγIIa, FcγIIb) para la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas. Se ha sugerido que los anticuerpos no- neutralizantes de la clase IgG, producidos durante una infección primaria, facilitan la entrada de un serotipo

diferente a la célula, por la formación de complejos IgG-virus y su interacción con los receptores Fcγ; la propuesta de esta ruta de infección incluye a los monocitos/macrófagos y a las células dendríticas como principales blanco celulares y por su capacidad para captar complejos inmunes (**Avirutnan P. et al., 1998; Goncálvez A. et al., 2007).**

I.2.2.- Ciclo evolutivo del virus dengue

Una vez que el DENV ingresa a la célula blanco por unión de la glicoproteína E-receptor celular, inicialmente la partícula viral queda dentro de una vesícula endosómica que conduce al denudamiento, la envoltura viral se fusiona con la membrana vesicular liberando la nucleocápside y el material genético al citoplasma. La molécula de ARN viral es transcrito en el retículo endoplásmico rugoso a una poliproteína, que es procesada por proteasas virales y celulares para producir simultáneamente todas las proteínas virales: las tres estructurales (C, prM, y E) y siete proteínas no estructurales (NS). La ARN polimerasa ARN dependiente viral (NS5), asociada a otras proteínas NS, replica el ARN genómico produciendo una molécula complementaria de ARN de polaridad negativa, la que a su vez actúa como templado para la síntesis de nuevas cadenas de ARN de polaridad positiva. Las réplicas de genoma viral son encapsuladas por la proteína C y luego, la nucleocápside adquiere su envoltura a partir de la membrana del retículo endoplásmico hacia el espacio luminal. A partir de allí, las partículas virales son transportadas por el sistema secretorio hacia la superficie en tanto que las glicoproteínas virales adquieren su forma madura por procesamiento de los residuos

hidrocarbonados en el sistema de golgi y, finalmente, los viriones son liberadas al medio extracelular por fusión de la vesícula de transporte con la membrana plasmática **(Damonte EB., 2006)** **(Figura 2).**

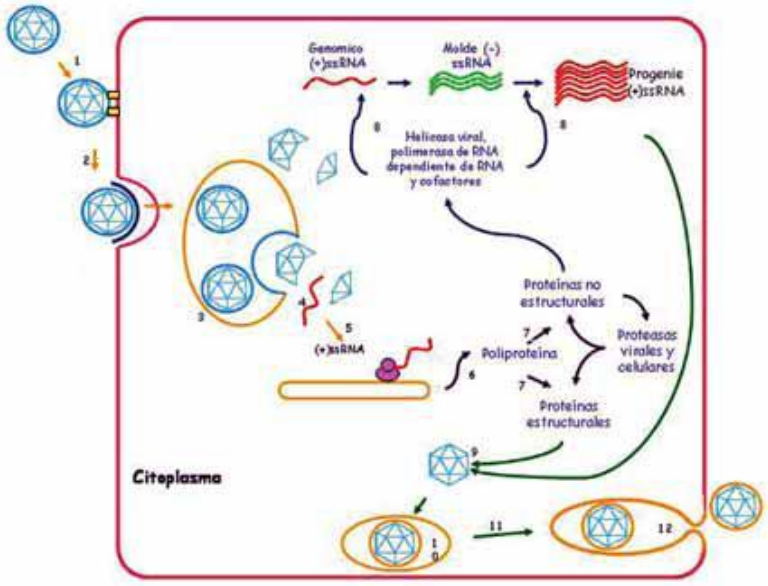


Figura 2. Ciclo evolutivo del virus dengue
Fuente: http://www.mex.ops-oms.org/documentos/dengue/entrada.pdf

I.3.- Epidemiología

La incidencia y epidemias de dengue han aumentado exponencialmente en los últimos 50 años a escala mundial. Se estima que de los 2500 millones de personas que viven en áreas endémicas, 50 millones se infectan anualmente y más de 500000 contraen su forma más grave **(OMS, 2009).** Actualmente, el DENV es endémico en más de 100 países del Sudeste Asiático, el Pacífico Occidental, América, África y el Medio Oriente (**Gubler DJ., 1998; Guzmán et al., 2006)** **(Figura 3).** Durante las epidemias, las tasas de ataque pueden llegar a afectar a 80-90% de las personas susceptibles

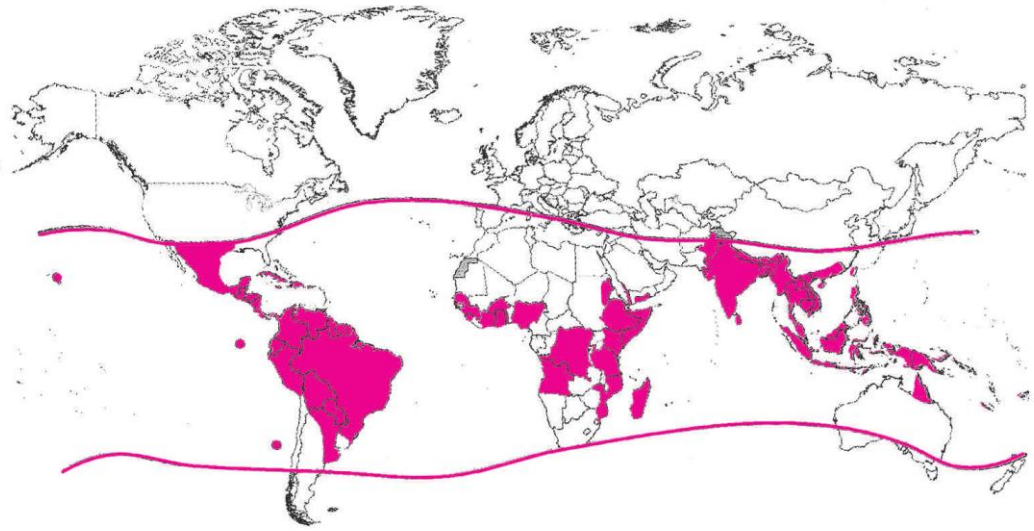
(**Calisher CH., 2005**) y la letalidad puede ser mayor de 5% **(Guzmán et al., 2002; Gubler DJ., 2004**).

El programa de control del *A. aegypti* interrumpió la transmisión del dengue en la mayor parte de las regiones de América desde 1946 hasta principios de 1970, a partir de ese año se iniciaron reinfestaciones, seguido de brotes en el Caribe y en América Central y del Sur debido a que fue difícil de mantener su erradicación y las medidas de control **(PAHO, 2007).** A partir de 1970, la situación epidemiológica de América paso de una baja endemicidad a presentar brotes cíclicos/epidémicos que ocurren cada 3 a 5 años, con tendencia ascendente.

El dengue en América adquiere cada vez mayor importancia como enfermedad re-emergente debido a la co-circulación de los cuatro serotipos del virus, al incremento en número de casos y consecuentemente a la expansión de áreas epidémicas y a la aparición de casos graves (**Valero N., 2002).**

El DENV ha estado presente por más de tres décadas en Venezuela, permaneciendo en situación de endemicidad en muchas regiones del país y produciendo grandes epidemias a pesar de los enormes esfuerzos por contenerlo **(MPPS, 2007; MPPS, 2006; MPPS, 2005).** En el país, la enfermedad ha causado importante impacto socio-económico en la población **(Querales J., 2002; Montes T., 2001; Añez G., 2006).** En el estado Zulia, Venezuela, han ocurrido epidemias periódicas durante los últimos 15 años y las cifras de morbilidad entre epidemia han sido de hasta 3 000 casos anuales **(Valero N. et al., 2001; 2002).** En esta región entre 1997 y 2003, se notificó el 12,68% del total de casos de dengue del país **(OPS, 2005).** A esto contribuyen, entre

otros factores, las particularidades climáticas de la región, como sus elevadas temperaturas y la humedad relativa.



Países o áreas de riesgo (para el 1° de noviembre 2008).

Figura 3. **Países/áreas en riesgo de transmisión del dengue, 2008**
Fuente: OMS, 2009.

I.3.1.- El vector

El DENV es trasmitido a través de la picadura de mosquitos hematófagos infectados, principalmente el *A. aegypti*. El cual tiene su origen en regiones etiópicas y desde esas áreas se dispersó convirtiéndose en un mosquito cosmopolita. Su presencia fue detectada en la mayor parte de zonas tropicales y subtropicales, comprendidas entre 45º de latitud norte y 35º de latitud sur, en las zonas isotermales intermedias a los 20ºC (**Gadelha et al., 1985)**. Esta especie ha sido diseminada por el hombre en todo el mundo, sus hábitos son altamente antropófilos y domésticos.

Ponen sus huevos preferiblemente en aguas limpias y estancadas, ya sea en depósitos naturales o artificiales (**Montes T., 2001; Gubler DJ., 1998**; **Hoyos et al., 2010).**

Otros vectores implicados en la trasmisión del DENV es el *Aedes albopictus*, presente en América, tiene el mantenimiento del dengue en Asia y más recientemente en Sur América **(Navarro JC. et al., 2009)**; *Aedes polynesiensis* y varias especies del grupo *Aedes scutellaris*; cada especie con una ecología, conducta y distribución geográfica particular (**OPS, 1995; Savage et al., 1996; WHO, 2009).** Recientemente, se ha reportado la existencia de transmisión vertical **(Maroun et al., 2008)** y por vía transfusional **(Blanco C., 2008; Petersen LR., 2010);** siendo estas infrecuentes, poco documentadas y muy raras.

I.3.1.1.- Ciclo biológico del vector

Los mosquitos hembra pueden ovopositar de 100 - 200 huevos por postura, pudiendo resistir las sequías hasta por un año. El huevo mide aproximadamente 1 mm, es ovalado, blanco y luego se torna a negro al desarrollar el embrión. Es depositado individualmente en diferentes recipientes por encima del nivel del agua. El ciclo desde la postura a la eclosión en condiciones óptimas de humedad y temperatura dura 48 horas, pero puede prolongarse hasta 5 días. Entre 7 y 10 días los huevos se convierten en larvas. La larva tiene tres fases: acuática, de alimentación y de crecimiento. El mosquito se divide en cabeza, tórax y nueve segmentos abdominales; el segmento posterior y anal tienen cuatro branquias lobuladas; un sifón respiratorio corto por el cual respira y se mantiene en la superficie casi vertical. Poseen cuatro espinas torácicas, dos a cada lado. El octavo segmento

con una hilera de siete a doce dientes formando el peine y sifón con el pecten. Tiene un movimiento serpenteante y presentan gran fotofobia. La fase completa demora entre ocho y doce días. Posteriormente, se forma la pupa, en esta fase no se alimenta y su función es la metamorfosis de larva a adulto. Se mueve rápidamente ante un estímulo y cuando están inactivas flotan en la superficie. Presentan una trompeta respiratoria corta y con un solo pelo en el borde de la paleta natatoria, en la base del abdomen tiene un par de aletas que le sirven para nadar. Este estadío dura de dos a tres días, para dar paso a la formación del mosquito adulto, el cual representa la fase reproductora del *A.aegypti*. Las hembras se distinguen de los anofelinos por tener palpos más cortos y por adoptar una posición horizontal durante el reposo. Se caracteriza por tener un abdomen agudo, de color negro con manchas blancas y plateadas en diferentes partes del cuerpo. En el tórax (mesonoto) tiene un dibujo característico con franjas claras a manera de "lira" (**Balta R., 1997**).

I.3.2.- Ciclos de transmisión de virus

La transmisión del DENV se produce en ciclos, el enzoótico (endémico) y el epizoótico (epidémico). En el ciclo enzoótico participan mosquitos selváticos como *Aedes furcifer* y *Aedes luteocephalus* y primates inferiores no humanos, demostrado en los bosques tropicales de Asia y África. El ciclo epidémico/urbano es el de mayor importancia desde el punto de vista de salud pública, el cual involucra al hombre y al mosquito vector. **(Rudnick A., 1978; Gubler DJ., 1998).**

En América, el DENV persiste en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión hombre – *A. aegypti* - hombre. El mosquito se infecta al picar a una

persona infectada en periodo de viremia (fase febril), el virus se disemina sistemáticamente durante 8 a 12 días (incubación extrínseca), permaneciendo infectado de por vida. Luego de este periodo el mosquito puede transmitir el agente viral a un hombre susceptible durante su alimentación, produciendo un amplio espectro clínico que varía desde individuos asintomáticos o sub clínicos hasta una infección severa, con sangrados y choque **(OPS, 1995; WHO, 2009).**

I.3.3.- Factores de riesgo del dengue

La dinámica de transmisión del DENV depende de interacciones entre el ambiente, el agente, la población de huéspedes y el vector **(OPS, 1995)**. Los factores determinantes de aparición del dengue grave son complejos, están relacionados con los cambios ambientales y sociales que se produjeron durante la segunda guerra mundial, los cuales favorecieron la propagación del virus y de su vector por varios países asiáticos. Posteriormente, el crecimiento acelerado de la población, la urbanización no planificada, el insuficiente abastecimiento de agua potable, la disposición inadecuada de residuos sólidos, el aumento de viajeros y de migraciones poblacionales, el deterioro de los sistemas de salud y de los programas de vigilancia y control y la pobreza han contribuido a agravar la situación epidemiológica mundial. La aparición de cepas con mayor virulencia y capacidad de transmisión, así como la circulación simultánea de varios serotipos y genotipos en una misma región, influyen en la aparición de epidemias y de dengue grave **(Guzmán M. et al., 2006; Mackenzie et al., 2004; Gubler DJ., 1998).**

También, los factores de riesgo individuales del huésped determinan la gravedad de la enfermedad e incluyen la infección secundaria, la edad, la etnia, y posiblemente enfermedades crónicas (asma, anemias falciformes y diabetes mellitus). Los niños, en particular son menos capaces que los adultos de compensar la extravasación plasmática y en consecuencia tienen mayor riesgo de desarrollar el choque por dengue **(OMS, 2009; OPS, 1995)**.

I.4.- Manifestaciones clínicas del dengue

El DEN tiene un amplio espectro de presentaciones clínicas, a menudo evoluciona con resultados impredecibles. Aunque la mayoría de los pacientes se recupera después de un curso clínico benigno y resolución espontánea, una pequeña proporción progresa a enfermedad grave, caracterizada principalmente por aumento de la permeabilidad vascular, con hemorragia o sin ella.

Los cambios actualmente observados en la epidemiología del dengue, conducen a problemas en la utilización de los actuales criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para realizar la clasificación de los pacientes **(OMS, 2009**). La infección por DENV es una enfermedad a la que se le reconoce que varía desde una forma asintomática a una sintomática, ésta se inicia con un estadío febril agudo inespecífico (fiebre indiferenciada), la cual clínicamente es indistinguible de otras infecciones virales, la Fiebre por dengue (FD) y la Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD). Para considerar que el paciente es un caso de FD debe presentar fiebre y dos síntomas de los siguientes: cefalea, dolor retro-ocular, dolores osteomioarticulares, exantema, leucopenia y algún sangrado. La FHD requiere la presencia de los cuatro

criterios siguientes: a) fiebre o historia de fiebre aguda, b) algún sangrado espontáneo: petequias, Prueba del Torniquete (PT) positiva, sangrado de mucosas o hematemesis, c) trombocitopenia menor o igual de 100.000 células por mm cúbico, y d) extravasación de plasma, evidenciada por elevación del 20% del hematocrito, o por la disminución del 20% del hematocrito después de la etapa crítica, o por la demostración de derrame pleural, ascitis o derrame pericardio mediante estudios de imágenes.

Además, la FHD se clasificó en cuatro grados según su gravedad, grado I donde la fiebre podría estar acompañada de síntomas generales no específicos y una PT positiva como única manifestación hemorrágica; grado II caracterizado por las mismas manifestaciones del grado I mas hemorragia espontánea de cualquier localización; grado III con insuficiencia circulatoria que se manifiesta por pulso rápido y débil, tensión diferencial disminuida (20 mmHg o menos) o hipotensión con piel fría y húmeda, y agitación; y grado IV choque profundo con presión arterial y pulso imperceptible en donde los grados III y IV corresponden al Síndrome de choque por dengue (SCD) **(WHO, 2005).**

En los últimos años se han publicado diversos artículos **(Balmaseda et al., 2005; Bandyopadhyay S., 2006; Setiati et al., 2007)** que cuestionan la utilidad de esta clasificación, por considerarla rígida, demasiado dependiente de resultados de laboratorio y no inclusiva de enfermos de dengue con otras formas de gravedad, tales como la afectación particular del SNC (encefalitis), del corazón (miocarditis) o del hígado (hepatitis grave). Tampoco era útil para el manejo clínico de los enfermos. Por tal razón, el Programa de Adiestramiento e Investigación en Enfermedades

Transmisibles de la Organización Mundial de la Salud (TDR/OMS) auspició un estudio internacional, llamado Dengue Control (DENCO), uno de sus componentes es de clínica y su objetivo principal era obtener información de un número elevado de enfermos con dengue confirmado, y encontrar una mejor forma de clasificarlos, así como identificar cuáles serían los signos de alarma útiles para mejorar el protocolo de manejo de casos de dengue **(Martínez E., 2008).**

La OMS realizó dicho estudio clínico prospectivo en regiones endémicas determinando evidencias acerca de los criterios para la clasificación de dengue dentro de niveles de severidad. Se obtuvo información clínica de casi 2.000 enfermos con dengue confirmado, procedentes de siete países de dos continentes. El estudio concluyó que del 18 a 40% de los casos no podían ser clasificados mediante la clasificación actual y más de 15% de casos con choque tampoco podían ser clasificados como casos graves de dengue, porque no cumplían con alguno de los criterios para ser considerado FHD/SCD. Los resultados del estudio confirmaron que, mediante el uso de un conjunto de datos clínicos, parámetros de laboratorio, o ambos, se puede observar una clara diferencia entre pacientes con dengue grave (DG) y dengue no grave. Sin embargo, por razones prácticas fue conveniente dividir el gran grupo de pacientes con dengue no-grave en dos subgrupos: pacientes con signos de alarma y aquellos sin éstos; teniendo muy en cuenta que los pacientes con dengue sin signos de alarma pueden desarrollar DG **(Martínez E., 2008; OMS, 2009) (Figura 4).**

Figura 4. Clasificación de dengue.
Fuente: OMS, 2009

I.4.1.- Fases evolutivas del dengue

El dengue es una enfermedad de amplio espectro clínico desde cuadros inaparentes hasta cuadros graves, que pueden evolucionar a la muerte, es vista como una enfermedad que puede evolucionar de múltiples formas **(Martínez E., 1995, 2008)**. Después del periodo de incubación, la enfermedad comienza abruptamente y es seguida por tres fases: febril, crítica y la de recuperación.

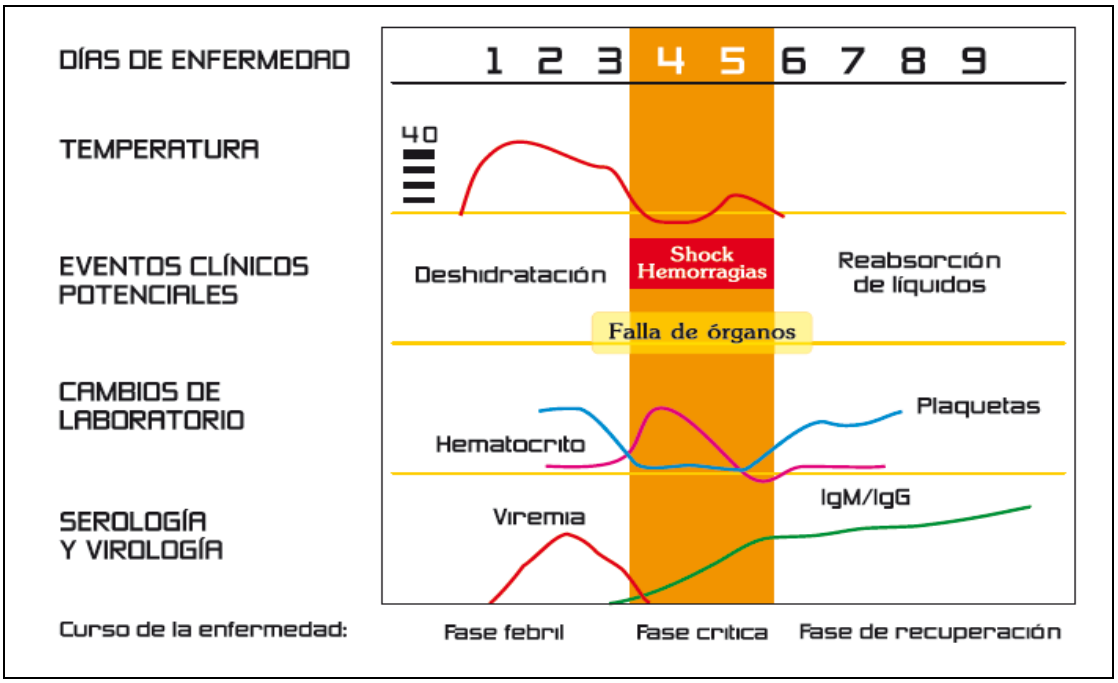


Figura 5. Evolución clínica de la enfermedad
Fuente: Eric Martínez Torres (2008).

La fase febril dura generalmente de 2 a 7 días, los pacientes desarrollan fiebre alta repentina, acompañada o no con exantema, malestar general, mialgias, artralgias, dolor de cabeza, de garganta, retro-orbital, anorexia, nauseas y vómitos **(Finizola F., 1998; Rigau-Pérez JG. et al., 1998)**. En esta fase temprana, es difícil la diferenciación de dengue con otras enfermedades; se destacan influenza y otros virus respiratorios, enfermedades febriles exantemáticas de la infancia, leptospirosis, fiebre amarilla, fiebre tifoidea, hepatitis, las púrpuras secundarias a bacteriemias, así como otras fiebres hemorrágicas virales **(Groot H., 1998).** Además, son indistinguibles entre casos de dengue grave del no grave; por lo tanto el seguimiento de los signos de alarma y de los parámetros de laboratorio son cruciales para el reconocimiento de la progresión a la fase crítica. En algunos casos se presentan hemorragias leves como petequias, epistaxis y gingivorragia. El hígado puede aumentar de tamaño.

Una prueba de torniquete positiva y el inicio al tercer día de una disminución progresiva de la cuenta de leucocitos totales aumenta la probabilidad de dengue **(WHO, 2009).**

La fase crítica se inicia entre el 3er al 7mo día de evolución de la enfermedad; es el periodo donde la fiebre se presenta en menor proporción, es decir, temperaturas de 37,5–38ºC o menores, puede ocurrir un aumento de la permeabilidad vascular en paralelo con incremento del hematocrito en un 20% o más. El tiempo clínicamente significativo de la extravasación plasmática por lo general es de 24 a 48 horas, puede detectarse derrame pleural y ascitis dependiendo del grado de escape y de volumen de rehidratación. Algunos pacientes evolucionan a la forma más grave; precedido por signos de alarma; entre ellos dolor espontáneo o durante la palpación del abdomen, vómitos persistentes, acumulación clínica de fluidos, sangrado de mucosas, letargia, irritabilidad, hepatomegalia >2cm y aumento de hematocrito asociado a una rápida caída de plaquetas **(WHO, 2009).** Puede desarrollarse un grave deterioro orgánico como hepatitis, encefalitis o miocarditis y/o hemorragias severas sin extravasación plasmática evidente o choque **(Martínez-Torres E., 2008).**

El dengue grave se caracteriza por la extravasación plasmática que lleva al SCD, y/o acumulación de líquido, con o sin dificultad respiratoria y/o daño severo de órganos (hígado, SNC, corazón, entre otros) y/o hemorragias graves. Por lo general, se desencadena en los días de defervescencia (fase crítica) entre el 4to o 5to día de evolución de la enfermedad, precedido por los signos de alarma. Durante la etapa inicial del choque, los mecanismos compensatorios que mantienen normal la presión

sanguínea sistólica, también producen taquicardia y vasoconstricción periférica con reducción de perfusión cutánea. La presión diastólica aumenta hacia la sistólica con pulso débil y rápido. Finalmente, existe una descompensación y ambas presiones desaparecen abruptamente. La hipotensión prolongada y la hipoxia pueden conducir a la falla de órganos y un curso clínico extremadamente difícil. Los pacientes son considerados que presentan choque si la presión de pulso (es decir la diferencia entre sistólica y diastólica) es de ≤ 20 mm Hg en niños o si la persona presenta signos de mala perfusión capilar (extremidades frías, llenado capilar lento o pulso rápido). En los adultos, la hipotensión de ≤ 20 mm Hg puede indicar un choque más grave, dado que está asociada con choque prolongado el cual a menudo es complicado con hemorragias mayores **(WHO, 2009).**

Los pacientes con DG presentan alteraciones de la coagulación, pero éstas no suelen ser suficientes para causar hemorragias mayores y están asociadas a choque profundo ya que, en combinación con trombocitopenia, hipoxia y acidosis, pueden conducir a la falla orgánica múltiple y a la coagulación intravascular diseminada avanzada (CID). Cada vez con mayor frecuencia se describen las llamadas manifestaciones inusuales, de las cuales la insuficiencia hepática aguda, miocardiopatías y trastornos neurológicos (encefalitis y encefalopatía) son las observadas con mayor frecuencia. La hipotensión, edema cerebral, hemorragias focales y la insuficiencia hepática fulminante pueden ser causa de la encefalopatía **(Cam BV. et al., 2001; Nguyen TL., 1997; Rigau JG., 1997).**

Después de la etapa crítica, el enfermo pasa un tiempo variable en la etapa de recuperación, durante este período el paciente debe eliminar fisiológicamente el

exceso de líquidos que se había extravasado hasta normalizar todas sus funciones vitales; en el niño y el adulto sano esta diuresis aumentada es bien tolerada, pero hay que vigilar especialmente a cardiópatas, nefrópatas o personas ancianas. Debe vigilarse también una posible coinfección bacteriana, casi siempre pulmonar, así como la aparición del llamado exantema tardío (10 días y después). Algunos pacientes adultos se mantienen muchos días con astenia y algunos refieren bradicardia. El hematocrito comienza a estabilizarse y continúa el aumento de leucocitos y de plaquetas **(WHO, 2009).**

I.5.- Diagnóstico de laboratorio de la infección por virus dengue

El diagnóstico eficiente y preciso de dengue es de gran importancia para la atención primaria (es decir, la detección precoz de casos graves, confirmación de casos, y el diagnóstico diferencial con otras enfermedades infecciosas), las actividades de vigilancia, el control de brotes, la patogénesis, la investigación académica, el desarrollo de vacunas y ensayos clínicos **(WHO, 2009).** Los métodos de diagnóstico para dengue están clasificados en diagnóstico virológico o directo y diagnóstico serológico o indirecto. Los directos incluyen el aislamiento del DENV, la detección del genoma viral y la detección de antígenos virales. En los indirectos se determinan las inmunoglobulinas específicas del virus IgM e IgG.

I.5.1.- Diagnóstico virológico

El diagnostico virológico o directo tiene por objetivo identificar el patógeno y monitorear el serotipo viral circulante. Debe realizarse con muestras tomadas durante el período de viremia (antes del día 5). El virus puede recuperarse de muestras de suero, plasma y células mononucleares (CMN) de sangre periférica y tejidos de autopsia. Al igual que otros virus envueltos el DENV tiende a ser lábil al calor y las muestras deben ser conservadas y transportadas en hielo húmedo para mantener su viabilidad.

Los cultivos celulares de mosquitos y principalmente de células de línea *Aedes albopictus*, C636 y de *Aedes pseudoscutellaris* (AP61) son los más utilizados de rutina para el aislamiento del virus **(Igarashi A., 1978; Kuno G., 1982; Race MW. et al., 1979; WHO, 2009).** Otros cultivos de células de mamíferos (Vero, LLCMK2 y BHK21) y la inoculación intracerebral en ratones lactantes también se han empleado, pero tienen poca sensibilidad. La inoculación intratorácica de mosquitos y en particular del *Toxorhynchites amboinensis* es el método más sensible para aislar el DENV **(Rosen L. et al., 1985).** El aislamiento es seguido con la identificación viral a través del desarrollo de una inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales específicos a los cuatro serotipos **(Henchal EA., 1983).** El método seleccionado para el aislamiento viral depende de las facilidades disponibles en cada laboratorio.

La detección del genoma viral (ARN) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polimerase chain reaction*) ofrece una mayor sensibilidad en comparación con el aislamiento viral y los resultados se pueden obtener entre 6 y 24 horas después de recibida la muestra. Este sistema se desarrolla en tres etapas

básicas: la extracción del ácido nucleíco y purificación; la amplificación y la detección del producto amplificado. Desde el año 1990, varios ensayos de PCR-Transcriptasa Reversa (RT-PCR) se han desarrollado para la detección del ARN viral, destacándose aquellos que detectan la presencia del gen que codifica la envoltura del virus o alguno de los genes que codifican para las proteínas no estructurales. La RT-PCR anidada (nested/PCR) es ampliamente utilizada por su mayor sensibilidad **(Lanciotti R. et al., 1992; Rosario D. et al., 1998).** El ensayo PCR-TR en tiempo real es recientemente uno de los sistemas más sensibles que permite detectar y cuantificar el ARN viral presente en las muestras de suero y CMN de sangre periférica de pacientes con dengue aun en presencia de un bajo número de copias. Se realiza en un solo paso lo que disminuye las posibilidades de contaminación, la señal que se produce en las muestras positivas se monitorea en tiempo real, utiliza pares de cebadores y sondas específicas para cada serotipo viral **(Chutinimitkul S. et al., 2005; Levi J. et al., 2007).**

Los métodos para la detección de antígenos virales en particular proteínas de la envoltura/membrana (E/M) y la proteína 1 no estructural (NS1) del DENV están en proceso de evaluación y validación por el OMS/TDR. Varios autores han reportado la detección de la proteína E como método de diagnóstico temprano, sin embargo su baja sensibilidad obtenida principalmente en pacientes con infección secundaria aun no ha permitido su uso en la rutina diagnóstica **(Kittigul L., et al., 1997).** La proteína NS1 se ha demostrado que circula en sangre durante las etapas tempranas de la enfermedad lo que sugiere su posible aplicación en el diagnóstico agudo de la infección (**Kumarasamy V. et al., 2007).**

I.5.2.- Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico o indirecto es utilizado para la detección de anticuerpos anti-dengue y debe solicitarse a partir del sexto día después del inicio de síntomas. La respuesta de anticuerpos a la infección por DENV varía según el estado inmunológico del paciente **(Vorndam V. et al., 1997).** La cinética de las inmunoglobulinas depende del tipo de infección. Cuando la infección ocurre en personas quienes no han sido previamente infectados por un flavivirus o vacunados, desarrollan una respuesta primaria de anticuerpos, caracterizada por un aumento gradual de IgM específicas, los cuales pueden ser detectados en el 50% de pacientes entre los días 3-5 de la enfermedad, incrementando a un 95% a partir del quinto día. Los niveles máximos de IgM se detectan dos semanas después del inicio de los síntomas y declinan a niveles no detectables generalmente entre 2-3 meses después del inicio de la enfermedad. Las IgG anti dengue en suero son detectables a títulos bajos al final de la primera semana de la enfermedad, aumentando lentamente hacia el séptimo a décimo día, se mantienen detectables por varios meses e incluso de por vida. Durante la infección secundaria (infección por dengue en un persona que haya sido previamente infectada por un serotipo viral o algunas veces después de infección o vacunación por otro flavivirus) los títulos de anticuerpos aumentan rápidamente y pueden detectarse títulos a partir del segundo día. La IgG es la inmunoglobulina que se detecta a niveles más altos, incluso en la fase aguda, y persiste por meses. Los títulos de IgM son significativamente inferiores en la infección secundaria que en la primaria. En un pequeño número de pacientes con infección secundaria, los anticuerpos IgM pueden no ser detectados (**WHO, 1997, 2009;**

Innis B. et al., 1989; Guzmán MG. et al., 2005). Para distinguir infección primaria de secundaria, la relación de anticuerpos IgM/IgG es ahora más usada que la prueba de inhibición de la hemaglutinación **(Falconar AK. et al., 2006).**

Actualmente, el TDR/OMS y la Iniciativa para la vacuna de Dengue Pediátrica (PDVI) lideran un proyecto de evaluación de los diferentes estuches de diagnóstico comerciales existentes, para definir los mejores sistemas de diagnóstico en términos de sensibilidad, especificidad y factibilidad **(Guzmán MG. et al, 2008).**

Se ha descrito incremento de IgA específica en suero durante la infección por dengue, a menudo se presenta un día después que la IgM. Los títulos de IgA alcanzan el pico alrededor de los ocho días después de la aparición de la fiebre y disminuyen rápidamente hasta ser indetectables cerca de los 40 días. Han sido propuestos como marcadores de infección reciente junto con la detección de IgM y como ayuda en la interpretación de la serología para dengue **(Talarmin et al., 1998).** Así mismo, se desarrolló un ELISA para IgE anti dengue, concluyendo que pueden ser posibles marcadores de pronóstico y contribuir en la patogénesis del virus **(Koraca P. et al., 2003)**. Se requieren estudios más profundos que permitan definir exactamente el significado y papel de estos anticuerpos, desde el punto de vista de la respuesta inmunitaria y la patogenia de la enfermedad así como su valor diagnóstico y pronóstico **(Guzmán MG. et al., 2008)**.

La detección de IgM permite el diagnóstico de una infección reciente. Diferentes formatos de ensayos inmunoenzimáticos y principalmente ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC-ELISA), las tiras reactivas y el sistema ultramicroELISA (UMELISA/Dengue) son ampliamente usados en el diagnóstico de

rutina como apoyo a la vigilancia de laboratorio. Estos sistemas muestran cifras de sensibilidad y especificidad mayor a 95% dependiendo del método, fuente de antígeno viral y del conjugado. La mayoría de los antígenos en el MAC-ELISA son derivados de proteína de la envoltura del DENV (sobrenadantes de cultivos de células o suspensiones de cerebro de ratón infectadas) **(PAHO, 1994; Vázquez S. et al., 2007).**

Las pruebas de ELISA para IgG se utilizan en la determinación de infecciones recientes o pasadas (si se recolectan las muestras de suero pareados dentro del periodo de tiempo correcto). El uso de ELISA para la captura de IgG (GAC-ELISA) específico para envoltura y membrana permite la detección de IgG en un periodo de 10 meses después de la infección. Los anticuerpos IgG son detectados de por vida con ELISA IgG indirecta, un aumento de cuatro veces o más del título en sueros pareados de fase aguda y convaleciente son utilizados para confirmar infección reciente **(Innis B. et al., 1989).** En el diagnóstico serológico y vigilancia de casos de dengue, también se utiliza la detección de IgG por el método de inhibición de ELISA (EIM) **(Fernández R. et al., 1990).** Estos métodos pueden ser usados para detectar IgG anti dengue en suero o plasma, y en muestras de sangre almacenadas en papel filtro y permiten identificar los casos de infección primaria o secundaria **(OMS, 2009).**

La relación IgM /IgG específica a la proteína E/M del DENV puede utilizarse para distinguir infecciones primarias de secundarias. Los ELISA de captura de IgM e IgG son los ensayos comunes para este propósito. En algunos laboratorios, la infección primaria por dengue se define si la relación de densidad óptica (DO) IgM/IgG es superior a 1,2 (suero diluido 1/100) o 1,4 (suero diluido 1/20). La infección

es secundaria si la relación es menor de 1,2 o 1,4 **(Shu, P. et al., 2003; Falconar AK. et al., 2006).**

I.6.- Patogénesis

Después que una persona es picada por un mosquito hembra infectado, el virus se replica en los nódulos linfáticos regionales produce una viremia y se disemina a los diferentes tejidos afines donde alcanza el sistema fagocítico mononuclear, principal blanco de su acción patógena **(Monath TP., 1996)**. El periodo de incubación varía de 3 a 14 días, con un promedio de 4 a 7 días (**Gubler DJ., 1998; Rigau-Pérez JG., 1998).** En la infección primaria, el virus penetra a la célula mediante su interacción con un receptor celular dando lugar a la aparición de anticuerpos neutralizantes capaces de proteger al individuo contra virus homólogo y durante solo 2-3 meses contra los otros serotipos (**Morens DM., et al., 1990; Kurane I., 2007).**

I.6.1.- Factores virales

Dentro de las diversas hipótesis que tratan de explicar la forma grave del dengue destacan los factores relacionados al virus, la asociación de ciertos tipos genéticos del DENV con brotes de dengue grave, apuntando a las cepas con mayor virulencia **(Rosen L., 1986; Rico-Hesse et al., 1997**); altos títulos de viremia y cambios en la estructura del virus, específicamente en las prM, E, NS4b y NS5 del genoma de DENV-2, que sugieren ser determinantes primarios para el desarrollo de DG **(Leitmeyer K., 1999; Vaughn DW., 2000)**. Al respecto se ha reconocido la relación de algunos genotipos, como los serotipos DENV -2 y DENV-3 de origen asiático con

epidemias de DG, mientras que los llamados genotipos americanos de estos dos serotipos virales no se han relacionado con severidad de la enfermedad **(Rico-Hesse R. et al., 1997, 1998)** Recientemente, se describió que la virulencia del DENV está relacionada con la presencia de anticuerpos heterólogos que se forman en las infecciones primarias, en las que generalmente no se desarrolla la forma severa de la enfermedad **(Halstead SB., 2009).** El riesgo de desarrollar la forma grave es mayor en la infección secuencial DENV-1/DENV-2, seguida de DENV-3/DENV-2 **(Álvarez M. et al., 2006; Guzmán MG. et al., 1991).** Sin embargo, la severidad de la enfermedad se puede desarrollar en infecciones primarias en adultos que no han sido expuestos con anterioridad a una infección por el virus **(Ong A. et al., 2007).** En investigaciones recientes, se ha propuesto que la estructura secundaria del ARN viral de diferentes cepas de un mismo serotipo, específicamente la región proximal 3'UTR, está asociada a la posibilidad de manifestar la forma severa de la enfermedad **(Koraka P. et al., 2009).** El dengue grave desarrollado en algunos niños menores de un año, sin antecedente de exposición al virus, es otra importante evidencia epidemiológica a favor de la infección secuencial como factor de riesgo. En ellos, probablemente, el cuadro grave es causado por los anticuerpos maternos **(Kliks SC. et al., 1988).** La carga viral es un factor contribuyente de DH/SCD **(Vaughn DW. et al., 2000),** en un estudio realizado en niños tailandeses encontraron que los picos de los títulos virales eran de 10 a 100 veces más altos en pacientes con SCD que en aquellos con FD. Pero, esto tiene cambios dinámicos, varían de individuo a individuo, de día a día después de la infección, y disminuye rápidamente el día que desaparece la fiebre **(Lei et al., 2008).**

I.6.2.- Factores del huésped

La patogénesis de la enfermedad grave aun no está bien esclarecida, varias teorías han sido propuestas de acuerdo a factores dependientes del huésped.

I.6.2.1.- Observaciones epidemiológicas

La hipótesis de Halstead **(1974),** basada en el fenómeno conocido como **Amplificación Dependiente de Anticuerpos** (ADA), sucede cuando un serotipo heterólogo viral infectante forma complejos virus-anticuerpos no neutralizantes que penetran en las células fagocíticas-mononucleares (monocitos-macrófagos) a través de los receptores celulares de tipo gamma (Fc-γ) tipo I (CD64) y II (CD32). La replicación del virus induce a estas células infectadas a liberar mediadores vasoactivos que producen permeabilidad vascular y manifestaciones hemorrágicas típicas, lo que explica el mayor número de monocitos infectados en el dengue secundario, sin embargo hay que reconocer que esta teoría no explica la totalidad de los casos **(Halstead SD., 2007; 1988;1982).** Tambien, han sido implicados los anticuerpos IgG, IgM y receptores C3 del sistema de complemento **(Van der Schaar HM ete al., 2009; Gollins SW. et al., 1986; Cardosa MJ. et al., 1983).** Diversos estudios epidemiológicos, clínicos y de laboratorio soportan esta teoría dada la asociacion de la forma grave con infecciones secundarias por el DENV **(Burker DS., 1988; Guzmán MG., 1990)**.

La respuesta inmunitaria del hospedero incluyendo **la activación de los linfocitos T** durante la infección por DENV es también otro factor importante en la patogénesis de la forma grave del dengue (**Kurane I., 2007**). En la infección primaria se producen clones de linfocitos T CD4+ y CD8+ efectoras y con memoria específicas

para el serotipo infectante. Los anticuerpos con reactividad cruzada para los serotipos de una infección previa se unen a los viriones sin neutralizarlos y aumenta la entrada del virus al monocito, incrementando el número de estas células infectadas por el DENV y como consecuencia los niveles de linfocitos T activados incrementan marcadamente; éstos desempeñan diversas acciones entre las cuales se encuentran la proliferación y producción de citoquinas tales como IFN-γ, IL-2 y TNFα y la lisis de los monocitos infectados. El TNFα también es producido por los monocitos activados. La cascada del complemento es activada por los complejos virus-anticuerpo así como también por varias citoquinas, para liberar C3a y C5a que tienen efectos directos sobre la permeabilidad vascular **(Lei HY. et al., 2008; 2001).** Seguida de la activación de los linfocitos T se evidencian diversos patrones de **sobreproducción de citoquinas** proinflamatorias frecuentes en los pacientes con dengue **(Kurane I., 2007)**. Una serie de estudios han sugerido que el escape plasmático observado en DG, es causado por la disfunción de las células endoteliales vasculares inducida por citoquinas y mediadores químicos antes que por destrucción de los pequeños vasos **(Green S. et al, 2006).** Sin embargo, aun no se entiende claramente como estas citoquinas son inducidas y como causan la disfunción de las células endoteliales vasculares y conducen al escape plasmático. Diversos autores sugieren que las citoquinas secretadas por los monocitos/macrófagos infectados con DENV cumplen un papel crucial en la fisiopatología de la forma severa de la enfermedad **(Chaturvedi UC. et al., 2009).**

También, reportan un cambio de una respuesta TH1 presentado en pacientes con dengue a una respuesta TH2 en la forma grave de la enfermedad, es decir, a

medida que la gravedad de la enfermedad incrementa la respuesta cambia a TH2. **(Chaturvedi UC. et al., 1999, 2005).** Las células T CD4+ tienen dos principales subpoblaciones celulares tradicionalmente denominadas TH1 y TH2 y recientemente entra en escena un nuevo tipo de células T CD4+, denominadas TH17. Las células TH1 son las responsables de las reacciones mediadas por células, la hipersensibilidad retardada e injuria tisular en infecciones y enfermedades autoinmunes, con un patrón de citoquinas que producen IFNγ, IL-2, y TNFβ. Las células TH2 están asociadas con la producción de anticuerpos por células B y secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Se han escrito un gran número de estudios para entender el mecanismo del cambio de respuesta de citoquinas de TH1 a una respuesta TH2 en el dengue grave **(Chaturvedi UC. et al., 1999; Green S. et al., 1999; Pacsa A. et al., 2000; Chen R. et al., 2007)**.

Así mismo, se planteo una **hipótesis integral** donde la presencia o ausencia de factores de riesgo individuales determinan la gravedad de la enfermedad e incluyen la infección secundaria, la edad, el sexo, etnia, y enfermedades crónicas posibles (asma y diabetes); factores epidemiológicos relacionados con el vector, el intervalo de tiempo entre las infecciones, la amplia circulación viral y factores relacionados con el virus, el serotipo y virulencia del virus, los que como consecuencia de su integración ocasionan el desarrollo de la forma severa de la enfermedad **(Kourí GP., 1987; Guzmán M. et al., 2008).**

Los factores individuales son factores predisponentes que hacen que la enfermedad sea más frecuente en un grupo racial o a determinada edad. Sin embargo, la existencia de anticuerpos de una primera infección es el factor de riesgo

individual principal para el desarrollo de la forma grave de la enfermedad. Así mismo, estos factores determinan que la enfermedad se produzca en un determinado individuo en una población en específico. La presencia o ausencia de estos factores individuales en el contexto de los factores epidemiológicos y virales determinan que no todas las personas con una infección secundaria presentan el cuadro severo de la enfermedad. Los niños tienen un mayor riesgo de desarrollar la forma grave de dengue que los adultos lo que ha sido señalado principalmente en el Sudeste Asiático y Pacífico Occidental. Estos estudios demostraron que la edad para el desarrollo del dengue grave era bimodal con dos picos de severidad, a los 7 meses de edad y en las edades de 3-5 años. El dengue grave ocurre en niños menores de un año con anticuerpos anti-dengue transmitidos por vía placentaria quienes se infectan posteriormente con el virus. En general, los niños menores de un año desarrollan FHD en el curso de una infección primaria. Estos niños son hijos de madres inmunes a dengue. Por otra parte, los niños de 3-5 años desarrollan FHD en el curso de una infección secundaria. Además de la infección secundaria, las enfermedades crónicas como asma bronquial y diabetes se han sugerido como factores de riesgo de la forma grave de dengue. Finalmente los blancos tienen un mayor riesgo de desarrollo de dengue grave que los negros **(Guzmán M. et al., 1987, 1999).** No obstante, en Haití, en un estudio realizado en escolares encontraron como factores de riesgo para DH, que el 85% de los niños tenían anticuerpos para dos o más serotipos, la tasa de transmisión anual era 30%, y el serotipo circulante era DENV-2, sin embargo no se hallaron casos de DH **(Halstead SD. et al., 2001)**. En África

aunque circulen los cuatro serotipos del dengue y exista el vector, no se han reportados epidemias de DG **(Gubler DJ., 1998).**

I.6.2.2.- El DENV induce producción de auto-anticuerpos

Los desórdenes autoinmunes son relevantes en la patogénesis del dengue. La respuesta de anticuerpos anti-NS1 en ratones ha mostrado reacción cruzada con una gran variedad de tejidos. Cuando los anticuerpos anti-NS1 humanos son desarrollados, muestran afinidad por el fibrinógeno humano, los trombocitos y las células endoteliales **(Nielsen D., 2009; Faconar AK., 1997).**

Se ha sugerido que el DENV induce supresión de la médula ósea deprimiendo la síntesis de plaquetas, originando trombocitopenia **(La Russa and Innis, 1995). Wang S. et al.**, **(1995)** describieron que el DENV-2 puede unirse a plaquetas humanas en presencia de anticuerpos específicos contra el virus. Se han determinado auto-anticuerpos tipo IgM anti-plaquetas en pacientes con dengue y en ratones infectados con el virus **(Lin C. et al., 2001; Huang et al., 2000)**. El título de anticuerpos IgM anti-plaquetas es más alto en pacientes con FHD/SCD que en los que presentan FD. La presencia de estos auto-anticuerpos induce lisis de las plaquetas en presencia del complemento e inhibe la agregación plaquetaria inducida por el ADP. Aunque no se han reportado diferencias o correlación entre los niveles de estos anticuerpos IgM anti-plaquetas con el contaje de plaquetas en recién nacidos y niños con FHD/SCD, o FD sin choque en relación a SCD, los auto-anticuerpos anti-plaquetas pueden contribuir a la destrucción de las mismas **(Lin C. et al., 2006).**

También se ha descrito que anticuerpos de suero de pacientes con DEN provocan una reacción cruzada con las células endoteliales e inducen daño. Estos anticuerpos anti-célula endotelial se han observado en mayor porcentaje en pacientes con DG que los que presentan dengue leve **(Lin C. et al., 2003).**

I.6.2.3.- Efecto del DENV sobre células endoteliales

Las anormalidades hematológicas constantes en dengue incluyen supresión de médula ósea, leucopenia y trombocitopenia. Los mecanismos planteados para explicar los fenómenos hemorrágicos son: trombopatía, consistente en trombocitopenia y disfunción plaquetaria, vasculopatía y coagulación intravascular diseminada (CID) **(Srichaikul T. et al., 2000).** En cuanto a la trombopatía, se han realizado múltiples estudios **(Lei H. et al., 2001, Huang K. et al., 2000, Gubler D., 1998),** que señalan los diferentes mecanismos de producción de la trombocitopenia observada en Dengue. Igualmente se ha descrito que el endotelio juega un papel crucial en el mantenimiento de la hemostasia, y que en la FHD se produce daño en la célula endotelial, lo cual es un estimulo para el proceso de formación del trombo plaquetario, las plaquetas estimuladas se adhieren al endotelio mediante moléculas de adhesión conocidas como Integrinas, el Factor de von Willebrand (FvW) y el fibrinógeno, entre otras **(Huang YH., 2001).**

I.6.2.3.1.- Vasculopatía

La principal característica de la forma grave de DEN y el mejor indicador de severidad de la enfermedad es la pérdida de plasma; la cual se debe a un

incremento difuso en la permeabilidad capilar, que puede manifestase en forma clínica como serositis y evidenciarse por derrame pleural, pericardico o ascitis, y/o por exámenes de laboratorio que evidencien hemoconcentración e hipoproteinemia. Por lo general, se hace evidente entre los días 3-7 de la enfermedad, tiempo durante el cual desaparece la fiebre (**Burke et al., 1988**). La pérdida de plasma se produce en forma sistémica, avanza rápidamente, pero se resuelve en 1 o 2 días en pacientes que reciben restauración adecuada de líquidos. Aunque el edema perivascular es obvio, no se ha reportado destrucción de células endoteliales vasculares. Anteriormente, se pensaba que la pérdida de plasma se debía a alteración en la permeabilidad vascular, en lugar de destrucción estructural de las células endoteliales. La alteración funcional de las células endoteliales es causada probablemente por efectos estándares de mediadores o citoquinas liberados en la infección por el virus. El DENV puede infectar células endoteliales *in vitro,* las cuales conducen a la apoptosis, así como también, a la producción de citoquinas y quimiocinas tales como IL-6, IL-8 y RANTES **(Avirutnan et al., 1998; Huang et al., 2000)**, pero no ha sido demostrado en biopsia de humanos con FHD/SCD.

Las células endoteliales infectadas por DENV son capaces de activar el complemento e inducir expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular–1 (ICAM-1). La expresión de ICAM-1 junto con la producción de IL-6, IL-8 y de la quimioquina RANTES incrementan la adherencia de células mononucleares y polimorfonucleares, asociada con el daño de la célula endotelial y el incremento de la permeabilidad vascular **(Huang et al., 2000; Bosh I. et al., 2002)**.

I.6.2.3.2.- Coagulopatía

Algunas infecciones virales pueden causar anormalidades hemostáticas. La hemorragia es una consecuencia de la trombocitopenia y se asocia con disfunción plaquetaria o CID. En dengue las manifestaciones hemorrágicas inducidas por el virus, las alteraciones vasculares plaquetarias, son muy comunes, pero a medida que progresa la severidad de la enfermedad, puede ocurrir hemorragia masiva con CID. La hemostasia se mantiene debido al balance entre la coagulación y la fibrinólisis. El sistema de coagulación puede ser activado tanto por vía intrínseca como extrínseca para formar trombina, la cual convierte el fibrinógeno en fibrina. Por el contrario, el sistema fibrinolítico, puede romper la fibrina en productos de degradación de la fibrina. El sistema fibrinolítico humano se compone de plasminógeno, una proenzima, activada a plasmina activa por varios tipos de activadores de plasminógeno. El activador endógeno principal del plasminógeno es el activador de plasminógeno tisular (APt), la cual es una proteína proteolítica implicada en la disolución de los coágulos de sangre y es sintetizada por las células endoteliales **(Bachmann and Kruithof, 1984).** El inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), que es producido por las plaquetas, hígado y endotelio, es el principal inhibidor del APt. En general, la activación de la coagulación desencadena una activación secundaria de la fibrinólisis, que es rápidamente cortada por la liberación de grandes cantidades de PAI-1 **(Van Gorp et al., 1999).**

Durante la infección aguda por el DENV se alteran los parámetros de la coagulación, tales como contaje de plaquetas, tiempo parcial de tromboplastina

(TPT), así como los parámetros fibrinolíticos APt y PAI-1. El TPT se prolonga, mientras que el APt aumenta. Tanto la coagulación como la fibrinólisis se activan, y esta activación es mucho más severa en pacientes con FDH/SCD que en FD. Después de la convalecencia, hay elevación de los niveles de PAI-1 y plaquetas, los cuales son concomitantes con la disminución del nivel de APt y regresa a la normalidad el TPT. La relación APt/PAI-1 es más alta en pacientes con FHD/SCD que en los pacientes FD. La prolongación del TPT y la relación APt/PAI-1 incrementada en la fase aguda de la infección por el virus se correlaciona con la severidad de la enfermedad y puede ser utilizada como indicadores tempranos de FHD/SCD **(Huang et al., 2001).** El TPT y el 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 DENV, lo que sugiere que ocurre una alteración en la vía intrínseca de la coagulación. Esto puede ser causado por una baja regulación de síntesis de factores específicos o por aumento del consumo de estos factores. Dado que se ha encontrado hepatitis leve en la infección por DENV, un análisis sobre la correlación y regresión lineal entre los niveles de AST/ ALT y TPT muestran una fuerte asociación entre la elevación de las transaminasas y la prolongación del TPT en pacientes con DH. La disfunción hepática podría ser responsable de la disminución en la síntesis de factores específicos en la vía intrínseca. El consumo incrementado de los factores como lo indican los altos niveles de APt se asocian también con la prolongación del TPT, pero de manera menos significativa. Por lo tanto, la síntesis disminuida, como el consumo incrementado de los factores de

coagulación se relacionan con la prolongación del TPT **(Lei et al., 2008; Larreal Y et al, 2005).**

I.7.- Citoquinas

Las citoquinas son factores solubles de carácter pleitrópico liberados principalmente por leucocitos, y constituyen una vía esencial de interacción entre los diferentes tipos celulares del sistema inmunitario, y entre éste y el resto del organismo. Las citoquinas intervienen en el desarrollo del sistema inmunitario controlando la proliferación y movilización de células madre hematopoyéticas, así como de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T que participan en la respuesta inmunitaria. Estas moléculas intervienen en la regulación del sistema inmunitario, los procesos inflamatorios y están implicadas en las respuestas frente a agentes infecciosos que en ocasiones pueden ser responsables de procesos patológicos. Las citoquinas incluyen a las interleuquinas, linfoquinas, interferones, monoquinas y quimiocinas **(Moree MA., 2002; Geginat J. et al., 2001**).

Las citoquinas son polipéptidos o glicoproteínas con un peso molecular menor de 30 kDa, aunque algunas pueden formar oligómeros de mayor peso molecular. La clonación de los genes de estas citoquinas ha permitido su producción en masa y actualmente está siendo explorada la utilidad terapéutica de la administración de citoquinas o moléculas antagonistas en enfermedades infecciosas, tumorales o autoinmunes **(Suarez A., 2003).**

Las citoquinas ejercen su función actuando sobre receptores específicos de membrana y contribuyen a la activación, blastogénesis y/o diferenciación en células

efectoras, regulando también otros procesos como la apoptosis, adquisición de capacidad citotóxica y recirculación de leucocitos (**Alvarez-Mon et al., 1985**).

Las citoquinas juegan un papel fundamental en la respuesta innata mediante mecanismos de acción directa frente al agente agresor o mediante la movilización de mecanismos inmunorreguladores (iniciadores de la inflamación, elevando la temperatura corporal y activando las células NK y los macrófagos). Las citoquinas que actúan en esta fase están producidas fundamentalmente por los macrófagos, las células NK y otras no inmunitarias como fibroblastos y células endoteliales. Las principales citoquinas que intervienen en la respuesta innata son: IL-1, IL-6, TNFα e interferones (IFNα e IFNγ).

En la infección por DENV, las citoquinas pueden ser liberadas tanto directamente de células infectadas por el virus tales como monocitos/macrófagos, como en interacciones de células infectadas por virus con otras células inmunitarias, tales como linfocitos T activados. Por este mecanismo es que se involucra la activación de los macrófagos infectados con virus y la producción de citoquinas como Factor de Necrosis Tumoral (TNFα), Interlequina-6 (IL-6) e Interlequina-1β (IL-1 β) (**Yang K. et al., 1995**).

I.7.1.- Factor de necrosis tumoral (TNFα)

Es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos tales como Lipopolisacárido (LPS) y tras la estimulación por linfocitos T activados mediante contacto célula a célula y/o la secreción de citoquinas (IFNγ o IL-2). Además, es producido por linfocitos B y T, células NK, fibroblastos y

mastocitos. Junto con la IL-1 está implicado en las reacciones inflamatorias derivadas de los procesos infecciosos. Inducen la producción de factores de crecimiento endotelial y tienen actividad angiogénica. Por otra parte, induce la expresión de moléculas de adhesión y estimula la producción de IL-8 por células del endotelio vascular, lo que contribuye a la extravasación de linfocitos, neutrófilos y monocitos. **(Joost J. et al., 2000; Abbas A. et al., 2009)**. Este factor ejerce su actividad biológica a través de dos receptores p55TNFR I y p75TNFR II, pertenecientes a la superfamilia del TNFR.

El TNF- α se conoce por ser uno de los más potentes factores activadores de células endoteliales e inductores de la permeabilidad capilar **(Pober et al., 1990)**. Esta citocina es liberada por monocitos infectados por DENV **(Anderson et al., 1997)**, y se ha sugerido que existe fuerte correlación entre las concentraciones de TNF-α en sangre y la severidad del DH **(Braga E. et al., 2001; Hober et al., 1998).**

I.7.2.- Interleucina 1 beta (IL-1β)

La IL-1 es segregada de forma inducible por múltiples tipos celulares, monocitos, macrófagos, células dendríticas, endoteliales, NK y gliales. Los monocitos/macrófagos secretan IL-1 en respuesta a productos bacterianos y citoquinas proinflamatorias (TNFα e IFNγ) **(Weawe CT. et al., 1986).** Existen dos formas, IL-1α e IL-1β, que actúan a través de receptores con actividades biológicas similares, IL-1RI e IL-1RII. Éstos pertenecen a la familia de los receptores tipo Toll/IL-1R (TLR) implicados directamente en la respuesta inmunitaria innata mediante el reconocimiento de moléculas asociadas a patógenos como bacterias, hongos y virus

(Martin MU. et al., 2002). Esta citoquina induce la liberación de histamina en los mastocitos, generando vaso dilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el lugar de la inflamación. Es el principal pirógeno endógeno, induciendo fiebre a través de la producción de prostaglandinas. Promueve la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y actúa sobre el sistema nervioso central induciendo sueño y anorexia, típicamente asociados con los procesos infecciosos **(Joost J. et al., 2000; Abbas A. et al., 2009)**.

I.7.3.- Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citocina pleiotrópica con actividad proinflamatoria y anti inflamatoria que actúa sobre una gran variedad de células induciendo diferenciación, proliferación y supervivencia de las células diana, además es un importante mediador de la respuesta de fase aguda y tiene actividad neuroendocrina. En linfocitos B estimula la diferenciación a célula plasmática, la proliferación y la producción de inmunoglobulinas (Igs), en linfocitos T induce la proliferación y diferenciación de linfocitos T citotóxicos. También tiene actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de la producción de IL1 y TNFα por macrófagos por un lado y la inducción de la producción de IL1Ra por otro **(Horn F. et al., 2000).**

Lei HY et al **(2001**), señalan que la IL-6 tiene un papel dual en dengue, tanto como pro-inflamatorio como de mediador anti-inflamatorio, su análisis cinético mostró una alta variación a diferentes tiempos y en diferentes individuos, pero ocurrió una elevación alta y transitoria tanto en el día 7 como en los días 9-11 después del inicio de la fiebre. Esto sugiere que cuando un huésped responde a la infección del virus

dengue vía generación de citoquinas inflamatorias, simultáneamente, también hay generación de citoquinas inhibitorias para contrarrestar la inflamación.

I.7.4.- Interleucina 12 (IL-12)

La IL- 12 es producida mayoritariamente por monocitos/macrófagos, pudiendo también ser inducida por células dendríticas y linfocitos B. La importancia actual de esta citoquina deriva de su capacidad de dirigir la diferenciación de los linfocitos Th hacia células efectoras tipo TH1. La forma madura de esta molécula (p75) está compuesta de dos subunidades, p35 y p40. La síntesis de ambas subunidades está regulada diferencialmente, siendo ambas necesarias para la actividad funcional del heterodímero. Incrementa la actividad citotóxica de las células NK e induce células LAK (linfocitos asesinos activados por linfoquinas) por linfocitos T y células NK y activa e incrementa la producción de IFN-γ y linfocitos T citotóxicos **(Abbas A. et al., 2009; Trincheri G. et al., 1997).**

La IL-12 tiene un amplio rango de actividades incluyendo la regulación de síntesis de citoquinas y el efecto en la sobreregulación de las células TH1, mientras que su ausencia cambia el balance hacia citoquinas tipo TH2. **Pasca et al., 2000**, observaron niveles elevados de IL-12 en pacientes con DC y su completa ausencia en DH grado III y IV. Contrario a lo reportado por **Pérez A et al., (2004)**, quienes no encontraron alteración alguna de las concentraciones de IL-12 en los pacientes con dengue al compararlos con el grupo control.

I.7.5.- Interleucina 17 (IL-17)

La interleuquina 17 (IL-17), también conocida como IL-17A o CTLA-8 (antígeno 8 asociado al linfocito T citotóxico), es una citoquina proinflamatoria secretada exclusivamente por células T activadas; fue descrita en 1995 y pertenece a la familia de citoquinas llamada IL-17. Su receptor, denominado IL-17R, está distribuido en gran cantidad de tejidos **(Dong C. 2006; Kawaguchi M. et al., 2004; Moseley TA. et al., 2003).** La IL-17A ha sido caracterizada como una citoquina proinflamatoria que actúa en una variedad de tejidos dentro del organismo, y se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, osteoartritis, cáncer, rechazo a aloinjertos y procesos inflamatorios crónicos de la vía aérea. Identificándose como su principal papel biológico la activación y expansión rápida de neutrófilos durante procesos infecciosos u otro tipo de injurias **(Moseley TA. et al., 2003; McKanzie BS. et al., 2006).** Recientemente, se reportó un incremento de IL-17 en plasma de pacientes con dengue en fase aguda, días después del inicio de síntomas **(Becquart P. et al., 2010).**

I.7.6.- Receptores soluble del TNF

Las acciones biológicas del TNF soluble (sTNF) se ejercen subsecuentemente a la unión con los receptores de superficie celular. Se han descrito dos receptores p55TNFR I y p75TNFR II, ambos son expresados en todas las membranas celulares excepto los eritrocitos como unidad traductora de señal o en sus formas solubles en los fluidos extracelulares, lo que amplía su rango de acción. Ambos receptores de membrana unen el ligando con afinidad similar pero inician vías de señalización separadas y poseen diferentes cinética de unión **(Wallach D. et al., 1999);** median en

forma cooperativa o independiente un amplio rango de respuestas celulares, como la proliferación, diferenciación, citotoxicidad o apoptosis celular. La función principal de TNF-RI es la de interactuar con la forma soluble del TNFα y regular los procesos proinflamatorios y apoptóticos de esta citoquina. El TNF-RII, en cambio, tiene su interacción principal con la forma de membrana del TNF, cumpliendo un papel clave en la respuesta tisular local, como es el caso de la hepatitis y la artritis reumatoide. Las formas solubles de ambos receptores (sTNF-R), se han designados como sTNF-RI y sTNF-RII parecen afectar de alguna manera la actividad biológica y la biodisponibilidad del TNFα a nivel sistémico **(Anaya JM., 2003).** Altas cantidades de sTNF-R funcionan como inhibidores específicos de la actividad de TNF en tejidos diana **(Opal S. et al., 2000).**

I.7.7.- Proteína 1 tipo receptor de interleucina-1 (IL-1RL1/ST2)

El IL-1RL1, también conocido como ST2, es un miembro de la superfamilia de receptores tipo Toll/IL1R (TLR) **(Dunne & O'Neill, 2003),** los cuales muestran homología en un 29% aproximadamente con el receptor de IL-1 tipo I (IL-1RI). El gen ST2, también denominado T1 o DER4 fue identificado principalmente como gen responsable de inducir proliferación en fibroblastos de ratón por estimulación de varios agentes inductores que incluyen a los factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y de fibroblastos (FGF) o ácido lisofosfatídico. Genera tres isoformas a partir del mRNA: una forma de membrana anclada larga (ST2L), una de membrana variante (ST2V) y una forma corta soluble (sST2) **(Tominaga, 1989; Yanagisawa K. et al., 1993).** ST2L y sST2 están involucradas en el control de expresión

de algunas citoquinas durante la inflamación, regulando la respuesta inflamatoria **(Trajkovic et al., 2004).** Su expresión ha sido detectada en varios tipos celulares, incluyendo las células TH2 y mastocitos **(Xu D. et al., 1998**; **Moritz DR. et al., 1998).**

La expresión de sST2 puede ocurrir en respuesta a un incremento de citoquinas pro-inflamatorias en fibroblastos de ratón y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) **(Kumar et al., 1997; Tajima S. et al., 2003).** Niveles incrementados de sST2 se han encontrado en pacientes con desordenes inflamatorios asociados con respuesta anormal mediada por células TH2, incluyendo enfermedades autoinmunes **(Kuroiwa K. et al., 2001),** fibrosis pulmonar idiopática **(Tajima S. et al., 2003),** asma **(Oshikawa K. et al., 2001),** infarto del miocardio agudo **(Shimpo et al., 2004),** sepsis y trauma **(Brunner et al., 2004).** Recientemente, se demostró elevación de sST2 en suero de pacientes con dengue secundario **(Becerra A. et al., 2008)** y asociado con DG **(Houghton-Triviño N. et al., 2010).**

I.7.8.- Ligando Inductor de Apoptosis relacionado al TNF (TRAIL)

TRAIL es un miembro de la superfamilia del TNF **(Wiley SR. et al., 1995)**, proteína transmembrana tipo II con un peso molecular de 33-35KD, que puede ser liberada de la membrana, conservando el potencial apoptótico. TRAIL se expresa de forma basal en numerosos tejidos, como hígado, corazón, riñón, pulmón o testículo, lo que sugiere que en condiciones fisiológicas debe tener algún papel no apoptótico sobre células parenquimatosas **(Corallini F. et al., 2008).** Es expresada en la membrana celular de los linfocitos T CD4+, células NK, monocitos/macrófagos y puede ser clivada a una forma soluble **(Ehrlich S. et al., 2003).** Recientes estudios han demostrado que

TRAIL induce la proliferación de linfocitos T y regula negativamente la inflamación y la respuesta inmunitaria innata a través de un mecanismo independiente de apoptosis (**Diehl G. et al., 2004).** Promueve la apoptosis en células cancerígenas y algunos tumores primarios por unión y activación a los receptores CR4 y CR5 **(Ashkenazi et al., 1999).**

Recientemente, se describió el efecto de TRAIL como una proteína contra el DENV; el cual induce la expresión del TRAIL en células inmunitarias (monocitos, células dendríticas, células B y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs). Además, el TRAIL recombinante (rTRAIL), disminuyó los niveles de IFNα y el porcentaje de células infectadas por un mecanismo independiente de apoptosis **(Warke R. et al., 2008)**. Así mismo, se ha demostrado que TRAIL media funciones antivirales *in vivo* en modelos de infección por virus de influenza y encefalomiocarditis **(Ishikawa E. et al., 2005; Sato K. et al., 2001)**. Niveles elevados de TRAIL se detectaron en pacientes con dengue durante el periodo febril de la enfermedad e interesantemente, los niveles más altos se encontraron en los pacientes con infección primaria. Datos que podrían formar parte de los mecanismos regulatorios provocados para controlar la respuesta inflamatoria, cuando la vía de acción del TRAIL para reducir la producción de citoquinas y quimioquinas aún se desconoce. El efecto del TRAIL como un antiviral podría ser responsable de la supresión de ellas inducidas por el virus dengue, niveles bajos del virus podrían justificar la disminuida inducción de estos mediadores solubles, sin embargo, no se descarta el rol directo anti inflamatorio del TRAIL **(Becerra A. et al., 2009).**

I.8. Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programado que juega un papel importante en el desarrollo y en el crecimiento de tejidos normales **(Gerscheson L. et al., 1992; Lodish H. et al., 2005; Broker et al., 2005; Burgués et al., 2005; Espino J. et al., 2010).** Ha sido definida como un mecanismo de muerte celular fisiológica que se caracteriza básicamente por presentar alteraciones morfológicas y bioquímicas a nivel celular; ocurre durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario **(Mark J. et al., 1993; Arango M. et al., 1997; Broker et al., 2005; Burgués et al., 2005; Lodish H. et al., 2005; Espino J. et al., 2010).** Es considerada como un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática. Sus características morfológicas revelan condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de organelos (excepto mitocondrias y ribosomas), con alteraciones del citoesqueleto. Durante el proceso final ocurre fragmentación del ADN debido a una ruptura internucleosomal del ADN y se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana llamados cuerpos apoptóticos, que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria. Esta fagocitosis está mediada por receptores y ligandos situados en la superficie de la célula fagocítica y la célula apoptóticas (**Arango M. et al., 1997; Broker et al., 2005; Burgués et al., 2005**).

Existe una larga lista de compuestos que generan la inducción o inhibición de la apoptosis. Como inductores podemos encontrar activadores fisiológicos (falta de factores de crecimiento, calcio, proteínas proapoptóticas, glucocorticoides), agentes que dañan la célula (choques térmicos, radicales libres, proteínas supresoras de

tumores), agentes terapéuticos anticancerígenos (drogas, radiaciones) y toxinas (etanol, péptido beta-amiloide). Como inhibidores se presentan los de tipo fisiológico (factores de crecimiento, hormonas, zinc), genes víricos (adenovirus, herpesvirus, virus Epstein-Barr, poxvirus) y agentes farmacológicos (promotores de tumores) **(Zmasek et al., 2007).**

En la apoptosis el proceso afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas, y no a todas en un área tisular. La membrana celular no se destruye, lo que impide el escape al espacio extracelular de su contenido, resultando un proceso "silencioso" sin inflamación. En el citoplasma se produce granulación fina, con conservación de algunos orgánulos, en especial las mitocondrias que tienen un rol interactivo importante. A nivel nuclear la cromatina se condensa. La membrana celular se recoge sobre las eminencias globuliformes que forman los elementos deteriorados del citoplasma y núcleo. Finalmente, los fagocitos captan la célula en su totalidad impidiendo que se produzca alarma en el resto del tejido. Se ha demostrado, al menos en tejidos epiteliales, que si algo de material apoptótico escapa a la acción de los fagocitos es captado por células vecinas. La participación de células vecinas en este proceso se manifiesta además por la capacidad de éstas de enviar señales moleculares a la célula que debe morir como mecanismo complementario al que desarrolla la célula misma cuando se determina molecularmente su autodestrucción (**Cascales M., 2003; Bernhardi R., 2004**).

I.8.1.- Fases en la apoptosis

En el proceso de muerte celular programada pueden diferenciarse varias fases: la **fase efectora,** adopción sin retorno del compromiso hacia la muerte. Se

caracteriza por el aumento en el contenido de Ca++ intracelular, que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas-caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto celular que producen cambios en el tamaño y forma celular. **La fase degradativa**, se degradan las proteínas y los ácidos nucleicos y hay cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando inflamación. En esta fase las endonucleasas se encargan de fragmentar el ADN, las caspasas degradan las proteínas, se producen cambios marcados en el citoesqueleto, y se condensa la cromatina y la **fase de eliminación**, donde los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos de la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas **(Cascales M., 2003).**

I.8.2.- Inducción de apoptosis

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte. Las señales estimuladoras de la supervivencia son necesarias para que las células se mantengan vivas. Estas señales han de ser continuas y proceden de otras células. Entre estas señales positivas están los factores del crecimiento y las hormonas. En ciertos tipos de células hematopoyéticas, el crecimiento y la supervivencia depende de la presencia continua de factores del crecimiento (CSF, factores estimuladores de colonias), y la eliminación de ellos conduce irremediablemente a la apoptosis en lugar de la cesación del crecimiento. Las

señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión del ADN por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos, entre otros; moléculas que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el programa apoptótico. Entre estos activadores de muerte se encuentran el TNFα que se une al TNFR, el ligando Fas (FasL) que se une al receptor Fas, denominado también CD95 **(Cascales M., 2003).**

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales uno de los más importantes y mejor estudiados es el complejo de cisteinil-aspartato proteasa (caspasas). Se han descrito 14 caspasas en células humanas que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos. Desde el punto de vista funcional se ha descrito que algunas caspasas intervienen como iniciadoras (caspasas 8, 9 10) y otras como efectoras (caspasas 3, 6 y 7) del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. La caspasa -8, fue identificada como el iniciador más importante de la vía Fas/CD95, y la caspasa-9, interactúa con muchos otros reguladores y transductores, como el citocromo c, en la vía intrínseca. En cuanto a la caspasa- 3 se ha considerado la más importante entre ellos, ejecuta el desmontaje final de la célula por la ruptura de una variedad de estructuras proteicas celular y generando rupturas de cadenas de ADN **(Espino J. et al., 2010).** En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas. Una es la mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular; y la otra es la mediada por estrés celular o por lesión en el ADN. Estas dos vías,

también denominada extrínseca e intrínseca, respectivamente, pueden solaparse, aunque, la transducción de señales es diferente **(Cascales M., 2003).**

I.8.2.1.- Vía intrínseca o mitocondrial

La apoptosis inducida por señales intrínsecas o apoptosis inducida por estrés, se inicia en la mitocondria con la liberación de proteínas mitocondriales como el citocromo c y el smac/diablo. El citocromo c, actúa como cofactor e interactúa con el Factor 1 activador de la proteasa apoptótica (APAF-1) lo que conlleva a la activación de la caspasa 9 y con ello a la cascada de las caspasas; mientras que smac/diablo se une y antagoniza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP). La permeabilización de la membrana mitocondrial es regulada por miembros de la familia Bcl-2 **(Cascales M., 2003; Reddig and Juliano, 2005).**

I.8.2.2.- Vía extrínseca

Esta vía se inicia por unión de un ligando a su receptor transmembrana como TNFα, TRAIL o el ligando Fas (FASL) a su receptor de muerte TNF-RI, TRAIL-RI/II y/o Fas (CD95)/Apo-1, respectivamente, para activar a las caspasas iniciadoras (-8) y que a su vez, activan por proteólisis a las caspasas efectoras (-3 y -7), provocando la activación del resto de las caspasas que culminan en la proteólisis y muerte celular. Esta vía puede ser regulada por diferentes factores, entre los que se encuentra el IAP que afecta a las caspasas iniciadoras y efectoras **(Cascales M., 2003; Feig and Peter., 2007; Taylor, Cullen and Martín, 2008).**

I.8.3.- Apoptosis y virus

Diversas enfermedades están asociadas con la inapropiada regulación de la apoptosis. Estas enfermedades pueden dividirse en dos grandes grupos: el que presenta aumento de la supervivencia celular (asociado con la inhibición de la apoptosis) y otro en el que hay un exceso de muerte celular (sobre activación de la apoptosis). Las enfermedades en las que hay un aumento excesivo de células, incluyen al cáncer, infecciones virales y las enfermedades autoinmunes que permiten la persistencia de células B y T autorreactivas. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y los trastornos neurodegenerativos como Alzheimer son ejemplos de un exceso de apoptosis **(Ortega et al., 2001).**

Por lo general, los virus poseen mecanismos para bloquear la apoptosis prematura de las células infectadas, propiciando establecer y mantener la infección, o bien prolongar la vida de las células infectadas líticamente, de modo que se asegure la máxima replicación viral. Por ejemplo, el establecimiento de una infección efectiva por adenovirus depende de la función de la proteína E1B19K, un homólogo viral de la proteína antiapoptótica Bcl-2 **(Young SL. et al., 1997; Fadeel B. et al., 1999; Ortega et al., 2001)**. Además, estas estrategias virales antiapoptóticas pueden también contribuir a la patogénesis de la infección viral y en situaciones extremas, promover la capacidad oncogénica de ciertos virus **(Young SL. et al., 1997; Ortega et al., 2001)**.

Es interesante destacar que la apoptosis es una de las consecuencias más importantes de la infección por DENV tanto *in vitro* como *in vivo* y es considerado como una característica importante de la patogénesis viral**.** Se ha demostrado que la replicación del DENV induce apoptosis en neuronas de ratones y en hepatocitos

humanos y que la habilidad de activar esta vía depende tanto de determinantes virales como celulares. De hecho, las células citotóxicas activadas durante la respuesta inmunitaria antiviral y la activación de células fagocíticas asociadas con la producción de citoquinas pueden causar daño tisular local o desbalances transitorios en la homeostasis. Además, la apoptosis inducida por el DENV puede ser considerada como una característica importante de la patogénesis viral **(Marianneau et al., 1998, Mosquera J. et al., 2005)**

En la infección viral primaria, el DENV podría inducir apoptosis en monocitos, pero además, éstos pueden contribuir a los mecanismos de defensa del huésped en contra del virus a través de la fagocitosis viral, fagocitosis de células apoptóticas infectadas y la liberación de citoquinas proinflamatorias **(Espina LM. et al., 2003).** Dado que, los monocitos/macrófagos son células fagocíticas activas con componentes lisosomales citoplasmáticos capaces de eliminar microorganismos, y el DENV puede inducir muerte celular por mecanismos apoptóticos **(Marianneau et al., 1999; Avirutnan et al., 1998)**, la interacción del virus con su principal célula blanco puede provocar efectos deletéreos tanto en los virus como en las células **(Espina LM. et al., 2003).** Recientemente, se reportó la inducción de apoptosis en monocitos primarios humanos por DENV-2 **(Torrentes-Carvalho et al., 2009)** y un incremento en el número de células apoptóticas cuando se incubaron monocitos humanos individuos sanos con los diferentes serotipos de DENV **(Levy A. et al., 2010).**

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El dengue es la infección por arbovirus más frecuente a nivel mundial y supone un problema de salud pública por su alta incidencia en diversas áreas donde adquiere características de endemia. Esta infección conlleva a una elevada morbilidad e incluso mortalidad en un porcentaje relevante de los enfermos infectados por el virus y supone un importante consumo de recursos económicos y asistenciales.

Los mecanismos implicados en la variabilidad clínica que presentan las personas infectadas aún no están bien establecidos. Se ha demostrado que los pacientes que sobreviven a la infección desarrollan una memoria inmunológica protectora al serotipo específico correspondiente. Se detectan anticuerpos protectores como marcadores de este estado de memoria inmunológica. Sin embargo, ante la presencia de anticuerpos sub neutralizantes contra un serotipo, la infección heterotipica produce una respuesta infrecuente, casi exclusiva de esta infección que consiste en la amplificación dependiente de anticuerpos que se traduce en una elevada replicación viral y aumento de la viremia, lo cual condiciona y favorece el desarrollo de la forma grave de la enfermedad.

Los monocitos/macrófagos son unas de las células diana más importante en la infección por DENV. La interacción del virus con estas células desencadena diferentes procesos biológicos de respuesta entre los que destacan la expresión de antígenos de superficie ligados a la activación celular y la secreción de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores. La producción de citoquinas desempeña una función muy relevante en la regulación de la respuesta inmunitaria inducida por la infección del virus. No se conoce con precisión la posible relación entre la intensidad

y el patrón de la respuesta secretora de citoquinas inducida por el DENV y la evolución clínica del cuadro.

La infección de las células de estirpe mielomonocítica por el virus dengue conlleva además modificaciones en su ciclo celular e incluso en su supervivencia. Los mecanismos de inducción de muerte celular por el virus en la célula infectada son diversos y entre ellos se incluye como relevante el de la inducción de la apoptosis. El grado de alteración monocitaria y de apoptosis inducida en estas células durante la infección aguda son procesos no establecidos y cuya posible significación patogénica y clínica son objetos de investigación.

Teniendo en cuenta estas consideraciones nos planteamos que el patrón y la intensidad de la respuesta inmunitaria cuantificada por los niveles circulantes de citoquinas secretadas preferentemente por células monocíticas y por linfocitos T en los pacientes con la infección por DENV se relacionan con el tipo de infección y con el serotipo viral infectante. Además nos planteamos que los monocitos circulantes de los pacientes infectados pudieran presentar evidencias funcionales y de supervivencia celular.

OBJETIVO GENERAL

Análisis de la respuesta inmunitaria inflamatoria sistémica en la infección por el virus dengue y su significancia clínica

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En pacientes con diagnóstico clínico, serológico y virológico de infección por virus dengue se investigará durante su seguimiento clínico:

1. La concentración sérica de citoquinas pro-inflamatorias TNFα, IL-1β, IL-6, IL-12 e IL-17, citoquinas anti-inflamatorias sTNF-RI, sTNF-RII y el IL-1RL1/ST2; y el marcador de apoptosis TRAIL.

2. Estudio de la significancia clínica de las alteraciones del sistema inmunitario encontradas, con énfasis en sus fases evolutivas y severidad de la enfermedad.

3. Estudio de la posible relación de las alteraciones del sistema inmunitario encontrados con el serotipo viral infectante y tipo de infección.

4. Análisis del estado funcional de las células monocitarias del paciente.

5. Análisis del estado de superviviencia/apoptosis de las células monocitarias del paciente

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- Población objeto de estudio

III.1.1.- Pacientes con Dengue en fase aguda.

Se incluyeron en el estudio 30 pacientes con dengue, los cuales acudieron al Hospital General del Sur “Dr. Pedro Iturbe” de Maracaibo (Estado Zulia, Venezuela) y a la Sección de Virología del Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zulia.

III.1.1.1.- Criterios de inclusión basados en la guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control **(WHO, 2009).**

Dengue en fase aguda: Incluye a todo paciente que presenta fiebre entre dos hasta siete días (fase febril), acompañada de 2 o más de los siguientes síntomas: cefalea, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias, dolor generalizado, exantema, anorexia, nauseas y vómitos; con o sin manifestaciones hemorrágicas leves como petequias y sangrado de mucosas, prueba de torniquete positiva y leucopenia. Esta fase aguda también incluye a los pacientes en defervescencia entre el 3^{er} y 7^{mo} día de evolución de la enfermedad (fase crítica); con o sin extravasación plasmática.

Dengue en fase de recuperación precoz: Incluye a los pacientes que sobreviven la fase aguda, 24 a 48 horas después (8^{vo} a 9^{no} día después del inicio de fiebre).

Dengue en fase de recuperación tardía: Incluye a los pacientes entre 15 y 60 días después del inicio de síntomas.

III.1.1.2.- Criterios de exclusión los criterios para excluir a pacientes de este estudio fueron:

a) Enfermedad cardiovascular grave (insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión no controlada, enfermedad coronaria y arritmias graves)
b) Trastornos hematopoyéticos, metabólicos o diabetes, pulmonares, hepáticos o renales.
c) Otras enfermedades concomitantes infecciosas bacterianas o virales.
d) Enfermedades autoinmunes
e) Tratamientos con esteroides, inmunosupresores u otro medicamento que interactué con el sistema inmunológico en los últimos seis meses.
f) Embarazo
g) Neoplasia maligna o historia
h) Desnutrición
i) Seronegativos al virus

III.1.1.3.- Clasificación según severidad clínica

Posterior al examen clínico y de laboratorio los pacientes fueron clasificados en tres grupos siguiendo los nuevos criterios de clasificación de dengue **(OMS, 2009).**

III.1.1.3.1.- Dengue sin signos de alarma (DSSA) incluye a los pacientes con fiebre con dos o más criterios clínicos como nauseas- vómitos, rash (exantema), mialgias y artralgias, test del torniquete (+), leucopenia(<4.000), acompañado o no con un signo de alarma como: dolor espontáneo o durante la

palpación de abdomen, vómitos persistentes, acumulación clínica de fluidos, sangrado de mucosas, somnolencia y/o irritabilidad, hepatomegalia >2 cm y/o aumento de hematocrito (HTO) asociado a rápida caída de las plaquetas (<100.000).

III.1.1.3.2.- Dengue con signos de alarma (DCSA) en este grupo se incluyeron aquellos pacientes que desarrollaban los mismos síntomas de DSSA y además presentaban más de un signo de alarma.

III.1.1.3.3.- Dengue grave (DG) pacientes que desarrollaron complicaciones como: extravasación grave de plasma que conduce al síndrome del shock por dengue (SSD), acumulación de fluidos y/o insuficiencia respiratoria; sangrado intenso (según evaluación clínica) y daño grave de órganos (hígado: AST o ALT ≥1.000, SNC: alteración de la conciencia, corazón u otros órganos).

III.1.1.4.- Clasificación según el tipo de infección

De acuerdo al tipo de infección los 30 pacientes con dengue fueron clasificados con: **Infección primaria (IP)** debido a la presencia o ausencia de anticuerpos IgM anti-dengue y/o titulo bajo (<1:20) de IgG anti-dengue específica e **Infección secundaria (IS)** por la detección de IgG anti-dengue a títulos elevados (4 veces o incluso títulos más altos entre suero en fase aguda y convaleciente) **(Kao et al., 2005; OMS, 2009).**

III.1.2.- Grupos controles

Se estudiaron paralelamente muestras de dos grupos controles:

III.1.2.1.- Controles sanos (control): Conformado por 10 individuos voluntarios sanos, con un rango de edad similar al grupo de pacientes seleccionados,

sin antecedentes de infección durante las últimas 4 semanas para el momento de la toma de la muestra y con resultados negativos a las pruebas virológicas y/o serológicas para DENV.

III.1.2.2.- Controles con otra infección viral febril (OIVF): Conformado por 8 pacientes en fase aguda, con mononucleosis infecciosa producida por virus Epstein Barr (VEB), con resultados positivos para anticuerpos IgM anti-antígeno de la cápside viral (VCA) y negativos a las pruebas virológicas y/o serológicas (IgM e IgG) para DENV.

Todos los pacientes dieron su consentimiento para ser incluidos en esta investigación longitudinal y el proyecto fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

Para los cultivos de monocitos se incluyeron 8 pacientes con dengue **(OPS, 2010)**, en fase aguda (NS1 y/o IgM/IgG= positivo) y 8 controles sanos conformado por individuos voluntarios seronegativos al virus con edad similar a los pacientes.

III.2.- Toma de muestra

Con el objeto de evaluar los parámetros inmunológicos durante la evolución de la enfermedad a cada paciente y controles, se les tomaron muestras sanguíneas en las tres diferentes fases evolutivas de la enfermedad: aguda (entre los primeros 6 días después del inicio de la enfermedad), recuperación precoz (segunda semana de evolución) y recuperación tardía (entre cuarta y quinta semana post infección (pi)). Una de las muestras (recolectada con anticoagulante) se utilizó para los estudios

hematológicos: hematología completa (hemoglobina (Hb), hematocrito (HTO), contaje de blancos (CB), contaje de plaquetas (CP), tiempo de protrombina (TP), tiempo parcial tromboplastina (TPT). Otra muestra (sin anticoagulante) fue centrifugada para la obtención del suero para estudios bioquímicos (glicemia, creatinina, y transaminasas (AST y ALT), serológicos y virológico. Solo a los pacientes que se encontraban entre los 5 primeros días de evolución de la enfermedad se les realizó aislamiento e identificación viral.

Para la obtención de los monocitos de los pacientes con dengue y de los controles, se les extrajo sangre venosa en tubos con heparina. Además, a cada paciente con dengue se le tomó muestra de sangre sin anticoagulante para la determinación de la proteína NS1 y/o anticuerpos IgM/IgG anti dengue.

III.3.- Aislamiento viral e identificación por inmunofluorescencia Indirecta

Las muestras de suero (100 µl) se sembraron en cultivos celulares de mosquitos *Aedes albopictus* C6/36, posterior a lo cual (5º día post-infección) se retiró el sobrenadante del cultivo para su posterior uso y en las células se identificaron los antígenos virales a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) **(Tesh,1979)** utilizando anticuerpos monoclonales específicos de serotipo producidos en ratón y un anticuerpo secundario conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (anti-mouse IgG FITC, Sigma, St. Louis MO). Se utilizó para la visualización un microscopio invertido con fluorescencia modelo 872E (Carl Zeiss, Alemania).

III.4.- Detección de anticuerpos específicos anti-dengue.

Para la detección de inmunoglobulinas anti-dengue en los sueros de fase aguda (entre el 6-7 día) y de recuperación precoz, se utilizó la técnica de Inmunoabsorción Enzimática (ELISA) IgM de captura e indirecto para IgG, según el protocolo de trabajo del fabricante (Vircell microbiologists, Granada, España). Además, se utilizó una prueba rápida (BIOLINE Dengue Dúo, Standard Diagnostics, Inc., Corea) de inmunocromatografía para la determinación en paralelo de antígeno NS1 del DENV + anticuerpos IgM/IgG anti dengue.

III.4.1.- ELISA de captura para determinar IgM anti-dengue

La técnica consiste en hacer reaccionar las muestras de suero, con anticuerpos anti-IgM humana (µ específico) inmovilizados en los micropozos. Luego de un periodo de incubación y posterior a una fase de lavado se adicionan el antígeno dengue conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante, los cuales se unen a los anticuerpos específicos IgM capturadas y los que no se unen son eliminados por lavados, previo a un periodo de incubación. El antígeno unido reacciona con el sustrato–cromógeno tetrametilbenzidina (TMB). La enzima conjugada cataliza una reacción que consume el peróxido da una reacción coloreada azul el cual torna a color amarillo brillante al detener la reacción con ácido sulfúrico; cuya intensidad es proporcional a la concentración de IgM anti dengue presente en la muestra del paciente. La reacción fue leída a 450 nm con un lector de ELISA (BIORAD, USA). Las muestras se clasificaron en positivas y negativas, de acuerdo a

los criterios de validación de la prueba, para lo cual se utilizaron controles positivos y negativos en cada montaje.

III.4.2.- ELISA Indirecto para determinar IgG anti-dengue

La técnica consiste en hacer reaccionar las muestras de suero, con los antígenos de DENV-1 (cepa Hawai), 2 (cepa New guinea C, 3 (cepa H87) y 4 (cepaH241) inmovilizados en los micropozos. Luego de un periodo incubación y posterior a una fase de lavado se adicionan anticuerpos anti-IgG humana conjugada con la enzima peroxidasa de rábano picante, los cuales se une a los anticuerpos específicos. Después de otro periodo de incubación y lavado, se adiciona el sustrato –cromógeno tetrametilbenzidina (TMB).

La enzima conjugada cataliza una reacción que consume el peróxido y convierte el cromógeno de claro a azul el cual torna a color amarillo brillante al detener la reacción con ácido sulfúrico; cuya intensidad es proporcional a la concentración de IgG anti dengue presente en la muestra del paciente. La reacción fue leída a 450 nm con un lector de ELISA (BIORAD, USA).

Las muestras se clasificaron en positivas y negativas, de acuerdo a los criterios de validación de la prueba, para lo cual se utilizaron controles positivos y negativos en cada montaje.

III.4.3.- Inmunocromatografía para la detección de NS1 y/o IgM/IgG anti dengue.

El ensayo inmunocromatográfico de un paso contiene dos dispositivos de prueba (el lado izquierdo; prueba del Antígeno NS1 y el lado derecho; prueba de IgM/IgG anti dengue). La primera consiste en la determinación cualitativa del NS1 del DENV en el suero. La parte izquierda del dispositivo contiene una tira de nitrocelulosa la cual esta precubierta con un anticuerpo anti NS1 de dengue en la región de la banda de prueba. El conjugado formado por anticuerpos anti NS1 con oro coloidal y la muestra migran a lo largo de la membrana cromatográfica hacia la región de prueba y de estar presente el NS1 en el suero forma una banda coloreada visible que representa el complejo anticuerpo-NS1-anticuerpo/oro coloidal, indicando un resultado positivo. La parte derecha del dispositivo está diseñada para detectar y diferenciar simultáneamente IgM/IgG anti dengue.

El ensayo se basa en la reacción de fase sólida donde el suero se adiciona al pozo de muestra, si en ésta están presentes los anticuerpos IgM e IgG anti dengue reaccionaran con los conjugados las proteínas de envoltura del virus recombinantes/oro coloidal y forman un complejo antígeno-anticuerpo. Este complejo migra a lo largo del dispositivo de prueba por acción capilar, y es capturado por IgG y/o IgM anti humano inmovilizadas en dos líneas de pruebas a través del dispositivo, generando una línea de color (IgM o IgG positivo) o ambas coloreadas (IgM e IgG positivo).

III.5.- Aislamiento y cultivo de monocitos de sangre periférica.

Los monocitos de sangre periférica se aislaron a partir de la sangre completa de 8 donantes voluntarios aparentemente sanos (Grupo control) y de 8 pacientes con dengue en fase aguda. Para ello se utilizó centrifugación diferencial y formación de gradientes de densidad sobre una solución de Histopaque 1077® (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (**Boyum 1968; Katial et al., 1998**).

Las células mononucleares de sangre periférica fueron suspendidas en 1 mL de medio completo (medio RPMI 1640, con 10% de suero fetal bovino, 1000 U/ml de penicilina, 500 µg/ml de estreptomicina y 4 µg/ml de anfotericina B). Se verificó la viabilidad celular con la coloración supravital de azul tripan 0,4% y recuento en microscopio óptico en un hemocitómetro (cámara de Neubauer). El porcentaje de células vivas se determinó por la capacidad de exclusión del colorante (las células muertas permeabilizan su membrana permiten la entrada del tripán tornándose de color azul). Las células viables (>de 95%) se ajustaron a una concentración de $2x10^6$ cel/ml.

Para evaluar la existencia o no de daño causado por el virus dengue en los monocitos circulantes de los pacientes, las suspensiones celulares tanto de los pacientes como de los controles se sembraron en platos de veinticuatro pozos plásticos de fondo plano con un diámetro de 16 mm y se incubaron por tres horas a 37ºC en atmósfera de 5 % de CO_2. Las células no adherentes fueron removidas por lavados con medio de cultivo. Al remover las células se estimó una población de monocitos de aproximadamente $3X10^5$ cel/pozo (**Peña et al., 2007**). Una parte de las monocapas homogéneas de monocitos fue estimulada o no con 50 ng/mL de LPS

(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 24 horas **(Wittmann M et al., 1999)** transcurrido este tiempo, se recolectaron los sobrenadantes para la determinación de citoquinas y las células fueros fijadas con formalina al 10% para la detección de apoptosis.

Con la finalidad de analizar el impacto sobre el sistema inmunitario-inflamatorio del DENV aislado de pacientes, se midió el resultado de la inoculación del virus sobre la inducción de apoptosis *in vitro* en células mononucleares cultivadas de sujetos normales, para ello se utilizaron monocapas obtenidas del grupo control que fueron infectadas con suspensiones de cultivo viral de los serotipos circulantes en la población estudiada (DENV-2,3 y 4) y de cepas de referencia como controles positivos (DENV-1 (Hawaii), DENV-2 (New Guinea C), DENV-3 (H-87) y DENV-4 (H-241) (**Lanciotti et al, 1992**), a una concentración de $4x10^3$ UFP/ml (MOI:1). En este ensayo se incluyeron monocitos control, que se cultivaron con medio suplementado sin virus (**Espina et al., 2003**). Utilizando la técnica de IFI descrita previamente se confirmó la infección viral de los monocitos y se determinó apoptosis al 3^{ro} y 5^{to} día PI.

III.6.- Determinación de citoquinas en el suero y en sobrenadantes de cultivo de monocitos

Para la cuantificación de IL-1β, IL-6, TNFα e IL-12 se utilizó la técnica de ELISA cuantitativa (Thermo Scientific, USA) y para la detección de IL-17, TRAIL, IL-1RL1/ST2, sTNF-RI y sTNF-RII se utilizó el sistema de ELISA desarrollado por R&D Systems, Inc., USA.

III.6.1.- Cuantificación de TNFα, IL-1β, IL-6 e IL-12

La técnica consiste en un ELISA cuantitativo tipo sándwich, donde se hacen reaccionar las muestras y controles con un anticuerpo monoclonal de captura específico para cada citoquina a ensayar fijado en la fase sólida de micropozos, sobre la cual se agrega un anticuerpo monoclonal biotinilado. Luego de un periodo de incubación y lavado se le agrega un complejo de estreptavidina-peroxidasa que se unirá al anticuerpo biotinilado. Posterior al periodo de incubación y lavado, se agrega el sustrato TMB. La reacción enzimática-sustrato se evidencia por el desarrollo de un color cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de la citoquina presente en la muestra. El cálculo de la concentración se determinó a través de una curva de regresión lineal de densidad óptica vs concentración que se obtuvo con estándares de concentraciones conocidas y que se incluyen simultáneamente al procesamiento de las muestras. Los resultados fueron expresados en pg/ml. La dosis mínima detectable por el ensayo de TNFα, IL-1β, IL-6 e IL-12 fue de 2, 1, 1 y 5 pg/ml, respectivamente.

III.6.2.- Cuantificación de IL-17, sTRAIL, IL-1RL1/ST2, sTNF-RI y sTNF-RII

La técnica consistió en un ensayo cuantitativo de ELISA tipo sandwich, en la cual se hizo reaccionar la muestra y controles con un anticuerpo monoclonal anti-humano de captura específico para cada citoquina fijado a una fase sólida de los micropozos. Luego, se hizo reaccionar con un anticuerpo policlonal conjugado a la peroxidasa. Posterior a un periodo de incubación y fase de lavado, se le agregó la solución de substrato de TMB-H_20_2. La enzima se consume al peróxido y convierte el

cromógeno de claro a azul cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de las citoquinas presente en la muestra. El cálculo de la concentración se determinó a través de una curva de regresión lineal de densidad óptica vs concentración que se obtuvo con estándares de concentraciones conocidas y que se incluyeron simultáneos al procesamiento de las muestras. Los resultados se leyeron a 450 nm y fueron expresados en pg/ml. La dosis mínima detectable por el ensayo de IL-17, sTRAIL, IL-1RL1/ST2, sTNF-RI y sTNF-RII fue de 15; 2,86; 2,45; 0,77 y 0,6 pg/ml, respectivamente

III.7.- Determinación de proteínas

La determinación de las proteínas se realizó por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), basado en la unión del colorante Comassie blue G-250 a las proteínas. Éstas fueron medidas en los monocitos que quedaron adheridos en el fondo de la placa, los cuales se sometieron a un proceso de sonicación para romper la pared celular. El cálculo de la concentración se determinó a través de una curva de regresión lineal de densidad óptica vs. concentración que se obtuvo con estándares de concentraciones conocidas de albumina y que se incluyeron simultaneo al procesamiento de las muestras. Los resultados se leyeron a 595 nm y fueron expresados en mg.

III.8.- Detección de apoptosis

Se realizó la técnica de TUNEL, utilizando el kit de detección de Apoptosis por fluorescencia (ApopTag® In Situ, Chemicon International, USA & Canadá) de

acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este ensayo se basa en el marcaje de los extremos 3'–OH libres del ADN fragmentado con nucleótidos marcados a dichos extremos mediante la acción de la enzima deoxinucleotidil terminal transferasa (TdT). Esta enzima cataliza la adición de los nucleótidos trisfosfato a la extremos 3'–OH terminales del ADN. Los nucleótidos incorporados forman un oligómero compuesto por nucleótidos digoxigenina y nucleótidos no marcados en una secuencia aleatoria. Los fragmentos de ADN marcados con los dNTP se hacen reaccionar con un anticuerpo anti digoxigenina conjugada con FITC. Este sistema biológico-histoquímico molecular permitió teñir específicamente de los extremos 3'–OH terminales los cuales son localizados en los cuerpos apoptóticos. Se agregó medio de montaje (DAPI) y los núcleos apoptóticos positivos fueron visualizados usando un microscopio de epifluorescencia (Axioskop, Zeiss, Germany). La presencia de apoptosis se reportó como porcentaje de monocitos TUNEL +/total de 100 células.

III.9.- Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos se representan como promedios ± desviación estándar (DS) y se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) seguido por un test de comparaciones múltiples (post-test) de Bonferroni, según el caso. El criterio para la significancia estadística fue $p<0,05$. Para todos los análisis se utilizó el programa Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, C.A., USA), a excepción de las Áreas Bajo la Curva (AUC) que fueron calculadas con el programa SigmaPlot 8.0 (www.sigmaplot.com).

IV. RESULTADOS

IV.1.- Datos Clínicos

Se estudiaron 30 pacientes, 16 (53,3%) mujeres y 14 (46,7%) hombres con edad media de 14,27±8,8 años (mínimo: 1 año y máximo: 39 años) con diagnóstico clínico, serológico y/o virológico de dengue. Fueron ordenados según la clasificación revisada de dengue (**OMS, 2009)**, en 12 (40%) pacientes con DSSA los cuales evolucionaron a la curación espontánea; 10 (33%) con DCSA caracterizados por la presencia de más de dos signos de alarma y 8 (27%) con DG los cuales presentaron dolor abdominal intenso y continuo, vómitos, derrame pleural (ascitis), hepatomegalia, vasculopatía y/o hemorragias.

La evaluación tanto de parámetros inmunológicos como clínicos, fue realizada en tres fases evolutivas de la enfermedad: fase aguda (FA), fase de recuperación precoz (FRP) y fase de recuperación tardía (FRT). Se observó leucopenia marcada ($p<0,01$) en todos los pacientes con dengue en la FA al compararlos con los grupos control y OIVF, independientemente de la severidad de la afectación; alcanzando los límites normales en la FRP manteniéndose hasta la FRT.

En cuanto al contaje total de plaquetas, no se objetivó trombocitopenia en los pacientes con DSSA en la FA, a pesar que los niveles fueron estadísticamente diferentes a los grupos control ($p<0,05$) y OIVF ($p<0,01$). En los pacientes con DCSA y DG fue evidente el descenso de las plaquetas con respecto a los grupos control ($p<0,01$) y OIFV ($p<0,001$), normalizándose los valores en la FRP hasta la FRT.

Con respecto a los tiempos de coagulación, el TPT se apreció alargado ($p<0,001$) tanto en la FA de pacientes con DCSA como en los casos de DG comparados con el grupo control, no así en el resto de las fases evolutivas. Los valores de glicemia y creatinina no se encontraron alterados en estos pacientes; sin embargo, hubo diferencias ($p<0,01$) entre los DG en FA con el grupo control. Entre las pruebas de funcionalismo hepático se midió AST y ALT, observándose elevación de ambas enzimas, a predominio de AST. Las dos enzimas incrementaron significativamente ($p<0,001$) en los casos de DCSA y DG tanto en FA como en la FRP con respecto al grupo control, hasta normalizarse en la FRT; también los valores de ALT fueron elevados ($p<0,001$) en los pacientes con DSSA en FA comparados con el grupo control hasta equipararse los valores en la FRT **(Tabla 1).**

De los 30 pacientes estudiados 24 (80%) resultaron positivos a la presencia del virus, de los cuales 5 (21%) fueron infecciones por DENV-1, 8 (33%) por DENV-2, 5 (21%) DENV-3 y 6 (25%) casos de DENV-4. Así mismo se determinó, que de los 12 pacientes con DSSA, 9 (75%) fueron positivos a la presencia de IgM anti-Dengue y 11 (91,6%) presentaron anticuerpos IgG anti-Dengue; de los 10 con DCSA 8 (80%) se comprobaron positivos para IgM anti-Dengue y 10 (100,0%) para IgG y de los 8 que cursaron con DG, 100,0% fueron positivos para la presencia de IgM e IgG anti-Dengue. También, de los 12 con DSSA, 5 presentaron infección primaria y 7 secundaria, de los 10 con DCSA, 3 con infección primaria y 7 con infección secundaria y de los 8 que cursaron con DG, todos (100,0%) presentaron infección secundaria **(Tabla 2).**

Tabla 1. Características clínicas de los grupos incluidos en el estudio

Grupos	Control	DENGUE									OIFV
		Sin signos de alarma			Con signos de alarma			Grave			
n	10	12			10			8			8
Edad*	18 (2-42)	20 (5-33)			12 (1-39)			10 (4-26)			15 (2-31)
Sexo (F/M)	6/4	6/6			6/4			4/4			2/6
Laboratorio/ Fases		**Aguda**	**Recuperación Precoz**	**Recuperación Tardía**	**Aguda**	**Recuperación Precoz**	**Recuperación Tardía**	**Aguda**	**Recuperación Precoz**	**Recuperación Tardía**	
Contaje leucocitos x10^3/µl	6,9±1.3	3,7±1,3[a,e]	6,0±1,9[b,c,d]	6,9±1,3[b,c,d]	3,7 ±0,8[a,e]	6.2±1,4[b,c,d]	6,0±3,1[b,d]	3,0±0,6[a,e]	5,93±1,8[d]	6,72±1,1[b,c,d]	5,7±0,6[d]
Contaje de plaquetas x10^3/µl	274,5±50,1	150,9±34,2[a]	306,0±160,6[b,c,d]	321,1±97,5[b,c,d]	64,5±32,2[a]	212,0±86,7[c,d]	262,4±38,9[c,d]	44,0±15,9[a]	164,2±71,3	262,2±36,3[c,d]	300,1±86,2[b,c,d]
Hemoglobina (g/dl)	13,1±1,9	13,4±1,5	12,8±1,5	12,6±1,3	12,4±1,2	11,7±0,8	12,5±1,6	11,1±1,7[b]	11,7±1,3	11,8±1,1	12,6±0,8
Hematocrito (%)	41,3±6,0	42,8±4,7	40,2±4,0	39,1±3,0	40,4±3,1	39,1±1,2	38,7±5,5	38,1±5,6	38,0±4,9	37,3±2,9	38,9±2,3
TP (seg)	12,4±0,9				12,8±2,0	12,3±0,4[d]		14,7±1,2[a,c]	12,4±0,8[d]		
TPT (seg)	30,4±3,8				39,7±6,2[a]	27,9±2,3[c,d]		36,6±5,6[a]	29,9±0,7[c,d]		
Glicemia (mg/dl)	78,9±6,6	86,5±7,9	89,2±6,2	86,3±7,8	92,7±15,8	93,0±6,7	90,8±7,6	107,4±41,5[a]	88,6±15,2	89,0±12,7	
Creatinina (mg/dl)	0,9±0,2	0,65±0,3	0,7±0,2	0,7±0,09	0,7±0,2	0,6±0,2	0,6±0,2	0,7±0,1	0,7±0.1	0,7±0,1	
AST (U/L)	21,2±4,2	49,7±22,9	23,2±6,2[c,d]	19,1±3,7[c,d]	156,3±105,0[a,b]	82,2±41,1[a,d]	21,0±3,5[c,d]	233,9±160,7[a,b]	107,3±67,6[a,d]	18,7±4,32[c,d]	
ALT(U/L)	23,0±5,3	59,6±26,1[a]	28,8±8,7[c,d]	21,1±4,0[c,d]	146,1±113,0[a,b]	94,2±59,6[a]	24,0±4,1[c,d]	152,5±115,6[a,b]	96,7±55,7[a]	21,7±5,9[c,d]	

Hallazgos clínicos y analíticos de los grupos de pacientes con Dengue clasificados según la OMS (2009), controles: individuos sanos (control) y pacientes con otra infección febril viral (OIFV). Los valores se representan como promedio ± DE. %: Porcentaje. *Años de edad (mediana y el rango). [a]p<0,01 comparado con el control. [b]p<0,01 comparado con DSSA en fase aguda. [c]p<0,01 comparado con DCSA en fase aguda. [d]p<0,01 comparado con DG en fase aguda. [e]p<0,001 comparado con OIVF.

Tabla 2. Distribución de los pacientes con dengue de acuerdo al serotipo viral y tipo de infección.

	DENGUE							
	DSSA		DCSA		DG		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Serotipo viral								
DENV-1	3	37,5	2	25,0	0	0,0	5	21,0
DENV-2	4	50,0	2	25,0	2	25,0	8	33,0
DENV-3	1	12,5	2	25,0	2	25,0	5	21,0
DENV-4	0	0,0	2	25,0	4	50,0	6	25,0
IgM anti-Dengue (+)	9	75,0	8	80,0	8	100,0	25	83,0
IgG anti-Dengue (+)	11	91,6	10	100,0	8	100,0	19	63,0
Tipo de Infección								
IP	5	42,0	3	30,0	0	0,0	8	27,0
IS	7	58,0	7	70,0	8	100,0	22	73,0

n: número de muestras, %: porcentaje, IP: infección primaria, IS: Infección secundaria

IV.2.- Determinación de citoquinas en pacientes con dengue

En el presente estudio se evaluaron los niveles circulantes de las citoquinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12, e IL-17 como representantes de las citoquinas pro-inflamatorias; los receptores solubles del TNF (sTNF-RI y sTNF-RII) e IL-1RL1/sST2 en representación de citoquinas anti-inflamatorias y el marcador de apoptosis TRAIL. Se estudió esta respuesta sistémica durante la infección viral considerando las fases evolutivas de la enfermedad (FA, FRP, FRT), severidad de afectación (DSSA, DCSA y DG), tipo de infección (IP e IS) y serotipo viral infectante (DENV 1, 2, 3, 4).

IV.2.1.- Concentración sérica de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-6, IL-12, IL-17, IL-1β).

IV.2.1.1.- Citoquinas proinflamatorias según fases evolutivas de la enfermedad

Al evaluar los niveles circulantes de las citoquinas proinflamatorias en el suero de los pacientes con dengue relacionándolas con las fases evolutivas de la enfermedad se observó aumento de las concentraciones de TNFα, IL-6 e IL-12 en la FA mantenida hasta la FRP, la IL-17 solo incrementó durante la FA, que se normalizaron para la FRT, mientras que la IL-1β se mantuvo sin cambios durante todo el estudio.

Las concentraciones séricas de TNF-α se elevaron ($p<0,05$) en los pacientes durante la FA (47,36±21,17 pg/ml) y FRP (41,96±17,55 pg/ml) con respecto al grupo control sano (20,38±3,24 pg/ml). También, se evidenció que la concentración de esta citoquina tiende a normalizarse en la FRT (30,07±9,92 pg/ml) **(Figura 6).**

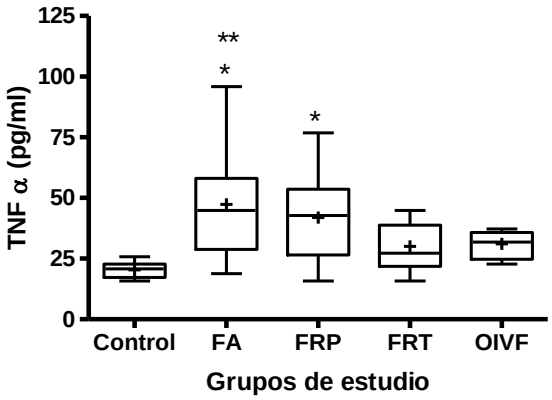


Figura 6. Concentraciones de TNF-α en pacientes con dengue, relacionadas con las fases evolutivas de la enfermedad. La concentración de TNF-α se determinó por la técnica de ELISA en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (FA n=30), fase de recuperación precoz (FRP n=18) y fase de recuperación tardía (FRT n=14). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,01 con respecto al grupo control. **p<0,05 comparado con el grupo en FRT.

En cuanto a las concentraciones de IL-6 obtenidas en el suero de los pacientes con dengue, se objetivó un aumento significativo (p<0,001) de esta citoquina en la FA de la enfermedad (6,18±2,08 pg/ml) con respecto al resto de los grupos evaluados (FRP: 4,51±1,08 pg/ml; FRT: 3,14±0,58 pg/ml; control sano: 2,22±1,03 pg/ml y el control con OIVF: 3,89±0,48 pg/ml). También, resultó evidente el incremento (p<0,05) de IL-6 en la FRP (4,51±1,08 pg/ml) comparada con el grupo control sano **(Figura 7).**

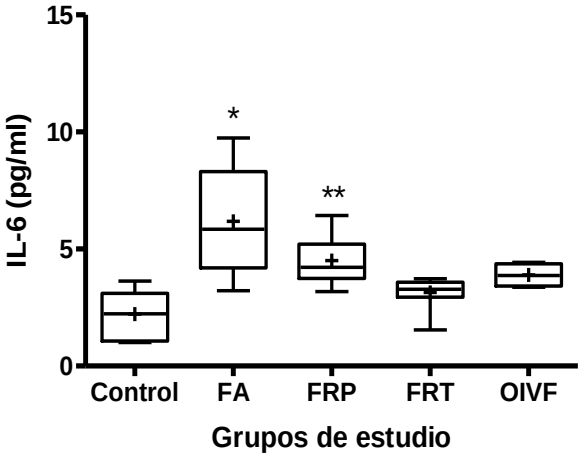


Figura 7. Concentraciones de IL-6 en pacientes con dengue, relacionados con las fases evolutivas de la enfermedad. Las concentraciones se determinaron por ELISA en suero de pacientes en fase aguda (FA n=30), fase de recuperación precoz (FRP n=18) y fase de recuperación tardía (FRT n=14). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie.*p<0,001 con respecto al resto de los grupos evaluados. **p<0,05 con respecto al control.

Las concentraciones circulantes de IL-12 se encontraron aumentadas significativamente (p<0,05) en los pacientes con dengue en FA (86,25±40,65 pg/ml) y FRP (76,84±36,83 pg/ml) respecto al grupo control (42,72±9,85 pg/ml) y a los pacientes en FRT (52,58±15,91 pg/ml). Asimismo, se observó un incremento significativo (p<0,05) de las concentraciones de IL-12 en los controles con OIVF (116,40±10,28 pg/ml) con respecto al resto de los grupos evaluados **(Figura 8).**

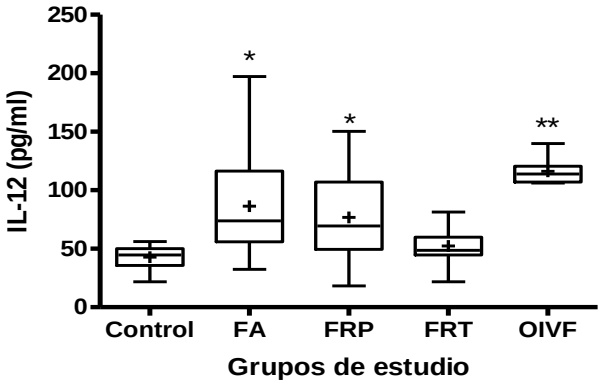


Figura 8. Concentraciones de IL-12 en pacientes con dengue, relacionados con las fases evolutivas de la enfermedad. Las concentraciones se determinaron por ELISA en suero de pacientes en fase aguda (FA n=30), fase de recuperación precoz (FRP n=18) y fase de recuperación tardía (FRT n=14). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,05 con respecto al grupo control y a FRT **p<0,01 con respecto al resto de los grupos evaluados.

En cuanto a los niveles de IL-17 se objetivó aumento significativo (p<0,001) de esta citoquina en los pacientes con dengue en FA (45,93±25,11 pg/ml) y en el grupo control con OIVF (79,91±36,78 pg/ml) con respecto al resto de los grupos de estudio (control: 3,27±2,19 pg/ml; FRP: 13,24±9,02 pg/ml y FRT: 3,83±2,51 pg/ml) **(Figura 9).** Es importante resaltar que las concentraciones de IL-17 solo fueron detectadas en 8 de 10 (80%) de los individuos sanos (control), en 23/30 (77%) pacientes con dengue en FA, 9/18 (50%) en FRP, 12/14 (86%) y 4/8 (50%) de los controles con OIVF.

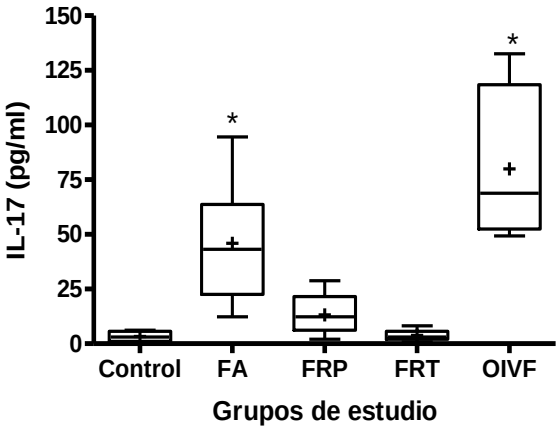


Figura 9. Concentraciones de IL-17 en pacientes con dengue, relacionadas con las fases evolutivas de la enfermedad. Las concentraciones se determinaron por ELISA en el suero de pacientes en fase aguda (FA n=23), fase de recuperación precoz (FRP n=9) y fase de recuperación tardía (FRT n=12). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,001 con respecto al resto de los grupos.

Con respecto a las concentraciones séricas de IL-1β, no se observaron cambios significativos de esta citoquina en los pacientes con dengue en las diferentes fases evolutivas de la enfermedad (FA: 5,80±0,86 pg/ml; FRP: 5,90±0,76 pg/ml; FRT: 5,40±0,48 pg/ml), ni al compararlos con los controles (control sano: 5,19±0,46 pg/ml y OIVF: 5,38±0,35 pg/ml (Figuras no mostradas).

IV.2.1.2.- Citoquinas proinflamatorias según severidad de afectación

Los niveles séricos de IL-6 e IL-17 se incrementaron en los pacientes con dengue en todas las formas clínicas y de severidad, mientras que el TNFα fue marcadamente elevado en las formas más graves de la infección (DCSA y DG)

durante las FA y FRP, a excepción de la IL-17 que solo incremento en la FA, normalizándose todas las citoquinas en la FRT. Altos niveles de IL-12 se encontraron en el suero de pacientes con DSSA entre los primeros 6 días después del inicio de la enfermedad y la segunda semana de evolución.

Al relacionar los niveles circulantes de las citoquinas proinflamatorias con la severidad de afectación, se encontró aumento significativo ($p<0,05$) del TNF-α en los grupos de pacientes con DCSA (54,70±23,85 pg/ml) y DG (54,18±21,25 pg/ml) en FA comparados con el grupo control sano (20,38±3,24 pg/ml). Además, los niveles de TNF-α en el grupo de pacientes con DCSA fueron diferentes estadísticamente ($p<0,05$) con respecto al grupo control con OIVF (31,10±5,63 pg/ml) **(Figura 10).**

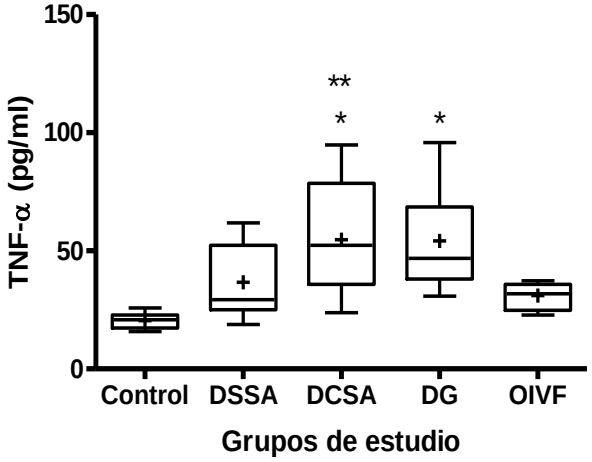


Figura 10. Concentraciones de TNF-α en pacientes con dengue en fase aguda, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=12), DCSA (n=10) y DG (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,001 con respecto al grupo control. **p<0,05 con respeto al grupo con OIVF.

Con respecto a las concentraciones de TNF-α en los pacientes en FRP de la enfermedad, se observó que se mantienen elevadas significativamente ($p<0,05$) en los grupos con DCSA (47,80±19,71 pg/ml) y DG (45,30±17,75 pg/ml) con respecto al grupo control sano (20,38±3,24 pg/ml) **(Figura 11).** Mientras que no se observaron cambios significativos en los niveles circulantes de TNF-α en los pacientes en la FRT.

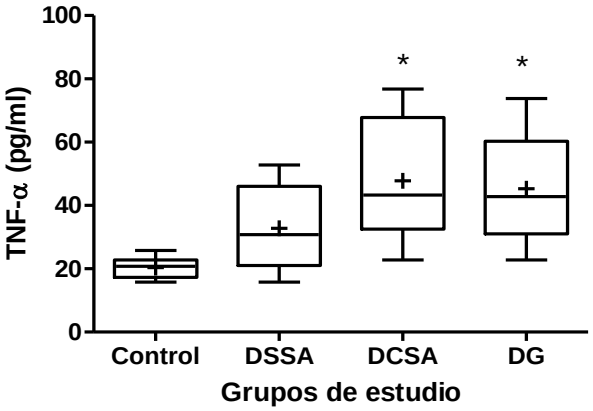


Figura 11. Concentraciones de TNF-α en pacientes con dengue en fase de recuperación precoz, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=6), DCSA (n=6) y DG (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,05 con respecto al grupo control.

Se evidenció un aumento significativo ($p<0,01$) de IL-6 en el suero de los pacientes con DSSA (4,75±1,74 pg/ml), DCSA (6,41±1,69pg/ml) y DG (8,02±1,40 pg/ml) en la FA con respecto al control sano (2,22±1,03 pg/ml). Igualmente, se observó un incremento ($p<0,01$) en los pacientes con DG al compararlos con el grupo

con DSSA y OIVF (3,89 ±0,48 pg/ml). También, los niveles circulantes de IL-6 fueron mayor (p<0,01) en el grupo DCSA con respecto al grupo con OIVF **(Figura 12).**

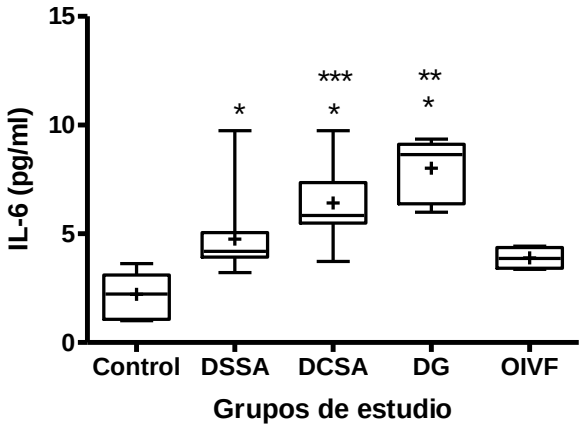


Figura 12. Concentraciones de IL-6 en pacientes con dengue en fase aguda, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=12), DCSA (n=10) y DG (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentil (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,05 con respecto al grupo control. **p<0,01 con respecto al grupo con DSSA y con OIVF.***p<0,01 con respecto al grupo OIVF.

Las concentraciones de IL-6 sérica se mantuvieron elevadas significativamente (p<0,05) en todos los grupos con dengue (DSSA: 3,91±0,45 pg/ml, DCSA: 4,53±1,24 pg/ml y DG: 5,08±1,17 pg/ml) en la FRP de la enfermedad, al compararlos con el grupo control sano (2,22±1,03 pg/ml) **(Figura 13).**

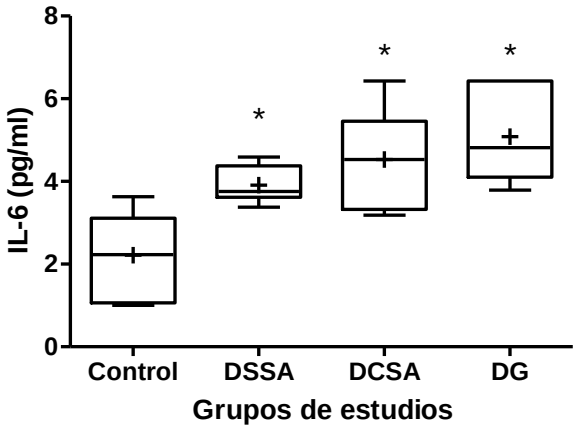


Figura 13. Concentraciones de IL-6 en pacientes con dengue en fase recuperación precoz, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=6), DCSA (n=6) y DG (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,05 con respecto al grupo control.

No se encontró diferencia estadística entre las concentraciones de IL-6 en los grupos con dengue en FRT.

Al observar las concentraciones séricas de IL-12 se evidenció un incremento significativo (p<0,01) de esta citoquina proinflamatoria en los pacientes con DSSA (106,30±49,18 pg/ml) y en el grupo control con OIVF (116,40±10,28 pg/ml) al compararlos con el control sano (42,72±9,86 pg/ml) **(Figura 14).**

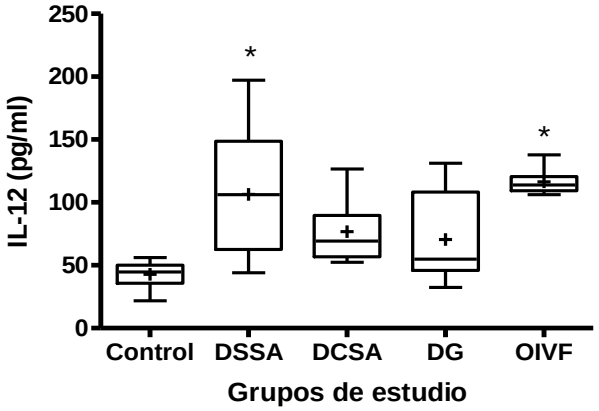


Figura 14. Concentraciones de IL-12 en pacientes con dengue en fase aguda, relacionados con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=12), DCSA (n=10) y DG (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,01 con respecto al control.

Así mismo, se observó que las concentraciones de IL-12 en el grupo de pacientes con DSSA (92,7±32,5 pg/ml) se mantienen elevadas significativamente (p<0,05) en la FRP al compararlos con las del grupo control sano (42,7±9,9 pg/ml) **(Figura 15)**, mientras que no se observaron cambios significativos en los niveles circulantes de IL-12 en los pacientes en FRT.

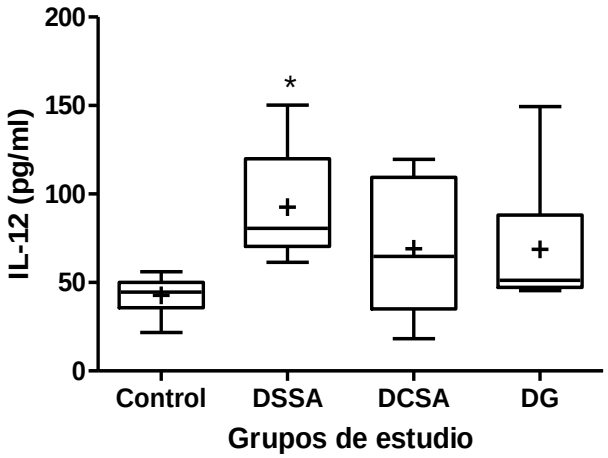


Figura 15. Concentraciones de IL-12 en pacientes con dengue en fase de recuperación precoz, relacionados con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=6), DCSA (n=6) y DG (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,01 con respecto al control.

En cuanto a la IL-17, se observaron altas concentraciones séricas (p<0,05) en los pacientes con DSSA (39,82±14,82 pg/ml), DCSA (45,99±27,52 pg/ml), DG (52,85±32,65 pg/ml) y en el grupo control con OIVF (79,91±36,78 pg/ml) comparadas con el grupo control sano (3,27±2,19 pg/ml) en la FA de la enfermedad **(Figura 16).**

No se encontraron diferencias en los niveles circulantes de IL-17 en los pacientes con dengue durante la FRP y FRT.

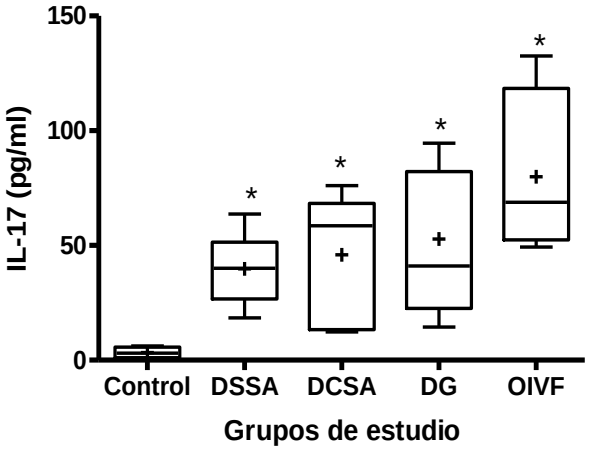


Figura 16. Concentraciones de IL-17 en pacientes con dengue en fase aguda, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=8), DCSA (n=8) y DG (n=7). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,05 con respecto al grupo control sano.

Con respecto a los niveles séricos de IL-1β, no se observaron cambios entre los pacientes con dengue relacionados con la severidad de afectación (DSSA= 5,88±1,12 pg/ml; DCSA= 5,78±0,7 pg/ml y DG= 5,71±0,52 pg/ml), ni al compararlos con el control sano (5,19±0,46 pg/ml) y con OIVF (5,38±0,35 pg/ml) (Figuras no mostradas).

IV.2.1.3.- Citoquinas pro-inflamatorias según el serotipo viral infectante

Se analizó la posible inducción de diferentes niveles de citoquinas circulantes provocada por distintos tipos del DENV las cifras de virus, encontrándose que todos los serotipos del virus fueron capaces de inducir valores elevados de TNF-α, IL-17 e IL-6 en los sueros de los pacientes con esta infección viral, en esta última el aumento fue aún más marcado en los pacientes infectados por DENV-4; mientras que la IL-12 solo incrementó en el suero de pacientes con dengue causado por los serotipos 1 y 3.

En el suero de los pacientes con infección aguda por DENV, se evidenció un aumento ($p<0,05$) de los niveles circulantes de TNF-α en la infección causada por cualquiera de los cuatro serotipos: DENV-1 (56,81±13,92 pg/ml), DENV-2 (52,05±25,42 pg/ml), DENV-3 (53,60±5,27 pg/ml) y DENV-4 (50,63±26,75 pg/ml) con respecto al grupo control sano (20,38±3,24 pg/ml) **(Figura 17).**

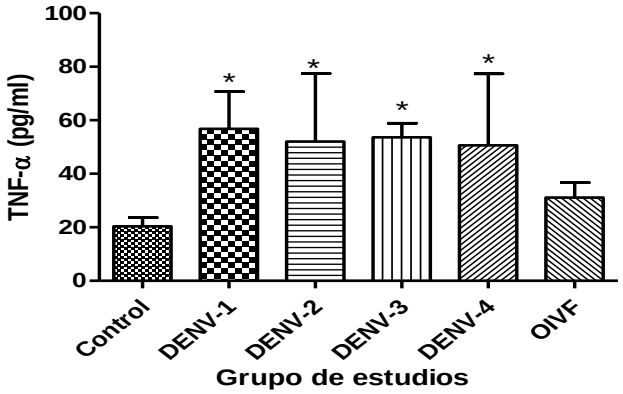


Figura 17. Concentraciones de TNF-α en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el serotipo viral infectante. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DENV-1 (n=5), DENV-2 (n=8), DENV-3 (n=5) y DENV-4 (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,05 con respecto al grupo control.

De igual forma, se observó un incremento (p<0,05) de las concentraciones de IL-6 en los pacientes infectados por los tipos virales: DENV-1 (4,60±0,63 pg/ml), DENV-2 (4,43±1,09 pg/ml), DENV-3 (5,56±2,09 pg/ml) y DENV-4 (7,79±1,20 pg/ml) con respecto al grupo control sano (2,22±1,03 pg/ml). Este incremento fue mayor (p<0,05) ante la infección por DENV-4 (7,79±1,20 pg/ml) al compararlo con los otros grupos con DEN y con el grupo con OIVF (3,89±0,48 pg/ml) **(Figura 18).**

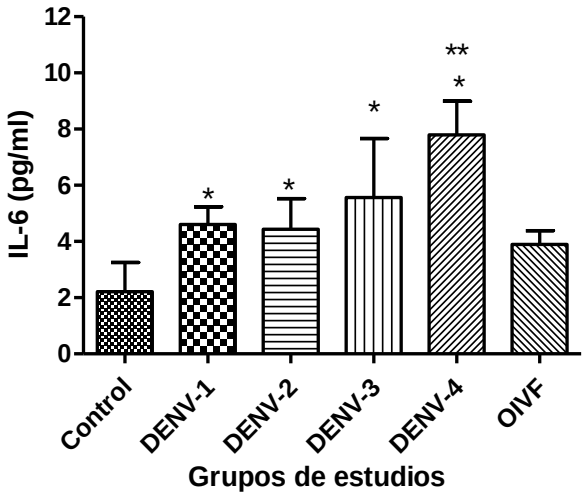


Figura 18. Concentraciones de IL-6 en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el serotipo viral infectante. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DENV-1 (n=5), DENV-2 (n=8), DENV-3 (n=5) y DENV-4 (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,05 con respecto al grupo control. **p<0,05 con respecto al resto de los grupos infectados y al grupo con OIVF.

Al comparar las concentraciones de IL-12 entre los distintos serotipos del virus, se observó un patrón diferente a lo anteriormente descrito, incrementaron los niveles (p<0,05) sólo cuando los serotipos infectantes fueron DENV-1 (110,20 ±41,58 pg/ml) y DENV-3 (111,90±24,17 pg/ml) y en el grupo control con OIVF (116,40±10,28 pg/ml) con respecto al grupo control sano (42,72±9,86 pg/ml), DENV-2 (64,76±12,37 pg/ml) y DENV-4 (59,55±17,58 pg/ml) **(Figura 19).**

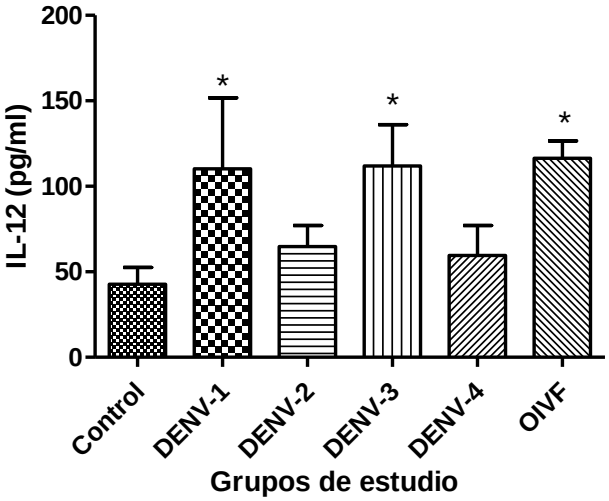


Figura 19. Concentraciones de IL-12 en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el serotipo viral infectante. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DENV-1 (n=5), DENV-2 (n=8), DENV-3 (n=5) y DENV-4 (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,05 con respecto al grupo control, DENV-2 y DENV-4.

Se determinó un aumento significativo (p<0,05) en las concentraciones de IL-17 ante la presencia de DENV-1 (46,76±16,57 pg/ml), DENV-2 (55,91±15,89 pg/ml), DENV-3 (55,50±21,96 pg/ml), DENV-4 (74,0±25,35 pg/ml) y en los pacientes con OIVF (79,91±36,78 pg/ml) con respecto al grupo control (3,27±2,19 pg/ml) **(Figura 20).**

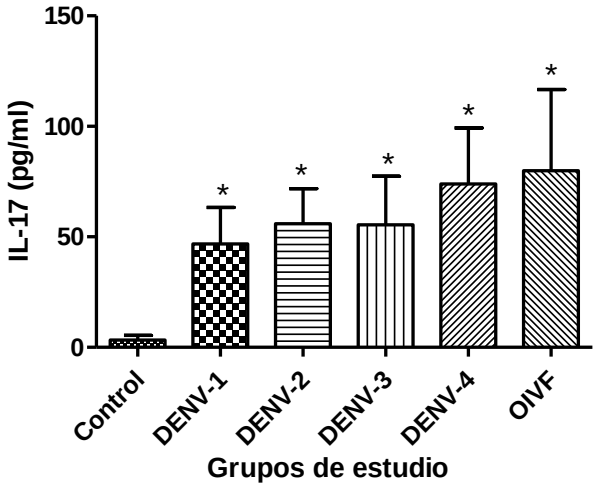


Figura 20. Concentraciones de IL-17 en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el serotipo viral infectante. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DENV-1 (n=4), DENV-2 (n=5), DENV-3 (n=4) y DENV-4 (n=4). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,05 con respecto al grupo control.

No se encontraron cambios significativos en las concentraciones séricas de IL-1β al relacionarlas con los diferentes serotipos del virus DENV-1 (5,83±0,61 pg/ml), DENV-2 (5,98±0,63 pg/ml), DENV-3 (5,41±0,40 pg/ml) y DENV-4 (5,69±26,75 pg/ml) ni al compararlas con los controles (control: 5,19±0,46 pg/ml y OIVF 5,38±0,35 pg/ml) (Figuras no mostradas).

IV.2.1.4.- Citoquinas pro-inflamatorias según tipo de infección

Las citoquinas TNF-α, IL-6, IL-12 e IL-17 estuvieron incrementadas en el suero de los pacientes con IP por virus dengue; en la IS sólo los valores séricos de TNF-α e IL-6 se observaron elevados.

Al analizar las concentraciones séricas de TNF-α de acuerdo al tipo de infección, se objetivó un incremento significativo (p<0,05) de los niveles circulantes en los pacientes con IP (51,30±21,87 pg/ml) e IS (45,93±21,25 pg/ml) con respecto al grupo control (20,38±3,24 pg/ml), al igual que las concentraciones de IL-6 (p<0,001) en la IP (6,20±1,99 pg/ml) e IS (6,17±2,15 pg/ml) comparadas con las del control sano (2,22±1,03 pg/ml). También, incrementó la IL-12 (p<0,05) en la IP (87,47±19,36 pg/ml) con respecto al grupo control sano (42,72±9,86 pg/ml) y la IL-17 (p<0,05) en los pacientes con IS (46,2±26,3 pg/ml) con respecto al grupo control (3,3±2,2 pg/ml) **(Figura 21).**

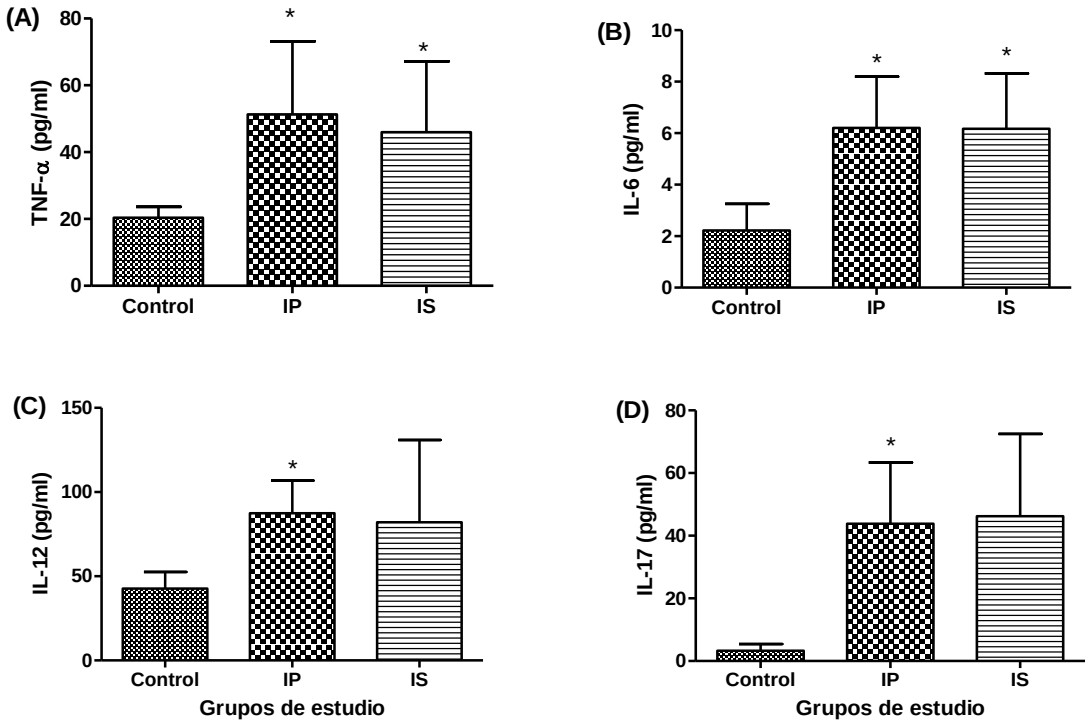


Figura 21. Concentraciones séricas de TNF-α (A), IL-6 (B), IL-12 (C) e IL-17 (D) en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el tipo de infección. La concentración se determinó por la técnica de ELISA. Infección Primaria (IP n=8) e Infección Secundaria (IS n=22). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio ± DE. *p<0,05 con respecto al grupo control.

Las concentraciones circulantes de IL-1β fueron similares con respecto al tipo de infección (IP: 5,87±0,46 pg/ml e IS: 5,64±0,63 pg/ml) y al compararlas con el grupo control sano (5,19±0,46 pg/ml) (Figuras no mostradas).

IV.2.1.5.- Área bajo la curva (AUC) de citoquinas pro- inflamatorias

El análisis de las AUC de las citoquinas pro-inflamatorias (TNF-α, IL-6, IL-12 e IL-17) que relacionan la concentración de estas citoquinas en el suero de pacientes con dengue según la severidad de la enfermedad con el tiempo o fase de evolución permitió observar un incremento significativo ($p<0,05$) de la AUC para IL-6 en los pacientes con DG en la FCP (147,2 ± 67,6 pg x día /ml) al compararla con la FA (46,2 ± 23 pg x día /ml) del mismo grupo. También, se encontró un aumento significativo ($p<0,05$) de la AUC_t de esta citoquina en el grupo de pacientes con DG (201,2 ± 61,4 pg x día /ml) con respecto al AUC_t del grupo con DSSA (123,6 ± 35,5 pg x día /ml). No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis AUC para las demás citoquinas analizadas, TNF-α, IL-12 e IL-17 entre los grupos por severidad ni entre las diferentes fases evolutivas de la enfermedad **(Tabla 3).**

Tabla 3. Área bajo la curva (AUC) de citoquinas pro-inflamatorias en el suero de pacientes con dengue.

		DSSA (n=12)	DCSA (n=10)	DG (n=8)
TNF-α (pg x día/ml)	**AUC_1**	304,2±173,6	535,2±79,5	388,2±105,0
	AUC_2	795,8±194,8	853,0±153,0	1353,0±343,8
	AUC_t	1174,0±281,3	1490,0±222,3	1796,0±380,0
IL-6 (pg x día/ml)	**AUC_1**	37,1±10,6	50,9±15,8	46,2±23,0*****
	AUC_2	83,4±30,4	87,2±17,2	147,2±67,6
	AUC_t	123,6±35,5**	137,9±20,1	201,2±61,4
IL-12 (pg x día/ml)	**AUC_1**	829,9±354,1	775,8±408,0	477,7±80,0
	AUC_2	1588,0±549,7	1515,0±369,2	2183,0±674,3
	AUC_t	2548,0±763,1	2450,0±520,3	2758,0±633,6
IL-17 (pg x día/ml)	**AUC_1**	189,4±45,6	286,0±125,2	233,4±163,3
	AUC_2	158,8±93,4	240,3±27,6	403,0±245,7
	AUC_t	376,2±185,0	502,6±190,5	687,3±345,0

Los datos se expresan en promedios ± DE. AUC_1: Área bajo la curva en el suero de pacientes con dengue entre FA y FRP, AUC_2: Área bajo la curva en el suero de pacientes con dengue entre FRP y FRT. AUC_t: Área bajo la curva total en el suero de pacientes con dengue Σ de AUC_1 y AUC_2. *p<0,05 comparado con AUC_2 del grupo DG. **p<0,05 comparado con AUC_t del grupo DG.

IV.2.2.- Concentración sérica de citoquinas anti-inflamatorias (sTNF-RI, sTNF-RII, IL-1RL1/sST2).

IV.2.2.1.- Citoquinas anti-inflamatorias según fases evolutivas de la enfermedad

Todas las citoquinas anti-inflamatorias evaluadas en los pacientes con dengue atendiendo a la fase evolutiva de la infección resultaron incrementadas en sus valores séricos durante la FA, alcanzando valores basales en la FRP y FRT.

Con respecto a las concentraciones del sTNF-RI se observó un incremento significativo (p<0,01) en los pacientes con dengue en FA (3.352,00±1.720,00 pg/ml) al compararlos con los valores en la FRP (2.236,00±922,00 pg/ml) y FRT (1.795,0±506,0 pg/ml) con el grupo control sano (1.583,00±458,30 pg/ml) **(Figura 22).**

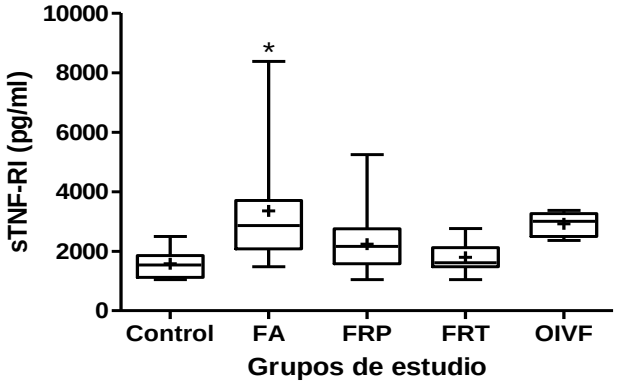


Figura 22. Concentraciones de sTNF-RI en pacientes con dengue, relacionadas con las fases evolutivas de la enfermedad. Las concentraciones se determinaron por ELISA en el suero de pacientes en fase aguda (FA n=30), fase de recuperación precoz (FRP n=18) y fase de recuperación tardía (FRT n=14). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,01 con respecto a los grupos FRP, FRT y al grupo control sano.

Resultados similares se encontraron en los niveles séricos de sTNF-RII, los cuales fueron elevados (p<0,05) en los pacientes con dengue en FA (10.858,00±5.978,00 pg/ml) al compararlos con las concentraciones del grupo en FRP (7.087,0±3.257,0 pg/ml) y FRT (4.603,00±1.557,00 pg/ml) y los controles (control: 2.545,00±697,20 pg/ml y OIVF: 5.982,00±631,10 pg/ml) **(Figura 23).**

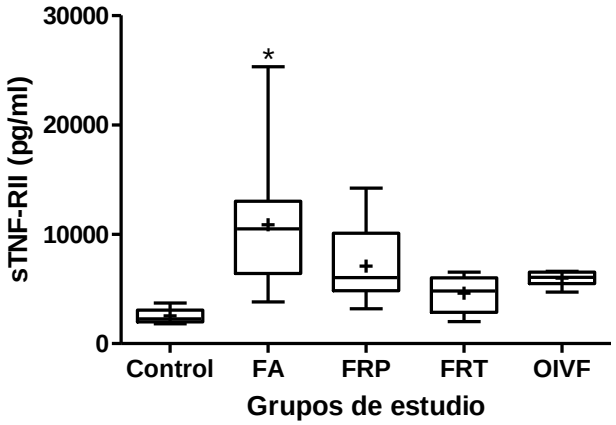


Figura 23. Concentraciones de sTNF-RII en pacientes con dengue, relacionadas con las fases evolutivas de la enfermedad. Las concentraciones se determinaron por ELISA en el suero de pacientes en fase aguda (FA n=30), fase de recuperación precoz (FRP n=18) y fase de recuperación tardía (FRT n=14). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,05 con respecto al resto de los grupos estudiados.

Se observó un incremento (p<0,001) de las concentraciones de IL1RLI/sST2 en los pacientes con dengue en FA (109,50±92,48 pg/ml) con respecto al resto de los grupos estudiados (control sano: 22,1±5,2 pg/ml; FRP: 26,4±10,12 pg/ml, FRT: 22,0±4,1 pg/ml y OIVF: 34,6±3,8 pg/ml) **(Figura 24).**

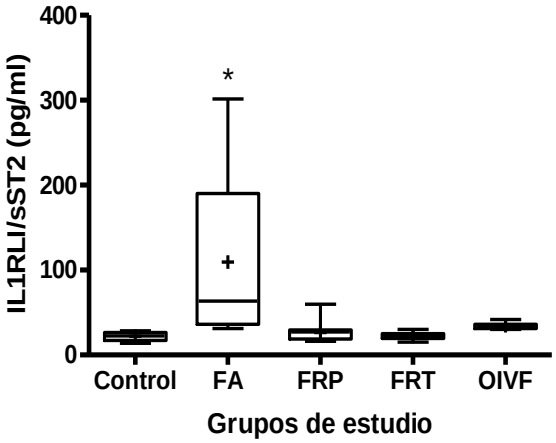


Figura 24. Concentraciones de IL1RLI/sST2 en pacientes con dengue, relacionadas con las fases evolutivas de la enfermedad. Las concentraciones se determinaron por ELISA en el suero de pacientes en fase aguda (FA n=30), fase de recuperación precoz (FRP n=18) y fase de recuperación tardía (FRT n=14). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,001 con respecto al resto de los grupos evaluados.

IV.2.2.2.- Citoquinas anti-inflamatorias según severidad de afectación

Considerando el rango de manifestaciones clínicas presentes en los pacientes con DEN, se objetivaron concentraciones séricas altas de sTNF-RI, sTNF-RII y IL1RLI/sST2 durante la FA de la infección en pacientes con las formas severas de la enfermedad (DCSA y DG), valores que se normalizaron en la FRP y FRT, a excepción del sTNF-RII, que se mantuvieron muy elevadas hasta en la FRT.

Con respecto al sTNF-RI, se encontró aumento estadísticamente significativo ($p<0,05$) en los grupos de pacientes con DCSA (3.521,0±2.010,0 pg/ml) y con DG (4.266,0±1.878,0 pg/ml) en la FA al compararlos con el grupo control (1.583,0±458,3

pg/ml). Además, se observó un incremento (p<0,05) de los niveles de este receptor soluble en el grupo con DG con respecto al grupo con DSSA (2.451,0±645,7 pg/ml) **(Figura 25).**

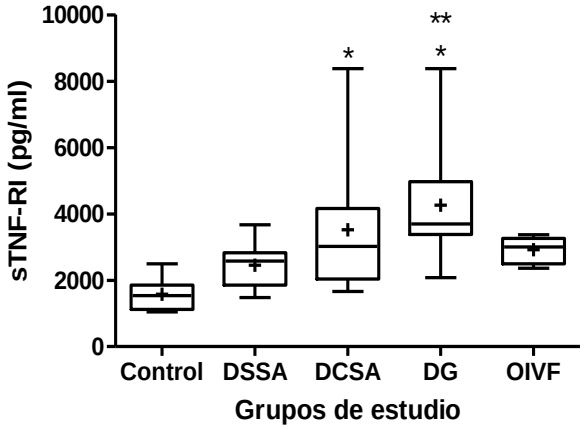


Figura 25. Concentraciones de sTNF-RI en pacientes con dengue en fase aguda, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=12), DCSA (n=10) y DG (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y el test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,05 con respecto al grupo control, **p<0,01 con respecto a grupos control y DSSA.

En la FRP y FRT no hubo cambios de las concentraciones de sTNF-RI en los pacientes según la severidad de afectación.

Se observó un aumento significativo (p<0,05) de las concentraciones de sTNF-RII en los pacientes con DCSA (10.931,0±2.167 pg/ml) y DG (17.143,0±6.873,0 pg/ml) en FA de la enfermedad con respecto a los demás grupos estudiados (control: 2.547,0±645,7 pg/ml; DSSA: 5.757,0±645,7 pg/ml y OIVF: 5.982,0±631,1 pg/ml) y entre ellos **(Figura 26).**

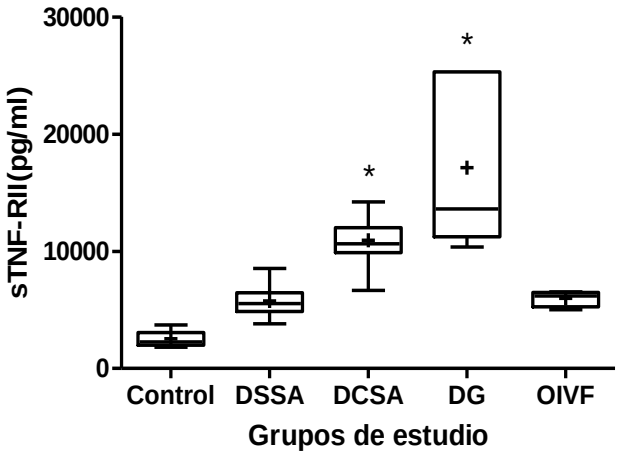


Figura 26. Concentraciones de sTNF-RII en pacientes con dengue en fase aguda, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=12), DCSA (n=10) y DG (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,05 con respecto al resto de los grupos.

En la FRP, las concentraciones de sTNF-RII se mantuvieron significativamente elevadas (p<0,05) en los pacientes con DCSA (6.456,0±1.792,0 pg/ml) y DG (10.202,0±3.469,0 pg/ml) al compararlos con el grupo control (2.545,0±697,2 pg/ml). Además los niveles de este receptor se encontraron aumentados en los pacientes con DG con respecto a los pacientes con DSSA (4.603,0±1.138,0 pg/ml) y DCSA **(Figura 27).**

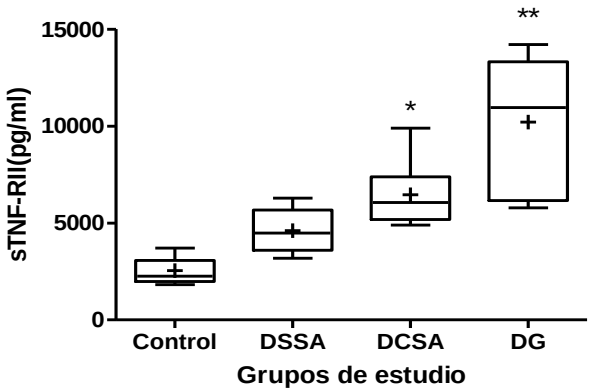


Figura 27. Concentraciones de sTNF-RII en pacientes con dengue en fase recuperación precoz, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=6), DCSA (n=6) y DG (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,01 con respecto al control. **p<0,001 con respecto al resto de los grupos.

En la FRT, los valores de sTNF-RII se mantienen aumentadas (p<0,05) en los pacientes con DCSA (5.215,0±685,1 pg/ml) y DG (5.896,0±785,6 pg/ml) con respecto al control (2.547,0±697,2 pg/ml) y a DSSA (2.852,0±678,8 pg/ml) **(Figura 28).**

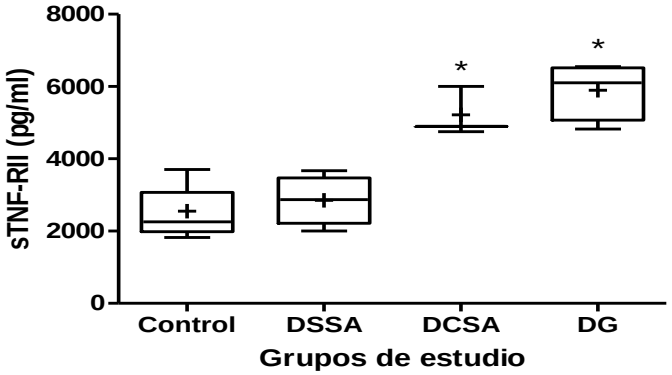


Figura 28. Concentraciones de sTNF-RII en pacientes con dengue en fase de recuperación tardía, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=4), DCSA (n=3) y DG (n=4). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,001 con respecto al grupo control y a DSSA.

Al analizar las concentraciones séricas de IL1RLI/sST2 de acuerdo a la severidad de afectación se encontró incremento significativo (p<0,001) en el grupo de pacientes con DG (243,30±42,99 pg/ml) comparado con el resto de los grupos (control sano: 22,08±5,16 pg/ml; DSSA: 46,58±14,10 pg/ml; DCSA: 60,58±19,99 pg/ml y OIVF: 34,59±3,79 pg/ml). Además, se evidenció un aumento (p<0,01) en los pacientes con DCSA (60,58±19,99 pg/ml) respecto al grupo control sano **(Figura 29).**

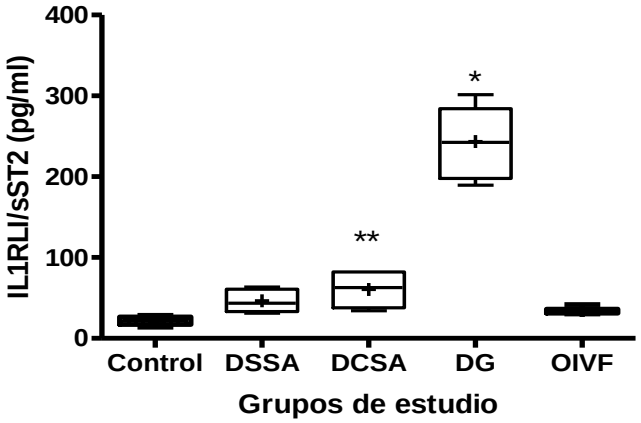


Figura 29. Concentraciones de IL1RLI/sST2 en pacientes con dengue en fase aguda, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=12), DCSA (n=10) y DG (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,001 con respecto al resto de los grupos. **p<0,01 con respecto al grupo control.

No se evidenciaron diferencias en las concentraciones de IL1RLI/sST2 en los pacientes en FRP y FRT.

IV.2.2.3.- Citoquinas anti-inflamatorias según el serotipo viral infectante

El patrón sérico observado para sTNF-RII y IL1RLI/sST2 fue similar en pacientes con dengue cuyos agentes etiológicos fueron los serotipos DENV-2 y DENV-4, que indujeron valores superiores a los observados en los controles y en la infección causada por los serotipos DENV-1 y 3, mientras que los niveles de sTNF-RI, se elevaron en pacientes con DENV-2.

Con respecto al sTNF-RI, se encontraron niveles elevados ($p<0,05$) de este receptor en los pacientes infectados por DENV-2 (4.882,0±2.460,0 pg/ml) con respecto al grupo control (1583,0±458,3 pg/ml), a los infectados por DENV-1 (2.678,0±789,0 pg/ml) y a los que presentaban OIVF (2921,0±390,2 pg/ml) **(Figura 30).**

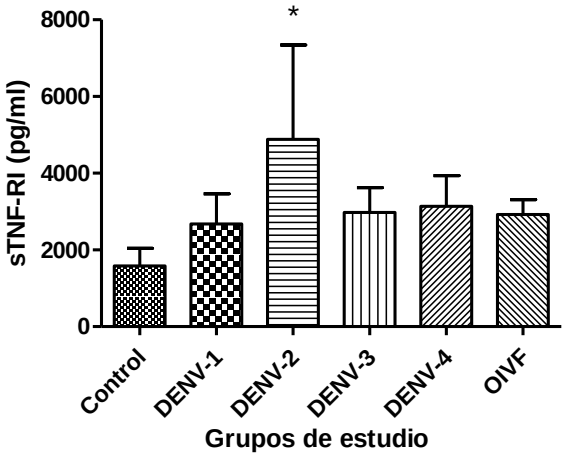


Figura 30. Concentraciones de sTNF-RI en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el serotipo viral infectante. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DENV-1 (n=5), DENV-2 (n=8), DENV-3 (n=5) y DENV-4 (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *$p<0,05$ comparado con el grupo control, DENV-1 y OIVF.

De igual manera, el sTNF-RII se encontró elevado significativamente en los pacientes infectados por DENV-2 (14.641,0±6.719,0 pg/ml), y por DENV-4 (14.222,0±631,1 pg/ml) al compararlos con el grupo control (2.547,0±697,2 pg/ml), con los infectados por DENV-1 (4.976,0±950,4 pg/ml) y el grupo con OIVF (5.982,0±631,1 pg/ml). Incluso los infectados por DENV-2 fueron diferentes

estadísticamente (p<0,05) con respecto al grupo infectado por DENV-3 (7.162,0±1.336,0 pg/ml) **(Figura 31).**

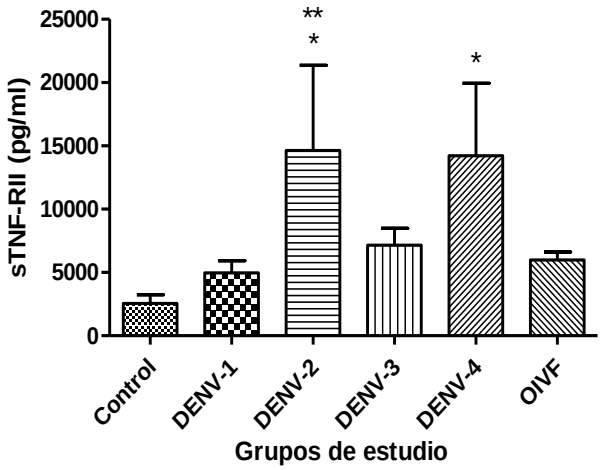


Figura 31. Concentraciones de sTNF-RII en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el serotipo viral infectante. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DENV-1 (n=5), DENV-2 (n=8), DENV-3 (n=5) y DENV-4 (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,001 con respecto al grupo control, DENV-1 y OIVF. **p<0,05 comparado con el grupo DENV-3.

Las concentraciones de IL1RLI/sST2 observadas en el suero de los pacientes infectados por DENV-2 (219,2±79,1 pg/ml) y DENV-4 (175,8±87,1 pg/ml) fueron significativamente altas (p<0,05) con respecto al control (22,1±5,2 pg/ml), DENV-1 (51,1±15,0 pg/ml), DENV-3 (56,20±19,02 pg/ml) y al grupo con OIVF (34,6±3,8 pg/ml) **(Figura 32).**

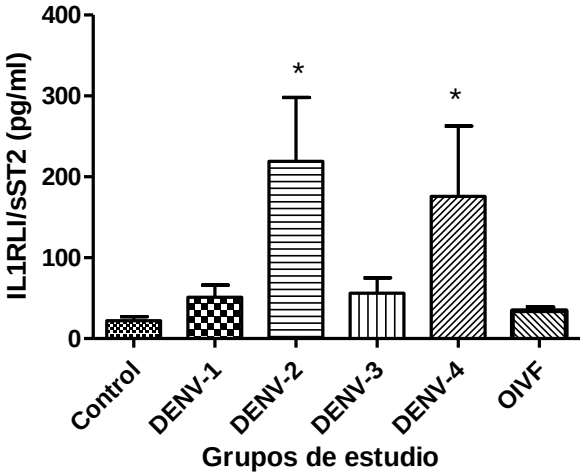


Figura 32. Concentraciones de IL1RLI/sST2 en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el serotipo viral infectante. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DENV-1 (n=5), DENV-2 (n=6), DENV-3 (n=5) y DENV-4 (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,01 con respecto al grupo control, DENV-1, DENV-3 y OIVF.

IV.2.2.4.- Citoquinas anti-inflamatorias según tipo de infección

En los pacientes con IS por DENV se encontraron los mayores niveles circulantes de las citoquinas anti inflamatorias estudiadas, al compararlos con la población control sana.

Se observó incremento (p<0,05) de las concentraciones de sTNF-RI (3.543,0±1.901,0 pg/ml) y de sTNF-RII (11.795±6.401 pg/ml) al compararlos con el grupo control (1.583,0±458,3 pg/ml y 2.547,0±697,2 pg/ml), respectivamente **(Figura 33).**

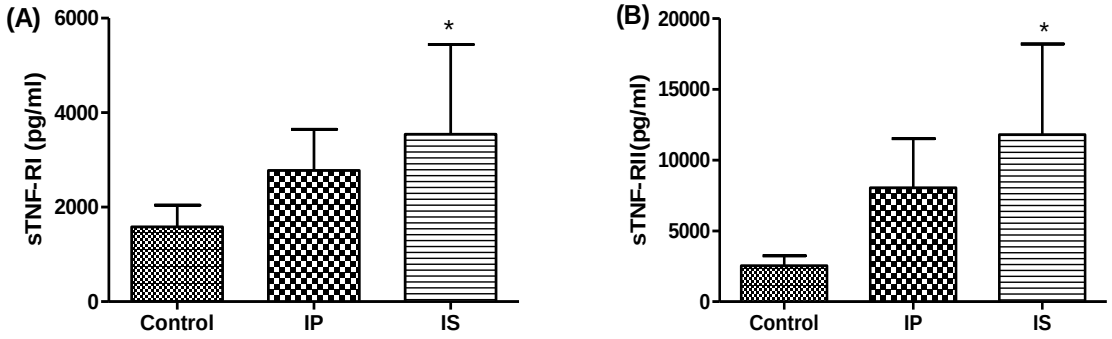


Figura 33. Concentraciones séricas de sTNF-RI (A) y sTNF-RII (B) en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el tipo de infección. La concentración se determinó por la técnica de ELISA. Infección Primaria (IP n=7) e Infección Secundaria (IS n=21). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio ± DE. *p<0,05 con respecto al grupo control.

Las concentraciones de IL1RLI/sST2 incrementaron significativamente (p<0,05) en el grupo de pacientes con IS (131,3±98,5 pg/ml) al compararlo con el resto de los grupos (control: 22,1±5,2 pg/ml e IP: 47,4±15,1 pg/ml **(Figura 34).**

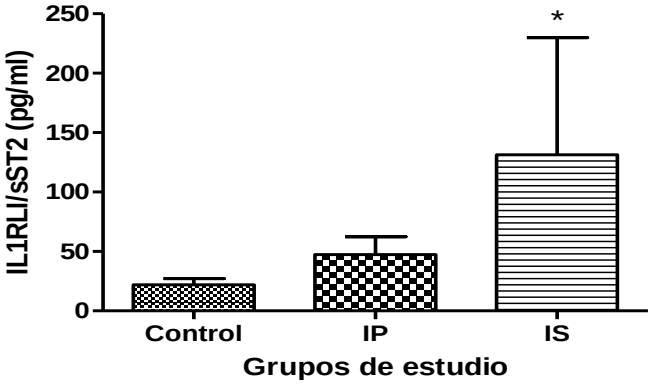


Figura 34 Concentraciones de IL1RLI/sST2 en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el tipo de infección. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con Infección Primaria (IP n=7) e Infección secundaria (IS n=20). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio ± DE. *p<0,05 con respecto al resto de los grupos.

IV.2.2.5.- Área bajo la curva (AUC) de citoquinas anti-inflamatorias

A continuación se describe las AUC de las citoquinas anti-inflamatorias (sTNF-RI, sTNF-RII e IL-1RL1/sST2) que relacionan la concentración de estos analitos en el suero de los pacientes de acuerdo a la severidad de la enfermedad y con el tiempo.

Hemos objetivado un incremento significativo ($p<0,05$) en el AUC del TNF-RI en los pacientes con DG en la FRP (76214,0 ±34777,0 pg x día/ml) al compararlo con el AUC del mismo grupo en FA (22343,0 ±9058,0 pg x día/ml). Por otro lado, el AUC del sTNF-RII en los pacientes con DG se encontró elevado significativamente ($p<0,05$) en la FRP (274236,0 ±143075,0 pg x día/ml) con respecto al AUC de los grupos DSSA (91198,0±38271,0 pg x día /ml) y DCSA (107884,0 ±45166,0 pg x día/ml). También, se encontró un aumento significativo ($p<0,05$) del AUC_t de este receptor soluble en los pacientes con DG (385817,0 ±109132,0 pg x día/ml) al compararlo con el del grupo DSSA (141738,0 ±55726,0 pg x día/ml). Asimismo, observamos un aumento significativo ($p<0,05$) en el AUC de IL-1RL1/sST2 en el grupo de pacientes con DG durante la FA (1055,0 ±503,4 pg x día/ml) con respecto AUC de los grupos DSSA (276,2 ±125,0 pg x día/ml) y DCSA (383,5 ±95,6 pg x día/ml) en la misma fase evolutiva de la enfermedad. Además, se encontró que el AUC_t de este receptor en los pacientes con DG (2089,0 ±593,8 pg x día/ml) fue mayor significativamente ($p<0,05$) con respecto a los de los grupos con DSSA (872,0 ±353,1pg x día/ml) y DCSA (919,7 ±174,4 pg x día/ml) **(Tabla 4).**

Tabla 4. Área bajo la curva (AUC) de citoquinas anti-inflamatorias en el suero de pacientes con dengue.

		DSSA (n=12)	DCSA (n=10)	DG (n=8)
TNF-RI	**AUC_1**	19323,0±8935,0	26415,0±11411,0	22343,0±9058,0[*]
(pg x día/ml)	**AUC_2**	41247,0±17245,0	44047,0±19622,0	76214,0±34777,0
	AUC_t	64182,0 ± 24049,0	73457,0± 30235,0	102366,0±31233,0
TNF-RII	**AUC_1**	44075,0 ±21818,0	84304,0±33020,0	96864,0±46118,0
(pg x día/ml)	**AUC_2**	91198,0±38271,0[b]	107884,0±45166,0[b]	274236,0±143075,0
	AUC_t	141738,0±55726,0[c]	191996,0±65695,0	385817,0±109132,0
IL-1RLI/sST2	**AUC_1**	276,2 ±125,0[a]	383,5 ±95,6[a]	1055,0 ±503,4
(pg x día/ml)	**AUC_2**	567,4 ±244,5	508,1 ±107,1	982,2 ±333,3
	AUC_t	872,0 ±353,1[c]	919,7 ±174,4[c]	2089,0 ±593,8

Los datos se expresan en promedios ± DE. AUC_1: Área bajo la curva en el suero de pacientes con dengue entre FA y FRP, AUC_2: Área bajo la curva en el suero de pacientes con dengue entre FRP y FRT AUC_t: Área bajo la curva en el suero de pacientes con dengue Σ de AUC_1 y AUC_2. *p<0,05 comparado con AUC_2 del grupo DG. [b]p<0,05 comparado con AUC_2 el grupo DG. [c]p<0,05 comparado con AUC_t del grupo DG. [a]p<0,05 comparado con AUC_1 del grupo DG.

IV.2.3.- Concentración sérica del marcador de apoptosis sTRAIL

IV.2.3.1.- sTRAIL según fases evolutivas de la enfermedad

sTRAIL estuvo aumentado en el suero de los pacientes con DEN desde los primeros días de evolución hasta la FRP, es decir las concentraciones de sTRAIL obtenidas en el suero de los pacientes con dengue resultaron significativamente incrementadas (p<0,05) en FA (95,81±26,93 pg/ml) y en la FRP (84,48±26,49 pg/ml) con respecto al control (51,71± 8,02 pg/ml). Se indica también una diferencia (p<0,05) entre los niveles en FA (95,81±26,93 pg/ml) y FRT (73,01±14,47 pg/ml) **(Figura 35).**

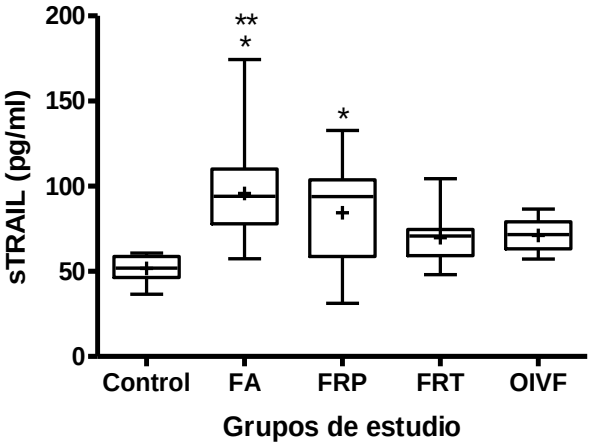


Figura 35. Concentraciones de sTRAIL en pacientes con dengue, relacionadas con las fases evolutivas de la enfermedad. Las concentraciones se determinaron por ELISA en el suero de pacientes en fase aguda (FA n=30), fase de recuperación precoz (FRP n=18) y fase de recuperación tardía (FRT n=14). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,05 con respecto al grupo control. **p<0,05 respecto a FRT.

IV.2.3.2.- sTRAIL según severidad de afectación

Al relacionar las concentraciones de sTRAIL obtenidas de los pacientes en la FA con la severidad de afectación, este receptor se encontró elevado en todas las formas clínicas de la enfermedad (DSSA, DCSA, DG) con relación al grupo control sano y marcadamente incrementado en el suero de los pacientes con DSSA, manteniéndose elevados hasta la FRT en este grupo y con DG.

Se observaron diferencias (p<0,01) entre el grupo de pacientes con DSSA (115,10±25,58 pg/ml) con el resto de los grupos (control sano: 51,71±8,02 pg/ml; DCSA: 82,48±17,72 pg/ml; DG: 79,87±18,39 pg/ml y OIVF: 71,04±9,85 pg/ml).

Además, se evidencia un incremento significativo (p<0,01) entre los grupos DCSA (82,48±17,72 pg/ml) y DG (82,9±19,6 pg/ml) al compararlo con el grupo control (51,71±8,02 pg/ml) **(Figura 36).**

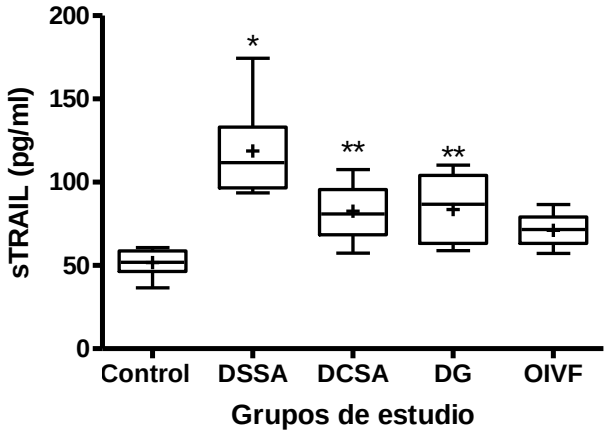


Figura 36. Concentraciones de sTRAIL en pacientes con dengue en fase aguda, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=12), DCSA (n=10) y DG (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,001 con respecto al resto de los grupos. **p<0,001 respecto al grupo control.

En la FRP, las concentraciones de sTRAIL se mantuvieron elevadas en los grupos de pacientes con DSSA (92,94±30,00 pg/ml) y DG (87,22±19,98 pg/ml) comparados con el control sano (51,71±8,02 pg/ml) **(Figura 37).**

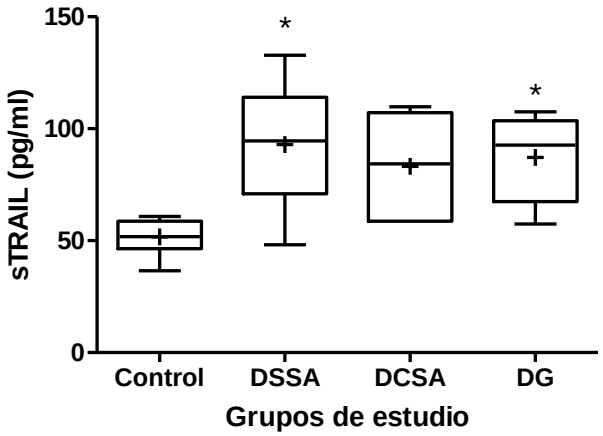


Figura 37. Concentraciones de sTRAIL en pacientes con dengue en fase recuperación precoz, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=6), DCSA (n=6) y DG (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,05 con respecto al grupo control.

En la FRT los valores de sTRAIL en los grupos DSSA (78,32±11,33 pg/ml) y DG (73,58±18,62 pg/ml) fueron diferentes a los del grupo control (51,71±8,02 pg/ml) **(Figura 38).**

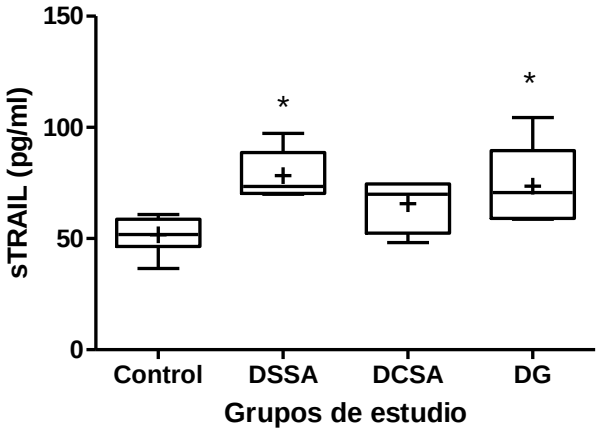


Figura 38. Concentraciones de sTRAIL en pacientes con dengue en fase recuperación tardía, relacionadas con la severidad de la enfermedad. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DSSA (n=5), DCSA (n=4) y DG (n=5). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio, mediana, percentiles (25 y 75%) y valores mínimo y máximo de cada serie. *p<0,05 con respecto al grupo control.

IV.2.3.3.- sTRAIL según serotipo viral infectante

Las concentraciones séricas del receptor sTRAIL se encontraron incrementadas en los pacientes con dengue causado por cualquiera de los serotipos virales al compararlo con el grupo control sano, sin embargo fue más notorio este aumento en la infección producida por DENV-1 y DENV-3 en relación al resto de los serotipos virales.

Las concentraciones de sTRAIL se incrementaron ($p<0,05$) en los pacientes con infección activa por los cuatro serotipos virales (DENV-1: 131,5±32,1 pg/ml; DENV-2: 84,7±14,3 pg/ml; DENV-3: 108,7±10,9 pg/ml y DENV-4: 79,2±12,2 pg/ml) al compararlas con el grupo control (51,7±8,0 pg/ml). De igual manera, se encontró un

aumento de sTRAIL en los pacientes con DENV-1 con respecto a DENV-2, DENV-4 y con OIVF (72,16±9,78 pg/ml) y en los pacientes con DENV-3 al compararlo con DENV-4 y con los que presentaban OIVF **(Figura 39).**

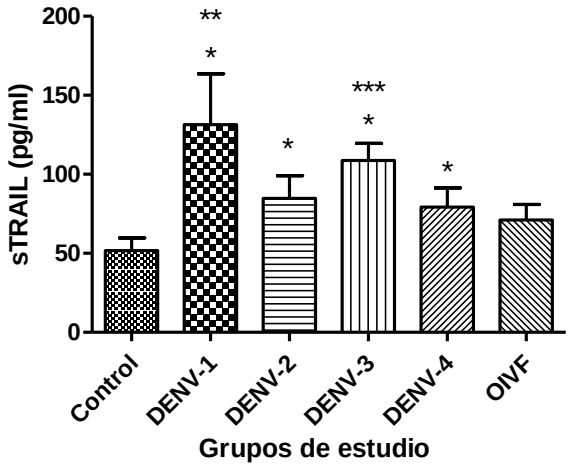


Figura 39. Concentraciones de sTRAIL en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el serotipo viral infectante. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con DENV-1 (n=5), DENV-2 (n=8), DENV-3 (n=5) y DENV-4 (n=6). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,05 con respecto al grupo control. **p<0,05 comparado con DENV-2, DENV-4 y OIVF, ***p<0,05 respecto a DENV-4 y OIVF.

IV.2.3.4.- TRAIL según tipo de infección

Los niveles séricos de sTRAIL fueron elevados (p<0,05) en ambos tipos de infección (IP: 113,6±34,8 pg/ml e IS: 89,9±21,7 pg/ml) en relación al grupo control (51,7±8,0 pg/ml) **(Figura 40).**

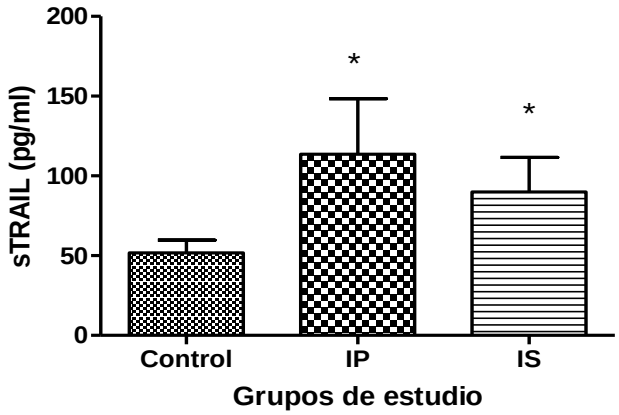


Figura 40. Concentraciones de sTRAIL en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas con el tipo de infección. La concentración se determinó por la técnica de ELISA en suero de pacientes con Infección Primaria (IP n=7) e Infección Secundaria (IS n=21). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,05 con respecto al grupo control.

IV.2.3.5.- Área bajo la curva (AUC) del marcador de apoptosis sTRAIL.

Al analizar el area bajo la curva del marcador de apoptosis sTRAIL en el suero de los pacientes de acuerdo a la severidad de la enfermedad relacionándolos con la fase evolutiva, se observó un incremento significativo (p<0,05) en el AUC en los pacientes con DG correspondiente a la FRP (2877,0±1770,0 pg x día/ml) al compararlo con la FA en el mismo grupo (656,3±379,3 pg x día/ml). No se encontraron diferencias significativas en el resto de los grupos DSSA y DCSA, ni en sus formas evolutivas **(Tabla 5).**

Tabla 5. Área bajo la curva (AUC) del marcador de apoptosis sTRAIL en el suero de pacientes con dengue.

		DSSA (n=12)	DCSA (n=10)	DG (n=8)
sTRAIL (pg x día/ml)	**AUC_1**	848,2±371,1	792,9±269,8	656,3±379,3*
	AUC_2	2508,0±733,7	1627,0±715,1	2877,0±1770,0
	AUC_t	3535,0±878,8	2521,0±943,8	3554,0±1800,0

Los datos se expresan en promedios ± DE. AUC_1: Área bajo la curva en el suero de pacientes con dengue entre FA y FRP, AUC_2: Área bajo la curva en el suero de pacientes con dengue entre FRP y FRT. AUC_t: Área bajo la curva en el suero de pacientes con dengue Σ de AUC_1 y AUC_2. *p<0,05 comparado con AUC_2 del grupo DG.

IV.3.- Análisis del efecto del DENV sobre la producción de citoquinas en cultivo de monocitos de sangre periférica de pacientes con dengue, estimulados o no con LPS.

IV.3.1.- Concentraciones de las citoquinas proinflamatorias TNF-α, IL-6, IL-12 e IL-1β

Se estimó conveniente analizar la producción de citoquinas *ex vivo* en cultivos de monocitos de pacientes con DEN, para evaluar la respuesta inflamatoria mediada por la producción de IL-1β, IL-12, IL-6 y TNFα en el sobrenadante de estas células estimuladas por los DENV *in vivo* y cultivadas en presencia o no de LPS. Así, se observó que las concentraciones de TNF-α en los sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con dengue (sin LPS) resultaron significativamente altas (p<0,01) (245,6±48,2 pg/mg de proteína) en relación a los monocitos control sin LPS (96,0±16,4 pg/mg de proteína) y a los monocitos infectados por el virus en presencia de LPS (123,6±50,5 pg/mg de proteína). También las concentraciones obtenidas en el grupo control estimulado con LPS (309,6±52,8 pg/mg de proteína) resultaron elevadas con respecto al resto de los grupos **(Figura 41).**

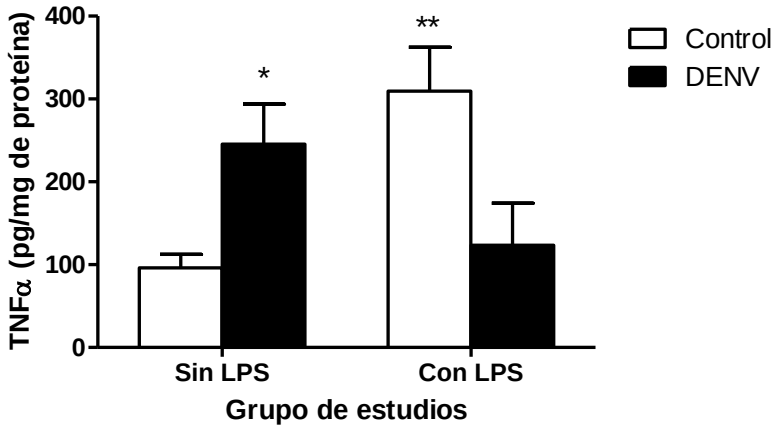


Figura 41. Concentraciones de TNFα en sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con dengue estimulados o no con LPS. La concentración se determinó por ELISA en pacientes con infección aguda por virus dengue (n=8) y controles (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,01 con respecto al resto de los grupos. **p<0,001 comparado con el control sin LPS y DENV con LPS.

Las concentraciones de IL-6 en los sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con DENV sin LPS (456,2±47,2 pg/mg de proteína) resultaron similares a su control (451,4±39,73pg/mg de proteína); mientras que los niveles de los controles estimulados con LPS fueron altas (746,9±39,9 pg/mg de proteína) (p<0,01) con respecto al resto de los sobrenadantes examinados (DENV con LPS: 336,2±156,53 pg/mg de proteína) **(Figura 42).**

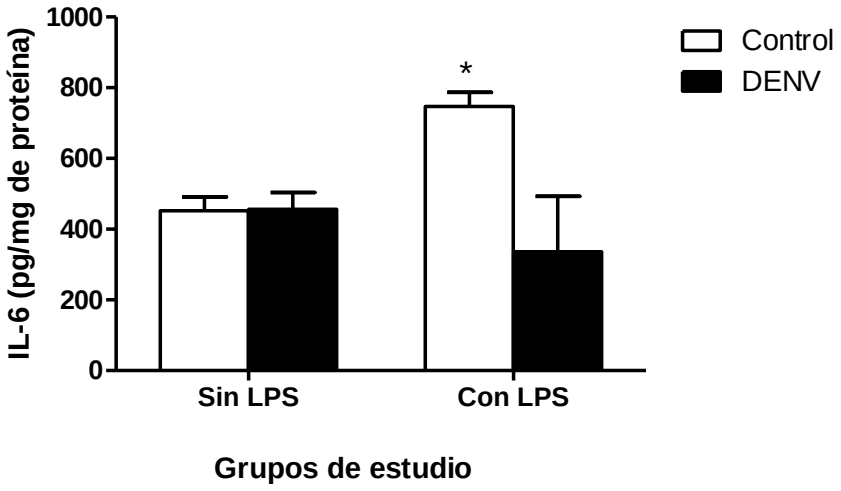


Figura 42. Concentraciones de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con dengue estimulados o no con LPS. La concentración se determinó por ELISA en pacientes con infección aguda por virus dengue (n=8) y controles (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,001 con respecto al resto de los grupos evaluados.

Al analizar las concentraciones de IL-1β se observó un aumento (p<0,01) de la misma en los sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con dengue estimulados (29,05±7,55 pg/mg de proteína) o no (30,66±2,93 pg/mg de proteína) con LPS al compararlos con los controles sin LPS (11,72±1,66 pg/mg de proteína). Además, se evidencia un marcado aumento (p<0,001) de esta citoquina en los controles con LPS (192,5±39,81 pg/mg de proteína) con respecto al resto de los sobrenadantes evaluados **(Figura 43).**

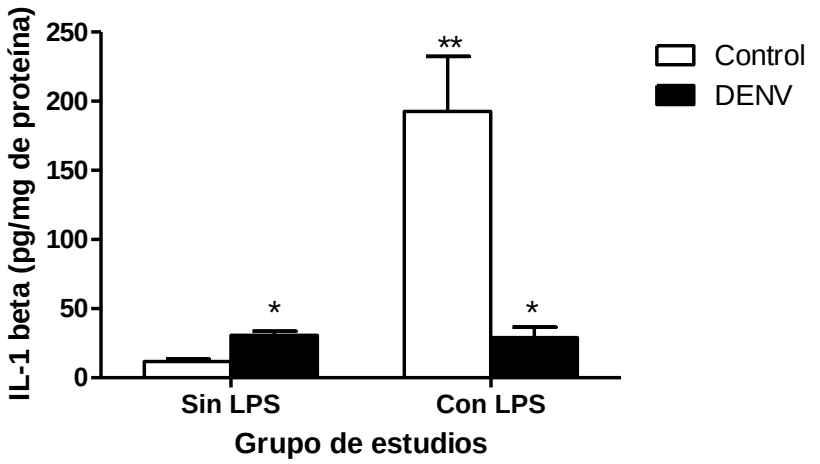


Figura 43. Concentraciones de IL-1β en sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con dengue estimulados o no con LPS. La concentración se determinó por ELISA en pacientes con infección aguda por virus dengue (n=8) y controles (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA + Bonferroni. Los datos se expresan en X ±DS. *p<0,05 con respecto al control sin LPS. *p<0,001 con respecto al control sin LPS.**p<0,001 comparados con el resto de los grupos.

Al determinar las concentraciones de IL-12 en los sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con dengue no estimulados se encontraron concentraciones similares (118,1±9,9 pg/mg de proteína) a los cultivos estimulados (68,2±29,0 pg/mg de proteína) y los controles sin estimulo (54,3±8,6 pg/mg de proteína), pero menores que las observadas en los cultivos de controles estimuladas con LPS (755,1±305,0 pg/mg de proteína) **(Figura 44).**

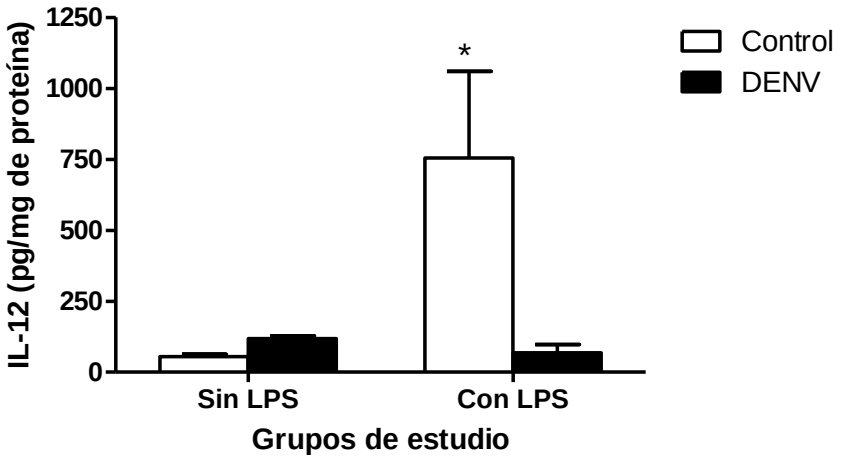


Figura 44. Concentraciones de IL-12 en sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con dengue estimulados o no con LPS. La concentración se determinó por ELISA en pacientes con infección aguda por virus dengue (n=8) y controles (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio ±DE. *p<0,001 comparado con el resto de los grupos.

IV.3.2.- Concentraciones de IL-1RL1/sST2

Con respecto a las concentraciones de IL-1RL1/sST2 se observó un incremento significativo (p<0,001) de esta proteína en los sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con DENV sin estimulación con LPS (35,0±7,6 pg/mg de proteína) al compararlos con el resto de los grupos estudiados (control sin LPS: 13,99±0,95 pg/mg de proteína; control con LPS: 15,76±1,81 pg/mg de proteína y DENV con LPS: 10,680±3,18 pg/mg de proteína) **(Figura 45).**

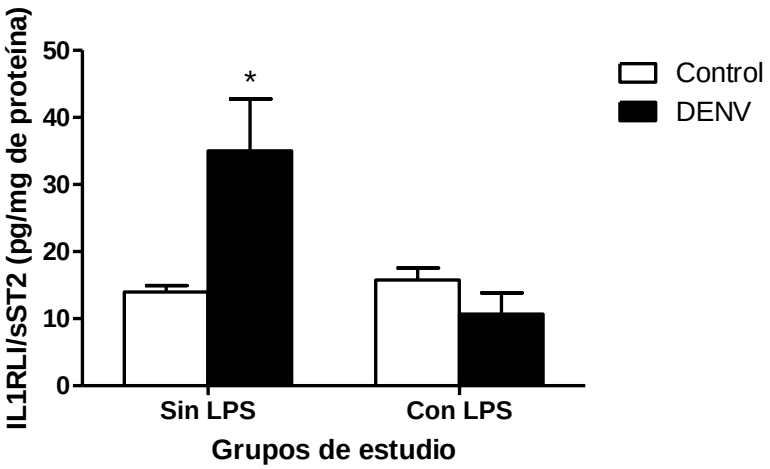


Figura 45. Concentraciones de IL1RLI/sST2 en sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con dengue estimulados o no con LPS. La concentración se determinó por ELISA en pacientes con infección aguda por virus dengue (n=8) y controles (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,001 con respecto al resto de los grupos evaluados.

IV.3.2.- Concentraciones del marcador de apoptosis: sTRAIL

Se evidenciaron concentraciones elevadas de sTRAIL (p<0,01) en los sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con DENV sin LPS (58,53±13,86 pg/mg de proteína) cuando se compararon con pacientes con DENV con LPS (33,84±10,6 pg/mg de proteína) y con los controles estimulados (29,08±7,35 pg/mg de proteína) y no estimulados (26,83±7,03 pg/mg de proteína) **(Figura 46).**

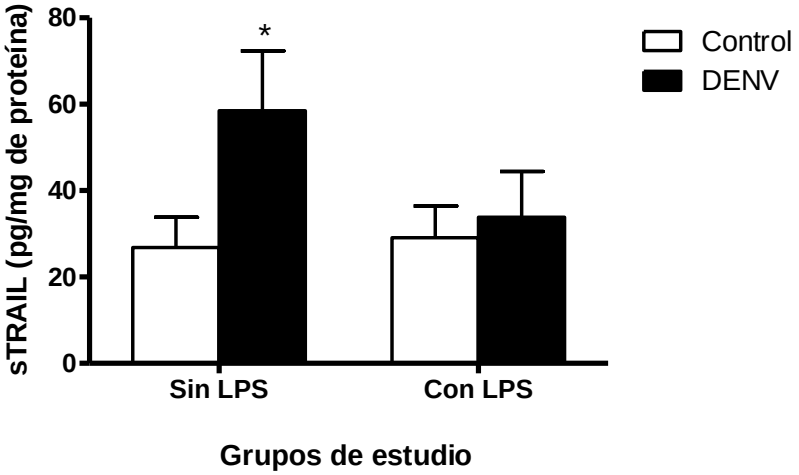


Figura 46. Concentraciones de sTRAIL en sobrenadantes de cultivo de monocitos de pacientes con dengue estimulados o no con LPS. La concentración se determinó por ELISA en pacientes con infección aguda por virus dengue (n=8) y controles (n=8). La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Los datos se expresan en promedio±DE. *p<0,001 con respecto al resto de los grupos.

IV.4.- Efecto inductor/modulador del DENV sobre la apoptosis en monocitos humano

IV.4.1.- Apoptosis en cultivo de monocitos de pacientes con Dengue, tratados o no con LPS.

Al analizar el estado de superviviencia/apoptosis de las células monocitarias de los pacientes con DEN se obtuvieron valores significativamente elevados (p<0,001) de monocitos apoptóticos en el grupo de pacientes con DENV sin LPS (46,50±5,93%) cuando se compararon con los monocitos de los individuos control sin estimulo (6,13±3,0%) y con estimulo (26,89±5,62%). Además, se evidenció una disminución de estas células apoptóticas en el grupo de pacientes con DENV sin

estimulo (46,50±5,93%) con respecto a los monocitos con DENV estimuladas con LPS (77,0±4,96%) **(Figura 47).**

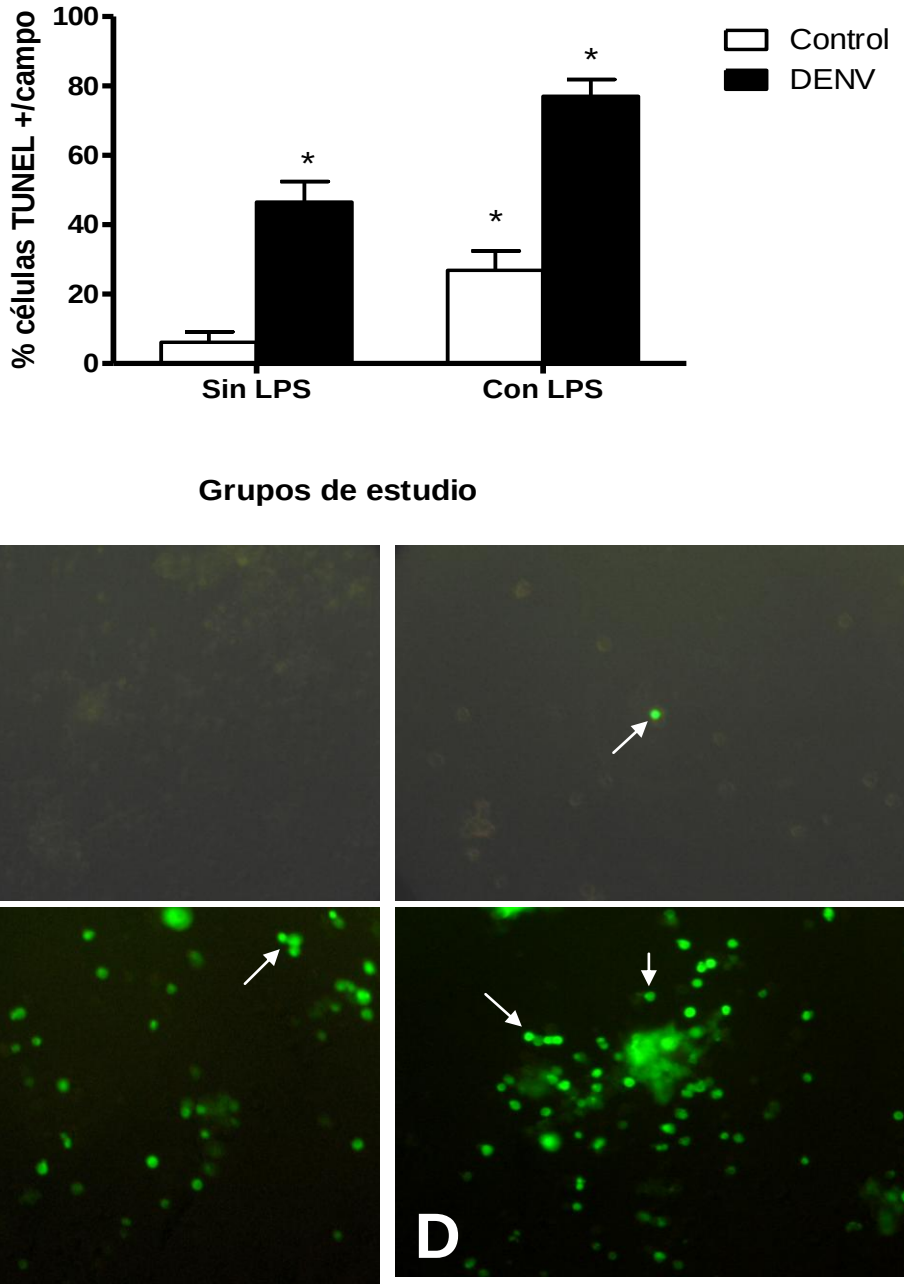


Figura 47. Frecuencia de células TUNEL positivas (apoptosis) en cultivo de monocitos de pacientes con DENV, estimulados o no con LPS. La significancia fue determinada con ANOVA + Bonferroni. Los datos se expresan en X±DS. n=8 pacientes y 8 controles. *p<0,001 con respecto al resto de los grupos estudiados. **La microfotografía representa apoptosis en monocitos de pacientes con dengue: A)** Monocitos procedentes de individuo sano negativo a TUNEL. **B)** Monocitos de individuo sano tratado con LPS (10 ng/ml por 24 horas). Flecha. **C)** Monocitos procedentes de paciente con DENV (etapa febril, NS1: +) positivos a TUNEL (flecha). **D)** Monocitos de paciente con DENV tratado con LPS (10 ng/ml por 24 horas), las flechas señalan células positivas a la reacción de TUNEL.

IV.4.2- Apoptosis en cultivo de monocitos infectados con los serotipos del virus dengue a diferentes días post-infección

Al evaluar el efecto inductor de apoptosis por DENVs en cultivos de monocitos procedentes de sujetos sanos, se encontraron diferencias significativas en el número de monocitos apoptóticos en los cultivos infectados por los diferentes serotipos del virus dengue cuando se compararon con los controles no infectados al 3er y 5to día post-infección. Se evidenció un patrón similar en los serotipos, mostrando diferencias altamente significativas ($p<0,0001$) en el 5to día post-infección (DENV-1: 70,53±9,36%; DENV-2: 69,50±10,47%; DENV-3: 73,33±6,658%; DENV-4: 72,50±10,08%) con respecto a los controles del 3er (6,00±0,261%) y del 5to día (12,00±0,236%) y en el 3er día post-infección (DENV-1: 55,00±4,777%; DENV-2: 53,00±5,477%; DENV-3: 59,67±1,155%; DENV-4: 50,50±5,802%) **(Figura 48).**

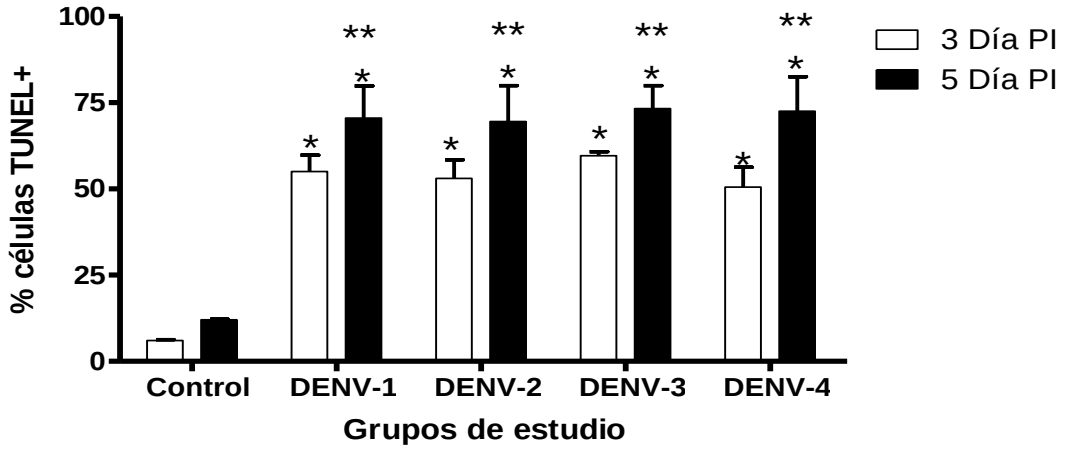


FIGURA 48. Frecuencia de células TUNEL positivas (apoptosis) en cultivo de monocitos humanos infectados con los diferentes serotipos del virus a diferentes días post-infección. *p<0,001 con respecto al grupo control. **p<0,0001 con respecto al control (3er y 5to día) y a los grupos al 3er día post-infección (PI)

Es importante destacar que los controles positivos utilizando cepas de referencia (Den-1 (Hawaii), Den-2 (New Guinea C), Den-3 (H-87) y Den-4 (H-241) mostraron un patrón similar a las muestras de los pacientes con dengue, hecho por el cual no fueron presentados en los resultados mostrados.

V. DISCUSIÓN

V.1- Respuesta inflamatoria sistémica en pacientes con dengue. Asociaciones clínicas.

En nuestro trabajo hemos investigado la intensidad y el patrón de respuesta secretora de citoquinas inducidas por el DENV y la evolución clínica en pacientes con dengue. Se decidió estudiar la respuesta inflamatoria al DENV con énfasis en las fases evolutivas y la severidad de la enfermedad.

Se dispuso estudiar el nivel circulante de las citoquinas TNFα, IL-1β, IL-6, IL-12 e IL-17 dado a que son mediadores inflamatorios claves e importantes en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. También, con la finalidad de obtener un análisis del funcionamiento del sistema molecular en conjunto estudiamos las moléculas anti-inflamatorias sTNF-RI, sTNF-RII e IL-1RL1/sST2 y finalmente estudiamos al sTRAIL como marcador relevante de apoptosis.

V.1.1.- Citoquinas pro-inflamatorias

Los aspectos que determinan el desarrollo de manifestaciones graves en algunas personas infectadas por DENV, han sido parcialmente identificados. Entre éstos se encuentra la producción de citoquinas, las cuales son moléculas necesarias en la modulación de la respuesta inmunitaria ante la presencia de infecciones; sin embargo pueden desencadenar respuestas inadecuadas en las personas. Los eventos generados debido a la desregulación de la respuesta tipo-1 (pro-inflamatoria) puede contribuir a múltiples aspectos en la patogénesis de la forma grave del dengue

(Chakravarti A. & Kumaria R., 2006). En el presente estudio se objetivó un incremento significativo de las concentraciones séricas de TNF-α, IL-6, IL-12 e IL-17 en los pacientes con dengue en la fase aguda (FA) y de recuperación precoz (FRP) de la enfermedad, con respecto al grupo control representado por individuos sanos, excepto los valores de la IL-17 que se normalizaron a valores basales en esta fase (FRP). Además, TNF-α e IL-6 mostraron asociación significativa con la severidad de la enfermedad. Las concentraciones de IL-1β permanecieron en niveles equivalentes en todos los grupos analizados (FA, FRP, FRT y en los controles sanos y con OIVF).

El TNF es uno de los más importantes mediadores, fundamental en el desencadenamiento de reacciones inflamatorias del sistema inmunitario innato **(Hehlgans T. et al., 2005)**. Nuestros hallazgos concuerdan con los descritos por Braga E. et al.**, (2001);** Chakravarti A & Kumaria R., **(2006);** y más recientemente por Levy A. et al., **(2010),** al observar concentraciones séricas de TNF-α e IL-6 incrementadas en pacientes con dengue. Sin embargo, otros estudios describen concentraciones de TNF-α inalteradas, en pacientes con dengue en el Oeste de la India **(Priyadarshini D. et al., 2010)** y en Gaboneses infectados con DENV-2 **(Becquart P. et al., 2010)**, quienes sugieren que las diferencias en las características de la población o en el estatus inmunológico previo, pudieran explicar estas discrepancias.

Se evidenció incremento prolongado y significativo de las concentraciones de TNF-α predominantemente en los pacientes con DCSA y DG con respecto al grupo control sano, datos similares a los descritos por varios autores quienes relacionan

esta citoquina con la severidad de afectación, encontrando sus valores más elevados en los pacientes con DG **(Houghton-Triviño N. et al, 2010; Nguyen T. et al, 2004; Braga et al., 2001).** Otros investigadores, han demostrado un incremento plasmático de IL-6, TNF-α e IL-1β en pacientes con dengue, pero no hallaron asociación del TNF con la severidad de la enfermedad (**Bozza F., 2008).** Estos datos sugieren una inconsistencia en los niveles de TNF-α encontrados en las diferentes formas clínicas de dengue leve y grave.

Los niveles de TNF-α incrementan por síntesis de la célula diana activada por el DENV y por sobreproducción del IFN-γ en los pacientes con dengue **(Kurane I., 2007).** La persistencia de los niveles elevados de TNF en la fase de recuperación precoz comparada con el grupo control sano, puede indicar alteración de la homeostasis y astenia, sugiriendo que aun en esa fase evolutiva persiste la activación celular.

El origen del incremento de TNF-α durante la infección por DENV es un aspecto fisiopatológico relevante. Algunos autores, señalan que aunque las células T son las responsables de la erradicación del virus, también tienen un importante papel en la patogénesis, a través de la producción de citoquinas y mediadores los cuales actúan sobre el endotelio vascular para producir aumento de la permeabilidad y como consecuencia DG **(Fink J. et al. 2006).**

Asimismo, se ha observado que las células T CD4+ y CD8+ reactivas al DENV producen predominantemente TNF-α, TNF-β y quimioquinas, incluyendo la proteína 1β inhibidora de macrófagos, al interactuar con las células presentadoras de antígeno (CPA) infectadas por este virus, incrementando la eficiencia de la lisis de las células infectadas *in vitro* **(Rothman A., 2004)**. Este estudio demuestra que la interacción de los diferentes serotipos de DENV con el monocito es suficiente para inducir a estas células a producir TNF-α, y establece la posibilidad de su contribución en el incremento sérico de esta citoquina en los pacientes con DG. Aunado a esto y como posible causa de incremento de la infectividad del virus, el TNF-α no interfiere en la capacidad de replicación del DENV en el sistema monocito/macrofágico **(Wati y col., 2007**).

El TNF-α es un potente desencadenante de síntesis de IL-6 **(Couderc R. et al., 2004)**, y se le caracteriza por provocar indirectamente daños en dengue mediante la producción de IL-6 **(Andersen K. et al., 2008).**

Se han descrito concentraciones altas de la IL-6 en las etapas tempranas del dengue **(Becquart P et al., 2010)** y asociadas con la severidad de la enfermedad **(Juffrie M. et al, 2001)**. Nuestros resultados demuestran, que tanto en la fase aguda como en la de recuperación precoz o convaleciente los pacientes con dengue independientemente de la gravedad de la enfermedad tienen aumentada de manera significativa la concentración de IL-6 al compararlos con el grupo control sano. Sin embargo, el incremento de esta citoquina fue significativamente mayor en los grupos

con DCSA y DG, con respecto a las encontradas en los pacientes con DSSA y con grupo control, lo que corrobora que esta citoquina está involucrada en la forma grave de dengue, hallazgos que concuerdan con los obtenidos por otros autores recientemente **(Levy A. et al., 2010; Bozza FA., 2008).**

La IL-6 puede causar lesión tisular, dado que sus concentraciones altas están implicadas en la patología de algunas enfermedades, especialmente en pacientes con DG. Además, desempeña un papel crucial en aumentar la producción local y sistémica de auto-anticuerpos anti-plaquetas y anti-endoteliales, valores elevados del activador de plasminógeno tisular (tPA), y deficiencias en la coagulación que conducen a la extravasación plasmática, hemorragias y muerte en los pacientes con DG **(Rachman A. et al., 2006; Suharti C. et al., 2002)**.

Estudios previos han demostrado que el TNF-α y la IL-6 están asociados con la severidad de la enfermedad en la infección por dengue, mientras que las concentraciones de IL-1β no (**Levy A. et al., 2010, Kuno I. et al., 1994, Hober D. et al., 1993)**, estos hallazgos coinciden con los encontrados en el presente estudio, donde los niveles de IL-1β en suero de los pacientes con dengue se mantuvieron en valores basales.

Otra citoquina proinflamatoria evaluada en los pacientes con dengue fue la IL-12, la cual es producida por los fagocitos mononucleares y células dendríticas **(Chen Y. et al., 2002; Libraty D. et al., 2001),** estimulados por infecciones bacterianas,

parasitarias o virales **(Abbas A. et al., 2009).** La IL-12 es un potente inductor de citoquinas, particularmente de IFN-γ, en células T y NK. Existen evidencias que demuestran la presencia de un cambio que va desde una respuesta de tipo TH1 observada en pacientes con dengue leve hasta la de tipo TH2 en DG **(Chaturvedi U. et al., 2006, 2000).** La respuesta TH1 está relacionada con la defensa mediada por los fagocitos y linfocitos T citolíticos $CD8^+$, frente a las infecciones, especialmente las ocasionadas por microorganismos intracelulares **(Abbas A. et al., 2009).**

En nuestros datos se observó un incremento de IL-12 en los pacientes con dengue en FA y FRP, con respecto a los pacientes en FRT y al grupo control sano. Estos hallazgos apoyan en parte lo demostrado en la India por Pacsa A et al., (**2000)**, quienes determinaron en pacientes con dengue los niveles más altos de IL-12 en los primeros cuatros día después del inicio de síntomas, a partir de los cuales se observó disminución progresiva hasta el día 9, en la que no se detectó la misma. De igual manera, Masaki H. et al **(2002)** señalan aumento transitorio de esta citoquina en un viajero japonés infectado por DENV-3. Contrario a esto, en Indonesia se indicó en un estudio, ausencia de respuesta mediada por IL-12-p40 en pacientes con dengue comparado con los controles negativos al virus **(Juffrie M. et al., 2002).**

Al asociar las concentraciones de IL-12 con la severidad de la enfermedad, no se encontró relación de esta citoquina con las diferentes formas clínicas de los pacientes estudiados. Sin embargo, se observó que los pacientes con DSSA presentan concentraciones séricas superiores a las encontradas en los grupos con

DCSA y DG en la FA, manteniéndose hasta la FRP. Esta observación podría ser un indicio de que esta citoquina tiene un efecto protector para el paciente con dengue, si este es el caso, se podría asomar la posibilidad de que IL-12 pueda utilizarse como marcador predictivo de la evolución clínica de pacientes infectados por DENV.

La clasificación de las células T CD4+ colaboradoras ha sido revisada actualmente debido a la identificación de la familia de la IL-17 y sus funciones efectoras. Las células reguladoras TH 17 productoras de IL-17 desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Asimismo, se ha descrito para ellas un efecto pro-inflamatorio que le permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida **(Betteli E. et al., 2007; Matsuzaki G. et al., 2007).** Aunque estas células se han descubierto recientemente, su hiperfunción ya se ha asociado a procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes promovidos, fundamentalmente por su efecto pro-inflamatorio **(Korn T. et al., 2007).** Se han sugerido implicaciones de autoinmunidad en la patogénesis del dengue. Se ha demostrado la reacción cruzada de los anticuerpos anti-NS1 del DENV con células endoteliales y plaquetas humanas, conduciendo al daño celular e inflamación **(Lin C. et al., 2006).**

Nuestros resultados revelan un incremento significativo de las concentraciones de IL-17 en el suero de los pacientes con dengue en la FA de la enfermedad al compararlas con las del grupo control sano. Estos datos relevantes, coinciden con los recientemente descritos por **Becquart P. et al (2010)** en pacientes con dengue

durante los primeros días de la infección. Así mismo, se ha descrito que las células TH17 a través de la secreción de la IL-17 parecen tener potencial en la patogénesis del DG por inducción de varias citoquinas **(Gupta N & Chaturvedi UC, 2009).** Sin embargo, previo a estos reportes otros autores observaron valores indetectables de IL-17, IL-5 e IL-12 en pacientes con dengue en Niterói (Río de Janeiro) **(Bozza F. et al., 2008).**

Es muy poca la información que existe sobre la función de la IL-17 en las infecciones virales y muy específicamente en la infección por DENV. Asimismo, no se encontró asociación de la IL-17 con la severidad de la enfermedad. Sin embargo, se observó un incremento de esta citoquina proinflamatoria en los pacientes con infección secundaria y en el grupo con OIVF cuando se compararon con el grupo control sano.

En general, ningún parámetro estudiado en los pacientes con dengue fue asociado con un solo serotipo del virus. La intensidad y el patrón de respuesta de TNF-α, IL-6 e IL-17 no variaron de manera relevante al asociarlas con el serotipo viral infectante. Los niveles circulantes de IL-12 incrementararon en los pacientes con infección por DENV-1 y DENV-3, no se esperaba que un serotipo viral específico pudiesa ser responsable de las alteraciones en la infección por DENV.

Tambien, las cuatro citoquinas estuvieron incrementadas en la IP por el virus; mientras que en la IS sólo los valores séricos de TNF-α e IL-6 se observaron

elevados, sugiriendo que ambas citoquinas están involucradas en la infección forma grave de dengue.

V.1.2.- Citoquinas anti-inflamatorias

Simultáneamente, a la determinación de las citoquinas pro-inflamatorias en suero examinamos las concentraciones circulantes de los sTNF-R, con la finalidad obtener un análisis del funcionamiento del sistema molecular en conjunto. La producción de TNF-α depende directamente de la unión con sus receptores. Los sTNF-R son moléculas proteicas que liberadas post-activación celular, se encuentran presentes en la orina, el plasma, líquido amniótico y en sobrenadantes de cultivo celulares estimulados. Se unen al TNFα para antagonizar y controlar los efectos que produce esta citoquina al incrementar sus concentraciones.

Al analizar las concentraciones de los sTNF-RI y sTNF-RII en los pacientes con dengue relacionándolos con las fases evolutivas de la enfermedad se observó que las mismas incrementaron significativamente en la FA, al compararlas con los valores del grupo control sano, los obtenidos en las fases de recuperación precoz y tardía. Diversos autores, reportan incremento de uno o ambos receptores en la infección por DENV **(Hobert D. et al., 1996; Bethell D. et al., 1998; Green S. et al., 1999; Pinto L. et al., 1999; Braga E. et al., 2001).** Asimismo, se observó una asociación significativa de estos receptores con la severidad de afectación, dado que las concentraciones de sTNF-RI y sTNF-RII en los pacientes con DCSA y DG fueron mayores con respecto a las del grupo control sano y al grupo de pacientes con DSSA. Estos datos

coinciden con lo descrito previamente en niños con DG, sugiriendo que podría ser un marcador temprano y específico de dengue con shock (**Bethell D. et al., 1998; Green S. et al., 1999).** Pero contrario a lo descrito por **Braga E. et al (2001)** quienes no hallaron relación de este receptor con la severidad de la enfermedad.

Un aumento significativo de las concentraciones de IL1RLI/sST2 se observaron en los pacientes con dengue durante la FA al compararlas con las otras fases evolutivas. Así mismo, esto fue evidente con respecto a los controles sano y los pacientes con OIVF; sugiriendo que esta proteína juega un papel crucial en el inicio de la enfermedad. Este aumento podría estar asociado significativamente con la severidad de la enfermedad, lo cual permitiría orientar de forma más específica el manejo del paciente. Los niveles elevados de sST2 en el suero de pacientes en fase aguda y con dengue grave, podrían ser producidos por CMN o células endoteliales debido a una respuesta de activación inmunitaria por mediadores pro-inflamatorios y vasoactivos en etapas tempranas de la infección y concomitante a niveles elevados de TNFα **(Houghton-Triviño et al., 2010).**

Recientemente, se ha propuesto a esta proteína como un marcador para el diagnóstico de dengue durante el estadío febril de la enfermedad, aun durante la defervescencia o inmediatamente después, cuando la mayoría de los virus se han aclarado o eliminado. En nuestra investigación se evidencia en conjunto, el incremento de las concentraciones de sST2 en la infección por el DENV en fase inicial de la enfermedad, su asociación con la severidad y en la infección secundaria,

tal como ha sido recientemente descrito **(Becerra A. et al., 2008; Houghton-Triviño et al., 2010).**

La función de sST2 durante la infección por DENV aun permanece desconocida. Diversos autores reportan que sST2 podría estar involucrada en la respuesta inflamatoria e inmunitaria celular Th2 **(Amatucci A. et al., 2007; Tajima S. et al., 2007).** Lo describen ciertas investigaciones como un receptor transmembranal huérfano que interfiere en la señalización que activa al factor nuclear-*k*B (NF-*k*B). El mecanismo por el cual ST2 bloquea la activación de los TLRs es secuestrando las proteínas adaptadoras como el factor de diferenciación mieloide-88 (MyD88) y a la proteína adaptadora con el dominio TRI (TIRAP) **(Liew F. et al., 2005).** Su expresión es inducida por estímulos pro-inflamatorios **(Kumar S. et al., 1997),** y recientemente se ha descrito que la IL-33 es el ligando específico de ST2L que induce la producción de citoquinas tipo TH2 **(Schmitz J. et al., 2005)**. La señalización de IL-33/ST2 está involucrada en la respuesta inmunitaria mediada por células T. Altos niveles de sST2 se han encontrado en diversos desordenes inflamatorios asociados con respuesta anormal mediada por células TH2, incluyendo enfermedades autoinmunes **(Hayakawa H. et al.; 2007; Kuroiwa K. et al., 2001),** fibrosis pulmonar idiopática **(Tajima S. et al., 2003),** asma **(Oshikawa K. et al., 2001),** infarto del miocardio agudo **(Shimpo et al., 2004),** sepsis y trauma **(Brunner et al., 2004).**

Actualmente se estableció una elevación de los niveles de sST2 sostenida y estable en sepsis severa, correlacionada con la severidad y mortalidad de la

enfermedad **(Hoogerwerf J. et al.; 2010),** similar a los resultados observados en pacientes con leptospirosis severa los cuales demostraron un aumento de sST2, asociados con hemorragia y mortalidad, sugiriendo que podría ser un marcador de daño tisular **(Wagenaar J. et al.; 2009).**

Tambien se observó que durante la infección por los serotipos DENV-1 y DENV-3 no alteraron los niveles circulantes de las moléculas anti-inflamatorias (sTNF-RI, sTNF-RII y IL1RLI/sST2).

V.1.3.- Marcador de apoptosis: TRAIL

La función que puede tener TRAIL *in vivo* en condiciones fisiológicas aun está siendo estudiada. Su expresión en células T efectoras y su capacidad de inducir apoptosis en células infectadas por virus proporcionan claves tempranas de que TRAIL puede cumplir una actividad relevante en la respuesta inmunitaria contra infecciones virales **(Cummins N. et al., 2009)**

En cuanto a las concentraciones de sTRAIL/TNFS10, se observó en nuestro estudio un incremento de esta proteína en los pacientes con dengue en la fase aguda y de recuperación precoz de la enfermedad con respecto a las obtenidas en el grupo control sano. Se ha descrito la expresión de sTRAIL en pacientes con dengue, encontrando un aumento en los niveles séricos durante el periodo febril, cuando fueron comparados con donantes sanos. También que células dendríticas pre-tratadas con recombinantes (rTRAIL), disminuyeron los niveles de IFNα y el porcentaje de células dendríticas infectadas con DENV en comparación con células

dendríticas no tratadas. Todo esto indica que el virus dengue induce la expresión de TRAIL *in vivo* e *in vitro*. Adicionalmente, en modelo de células dendríticas para infección por dengue, TRAIL inhibe la producción de citoquinas y quimioquinas inducidas en respuesta al virus, efecto que puede relacionarse con la disminución de la infección de células dendríticas después del tratamiento con rTRAIL **(Becerra A. et al.; 2009).**

El TRAIL es un gen de respuesta común que promueve específicamente apoptosis en células cancerígenas por unión y activación a los receptores DR4 y DR5 **(Huang Y. et al., 2007).** Así mismo, se ha evidenciado que media funciones antivirales *in vivo* en encefalomiocarditis e influenza en el modelo múrido **(Ishikawa E. et al., 2005; Sato K. et al., 2001)**. Se ha conceptualizado que TRAIL podría ser una nueva proteína antiviral contra el DENV; los resultados de la presente investigación apoyan esta hipótesis al observar en los pacientes que padecen de DSSA es decir, dengue leve, concentraciones séricas de sTRAIL significativamente altas comparadas con las encontradas en los pacientes con DCSA, DG, OIVF y el grupo control sano en la fase aguda de la enfermedad; manteniéndose este incremento en la fase de recuperación precoz con respecto al grupo control sano. En un estudio donde se utilizó un set de 23 genes inducidos por la infección con dengue en HUVECs, monocitos, células dendríticas y células B, el TRAIL, uno de los genes de respuesta común, fue identificado como clave entre los genes de respuesta de interferones tipo I y II. También, describen que el DENV induce la expresión del ARNm de TRAIL en células

inmunitarias y en HUVECs. Datos que sugieren que TRAIL es importante en la respuesta inmunitaria antiviral durante la infección por el DENV **(Warke R. et al., 2008)**.

V.2.- Efecto directo del DENV sobre la producción de citoquinas en cultivo de monocitos de sangre periférica de pacientes con dengue.

Los monocitos/macrófagos son unas de las células diana más importante en la infección por DENV **(Kou Z et al., 2008)** La interacción del virus con estas células desencadena diferentes procesos biológicos de respuesta entre los que destacan la expresión de antígenos de superficie ligados a la activación celular y la secreción de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores. Estos mediadores solubles liberados por los monocitos infectados ejercen efectos importantes sobre las propiedades biológicas de las células endoteliales y hematopoyéticas (**Anderson et al., 1997; Shaio et al., 1995**), lo que sugiere que la interacción del virus con estas células podría ser crucial en la patogénesis del dengue.

Por tal motivo, estimamos conveniente analizar la producción de citoquinas en cultivo de monocitos circulantes de pacientes con dengue. Se realizaron cultivos de monocitos de pacientes con dengue en fase aguda de la enfermedad los cuales fueron estimulados o no con LPS. Nuestros resultados indican que los monocitos durante la infección por DENV producen de manera estimulada algunas citoquinas, dado el incremento significativo de TNF-α, IL-1β e IL-12 observado con respecto al grupo control. Esta respuesta fue similar al patrón de secreción encontrado en el suero de los pacientes con dengue excepto la IL-1β que se mantuvo en niveles basales. Estos datos sugieren que la interacción del virus con el monocito *in vivo*

está asociada a altos niveles circulantes de estos mediadores inflamatorios y confirma la relevancia de estas células en la patogénesis de la enfermedad.

También, se observó una disminución de la producción de citoquinas en el grupo de monocitos de pacientes con DENV y estimulados con LPS, observado particularmente en TNF-α, lL-6 e IL-12. Esto podría deberse a que el LPS induzca marcadamente la muerte por apoptosis en los monocitos activados por el DENV y productores de citoquinas, deprimiendo la producción basal de las mismas.

V.3.- Efecto inductor/modulador del DENV sobre la apoptosis de monocitos de sangre periférica de pacientes con dengue

La infección de las células monocitarias por el DENV conlleva a modificaciones en su ciclo celular e incluso en su supervivencia. Los mecanismos de inducción de muerte por el virus en la célula infectada son diversos y entre ellos se incluye como relevante el de la inducción de la apoptosis. Nosotros analizamos la existencia o no de daño en los monocitos circulantes de los pacientes con dengue y evaluamos el impacto inductor del virus sobre los mismos, para determinar la causa principal del daño en estas células.

Los resultados indican un incremento significativo del porcentaje de monocitos apoptóticos de pacientes con dengue con respecto a los monocitos de sujetos sanos, sugiriendo que este daño es por efecto directo del virus sobre la célula. También, se observó un aumento marcado de apoptosis en los monocitos infectados y

estimulados con LPS con respecto a los monocitos infectados no estimulados y a los controles con y sin LPS. Al parecer, el LPS induce apoptosis tanto en los monocitos sanos como en los monocitos activados por el DENV haciéndolos más susceptibles al efecto pro-apoptótico y por consiguiente a la muerte celular.

Cuando se realizó la infección *in vitro* de monocitos humanos con los diferentes serotipos del virus dengue aislados de los pacientes, también se evidenció un incremento en el número de monocitos apoptóticos. Este hecho es complementario al anterior, lo que significa que la infección por DENV en parte, es la causa principal de daño en los monocitos. Estos hallazgos concuerdan con lo descrito por **Espina LM. et al., (2003)** quienes demostraron que el porcentaje de monocitos apoptóticos está relacionado con la concentración viral en los cultivos celulares infectados con DENV-2, sugiriendo la presencia del virus como inductor de la muerte celular.

Marianneau P. et al., (1998), demostraron que la replicación del virus dengue induce apoptosis en neuronas de ratones y en hepatocitos humanos y que la habilidad de activar esta vía depende tanto de determinantes virales como celulares. De hecho, las células citotóxicas activadas durante la respuesta inmunitaria antiviral y la activación de células fagocíticas asociadas con la producción de citoquinas pueden causar daño tisular local o desbalances transitorios en la homeostasis. Además, la apoptosis inducida por el DENV puede ser considerada como una

característica importante de la patogénesis viral (**Marianneau P. et al., 1998; Mosquera J. et al., 2005).**

En la infección viral primaria, el DENV podría inducir apoptosis en monocitos, pero además, éstos pueden contribuir a los mecanismos de defensa del huésped en contra del virus a través de la fagocitosis viral, fagocitosis de células apoptóticas infectadas y la liberación de citoquinas proinflamatorias. Dado que los monocitos/macrófagos son células fagocíticas activas con componentes lisosomales citoplasmáticos capaces de eliminar microorganismos, y el DENV puede inducir muerte celular por mecanismos apoptóticos **(Marianneau P. et al., 1999; Avirutnan P. et al., 1998**), la interacción del virus con su principal célula blanco puede provocar efectos deletéreos tanto en los virus como en las células **(Espina LM., et al., 2003).**

VI. CONCLUSIONES

Del estudio sobre los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-6, IL-12, IL-17, IL-1β), anti-inflamatorias (sTNF-RI, sTNF-RII, IL-1RL1/sST2), el marcador de apoptosis TRAIL y apoptosis en pacientes con dengue, se concluye que:

1. La infección por el virus Dengue produce un aumento significativo de las siguientes citoquinas pro-inflamatorias IL-6, TNFα, IL-12 e IL-17, pero no de IL-1β que se objetivan en la fase aguda con posterior normalización hasta la FRT. La intensidad del cuadro clínico se asocia a un diferente patrón de elevación de las mencionadas citoquinas.
2. El patrón de alteración de los niveles circulantes del TNF-α, IL-6 e IL-17 es similar en las infecciones producidas por la serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus DEN, pero los de IL-12 aumentan selectivamente en las producidas por DENV-1 y DENV-3.
3. La infeccción por DENV produce un aumento significativo de las móleculas anti-inflamatorias (sTNF-RI, sTNF-RII y IL1RLI/sST2) y al estratificar a los pacientes por cuadro clínico solo se observaron en las formas más graves (DCSA y DG) y no se alteraron en la infección por los serotipos DENV-1 y DENV-3.
4. La infección por DENV produce un aumento significativo del marcador de apoptosis sTRAIL y su patrón de alteración se relaciona con la forma clínica de la enfermedad siendo mayor en las menos graves.

5. El patrón de alteración de las citoquinas pro-inflamatoria y moléculas anti-inflamatorias es diferente en las infecciones primarias y secundarias asoiandose éstas a las formas clínicas mas graves.
6. Los monocitos de pacientes infectados con DENV muestran *ex vivo* un incremento de la producción de las citoquinas, TNFα, IL-1β e IL-12, pero no IL-6, así como de su apoptosis y la infección *in vitro* por los cuatro serotipos de virus aislados de los pacientes induce muerte celular programada en monocitos sanos.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A.K, Lichtman A.H., Pillai, S. Citoquinas en: ***Inmunología celular y molecular.*** Elsiever. 267-301, 2009.

2. Álvarez M, Rodríguez-Roche R, Bernardo L, Vázquez S, Morier L, González D, Castro O, Kouri G, Halstead SB, Guzmán MG. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic ***Am J Trop Med Hyg.*** 75(6):1113-7. 2001-2002, 2006.

3. Alvarez-Mon M, Kehrl JH, Fauci AS: A potential role for adrenocorticotropin in regulating human B lymphocytic functions***.*** ***J Immunol.*** 135: 3823-6, 1985.

4. Amatucci A, Novobrantseva T, Gilbride K, Brickelmaier M, Hochman P, Ibraghimov A. Recombinant ST2 boosts hepatic Th2 response in vivo. ***J Leukoc Biol****.* 82(1):124-32, 2007.

5. Anaya JM. Descripción Molecular del TNF-α. ***Reumatología*** 19(2):112-120, 2003.

6. Anderson R., Wang S., Osiowy C., Issekutz A. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. ***J Virol.*** 71: 4226-4232, 1997.

7. Añez G, Balza R, Valero N and Larreal Y. Impacto económico del dengue y del dengue hemorrágico en el Estado de Zulia, Venezuela, 1997–2003. ***Rev Panam Salud Pública.*** 19(5): 314–320, 2006.

8. Arango M.C., Fernández L.L., Díaz R.T., y García M.E. La apoptosis: Características y su papel en la transformación maligna de la célula. ***Rev. Cubana Oncol***. 13(2): 57-8, 1997.

9. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. ***J Clin Invest****.* 104(2):155-62, 1999.

10. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. ***J Immunol****.* 161(11): 6338-46, 1998.

11. Bachmann F. and Kruithof E.K.O. Tissue plasminogen activator: Chemical and physiological aspects. ***Semin. Thromb. Hemost****.* 10: 6-17, 1984.

12. Balmaseda A, Hammond SN, Pérez AA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, Idiaquez W, Harris E. Shot report: assessment of the world health organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua.

Am J Trop Med Hyg. 73(6):1059-1062, 2005.

13. Balta R. Guía práctica para la identificación de *Aedes aegypti*. Lima: Instituto Nacional de Salud. **Serie de Guías Entomológicas.** 2, 1997.

14. Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. **Trop Med Inter Health.**11(8):1238--1255. 2006.

15. Becerra A, Warke R, de Bosch N, Rothman A, Bosch I. Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients. **Cytokine.** 41(2):114-120. 2008.

16. Becerra A, Warke R, Martin K, Xhaja K, de Bosch N, Rothman A, Bosch I. Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo. ***J Med Virol***. 81:1403-1411, 2009.

17. Becquart P, Wauquier N, Nkoghe D, Ndjoyi-Mbiguino A, Padilla C, Souris M, Leroy EM. Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. ***BMC Infect Dis.*** 10:356, 2010.

18. Bernhardi R. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿Apoptosis o necrosis? ***Rev. Chil. Neuro-psiquiat.*** 42(4):281-292, 2004.

19. Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, Day NP, Pham TP, Buurman WA, Cardosa MJ, White NJ, Kwiatkowski D. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. ***J Infect Dis.*** 177(3):778-82, 1998.

20. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy ***Curr Opin Immunol.*** 19(6):652-7, 2007.

21. Blanco C. Dengue and Chikungunya viruses in blood donations: risks to the blood supply? ***Transfusin*** 48: 1279-8, 2008.

22. Bosh I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke R, Fournier M, Ennis F, Rothman A. Increased production of Interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial cell lines after dengue virus callenge. ***Journal of Virology***. 76(11):5588-5597, 2002.

23. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. ***Scand J Clin Lab Invest*.** 21(97):77, 1968.

24. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. ***BMC Infect Dis.*** 8:86, 2008.

25. Broker, L.E., Kruyt, F. A., and Giaccone, G. Cell death independent of caspases. ***Clin. Cancer. Res.*** 11(9):3155-62, 2005.

26. Brunner M, Krenn C, Roth G, Moser B, Dworschak M, et al. Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. **Intensive Care Med.** 30:1468–1473. .2004.

27. Burgués J.P., Moreno P., Vera C.D., Jimenez Cruz J.F. Mecanismo del ciclo celular y la apoptosis implicadas en la resistencia a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. ***Actas urol. Esp***. 29(9): 846-859, 2005.

28. Burke DS, Nisalak A, Jhonson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. **Am J Trop Med Hyg**. 38:172-80. 1988.

29. Cabrera-Hernandez A, Thepparit C, Suksanpaisan L, Smith DR. Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. **J Med Virol.** 79(4):386-92. 2007.

30. Calisher CH. Persistent emergence of dengue. **Emerg Infect Dis.** 11: 738-9. 2005.

31. Cam BV, Fonsmark L, Hue NB, Phuong NT, Poulsen A, Heegaard ED. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. ***Am J Trop Med Hyg.*** 65(6):848-51, 2001.

32. Cardosa MJ, Porterfield JS, Gordon S. Complement receptor mediates enhanced flavivirus replication in macrophages. ***J Exp Med*** 158: 258-263, 1983.

33. Cascales M. Bases moleculares de la apoptosis. ***Anal. Real Acad. Nal. Farm***. 69:2003.

34. Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak Indian. ***J Med Res.*** 123(1):25-30, 2006.

35. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. ***Annu Rev Microbiol*.** 44:649-88. 1990.

36. Chaturvedi U, Agarwal R, Elbishbishi E, Mustafa A. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. ***FEMS Immunol Med Microbiol***. 28*:* 183-188, 2000.

37. Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. Macrophage & dengue virus: friend or foe?. ***Indian J Med Res*** 124: 23-40, 2006

38. Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R, Raghupathy R, Nagar R, Tandon R, Pacsa AS, Younis OI, Azizieh FJ Sequential production of cytokines by dengue virus-

infected human peripheral blood leukocyte cultures. ***Med Virol.*** 59(3):335-40. 1999.

39. Chaturvedi UC, Shrivastava R, Nagar R. Dengue vaccines: problems and prospects. **Indian J Med Res.** 121(5):639-52. 2005.

40. Chaturvedi UC**.** Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever. Indian **J Med Res.** 129(1):1-3. 2009.

41. Chen RF, Yang KD, Wang L, Liu JW, Chiu CC, Cheng JT. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 101(11):1106-13. 2007.

42. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nat Med**. 3(8):866-71. 1997.

43. Chen Y, Wang S. Activation of terminally differentiated human monocytes/ macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines and the synergistic effect of lipopolysaccharide. J Virol 2002; 76(19): 9877-9887.

44. Chutinimitkul S, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. J Virol Methods. 129(1):8-15. 2005.

45. Corallini F, Rimondi E, Secchiero P. TRAIL and osteoprotegerin: a role in endothelial physiopathology? **Front Biosci.** 13:135-47. 2008

46. Cruz A, Rolland-Burger L. El virus del dengue. **Diagnóstico.** 41(4): 165-172. 2002

47. Cummins N, Badley A. The TRAIL to viral pathogenesis: the good, the bad and the ugly. **Curr Mol Med.** 9(4):495-505. 2009.

48. Damonte EB. Dengue: un Viejo y Nuevo desafío para la quimioterapia antiviral. Rev quimiva viva 2(5): 52-62. 2006.

49. Diehl G, Yue H, Hsieh,K, Kuang A, Ho M. TRAIL-R as a negative regulador of innate immune cell responses. **Immunity.** 21:877-889. 2004.

50. Dong C. Diversification of T-helper-Cell lineages: Finding the family root of IL-17-producing cells. Nature Rev Immunol 6:329-333. 2006.

51. Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. Sci STKE. 171:re3. 2003

52. Ehrlich S, Infante-Duarte C, Seeger B, Zipp F. Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. **Cytokine.** 24:244-253. 2003.

53. Espina, L; Valero, N; Hernández, J; Mosquera, J. Increased Apoptosis and Expression of Tumor Necrosis Factor-α Caused by Infection of Cultured Human Monocytes with Dengue Virus. **Am J Trop Med Hyg**. 68(1): 48-53, 2003.

54. Espino J., Bejarano I., Redondo P., Rosado J., Barriga C., Reiter R., Pariente J., Rodríguez A. Melatonin Reduces Apoptosis Induced by Calcium Signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. ***J. Membrane Biol***. 233: 105-118, 2010.

55. Fadeel B., Orrenius S., Zhivitovsk B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? ***Biochem Biophys Res Commun***. 266: 699-714, 1999.

56. Falconar AK, de Plata E, Romero-Vivas CM**.** Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. ***Clin Vaccine Immunol.*** 13(9):1044-51, 2006.

57. 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. ***Arch Virol.*** 142 (5): 897-916, 1997.

58. Feig C, Peter ME. How apoptosis got the immune system in shape. ***Eur J Immunol.*** 37 Suppl 1:S61-70, 2007.

59. Fernández RJ, Vázquez S Serological diagnosis of dengue by an ELISA inhibition method (EIM). ***Mem Inst Oswaldo Cruz.*** 85(3):347-51, 1990.

60. Finizola, F. Normas Básicas en el Manejo del Paciente con Fiebre Dengue, Dengue Hemorrágico y Dengue Shock. ***Acta Científica Venezolana.*** 49(1): 18-24, 1998.

61. Fink J, Gu F, Vasudevan SG Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. Rev Med Virol. 16(4):263-75, 2006.

62. Gadelha D, Toda A. Biologia e comportamento de A. aegypti. ***Rev Bras Malariol D Trop.*** 37:29-36, 1985.

63. Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentation of human naïve, central memory, and effector mamory CD4+ T cells ***Journal Experimental Medicine.*** 194 (12): 1711-1719, 2001.

64. Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, Zarski JP, Drouet E. Heparan sulfate-mediated

binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. ***Virology.*** 292(1):162-8, 2002.

65. Gerscheson L., Rotello J. Apoptosis: A different type of cell death ***Faseb J.*** 6: 2450-2455, 1992.

66. Golcálvez AP., Escalante AA., Pujol FH., Luudert JE., Tovar D., Salas RA., Liprandi F. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. ***Virology***. 303:110-119, 2002.

67. Gollins SW, Porterfield JS. A new mechanism for the neutralization of enveloped viruses by anti viral antibody. **Nature** 321: 244-246. 1986.

68. Goncálvez A, Engle R, St Claire M, Purcell R, Lai C. Monoclonal antibody- mediated enhancemet of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. ***Proceeding of the national academy of Sciences in the United States of América.*** 104 (22): 9422-9427, 2007.

69. Green S., Rolhman A., Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current opinion in infectious disease**. 19 (5): 429-36. 2006.

70. Green, S; Vaughn, D; Kalayanarooj, S; Nimmannitya, S; Suntayakorn, S; Nisalak, A; Rothman, A and Ennis, F. Elevated plasma Interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. **J of Med Virology.** 59: 329-334, 1999.

71. Groot H, Boshell J**.** Dengue, dengue hemorrágico y fiebre amarilla. **Capítulo 120 en Medicina Interna**, Tercera Edición (Fundación Instituto de Reumatología e Inmunología, Boehringer Ingelheim. Fernando Chalem, Jorge Escandón, Jaime Campos, Roberto Esguerra, Editores, 1998.

72. Gubler, DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology. Rev**. 11 (3): 480-496. 1998.

73. Gubler, DJ. The changing epidemiology of yelloe fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. 27: 319-30. 2004.

74. Gupta N, Chaturvedi UC. Can helper T-17 cells play a role in dengue haemorrhagic fever? ***Indian J Med Res.*** 130(1):5-8, 2009

75. Guzmán M., García G., y Kouri G. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. ***Rev Panam Salud Pública***. 19(3): 204-214, 2006.

76. Guzmán MG, Alvarez M, Rodríguez R, Rosario D, Vázquez S, Vald s L, Cabrera MV, Kourí G. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. ***Int J Infect. Dis.*** 3(3):130-5, 1999

77. Guzmán MG, Álvarez M, Vázquez S, Kourí G. Laboratory diagnosis of dengue infection: epidemiology and field studies. Dengue diagnostic: proceedings of an international workshop. ***ENICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for research and Training in Tropical Diseases (TDR),*** WHO/TDR, 2005.

78. Guzmán MG, García G, Kourí, G. Dengue y fiebre hemorrágica del dengue, un problema de salud mundial. ***Rev Cubana Med Trop*** 60(1):5-16, 2008.

79. Guzman MG, Kouri G, Martinez E, Bravo J, Riveron R, Soler M, et al. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). ***Bull Pan Am Organ****.* 2:270-279, 1987.

80. Guzmán MG, Kourí GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba. A retrospective seroepidemiologic study **Am J Trop Med Hyg**. 42:179-84. 1990.

81. Guzmán MG; Kourí G. Dengue: an update. **Lancet Infect Dis.** 2: 33-42. 2002.

82. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observation related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovery. ***Yale J Biol Med.*** 42:311-28, 1970.

83. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. ***Am J Trop Med Hyg.*** 65:180-3, 2001

84. Halstead SB. Dengue. ***Lancet.*** 370: 1644-52, 2007.

85. Halstead SB. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. ***Am J Trop Med Hyg****.* 23:974-982, 1974.

86. Halstead SB. Antibodies determine virulence in dengue. **Ann N Y Acad Sci.** 1171 Suppl 1:E48-56, 2009.

87. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. ***Science.*** 239:476–481, 1988.

88. Halstead SD. Immune enhancement of viral infection. ***Prog Allergy****.* 31:202-9, 1982.

89. Henchal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. ***Am J Trop Med Hyg.*** 32(1):164-9, 1983.

90. Hober D., Nguyen TL., Shen L., Ha DQ., Huong VT., Benyoucef S., Nguyen TH., Bui TM., Loan HK., Le BL., Bouzidi A., De Groote D., Drouet MT., Deubel V., Wattre P. Tumor necrosis factor alpha levels in plasma and whole-blood culture in dengue-infected patients: relationship between virus detection and pre-

existing specific antibodies. ***J Med Virol.*** 54: 210-218, 1998.

91. Hober D., Poli L., Roblin B., Gestas P., Chungue E., Granic G., Imbert P., Pecarere J., Verguez-Pascal R., Wattre P. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. ***Am J trop Med Hyg.*** 48 (3): 324-331, 1993.

92. Holmes EC and Burch S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. ***Trends in Microbiology***. 8(2):74-76, 2000.

93. Holmes EC. The evolutionary biology of dengue virus. ***Novartis Found Symp****;* 277: 177-87; discussion 187-92, 251-253, 2006.

94. Hoogerwerf JJ, Tanck MW, van Zoelen MA, Wittebole X, Laterre PF, van der Poll T. Soluble ST2 plasma concentrations predict mortality in severe sepsis. ***Intensive Care Med.*** 36(4):630-7, 2010.

95. Horn F., Henze C., Heidrich K. Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function I**mmunobiology**. 202 (2): 151-167, 2000.

96. Houghton-Triviño N, Salgado D, Rodríguez J, Bosch I, Castellanos J. Levels of soluble ST2 in serum associated with severety of dengue due to tumor necrosis factor alpha stimulation. **J Gen Virol**. 91:697-706, 2010.

97. Hoyos A., Pérez A. Actualización en aspectos epidemiológicos y clínicos del dengue. ***Revista Cubana de Salud Pública.*** 36 (1): 149-164, 2010.

98. Huang K.J., Li S.Y. J., Chen S.C., Liu H.S., Lin Y.S., Yeh T.M., Liu C.C., Lei H.Y. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. ***J. Gen. Virol.*** 81: 2177-2182, 2000.

99. Huang Y, Sheikh MS. TRAIL death receptors and cancer therapeutics. ***Toxicol Appl Pharmacol****.* 224(3):284-9, 2007.

100. Huang Y.H., Liu C.C., Wang S.T., Lei H.Y., Liu H.S., Lin Y.S., Wu H.L., Yeh T.M. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. ***J. Med. Virol****.* 63: 247-251, 2001.

101. Igarashi A. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses**.** ***J Gen Virol.*** 40(3):531-44.1978, 1978

102. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, Hoke CH. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. ***Am J Trop Med Hyg.*** 40(4):418-27, 1989.

103. Ishikawa E, Nakazawa M, Yoshinari M, Minami M. Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune response to influenza virus infection in mice. ***J Virol.*** 79(12):7658-63, 2005.

104. Joost J, Oppenheim MD, Francis W.R. Citocinas. En: Introducción a la Inmunológia Humana. ***Editorial Médica Panamericana.*** 5º ed. Caracas. p 165-92, 2000.

105. Juffrie M., Meer G., Hack C., Thus L. Inflammatory mediators in Dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. ***Am J Trop Med Hyg.*** 65 (1): 70-75, 2001.

106. Juffrie N, Meer vd GM, Veerman AJ P, Thijs LG and Hack CE. Inflammatory Mediators in Dengue Virus Infection: Circulating Interleukin-12 and Interferon-γ. ***Dengue Bulletin***. 26:144-154, 2002.

107. Kao CH, King CH, Chao D, Wu H, Chang G. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. ***J Microbiol Immunol Infect***. 38:5-16, 2005.

108. Katial RK, Sachanandani D, Pinney C, Lieberman MM. 1998. Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetents host. ***Clin Diagnost Lab Immunol***. 5(1): 78-81, 1998

109. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang S. IL-17 cytokine family. ***J allergy Clin Immunol*** 114: 1265-1273, 2004.

110. Kielian, M. Class II virus membrane fusion proteins. ***Virology.*** 344:38-47, 2006.

111. Kittigul L, Meethien N, Sujirarat D, Kittigul C, Vasanavat S. Comparison of dengue virus antigens in sera and peripheral blood mononuclear cells from dengue infected patients. ***Asian Pac J Allergy Immunol.*** 15(4):187-91, 1997.

112. Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants**.** ***Am J Trop Med Hyg.*** 38(2):411-9, 1988.

113. Koraka P, Williams MM, Djamiatun K, Setiati TE, van Batenburg FH, Stittelaar KJ, Osterhaus AD, Martina BE. RNA secondary structures in the proximal 3'UTR of Indonesian Dengue 1 virus strains. ***Virus Res.*** 142(1-2):213-6, 2009.

114. Koraka P, Murgue B, Deparis X, Setiati TE, Suharti C, van Gorp EC, Hack CE, Osterhaus AD, Groen J. Elevated levels of total and dengue virus-specific immunoglobulin E in patients with varying disease severity. *J Med Virol.* 70(1):91-8, 2003.

115. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. ***Semin Immunol.*** 19(6):362-71, 2007.

116. Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WW, Rose RC, Schlesinger JJ, Jin X. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. ***J Med Virol.*** 80(1):134-46, 2008.

117. Kourí G, Guzmán MG, Bravo J. Why dengue hemorragic fever in Cuba? An integral analysis. ***Trans Royal Soc Trop Med Hyg.*** 81:821-3, 1987.

118. Kumar S, Tzimas M, Griwold D, Young P. Expression of ST2, an interleukin-1 receptor homologue, is induce by proinflammatory stimuli. ***Biochem Biophys res Commun.*** 235:474-478, 1997

119. Kumarasamy V, Wahab AH, Chua SK, Hassan Z, Chem YK, Mohamad M, Chua KB. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. ***J Virol Methods.*** 140(1-2):75-9, 2007.

120. Kuno G. Dengue virus replication in a polyploid mosquito cell culture grown in serum-free medium. ***J Clin Microbiol.*** 16(5):851-5, 1982.

121. Kuno G., Bailey R. Cytokine responses to dengue infection among Puerto Rican patients. ***Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.*** 89 (2): 179-182, 1994

122. Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on Immunopathogenesis. ***Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*** 30(5-6):329-40, 2007.

123. Kurane, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. ***Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*** 30(5-6):329-49, 2007.

124. Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, Minota S, Tominaga S. Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 284: 1104–1108, 2001.

125. La Braga EL., Moura P., Pinto LM., Ignacio SR., Oliveira MJ., Cordeiro MT., 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. ***Mem Inst Oswaldo Cruz.*** 96: 229-232, 2001.

126. La Russa VF., Innis BL. Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. ***Baillieres Clin. Haem.*** 8: 249-270, 1995.

127. Lanciotti R., Calisher Ch., Gubler D., Chang D., Vorndamt G. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. ***Journal of clinical Microbiology***. 30 (3): 545-551, 1992.

128. Larreal, Y, Valero N, Estévez J, Reyes I, Maldonado M, Espina LM, Arias J, Melean E, Áñez G, Atencio R. Alteraciones hepáticas en pacientes con dengue. ***Invest Clín.*** 46(2):169-178, 2005.

129. Lei H, Yeh T, Liu H, Lin Y, Chen S, Liu C. Immunopathogenesis of dengue virus infection. ***J Biomed Sci.*** 8: 377-88, 2001.

130. Lei H-Y., Huang K-J., Lin Y-S., Yeh T-M., Liu H-S., Liu C-C. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. ***Am. J. Infect. Dis.*** 4 (1): 1-9, 2008.

131. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacón, Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. ***J Virol***. 73(6):4738-47, 1999.

132. Levi JE, Tateno AF, Machado AF, Ramalho DC, de Souza VA, Guilarde AO, de Rezende Feres VC, Martelli CM, Turchi MD, Siqueira JB Jr, Pannuti CS. Evaluation of a commercial real-time PCR kit for detection of dengue virus in samples collected during an outbreak in Goiania, Central Brazil, in 2005. ***J Clin Microbiol.*** 45(6):1893-7, 2007.

133. Levy A, Valero N, Espina LM, Añez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumor necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. ***Trans R Soc Trop Med Hyg.*** 104:16-23, 2010.

134. Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. ***J Virol.*** 75(8):3501-8, 2001.

135. Liew FY, Liu H, Xu D. A novel negative regulator for IL-1 receptor and Toll-like receptor 4. ***Immunol Lett***. 96(1):27-31, 2005.

136. Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. ***Viral Immunol.*** 19: 127-132, 2006.

137. Lin CF., Lei HY., Liu CC., Liu HS., Yeh TM., Wang ST., Yang TI., Sheu FC., Kuo CF., Lin YS. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. ***J. Med. Virol.*** 63: 143-149, 2001.

138. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Lin YS. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce

damage. J Med Virol. 69(1):82-90, 2003

139. Lozach, PY, Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sanchez, E., Harriaque J., Virelier JL., Rey FA., Despres P., Arenzana-Seisdedos F., Amara A. Drendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)- mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. ***J Biol Chem***. 280 (25), 23698-708, 2005.

140. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LT. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japonese encephalitis, West Nile and dengue viruses. ***Nat Med***. 10: 98-109. 2004.

141. Marianneau P., Flamand M., Deubel V., Després P. Apoptotic cell dead in response to dengue virus infection: the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever revisited. ***Clin Diagn Virol.*** 10: 113-119, 1998.

142. Marianneau P., Flamand M., Deubel V., Després P. Induction of Programmed Cell Death (Apoptosis) by Dengue Virus *In Vitro* and *In Vivo*. ***Acta Científica Venezolana.*** 49 (1): 13-17, 1998.

143. Marianneau P., Steffan AM., Royer C., Drouet MT., Jaeck D., Kirn A., Deubel V. Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. ***J Virol.*** 73 (6): 5201-6, 1999.

144. Mark J., Andrew H. Apoptosis: Mechanismo and Roles in pathology. Int. ***Rev. Exp. Pathol.*** 15: 223-49, 1993.

145. Maroun Sl., Marliere RC., Barcellus RC., Barbosa CN., Ramos JR., Moreira ME. Case report: vertical dengue infection. ***J. Pediatr., Rio de Janeiro***. 84(6): 556-9, 2008.

146. Martin MU., Wesche H. Summary and comparison of the signiling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family **Biochimica et Biophysica Acta.** 1592: 265-280, 2002.

147. Martínez, E. Dengue y dengue hemorrágico. Aspectos clínicos. ***Salud Pública Mex***. 37: 29-44, 1995.

148. Martínez, E. Dengue. ***Estudios Avanzados.*** 22(64): 33-52, 2008.

149. Masaki H, Hasebe F, Ahmed K, Fukuda T, Furumoto A, Watanabe K, Oishi K, Igarashi A, Nagatake T. A clinical, serological, and immunological study in a Japanese traveler with dengue fever. ***J Infect Chemother*****.** 8(4):365-7, 2002.

150. Matsuda T., Almasan A., Tomita M., Tamaki K., Saito M., Tadano M., Yagita H., Ohta T., Mori N. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related

apoptosis-inducing ligand. ***J Gen Virol.*** 86(4): 1055-65, 2005.

151. Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. ***Microbiol Immunol.*** 51(12):1139-47, 2007.

152. McKanzie BS, Kastelein RA and Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. Trends immunol; 27:17-23, 2006.

153. ***Ministerio del Poder Popular para la Salud****.* Acumulado del Año en el Estado Zulia. 2005.

154. ***Ministerio del Poder Popular para la Salud.*** Acumulado del Año en el Estado Zulia, 2006.

155. ***Ministerio del Poder Popular para la Salud***. Acumulado del Año en el Estado Zulia, 2007.

156. Monath TP. Flaviviruses. **In: Virology Fields BN Editor, New York: Raven Press**, p 763-814, 1996.

157. Montes, T. Actualización en Dengue 1. ***Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.*** 21(1): 39-45, 2001.

158. Moore MA. Cytokine and chemokinenetworks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing ***Journal of Cell Biochemistry*****.** 38: 29-38, 2002.

159. Moreno B., Sanchez F., Lourdes. Nan Fc receptor-mediated infeccion of human macrophage by dengue virus serotype 2. ***J Gem Virol*****.** 83, 1123-1130, 2002.

160. Morens, DM; Halstead, SB. Measurement of antibody-dependent infection enhacement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. ***J. Gen. Virol****.* 71: 2909-2914, 1990.

161. Moritz DR, Rodewald HR, Gheyselinck J, Klemenz R. The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. ***J Immunol.*** 161(9):4866-74, 1998.

162. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. ***Cytokine Growth Factor Rev.*** 14: 155-174, 2003.

163. Mosquera JA., Hernández JP., Valero N., Espina LM., Añez GJ. Ultrastructural studies on dengue virus type 2 infection of cultured human monocytes. ***Virol J.*** 2 (1): 26, 2005.

164. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Desprès 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 Rep.*** 4(7):723-8, 2003.

165. Navarrro JC, Zorrilla A y Moncada N. Primer registro de Aedes albopictus (Skuse) en Venezuela: Importancia como vector de Dengue y acciones a desarrollar. ***Bol Mal Salud Amb***. [online]. vol.49, no.1 [citado 29 Junio 2010], p.161-166. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482009000100013&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1690-4648. 2009,

166. Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, Lin CF, Yeh TM, Do QH, Vu TQ, Chen LC, Huang JH, Lam TM, Liu CC, Halstead SB. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. ***J Infect Dis.*** 189(2):221-32, 2004.

167. Nguyen TL, Nguyen TH, Tieu NT. The impact of dengue haemorrhagic. fever on liver function. ***Res Virol***. 148:273-7, 1997.

168. Nielsen DG. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. **Virol J.** Nov 27; 6:211, 2009.

169. Ong A, Sandar M, Chen MI, Sin LY. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. ***Int J Infect Dis.*** 11(3):263-7, 2007.

170. Ooi EE, Goh KT, Gubler DJ. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. ***Emerg Infect Dis.*** 12(6):887-93, 2006.

171. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. ***Chest.*** 117(4):1162-72, 2000.

172. Organización Mundial de la salud. ***Dengue: guía para estudio, tratamiento, prevención y control***, 2009.

173. Organización Panamericana de la Salud. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. ***Publicación 548.*** Washington, DC.110p, 1995.

174. Ortega C., Diaz M., Avalos A., Vergara M., Rosales A. La apoptosis y su importancia Biomédica. ***Gac Med Mex***. 137(6): 563-77, 2001.

175. Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, et al. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. ***Am J Respir Crit Care Med.*** 164: 277–281. 2001.

176. Pacsa, A; Agarwal, R; Elbishbishi, E; Chaturvedi, U; Nagar, R; Mustafa, A.. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever**.** ***FEMS Immunol Med Microbiol*****.** 20: 151-155, 2000.

177. PAHO. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: **guidelines for prevention and control.**

Washington, DC, Pan American Health Organization, No. 548), 1994

178. Peña C., Rincón J., Pedreñalez A., Viera N., Mosquera J. Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. ***J Pineal Res****.* 43 (3): 263-9, 2007.

179. Pérez AB, García G, Sierra B, Alvarez M, Vázquez S, Cabrera MV, Rodríguez R, Rosario D, Martínez E, Denny T, Guzmán MG. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. ***J Med Virol.*** 73(2):230-4, 2004

180. Petersen LR., Busch MP. Transfusion-transmitted arboviruses. ***Vox Sang****.* 98(4): 95-503, 2010.

181. Pinto L., Oliveira S., LA Braga E. Nogueira R., Kubelka C. Increased Pro-inflammatory Cytokines (TNF-α and IL-6) and Anti-inflammatory Compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during Exantematic Dengue Fever. ***Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro.*** 94 (3): 387-394, 1999.

182. Pober JS., Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. **Physiol Rev.** 70: 427-451, 1990.

183. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, Mokashi N, Vaidya D, Shah PS, Cecilia D. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. **PLoS One.** 5(1):e8709, 2010.

184. Querales, J. Serotipos del Dengue en Venezuela. ***Sociedad Venezolana de Hematología****.* 2(1): 12-13, 2002.

185. Race MW, Williams MC, Agostini CF. Dengue in the Caribbean: virus isolation in a mosquito (Aedes pseudoscutellaris) cell line. ***Trans R Soc Trop Med Hyg.*** 73(1):18-22. 1979.

186. Rachman A, Rinaldi I. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. ***Acta Med Indones*****.** 38(2):105-8, 2006

187. Redding P.J and Juliano R.L. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. ***Cancer Metastasis Rev***. 24(3): 425-39, 2005.

188. Reyes J, Chavez S, Medina F, y Angel R. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. ***J Virol.*** 79(8):4557-67, 2005.

189. Rice, CM. Flaviviridae: The virus and their replication. ***Fields virology. Vol I. Trird edition. Philadephia: Lippincott-Raven Publishers****:* 931-958, 1996.

190. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased

pathogenicity in the Americas. **Virology**. 230:244-51. 1997.

191. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. ***Virology.*** 174:479-493. 1990.

192. Rico-Hesse R., Harrison L., Nisalak A., Vaugh D.W., Kalayanarooj S., Green S., Rothman A.L., Ennis F.A. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. ***Am. J. Trop. Med. Hyg***. 58: 96-101, 1998.

193. Rigau-Perez JG, Clark G, Gubler D, Reiter P, Sanders E, Vorndam A. Dengue And Dengue haemorrhagic fever. ***Lancet.*** 352:971-977, 1998.

194. Rigau-Perez JG. Clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990-1991. Puerto Rico Association of Epidemiologists. **Rev Panam Salud Publica.** 1(5):381-8, 1997.

195. Rosario D, Alvarez M, Díaz J, Contreras R, Rodríguez R, Vázquez S, Guzmán MG. Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples. ***Rev Panam Salud Publica.*** 4(1):1-5, 1998.

196. Rosen L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever: a critical appraisal of current hipotesis. ***S Afr Med.*** 11: 40-42, 1986.

197. Rothman A. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. ***The Journal of Clinical Investigation***. 113 (7): 96-951, 2004.

198. Sato K, Hida S, Takayanagi H, Yokochi T, Kayagaki N, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Tanaka N, Taniguchi T, Ogasawara K. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. ***Eur J Immunol.*** 31(11):3138-46, 2001.

199. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. ***Immunity***. 23(5):479-90, 2005

200. Setiati TE, Mairuhu A, Koraka P, Supriatna M, Mac Gillavry M, Bradies D, Osterhaus A, van der Meer J, van Gorp E, Soemantri A. Dengue disease severity in Indonesian children: an evaluation of the World Health Organization classification system. ***BMC Infect Dis.*** 7(22):1-8, 2007.

201. Shaio M., Cheng S., Yuh Y., Yang K. Cytotoxic factors released by dengue virus-infected human blood monocytes. ***J. Med Virol.*** 46 (3): 216-223, 1995.

202. Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. ***Am J Trop Med Hyg.*** 84(2): 200-7, 2011.

203. Shimpo M, Morrow DA, Weinberg EO, Sabatine MS, Murphy SA, et al. Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. ***Circulation.*** 109:2186–2190. 2004.

204. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Comparison of a capture immunoglobulin M (IgM) and IgG ELISA and non-structural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. ***Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.*** 10:622–630, 2003.

205. Simith D, Cabrera Hernández A. Mammalian dengue virus receptor. ***Dengue Bull.*** 29:118-135, 2005.

206. Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. ***Baillieres Best Pract Res Clin Haematol****.* 13(2):261-76, 2000.

207. Suarez A, Mozo L, Gutiérrez M. Citocinas y quimiocinas. Capítulo de inmunología online coordinado por J. Peña. Cap. 9. ***Inmunología-online****,* 2003.

208. Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, ten CH, van der Meer JW. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. ***Thromb Haemost.*** 87(1):42-6, 2002.

209. Tajima S, Bando M, Ohno S, Sugiyama Y, Oshikawa K, Tominaga S, Itoh K, Takada T, Suzuki E, Gejyo F. ST2 gene induced by type 2 helper T cell (Th2) and proinflammatory cytokine stimuli may modulate lung injury and fibrosis**. Exp Lung Res.** 33(2):81-97. 2007.

210. Tajima S, Oshikawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. **Chest** 124: 1206–1214. 2003.

211. Talarico LB, Damonte EB. Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. ***Virology****.* 363(2): 473-85, 2007.

212. Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. ***J Clin Microbiol.*** 36(5):1189-92, 1998.

213. Tassaneetrithep, B., Burguess, T., H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., DCSIGN (CD209) mediates DEN infection of human dendritic cells. ***J Exp Med****.* 197, 823-829, 2003.

214. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. ***Nat Rev Mol Cell Biol.*** Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. 9(3):231-41, 2008.

215. Tesh RB. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. ***Am J Trop Med Hyg****.* 28(6):1053-1059, 1979.

216. Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1receptor. **FEBS Lett.** 258: 301–304. 1989

217. Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis S, Miranda AS, Gardini M, Barbosa LS, Kubelka CF. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. ***Mem Inst Oswaldo Cruz.*** 104 (8): 1091-1099. 2009.

218. Trajkovic V, Sweet MJ, Xu D. T1/ST2--an IL-1 receptor-like modulador of immune response. ***Cytokine Growth Factor Rev***. 15:87-95. 2004.

219. Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). ***Curr Opin Immunol.*** 9(1):17-23. 1997

220. Tsai TF. Flavivirus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. ***Principles and practice of infectious diseases.*** Fitch Edition; 1714. 2000.

221. Uzcátegui NY, Comach G, Camacho D., Salcedo M., Cabello de Quintana M, Jiménez M, Sierra G, Cuello De Uzcátegui R, James WS., Turner S., Holmes EC., Gould EA. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. ***J Gen Virol****.* 84: 1569-1575. 2003.

222. Valero N, Añez F, Larreal Y, Arias J, Rodríguez Z, Espina LM. Evaluación de la inmunidad contra los virus de encefalitis equina venezolana y dengue en la población humana de San Carlos, municipio insular Almirante Padilla, Estado Zulia, Venezuela. Año 1996. ***Invest Clín****.* 2001; 42(3):161–9.

223. Valero N. Hacia el control integral del dengue. ***Invest Clín****.* 43(3):141-144. 2002.

224. Van der Schaar HM, Wilschut JC, Smit JM. Role of antibodies in controlling dengue virus infection. ***Immunobiology.*** 214(7): 613-29, 2009.

225. Van Gorp E.C.M., Shuarti C., ten Cate H., Dolmans W.M.V., van der Meer J.W. M., ten Cate J.W., Brandjes D.P.M. Review: Infectious diseases and coagulation disorders***. J. Infect. Dis.*** 180: 176-186, 1999.

226. Vaughn D, Green S, Kalayanarooj S, Innis B, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy T, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus

serotype correlate with disease severity. J Infect Dis. 181(1):2-9. 2000.

227. Vázquez S, Hafner G, Ruiz D, Calzada N, Guzman MG. Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections. ***J Clin Virol.*** 39(3):194-8, 2007

228. Wagenaar JF, Gasem MH, Goris MG, Leeflang M, Hartskeerl RA, van der Poll T, van 't Veer C, van Gorp EC. Soluble ST2 levels are associated with bleeding in patients with severe Leptospirosis. ***PLoS Negl Trop Dis***. 3(6):e453. 2009.

229. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. ***Annu Rev Immunol.*** Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. 17:331-67. 1999.

230. Wang S., He R., Patarapotikul J., Innis BL., Anderson R. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. ***Virology.*** 213: 254-257, 1995.

231. Warke R, Martin K, Giaya K, Shaw S, Rothman A, Bosch I. TRAIL is a novel antiviral protein against dengue virus. **J Virol**. 82(1):555- 564. 2008.

232. Wati S., Li P., Burrell C., Carr J. Dengue Virus (DV) Replication in Monocyte-Derived Macrophages Is Not Affected by Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α), and DV Infection Induces Altered Responsiveness to TNF-α Stimulation. ***Journal of Virology.*** 81 (18): 10161-10171, 2007.

233. Weawe CT., Uname ER. T cell induction of membrane Il-1 on macrofages. ***Journal of Immunology***. 7: 320-1, 1986

234. Wiley S, Schooley K, Smolak P, Din W, Huang C. Identification and characterization of a new member of TNF family that induce apoptosis. ***Immunity***. 3:673-682, 1995.

235. Wittmann M, Larsson V, Schmidt P, Begemann G, Kapp A, and Werfel T. Suppression of Interleukin-12 Production by Human Monocytes After Preincubation With Lipopolysaccharide. ***Blood.*** 94(5) 1717-1726, 1999.

236. World Health Organization (WHO) and the Special programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). **Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. New edition, 2009.

237. World Health Organization. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control,** 2nd ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1997.

238. World Health Organization. ***Dengue, dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome in the context of the***

integrated management of childhood illness. 13, 2005.

239. Xu D, Chan W, Leung B, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D, Robinson J, Liew F. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. **J Exp Med**. 187:787-794. 1998.

240. Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, Tominaga S. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. **FEBS Lett** 318: 83–87. 1993.

241. Yang K., Lee C., Hwang K., Chu M., Shaio M. A model to study cytokine profiles in primary and heterologously secondary dengue-2 virus infections. ***Acta Virol.*** 39: 19-21, 1995