

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**INMUNOPATOGENESIS DEL DENGUE
HEMORRÁGICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JUAN GILBERTO VAUGHAN FIGUEROA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIERREZ

MEXICO D.F.

OCTUBRE, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología Especial del Departamento de Investigaciones Inmunológicas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, bajo la dirección del Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez y con la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra y el Dr. Leopoldo Santos Argumedo.

Durante la realización de este proyecto, el autor, Juan Gilberto Vaughan Figueroa estuvo becado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (beca número 130038).

INDICE

Resumen	i
Introducción	1
Objetivo General	20
Objetivos Particulares	20
Hipótesis	20
Diseño Experimental	21
Material y Métodos	22
Resultados	30
1. Caracterización molecular de los aislados virales de DEN-2	30
2. Estandarización de metodologías en células C6/36	33
2.1. <i>cell</i> -ELISA	33
2.2. Citometría de flujo	34
2.3. Determinación del intermediario de replicación (IR)	38
3. Infecciones experimentales en células humanas	41
3.1. Infección en células T y monocitos	41
3.2. Infección en poblaciones celulares enriquecidas	45
3.3. Determinación del IR en poblaciones celulares enriquecidas	47
4. Análisis de muestras clínicas naturalmente infectadas	48
4.1. Condiciones de transporte de muestras clínicas	49
4.2. Determinación de infección en muestras clínicas	50
4.3. Activación celular en muestras clínicas	50

4.4. Determinación de citocinas en muestras clínicas	52
Discusión	54
Conclusiones	66
Perspectivas	67
Referencias	68

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad febril aguda que es causada por la infección con cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DEN-1, -2, -3 y -4) que son transmitidos por mosquitos del género *Aedes* (Halstead, 1988). Es la enfermedad viral más importante transmitida por vector. Se estima que aproximadamente existen entre 50-100 millones de casos de dengue nuevos por año. Esta enfermedad es endémica en prácticamente todos los países con clima tropical y subtropical incluyendo diferentes partes de Asia, islas del Pacífico, África, América Central y México (Guzman et al., 2004).

Los mosquitos transmisores son dípteros que pertenecen al subgénero *Stegomyia*, siendo *Aedes aegypti* la principal especie transmisora aunque *Ae. albopictus* y *Ae. scutellaris* también han sido encontrados como importantes vectores. La enfermedad se extendió más allá de su distribución geográfica usual principalmente por los fenómenos originados por la Segunda Guerra Mundial, tales como el colapso económico y la migración humana. Durante la segunda mitad del siglo XX, el rápido incremento en el número de viajeros y las pobres medidas preventivas empeoraron la situación. En la década de los años sesenta del siglo XX, el dengue fue eliminado de nuestro país como resultado de los programas de control de la fiebre amarilla, sin embargo, el descuido de la campaña y la falta de recursos económicos propiciaron que el mosquito fuera reintroducido y rápidamente reinfestara las zonas tropicales del país (Diaz et al., 2006). El virus del dengue y la enfermedad surgieron muy pronto y en 1997 el número de casos notificados representó un incremento de cinco veces con respecto al del año de 1990. Los datos epidemiológicos señalan que durante el 2001 se registró el nivel más alto de casos por dengue en el continente americano con diferentes epidemias registradas en Brasil, Colombia, Ecuador entre otros países.

El tratamiento del dengue es principalmente paliativo, ya que no existen fármacos antivirales realmente eficaces. El desarrollo de una vacuna ha sido complicado, debido a la multiplicidad de serotipos, la falta de un modelo animal

que represente la enfermedad del ser humano, además de la posible participación de la respuesta adaptativa específica en el desarrollo de las formas graves de la enfermedad (Blaney et al., 2006).

Los virus del dengue son virus envueltos que pertenecen a la familia Flaviviridae y al género *Flavivirus*; sus partículas maduras son esféricas de aproximadamente 40-50 nm de diámetro, con una nucleocápside de 30 nm. Las proteínas estructurales de envoltura (E) y de membrana (M) se presentan como proyecciones en la superficie de la envoltura viral. La nucleocápside está formada por la proteína de cápside (C) y el genoma viral (fig. 1). La proteína E es una proteína de 60 KDa, con aproximadamente 500 aminoácidos, la cual es la más abundante en la superficie del virión maduro. Esta proteína es la responsable de la unión del virus a las células susceptibles y también es la encargada de mediar la fusión de membranas, lo cual permite al virus escapar de la vesícula endocítica y así iniciar el ciclo de replicación. Otras de sus funciones biológicas incluyen el ser la proteína hacia la cual se encuentra dirigida la mayoría de los anticuerpos neutralizantes, ser la responsable de la actividad hemaglutinante del virus, participar en el proceso de facilitación de la infección por anticuerpos y la de inducir clones de células T específicas. La proteína M, se encuentra codificada en el genoma viral como un precursor (PrM), la cual está presente en los virus inmaduros al ser transportados a la superficie de la célula hospedera. Este precursor es procesado para dar origen a la proteína M que se localiza únicamente en las partículas virales maduras. La PrM, es una glicoproteína de aproximadamente 18 KDa que al ser procesado, probablemente por una enzima asociada con el aparato de Golgi, da lugar a la proteína de 9 KDa que se compone de 75 aminoácidos. La interacción entre las proteínas de la E y PrM resulta ser esencial para el correcto proceso de maduración y biosíntesis de la proteína de envoltura viral. La proteína M es también requerida en el proceso de fusión de membranas dependiente del pH y el precursor parece actuar como una proteína chaperona de la proteína E durante el transporte de los virus a la superficie de la célula con la función de prevenir el cambio conformacional de la proteína E al ser expuesto al ambiente ligeramente ácido del aparato de Golgi. La proteína C es una proteína pequeña de aproximadamente 12 kDa y 127 aminoácidos que se

encuentra cargada positivamente debido al elevado número de residuos de arginina y lisina. Posee un elevado porcentaje de aminoácidos básicos los cuales interactúan y neutralizan al RNA viral, con quien se encuentra estrechamente asociada, a esta estructura se le conoce como nucleocápside viral. Esta proteína no genera anticuerpos neutralizantes (Brinton et al., 1998).

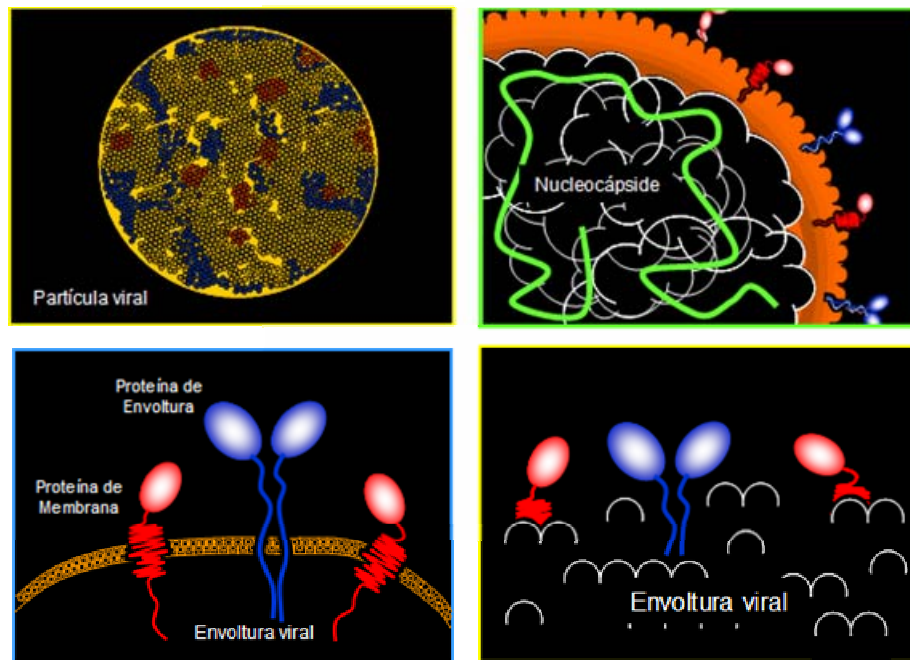


Figura 1. Partícula viral y proteínas estructurales del virus del dengue.

Representación esquemática de la partícula viral del virus del dengue. Las proteínas de envoltura y de membrana se encuentran localizadas en la superficie de la partícula viral y la proteína de cápside se encuentra asociada con el material genético del virus para formar la nucleocápside viral.

Las proteínas no estructurales (NS) son requeridas para la replicación viral y no se encuentran presentes en el virión maduro. Son siete proteínas (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) que son generadas a partir de una poliproteína codificada por el RNA viral y por su procesamiento subsiguiente. La proteína NS1, es una glicoproteína de 354 aminoácidos de aproximadamente 50 kDa que generalmente se encuentra como un homodímero que parece ser la forma funcional de la proteína. Existen dos isoformas, una unida a las membranas celulares de las células hospedadoras y otra que es soluble (Winkler et al., 1988). La dimerización de esta proteína es

dependiente de la porción carboxi-terminal de la misma, la cual también es requerida para su secreción (Pryor and Wright, 1993). Se desconoce el papel de la proteína NS1 en el ciclo replicativo del virus, aunque se ha sugerido su participación en la maduración de la proteína E debido a que se le ha encontrado asociada a esta proteína en el retículo endoplásmico (Fan and Mason, 1990). La forma soluble de esta proteína induce anticuerpos capaces de fijar complemento. Libraty et al, ha identificado complejos formados por la proteína NS1 y elementos del sistema del complemento (Libraty et al., 2002). Los anticuerpos anti-NS1 dan reacciones cruzadas con antígenos de plaquetas lo cual podría explicar en parte la trombocitopenia característica de los casos de dengue, ya que la formación de complejos antígeno-anticuerpo formados por dichos anticuerpos y las plaquetas podrían llevar a su lisis por acción del complemento (Falconar, 1997). La proteína NS3 ha sido propuesta como la helicasa del virus, además de ser una serina-proteasa implicada en el procesamiento de la poliproteína viral que da origen a las proteínas individuales (Rosales-Leon et al., 2006). La actividad de proteasa parece estar ligada a su interacción con la proteína NS2b (Khumthong et al., 2002); esta proteína induce una respuesta celular principalmente por células T CD4+, las cuales típicamente resultan ser de reacción cruzada. La proteína NS5 es la polimerasa del virus y se encuentra altamente conservada en todos los flavivirus. La actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA parece estar localizada en el extremo carboxi-terminal de la proteína y el extremo amino-terminal ha sido propuesto como participante en el "capping" del RNA viral (Edgil et al., 2006). Se sabe poco acerca de las proteínas NS2a, NS2b, NS4a y NS4b, las cuales son pequeñas y poco conservadas a nivel de la secuencia de aminoácidos, pero conservan un perfil hidrofóbico lo cual sugiere que estas proteínas se encuentran asociadas con membranas (Miller et al., 2006). Sus funciones en la replicación del virus del dengue siguen siendo desconocidas, aunque la proteína NS2a parece requerirse para el correcto procesamiento de la proteína NS1 (Falgout et al., 1989) y, como ya se ha mencionado, la proteína NS2b se asocia con la proteína NS3 para conferirle la función de proteasa (D'Arcy et al., 2006; Khumthong et al., 2002; Leung et al., 2001). No se han descrito funciones específicas para las proteínas NS4a y NS4b.

El RNA genómico es una cadena sencilla de RNA de sentido positivo de aproximadamente 11 kb de longitud (fig. 2). El RNA viral está conformado por diez genes, tres codifican para la proteína de cápside, el precursor de la proteína de membrana y la proteína de envoltura y siete más son codificantes para las proteínas no estructurales requeridas para la fase de replicación viral (Kuhn et al., 2002).

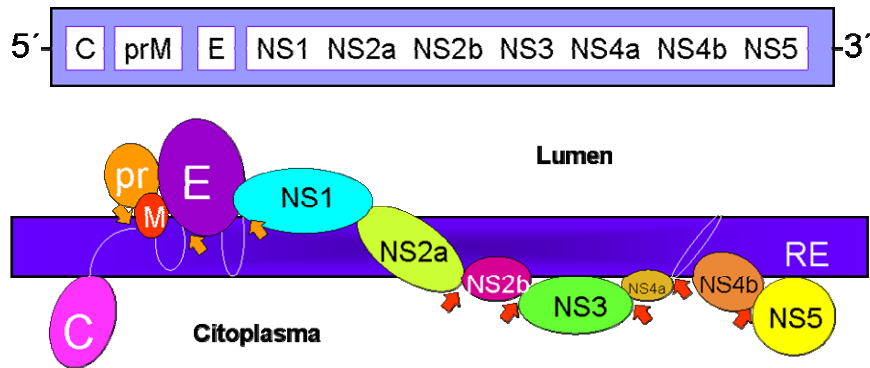


Figura 2. Representación esquemática del genoma viral del virus del dengue. Las flechas anaranjadas representan los sitios de corte enzimático llevado a cabo por proteasas celulares, los sitios de corte realizados por proteasas virales están indicadas con flechas en color rojo.

Los virus del dengue penetran al interior de las células hospederas a través de un proceso de endocitosis mediado por un receptor específico aún no del todo identificado (Reyes-Del Valle et al., 2005). Alternativamente, los complejos antígeno-anticuerpo formados por anticuerpos no neutralizantes y de reacción cruzada con partículas virales, pueden mediar la unión del virus a las células que en su superficie expresan receptores para la fracción Fc de inmunoglobulinas (FcR) (Chaturvedi et al., 2006b; Halstead, 2003; Halstead and O'Rourke, 1977a; Halstead and O'Rourke, 1977b). La penetración de la partícula viral ocurren por endocitosis (Ishak et al., 1988). Una vez dentro de la célula, el desnudamiento y la liberación del RNA genómico son llevados a cabo por un mecanismo dependiente del pH que permite la fusión de las membranas. Posterior al “vaciado” del material genético al citoplasma, se realiza la traducción del mismo para dar origen a una poliproteína que es procesada para generar a las proteínas individuales, incluyendo a las NS3 y

NS5 que son parte del complejo de replicación. El ensamble del complejo de replicación es llevado a cabo y se inicia la síntesis de las especies de RNA viral implicadas en la replicación. Esta replicación del RNA involucra la síntesis de cadenas complementarias del genoma viral de sentido negativo que sirven como un intermediario de replicación, que a su vez son empleadas como moldes para la producción de cadenas genómicas de sentido positivo. Estas nuevas cadenas pueden ser usadas para la obtención de más proteínas virales, para la síntesis de nuevas cadenas negativas o para ser encapsidadas en los viriones de la progenie (fig. 3). Es importante mencionar que la cadena negativa del RNA viral no se encuentra presente en el virión maduro, de tal manera que su identificación es una sólida evidencia de un proceso infeccioso activo (Anwar et al., 2006; Vaughan et al., 2002).

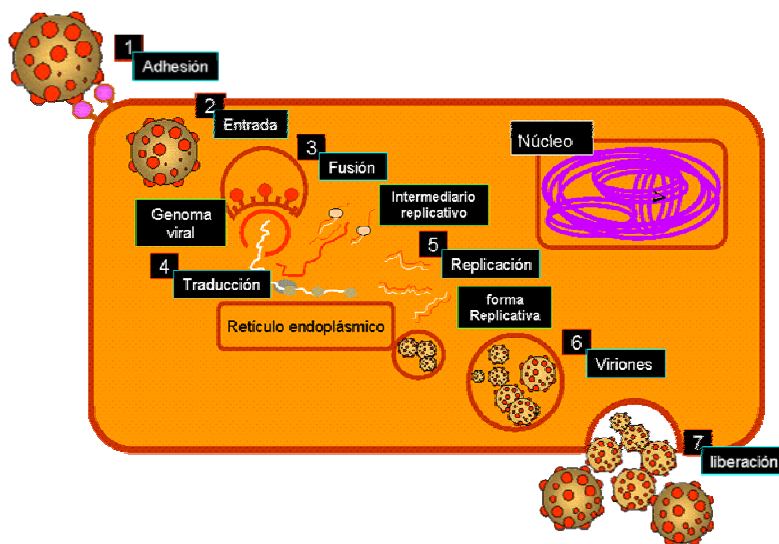


Figura 3. Ciclo de replicación del virus del dengue. Se representa esquemáticamente los diferentes pasos implicados en la replicación del virus que ocurren en la célula hospedera.

La mayoría de las primoinfecciones resultan en cuadros clínicos asintomáticos, principalmente en niños. Clínicamente, la enfermedad toma la forma de una enfermedad aguda febril, denominada dengue clásico (conocida en algunas regiones como quebranta huesos), de la cual la mayor parte de los pacientes se recuperan sin sufrir ningún tipo de secuela. Se caracteriza por dolor de cabeza, muscular y retroorbital, náusea y vómito de curso autolimitado

y temporal (Halstead, 1988). Ocasionalmente las formas severas de la enfermedad, conocidas como dengue hemorrágico (DH) y síndrome de choque por dengue (DSS), ocurren en aproximadamente el 5-20% de los pacientes, especialmente en infantes y niños. El cuadro clínico característico del DH/DSS incluye además de los síntomas propios del dengue clásico diferentes anomalías hemostáticas tales como la filtración de plasma a los espacios intersticiales, trombocitopenia y sangrado (Kurane et al., 1994).

La patogénesis del DH es desconocida, debido principalmente a la ausencia de un modelo animal capaz de representar los eventos ocurridos durante la infección *in vivo*. En la actualidad, a partir de los estudios *in vitro*, se ha sugerido que el fenómeno hemorrágico puede ser causado por mecanismos inmunopatológicos. Esta hipótesis involucra la participación de anticuerpos no neutralizantes, los cuales son generados durante el curso de una infección primaria y que resultan ser de reacción cruzada entre los diferentes serotipos (Kurane et al., 1994). En una segunda infección por un serotipo diferente al primero, dichos anticuerpos reconocen a las partículas virales, no los neutralizan y forman complejos inmunes, que facilitan la infección de un gran número de células fagocíticas mononucleares cuando son reconocidos por los receptores FcγR presentes en su superficie (Burke and Kliks, 2006; Halstead, 2002; Halstead et al., 1980; Kliks et al., 1989; Morens et al., 1987). Debido a esta actividad, estos anticuerpos de reacción cruzada son conocidos como “anticuerpos facilitadores”. El posible papel de los anticuerpos facilitadores en el desarrollo de DH/DSS ha motivado a diferentes grupos de investigación para analizar el mecanismo por el cual podrían estar participando en la patogenia de la enfermedad. Muchos factores influyen en el fenómeno de facilitación mediado por anticuerpos y la presencia de FcR en la superficie de las células permisivas a la infección, usualmente células pertenecientes al linaje de los monocitos/macrófagos, es un factor indispensable para que este proceso se lleve a cabo. De tal forma que el binomio anticuerpo-virus es unido a la superficie celular, lo que hace que el virión establezca una estrecha proximidad con el receptor para el virus presente en la célula hospedera y pueda interactuar con la proteína de envoltura. En estas condiciones, el FcR y el anticuerpo son correceptores para el virus y su interacción parece ser una

indispensable para que se incremente la capacidad de las células blanco para ser infectadas. El fenómeno de facilitación de la infección por anticuerpos ha sido reportado en otros virus como en el VIH, por ejemplo, sugiriendo que este proceso no es específico de los virus del dengue. Hipotéticamente, la presencia de estos anticuerpos debería producir un mayor número de células infectadas, reduciendo el tiempo de incubación e incrementando la severidad de la infección. Más aún, el hecho de que diferentes estirpes celulares involucradas en la respuesta inmunológica, también con receptores para el Fc de inmunoglobulinas, permitiría que fueran fácilmente infectadas y destruidas, contribuyendo así al empeoramiento del cuadro clínico debido a la liberación de los mediadores químicos y citocinas producidas por dichas células.

Aunque el fenómeno de facilitación de la infección por anticuerpos ha sido bien establecido en estudios *in vitro*, la evidencia de que este proceso se lleve a cabo en infecciones naturales es menos abundante. Halstead et al, demostró la factibilidad del fenómeno de facilitación en un modelo en primates no-humanos. En estos experimentos, algunos de los animales infectados consecutivamente con virus del serotipo 2 mostraron signos compatibles con DH y en algunos casos se pudieron detectar viremias diez veces mayores a las registradas durante la infección primaria (Halstead and Palumbo, 1973). Es importante enfatizar que estos experimentos no han sido reproducidos utilizando otros serotipos del virus.

A pesar de los estudios realizados en pacientes bajo diversas circunstancias de infección, la evidencia del fenómeno de facilitación en infecciones naturales ha resultado ser circunstancial y contradictoria en algunos de los casos. Esto lleva a pensar que los procesos hemorrágicos son más complejos de lo supuesto originalmente y son el resultado de múltiples factores que incluyen al hospedero, al virus y al vector.

Desde el punto de vista inmunológico, los mecanismos por los cuales se incrementa la permeabilidad vascular se inician cuando los macrófagos infectados presentan antígenos virales a las células T cuya estimulación da lugar a la síntesis de citocinas de tipo Th1 tales como IL-2 e IFN- γ . El IFN- γ

secretado provoca el aumento de la expresión de Fc γ R en la superficie de los macrófagos, favoreciendo aun más la infección. La elevada cantidad de macrófagos infectados resulta en una mayor producción de citocinas y otros mediadores, así como la activación exacerbada de linfocitos T. La cascada de eventos inicia con la producción de moléculas que directa e indirectamente participan en procesos de vasodilatación, tales como el TNF- α y el factor activador de plaquetas (PAF). La liberación de estos mediadores puede ser el resultado de la infección misma o por la lisis de los macrófagos infectados como resultado de la actividad de células T citotóxicas específicas para el virus (Halstead, 1988; Nguyen et al., 2006).

El papel del TNF- α en el curso de la patología del dengue hemorrágico puede ser la producción de IL-1, IL-6 y PAF que es retroalimentada por actividad de la propia IL-1. De esta forma una vez que diversas citocinas son producidas, se produce una compleja red de inducción que incrementa los niveles de otras citocinas y mediadores químicos, elevando las concentraciones de estas moléculas en un período de tiempo muy corto. Adicionalmente, las citocinas implicadas en esta red presentan efectos sinérgicos que inducen la producción de otras citocinas (Chakravarti and Kumaria, 2006; Lei et al., 2001; Rachman and Rinaldi, 2006; Sanchez-Burgos et al., 2004; Suharti et al., 2003; Suharti et al., 2002).

La activación del sistema del complemento a través de los complejos antígeno-anticuerpo puede también estar implicada en el proceso hemorrágico, ya que dicha activación promueve el incremento de los niveles séricos de C3a y C5a (Avirutnan et al., 2006). Dichas anafilatoxinas pueden unirse a sus receptores en células cebadas y basófilos con la liberación de histamina y otros mediadores pro-inflamatorios (Khanna et al., 1990; Marshall et al., 2003). Es así que el mecanismo que origina la hemorragia puede ser muy complejo y es resultado de una combinación de factores tales como el aumento súbito en la concentración plasmática de citocinas vasodilatadoras, la trombocitopenia, los defectos en la cascada de coagulación y la patología vascular provocada por la interacción de plaquetas, los productos de la activación del complemento y el

plasminógeno. Los estudios *in vitro*, sugieren que en la patogénesis del DH hay una combinación de la lesión celular por el virus (aunque la infección de células endoteliales *in vivo* no ha sido demostrada) y la lesión mediada por los procesos inmunológicos (Fig. 4). Finalmente, la presencia de todas estas moléculas puede provocar que el sistema vascular permita la infiltración de eritrocitos, electrolitos, así como proteínas plasmáticas, lo cual da como resultado el cuadro de choque (Halstead, 1988; Kurane and Ennis, 1992).

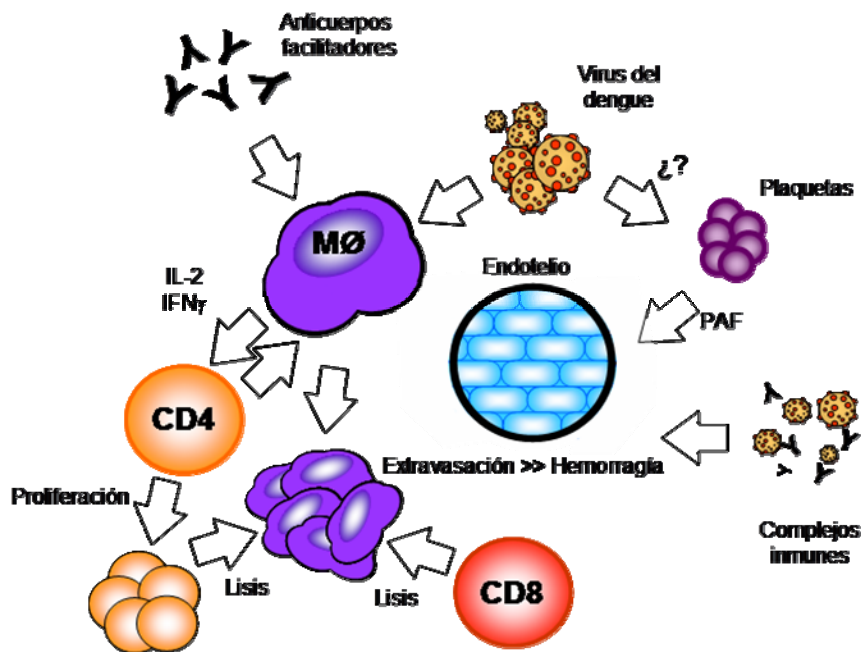


Figura 4. Modelo de los probables mecanismos inmunológicos involucrados en el desarrollo del dengue hemorrágico. Los anticuerpos facilitadores reconocen a los virus circulantes incrementando así su reconocimiento por los monocitos, la principal célula blanco de la infección. Estas células presentan antígeno viral y activan linfocitos T cooperadores (CD4) los cuales proliferan y producen citocinas. Los linfocitos citotóxicos también son activados y participan en la lisis de las células monocíticas infectadas, liberando al torrente circulatorio las citocinas proinflamatorias que produce, incrementando así los niveles de citocinas y mediadores que tienen acción vasodilatadora en el tejido endotelial. La probable infección en plaquetas provocaría la síntesis del factor activador de plaquetas, que al actuar sobre el endotelio favorece vasodilatación y los cuadros hemorrágicos. Los complejos antígeno-anticuerpo se depositan sobre el endotelio conduciendo a las lesiones correspondientes, incrementando la permeabilidad vascular.

Es así que la desregulación del sistema inmunológico podría explicar el malfuncionamiento del endotelio vascular, aún cuando éste no es motivo de daño significativo durante el proceso infeccioso. En este caso, el efecto sería debido al rápido incremento de los mediadores ya mencionados y sus acciones sinérgicas, pleyotrópicas y redundantes, así como el trastorno provocado en el sistema de coagulación por la misma cascada de eventos inmunológicos, lo que permitiría la expresión de las manifestaciones del DH (Kurane and Ennis, 1992). En resumen, el proceso podría ser iniciado por la presencia de anticuerpos que facilitan la infección, la cual se amplificaría por la activación exacerbada de las células T citotóxicas de reacción cruzada entre los diferentes serotipos del virus que producirían altos niveles de citocinas y mediadores que contribuyen al fenómeno hemorrágico.

Se ha encontrado que las formas severas de la enfermedad correlacionan con la presencia de ciertas variantes genéticas del virus. Se reconocen múltiples variantes genéticas de los cuatro serotipos virales. En el caso de DEN-2, se han encontrado dos variantes principales: las autóctonas americanas que no se encuentran asociadas con cuadros hemorrágicos y las asiáticas que incluyen variantes pro-hemorrágicas. La hipótesis donde se postula la presencia de cepas pro-hemorrágicas fue apoyada por la experiencia en Perú donde se comprobó que las infecciones secundarias con cepas del genotipo americano no causaron casos hemorrágicos. Rico-Hesse et al, ha reportado la circulación concomitantemente de estos dos genotipos en el continente americano (Rico-Hesse et al., 1997). En años recientes se ha reportado el aislamiento de cepas virales del genotipo asiático en países de Centro y Sudamérica. Molecularmente, y basados en la secuencia de un fragmento de la proteína E, estos aislados se clasifican en cinco grupos bien definidos; el primero contiene una única cepa aislada en Trinidad y Tobago en el año de 1954 y que es el prototipo del genotipo americano. El segundo grupo representa al genotipo americano que incluye cepas autóctonas y que no han sido asociadas con casos hemorrágicos. El tercer grupo se conforma por diferentes aislados asiáticos y aislados recientes en el continente americano, los cuales han sido asociados con casos de dengue hemorrágicos (Rico-Hesse, 2003; Rico-Hesse et al., 1998). El cuarto grupo está representado por

un aislado recuperado de un caso en Sri Lanka que es más divergente y el quinto grupo incluye aislados característicos del ciclo selvático (fig. 5).

Es también importante mencionar que las cepas virales del serotipo 2 del virus del dengue pueden clasificarse en tres grupos basados en sus características de facilitar su infección o no por anticuerpos anti-dengue (Halstead et al., 1984b). El grupo I, incluye aquellas cepas que facilitan su infección por cualquier tipo de anticuerpos, neutralizante o no, siempre y cuando los anticuerpos neutralizantes estén diluidos más allá de su punto de neutralización. El grupo II agrupa a las cepas virales que no facilitan su infección con anticuerpos anti-flavivirus. El grupo III se forma con las cepas que no pueden facilitar su infección con ningún tipo de anticuerpo. La cepa protipo *New Guinea C*, una cepa con genotipo asiático, pertenece a este último (Halstead et al., 1984b).

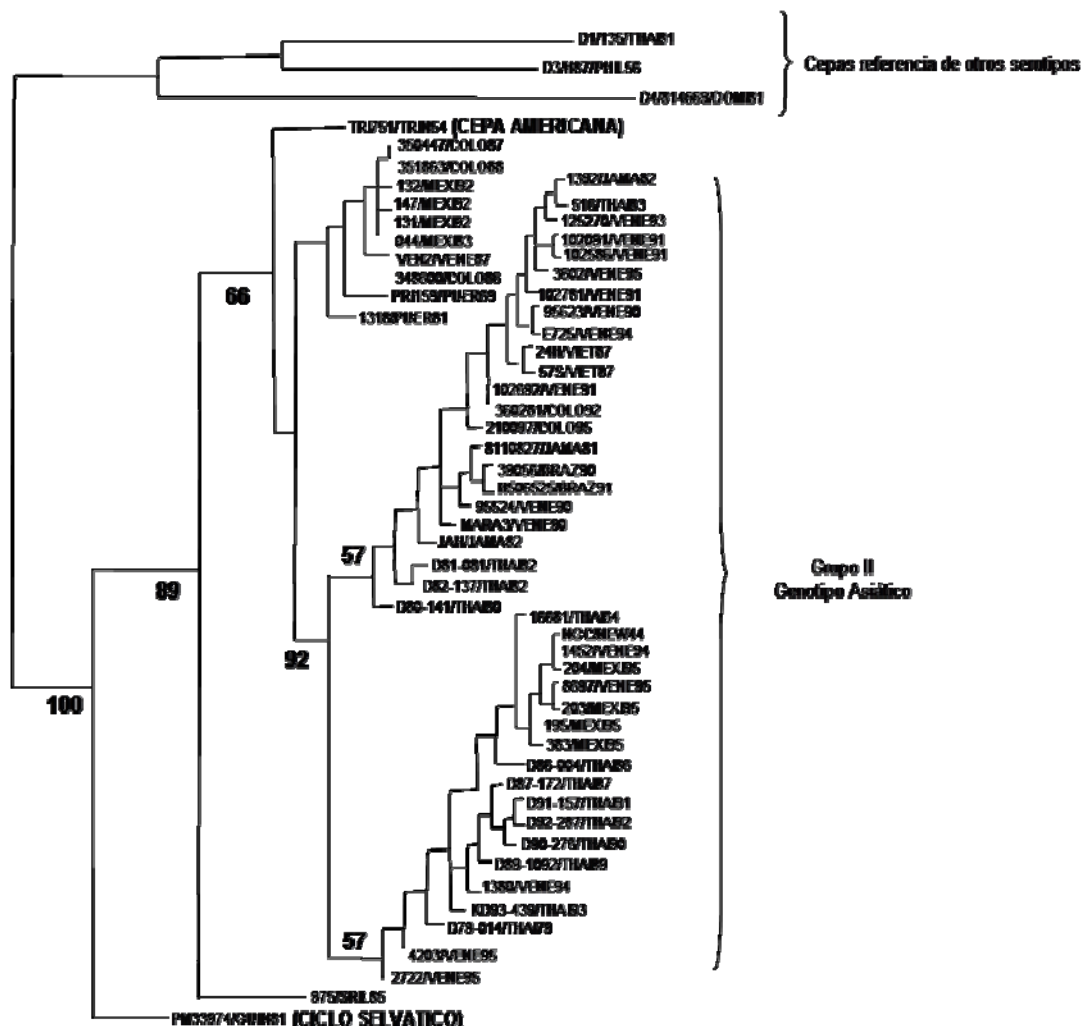


Figura 5. Análisis filogenético de los virus del dengue serotipo 2. El árbol filogenético fue construido utilizando 55 diferentes aislados pertenecientes al serotipo DEN-2. El análisis incluye un fragmente de 240 nucleótidos localizado en la región de la unión entre la proteína de envoltura y la proteína NS1. Los valores de “*bootstrap*” están indicados para cada uno de los grupos. Se incluyen aislados representativos de los otros tres serotipos (D1/135/THAI81; D3/H87/PHIL56 y D4/814669/DOMI86) como cepas de referencia. La nomenclatura utilizada fue la siguiente: Nombre de la cepa/País de aislamientoAño.

La participación del vector también resulta de gran importancia en el desarrollo de cuadros hemorrágicos. La capacidad del vector para infectarse, replicar el virus y transmitirlo, resulta ser un parámetro que debe ser tomado muy en cuenta en el estudio de epidemias por dengue. La presencia de diferentes especies o variedades del mosquito podrían favorecer la transmisión de determinadas cepas virales (Armstrong and Rico-Hesse, 2001); es bien sabido que diferentes especies replican al virus con distintas eficiencias, por ejemplo, *Ae. albopictus* es al menos tres veces más susceptible a la infección por el virus en comparación con *Ae. aegypti*. De igual forma se ha demostrado que las cepas de origen asiático son más fácilmente transmitidas y la posibilidad del reemplazo de las cepas americanas por asiáticas podría repercutir el incremento en el número de casos hemorrágicos (Armstrong and Rico-Hesse, 2001; Armstrong and Rico-Hesse, 2003; Cologna et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, los flavivirus (incluyendo a los virus del dengue) poseen la capacidad de infectar a una gran variedad de tipos celulares *in vitro*: células de mosquito (Corner and Ng, 1987; Humphery-Smith and Vincendeau, 1993; Salas-Benito and del Angel, 1997; Sasao et al., 1980; Suntharee et al., 1981; Zamree et al., 2005), células de primates no humanos (Malewicz et al., 1985; Marchette and Halstead, 1978; Marchette et al., 1976; Martinez-Barragan and del Angel, 2001; Nagar et al., 1986; Shafee and AbuBakar, 2002; Sydow et al., 2000; Taweechaisupapong et al., 1996), monocitos humanos (Anderson et al., 1997; Cologna and Rico-Hesse, 2003; Daughaday et al., 1981; Halstead et al., 1983a; Hotta et al., 1984; Krishnamurti

et al., 1989; Kurane and Ennis, 1988), células de riñón de perro (Alvarez et al., 2001; Bhamarapavati and Sutee, 2000; Halstead et al., 1984a; Puri et al., 1997), células dendríticas (Ho et al., 2001; Marovich et al., 2001; Navarro-Sanchez et al., 2003; Tassaneetrithep et al., 2003), células de Langerhans (Wu et al., 2000), linfocitos B (Bielefeldt-Ohmann, 1998; Lin et al., 2002), células endoteliales (Avirutnan et al., 1998; Huang et al., 2000; Peyrefitte et al., 2006; Talavera et al., 2004; Wei et al., 2003), plaquetas (Boonpucknavig et al., 1979; Wang et al., 1995), células neuronales (Imbert et al., 1994; Ramos-Castaneda et al., 1994) y líneas celulares y clonas derivadas de células T (Kurane et al., 1990b; Mentor and Kurane, 1997). Es importante mencionar que *in vivo*, la infección parece estar mucho más restringida debido a que no es concluyente la evidencia de que el virus infecte a todos estos tipos celulares. En infecciones naturales únicamente se ha podido confirmar la infección de células dendríticas, monocitos y linfocitos B (King et al., 1999; Kliks, 1990; Marovich et al., 2001; Pryor et al., 2001). Aunque la infección *in vivo* en células T no ha sido aún demostrada, su papel regulador y su capacidad para producir diversas citocinas y mediadores que potencialmente podrían contribuir al cuadro hemorrágico resulta ser muy interesante, ya que como se ha mencionado, evidencias preliminares han demostrado que líneas celulares derivadas de células T, al igual que clonas de células T obtenidas de donadores vacunados, pueden ser infectadas por el virus del dengue *in vitro*. Esto podría significar, que las células T al ser infectadas naturalmente durante el curso de la enfermedad, pudieran ser lisadas por células citotóxicas o por la infección misma (efecto citopático) y con ello liberar sus contenidos de mediadores químicos al torrente circulatorio, incrementando así los niveles de factores vasodiladores que van a contribuir al ambiente prohemorrágico.

Las células T (CD3+) con el TCR α - β se subdividen en dos poblaciones según la expresión de las moléculas CD4 (cooperadoras) y CD8 (citotóxicas). Las células T cooperadoras, conocidas como células Th (del inglés "*T helper*"), son un subgrupo que juega un papel importante en el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa y participa en el cambio de isotipo de anticuerpo por parte de las células B y en la expansión clonal de las células T citotóxicas. Las células Th, se diferencian en dos subtipos celulares conocidos como Th1 y

Th2, que se definen con base en el perfil de citocinas que producen. Las células Th1 producen IFN- γ e IL-2, las cuales activan macrófagos, estimulan a las células CD8+ e inhiben la respuesta Th2. En tanto que las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que estimulan células B, favoreciendo la producción de anticuerpos, y la IL-10 tiene una acción supresora en células Th1.

Las células T citotóxicas, conocidas también como CTL, principalmente son CD8+ y son capaces de inducir la muerte por apoptosis de las células infectadas. Cuando las células TCD8+ reconocen a las células infectadas, liberan perforinas y granzimas. Las primeras forman poros en las membranas de las células infectadas que permiten el paso de las granzimas que son activantes de la cascada de las caspasas. En algunos casos, la respuesta de células T participa en el proceso patogénico de algunas enfermedades, así, en hepatitis B la lesión hepática es resultado de la lisis de hepatocitos por CTL.

Aunque la existencia de células T específicas es esencial para la eliminación de muchas infecciones virales, incluyendo dengue, también pueden contribuir al desarrollo de cuadros más graves debido al daño tisular que pueden llegar a provocar. El papel de los linfocitos T durante las infecciones por dengue no es completamente claro; se ha postulado que las células T juegan un papel importante en la eliminación del virus, pero también que contribuyen en el fenómeno inmunopatológico de la enfermedad. Por ejemplo, las células CD8+ en ratones SCID (del inglés "*severe combined immunodeficient*") parecen jugar este doble papel, en tanto que las células CD4+ promueven la lisis celular (An et al., 2004). Los blancos de la respuesta celular mediada por células T es variada, en diferentes estudios, el reconocimiento de células T provenientes de pacientes infectados fue básicamente hacia las proteínas E, NS1 y NS2a (Gagnon et al., 1996; Kurane et al., 1991; Mathew et al., 1996). Algunos otros estudios han demostrado la reactividad de células T hacia la proteína de la cápside (Rothman et al., 1989). Los datos colectados en estos estudios sugiere que la respuesta generada por las células T resulta ser poco específica del serotipo inductor, siendo en términos generales de reacción cruzada entre los cuatro serotipos y en algunos casos con otros flavivirus

(Spaulding et al., 1999). Es necesario señalar que en este último caso, sus afinidades por otros serotipos fue más débil que por el serotipo inductor (Mongkolsapaya et al., 2003; Mongkolsapaya et al., 2006).

Durante el curso de la infecciones secundarias, una proporción importante de las clonas T reactivas son específicas para el serotipo causante de la infección primaria, lo cual conlleva a una respuesta inadecuada hacia el serotipo causante de la infección secundaria (Mongkolsapaya et al., 2003; Mongkolsapaya et al., 2006). Este fenómeno conocido como el “pecado antigénico original” puede entonces explicarse debido a que las clonas producidas durante la primoinfección y que se encuentran presente en el paciente como células de memoria, se expanden y responden más rápidamente que las clonas específicas que se deben generar a partir de células *naive* (Halstead et al., 1983b; Mongkolsapaya et al., 2003). Esto podría permitir el establecimiento de la infección provocando así niveles más elevados de virus circulante.

El número de clonas reactivas (linfocitos T citotóxicos; CTL) también parece ser importante en el desarrollo de los casos hemorrágicos, se ha observado que el número de células citotóxicas (CTL) son significativamente mayores en pacientes con dengue hemorrágico en comparación con donadores aparentemente sanos. Más aún, estas células presentaban rasgos característicos de apoptosis (Mongkolsapaya et al., 2003), probablemente debido a la inducción de muerte celular por activación (Budd, 2001; Budd, 2002; Welsh and Rothman, 2003). El número total de linfocitos durante las infecciones por dengue está reducido (Azeredo et al., 2001; Fadilah et al., 1999). Green et al, demostraron que pacientes con dengue clásico que desarrollaron hemorragias tenían cuentas reducidas de linfocitos T y B y que además presentaban una mayor grado de activación en comparación a aquellos pacientes que no desarrollaron cuadros hemorrágicos (Green et al., 1999). Estos datos en su conjunto señalan la importancia de las células T en la protección y en la patogenia del dengue, resulta importante el establecer si dicha población celular es blanco de la infección por el virus. Considerando que diferentes líneas celulares y las clonas T pueden ser infectadas con el virus del

dengue y que además el número de linfocitos T en los casos más graves de la enfermedad se encuentran reducidos (DH/DSS), son datos que podría sugerir que las células T son blanco de la infección por el virus del dengue.

A pesar de la información reportada y dada la ausencia de un modelo experimental capaz de representar la enfermedad del ser humano, no ha sido posible la corroboración de las diversas hipótesis para explicar la patogenia del dengue hemorrágico *in vivo*, sin embargo queda claro que los cuadros hemorrágicos en el dengue son multifactoriales.

El presente trabajo tiene por objetivo determinar si las células T de donadores aparentemente sanos y pacientes con dengue son blanco de la infección por el virus del dengue, así como identificar las citocinas producidas por esta población celular.

RESUMEN

El dengue es una enfermedad endémica en diferentes partes de Asia, islas del Pacífico, África y América Central. Es causado por la infección con cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DEN-1, -2, -3 y -4). Clínicamente la infección se presenta de dos formas; el dengue clásico (DC) y el dengue hemorrágico (DH). La patogénesis del DH es desconocida, aunque estudios *in vitro* y epidemiológicos han sugerido que el fenómeno hemorrágico puede ser debido por mecanismos inmunopatológicos.

Las células responsables de la replicación viral durante el curso de las infecciones naturales por el virus del dengue no son del todo conocidas. Diferentes grupos han reportado la infección en células de Langerhans, células dendríticas y monocitos, aunque estudios *in vitro* han demostrado que diferentes tipos celulares incluyendo diferentes líneas y clones celulares derivadas de linfocitos T son capaces de replicar al virus.

El presente trabajo tuvo por objetivo identificar la infección por virus del dengue en células T de donadores aparentemente sanos y pacientes con dengue. Los resultados obtenidos muestran que una subpoblación de células T son susceptibles a la infección *in vitro*, sin embargo la detección de antígeno en células obtenidas de casos clínicos no fue confirmada. Se requieren más estudios para identificar a la subpoblación de células T que replican al virus *in vitro*.

ABSTRACT

Dengue is endemic in different parts of the world including Asia, Africa and Central America. This disease is caused by any of the four dengue virus serotypes (DEN-1, -2, -3 and -4). Clinically, dengue infections can be classified as dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF). The pathogenesis of DHF is not fully understood, however, epidemiologic and *in vitro* studies have suggested the participation of immunopathologic events.

The cell types involved in viral replication are not well known. Different groups have reported infection in Langerhans cells, dendritic cells and monocytes, although *in vitro* studies have demonstrated the infection in different cell types including cell lines and cell clones derived from T lymphocytes.

The goal of this work was to demonstrate dengue virus infection in T cells obtained from healthy donors and infected patients. The results shown that a T cell subset is susceptible to dengue virus infection *in vitro*, however the expression of dengue virus antigens on cell from infected patients was not confirmed. More studies are required to identify the T cell subpopulation responsible for viral replication.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de los virus del dengue para infectar células T (CD3+) en condiciones de infección natural y experimental.

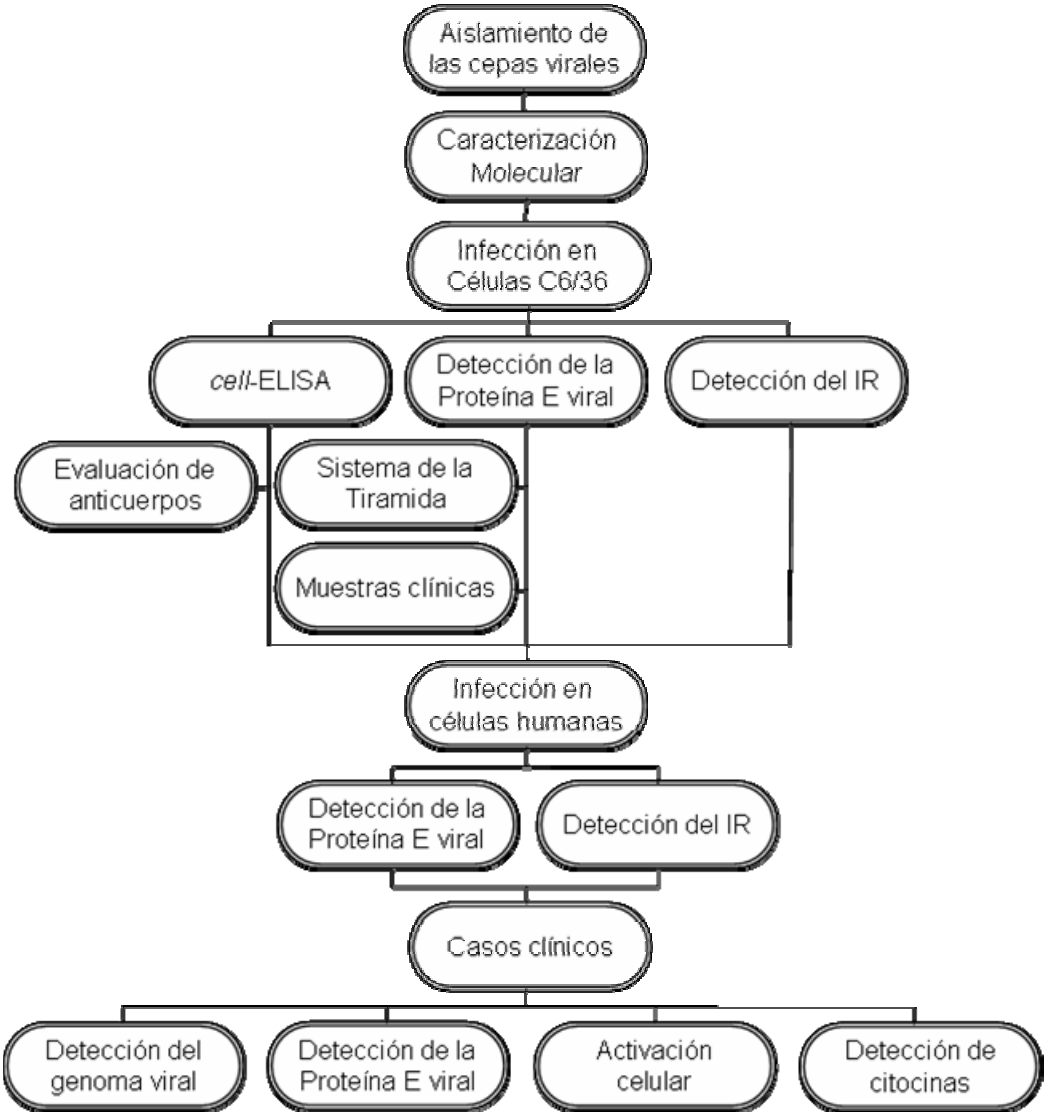
OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar molecularmente un aislado viral representativo de las cepas circulantes en México
2. Demostrar la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-dengue mediante un cell ELISA
3. Detectar antígenos virales en la superficie de células infectadas mediante un sistema de citometría de flujo
4. Identificar al intermediario replicativo del virus del dengue a través de RT-PCR
5. Establecer un modelo de infección con virus del dengue en células humanas y determinar la infección en linfocitos T (CD3+)
6. Identificar la infección en células de pacientes naturalmente infectados por virus del dengue
7. Identificar el perfil de producción de citocinas de las células mononucleares de pacientes con dengue

HIPÓTESIS

Las células T son blanco de la infección por el virus del dengue y durante el proceso mismo de infección o al destruirse, liberan al torrente circulatorio citocinas y mediadores químicos en cantidades suficientes para afectar la integridad del endotelio e iniciar las manifestaciones características de la enfermedad.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

Virus

Virus silvestres del dengue serotipo 2 fueron obtenidos en el banco de virus del Departamento de Virología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Los virus fueron propagados en células de mosquito C6/36 de la siguiente manera; la monocapa de células fue infectada con el virus del dengue a una multiplicidad de infección (MOI, *multiplicity of infection*) de 1 e incubado durante 7 días a 28°C en medio mínimo esencial (MEM), conteniendo 20% de suero fetal de ternera y 0.8% de albúmina sérica bovina (ASB). Los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a -70°C hasta su uso. El título viral se determinó por determinación del efecto citopático en células BHK 21.

Titulación viral

El aislado viral fue pasado cinco veces en células C6/36 para obtener un semilla viral que fue utilizada a lo largo de todo el proyecto. Para la titulación se tomó una alícuota la cual fue cuantificada mediante formación de placas líticas en células BHK-21. Para esto, se prepararon diluciones logarítmicas del virus las cuales fueron inoculadas sobre una monocapa confluyente de células BHK21 y posteriormente se adicionó un medio semisólido a base de carboxi-metil-celulosa (Sigma) para evitar la diseminación de las partículas infectantes a distancia, concentrando la progenie viral en un solo foco de infección que da origen a placas líticas. Las placas líticas fueron observadas al quinto día postinfección y su conteo se realizó con el uso del colorante naftol azul-negro (Sigma) al 0.1% en agua destilada. El título viral fue determinado y las infecciones fueron realizadas a una MOI de 1:1 y 1:10.

Selección de los pacientes

Se incluyeron pacientes con sospecha de cursar con una infección por virus del dengue, identificados como parte del Programa de Captura de Casos de

Dengue en la Jurisdicción de Coatzacoalcos, Veracruz, en la localidad de Cosoleacaque, después de obtener el consentimiento informado por parte de los familiares. La infección por virus del dengue se confirmó en el suero de los pacientes utilizando RT-PCR para la detección del RNA viral. Clínicamente, los pacientes fueron clasificados como dengue clásico o dengue hemorrágico (grado I, II, III o IV) de acuerdo a los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1997). La definición de trombocitopenia fue establecida como la reducción en el conteo de plaquetas a un número igual o menor a 100,000 plaquetas por milímetro cúbico.

Secuenciación del gene de la glicoproteína de envoltura

Se seleccionaron dos aislados virales de dengue obtenidos en 2002 a partir de casos clínicos de los estados de Tabasco (dengue hemorrágico) y Campeche (dengue clásico), los cuales fueron denominados TAB5322 y CAM7786, respectivamente. Estos aislados correspondientes al serotipo 2 que fue el predominante en México en el año de su aislamiento, se han utilizado ampliamente por nuestro grupo en diversos estudios sobre el virus. En ambos aislados se secuenció un producto de 450 bp correspondiente a las posiciones 1785 a 2235, localizado en el dominio III de la proteína de envoltura. Esto se llevo a cabo mediante el uso de los oligonucleótidos genéricos DEN2C 5´AAGTG TAGGCTGAGAATG3´ y DEN2D 5´TGGTGGAGAGCCTTTCCTA3´ los cuales fueron basados en la secuencia consenso disponibles en las bases de datos públicas (*GeneBank*). El RNA viral fue extraído a partir de células infectadas por métodos convencionales utilizando para ello al reactivo *Trizol*® (Invitrogen). Para la síntesis del cDNA correspondiente se utilizó el equipo comercial *SuperScript III Cells Direct cDNA synthesis kit* (Invitrogen) y su posterior amplificación mediante PCR se realizó como se describe más adelante en la sección de RT-PCR para la detección del virus. Los productos de amplificación fueron purificados en placas Millipore (*PCR Cleanup Filter Plates*, Millipore) y posteriormente se llevó a cabo la reacción de secuenciación para ambas cadenas,

utilizando cada uno de los oligonucleótidos empleados en la reacción de amplificación (*BigDye Terminator V3.1 Cycle sequencing kit*, Applied Biosystem). El producto de la reacción de secuenciación fue purificado mediante filtración en placas Millipore (*Montage SEQ₉₆ Cleanup Kit*, Millipore). El producto de secuenciación fue posteriormente analizado en un secuenciador *ABI 3100 DNA Sequencer* (Applied Biosystems). El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo en el programa *GCG software 10.3*. (Wisconsin package). El análisis filogenético se realizó en el programa MEGA 3.0.

Preparación de antígenos virales

El antígeno viral fue producido a partir de células C6/36 infectadas con el aislado TAB5322 fueron cosechados hasta que el 50% de la población celular mostró efecto citopático. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS, fijadas en glutaraldehído al 0.025% en PBS por 15 minutos y lavadas nuevamente, para ser resuspendidas a una concentración de 3×10^6 células/mL en medio RPMI (Invitrogen). La suspensión celular se rompió ultrasónicamente en hielo durante 3 min y fue centrifugada a 1600 rpm durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron colectados, fraccionados y congelados a -70°C.

cell-ELISA

Las células C6/36 infectadas con la cepa TAB5322 fueron cosechadas después de siete días de infección y posteriormente lavadas con dos veces con PBS. Las células fueron resuspendidas en 2 mL de PBS y contadas para ser resuspendidas en el volumen correspondiente para ajustar a la concentración de 62,000/100 μ L en Tritón X (Sigma) al 0.02% en PBS. Las células fueron fijadas en placas de ELISA a 37°C por 24 h. Las placas fueron a continuación bloqueadas con albúmina sérica bovina al 1% por 30 min y lavadas dos veces con PBS-Tween al 0.05%. Posteriormente los anticuerpos monoclonales fueron incubados por dos h a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas y 100 μ L del segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón-peroxidasa) fue incubado por 2 h a temperatura ambiente. Se

añadieron 100 μ L de la solución de revelado (OPD+H₂O₂) y la reacción fue detenida con ácido sulfúrico 2N.

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Se obtuvieron células mononucleares de muestras sanguíneas de pacientes con dengue y de donadores aparentemente sanos de la población general, sin antecedentes conocidos de dengue y con resultados serológicos negativos. La sangre periférica se colectó en tubos heparinizados y/o ácido cítrico (Vacutainer). Las PBMC fueron purificadas mediante gradiente de densidad en *Lymphoprep*[®] (Axis-Shield). Para este fin, un volumen de sangre se diluyó con igual cantidad de medio RPMI (Invitrogen) sin complementar. La sangre diluida se adicionó a tubos cónicos de cultivo celular con el reactivo de *Lymphoprep*[®] a una razón de 3:1 y después fue centrifugada a 1200 rpm durante 45 min. Posteriormente se obtuvo la fase de las PBMC, las cuales fueron lavadas dos veces con medio RPMI y colocadas en placas de cultivo de 24 pozos a razón de 2×10^6 células/mL. Simultáneamente, los sueros de todos los casos fueron analizados para la determinación de anticuerpos IgM específicos contra el virus, identificación del virus por PCR, cultivo y serotipificación. El enriquecimiento de células adherentes y no adherentes se llevo a cabo en botellas de cultivo de 75 mm², las células mononucleares totales se sembraron en medio RPMI por tres h. Las fracciones de células no adherentes fueron cosechadas mediante la recolección del sobrenadante y posteriormente centrifugadas para ser resembradas. Las células adherentes fueron lavadas y el medio descartado para finalmente ponerlas en cultivo en medio RPMI.

Determinación de anticuerpos IgM específicos en contra del virus

Determinación de anticuerpos IgM. Las placas para ELISA (Costar) fueron sensibilizadas durante toda la noche a 4°C con 100 μ L de anticuerpo anti-IgM humana a una dilución de 1:100 en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6. Posteriormente se realizaron cinco lavados con PBS y se bloquearon durante 15

min con 100 μL de una solución de albúmina al 4% a temperatura ambiente. Posterior a los lavados, se añadieron 50 μL del suero diluido 1:40 y se incubaron 2 h a 37°C. Las placas se lavaron y se añadió el anticuerpo policlonal anti-virus del dengue conjugado a peroxidasa. Finalmente se añadieron 100 μL de la solución cromógeno/sustrato y la reacción se leyó en un lector de ELISA con un filtro de 490 nm.

RT-PCR para la identificación del virus

Extracción de RNA. Se adicionaron 500 μL de reactivo *Trizol*® (Invitrogen) por cada 1×10^6 células, posteriormente se añadieron 100 μL de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (49:1 v/v) y se centrifugó por 10 min a 12 000 rpm a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un tubo estéril cuidando de no remover el material de la interfase orgánica; se adicionaron 250 μL de isopropanol y el tubo se colocó en hielo durante 5 minutos, se centrifugó 10 min a 12 000 rpm, posterior a lo cual el sobrenadante fue descartado. El precipitado se lavó con 200 μL de etanol frío al 75% y centrifugado durante 5 min a 12000 rpm a 4°C. El etanol fue removido y el precipitado secado a 37°C durante 5 minutos. Finalmente, el precipitado de RNA se resuspendió en 11 μL de agua destilada estéril tratada con dietilpirocarbonato (dEPC).

Síntesis de cDNA. Se llevó a cabo una reacción de transcriptasa inversa a partir de los 10 μL de RNA total obtenido y empleando como mezcla de reacción 10X de amortiguador (250 mM de Tris-HCl pH 8.3, KCl 375 mM, ditiotrietol 50 mM y MgCl_2 15 mM), 2 μL de dNTP (10mM) y 200 U de transcriptasa inversa *Superscript II* (Invitrogen). La reacción se realizó a 42°C durante 50 min con el oligonucleótido correspondiente, para el caso de la cadena positiva del virus del dengue se empleó el oligonucleótido TS2 (5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3') y con el oligonucleótido D1 (5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3') para la cadena negativa, ajustados a 5 pmol/20 μL de reacción. Con el material obtenido se llevó a cabo la PCR: la mezcla de reacción fue preparada como sigue, 3 μL de

cDNA, 2.5 μ L de amortiguador 10X (Tris-HCl 100mM pH 9.0, KCl 500 μ M, MgCl₂ 15 mM y gelatina 0.1%), 5 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq polimerasa (Roche). Se utilizaron los oligonucleótidos D1y D2 para la amplificación de la cadena positiva y con los oligos D1 y TS2 para la cadena negativa. Las condiciones de fueron: 35 ciclos a 94°C por 3 s, a 55°C por 3 s y 72°C durante 10 s. La identificación de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 2%.

Determinación de marcadores de identidad, infección y activación de poblaciones leucocitarias

El análisis mediante citometría de flujo para la identificación y activación de las diferentes poblaciones leucocitarias fue llevada a cabo a partir de los cultivos celulares y en sangre total. La tinción de identidad comprendió los siguientes anticuerpos: anti-CD3-PE, anti-CD4-PE y anti-CD8-PE (células T); anti-CD19-PE (células B) y anti-CD14-PE (monocitos) (Becton Dickinson). La evaluación de la infección se realizó mediante el empleo de anticuerpos monoclonales murinos anti-virus del dengue serotipo 2 (clona 3H5, ATCC). Las células fueron cosechadas y colocadas a razón de 3×10^5 células/tubo, posteriormente fueron lavadas e incubadas durante 15 min con 5 μ L del anticuerpo anti-dengue virus correspondiente. Las células se lavaron por centrifugación a 1500 rpm por 5 min y después se incubaron con 5 μ L del anticuerpo anti-IgG murino-FITC (Sigma) por 15 min. Finalmente las células fueron lavadas dos veces con PBS y se les añadió 5 μ L del anticuerpo de identidad correspondiente. Después de lavadas las células fueron resuspendidas en 200 μ L de solución de flujo y se analizaron por citometría (FACSort, Becton Dickinson).

Activación celular

Las células de sangre total de donadores aparentemente sanos y pacientes con dengue fueron activadas con antígeno del DEN-2 a una concentración de 10 μ g/mL durante 12 h. Las células fueron cosechadas y analizadas por citometría de flujo para la detección de la molécula de activación temprana CD69 (anti-CD69

humano; Becton Dickinson) en células CD4⁺ y CD8⁺ (anti-CD4 o CD8 FITC; Becton Dickinson). Durante los ensayos, fueron incluidos testigos sin activación y activación inespecífica con fitohemaglutinina (PHA).

Infección celular

La infección de las diferentes poblaciones leucocitarias se realizó con las siguientes MOI: 10 para monocitos; 10 para PBMC y 10 para células T. Los sobrenadantes de cultivo se colectaron a intervalos de 16 h y se almacenaron hasta su uso.

Determinación de citocinas en cultivos celulares

RT-PCR. Posterior a la extracción del RNA total de células mononucleares de sangre periférica de los donadores aparentemente sanos y de los pacientes con dengue, se llevó a cabo la reacción de transcriptasa inversa a partir de los 11 µL de RNA total obtenido y empleando como mezcla de reacción 10X de amortiguador (250 mM de Tris-HCl pH 8.3, KCl 375 mM, ditiotretitol 50 mM y MgCl₂ 15 mM), 2 µL de dNTP (10mM), 1 µL oligo dT (0.5 µg/µL) y 200 U de transcriptasa inversa *Superscript II* (Invitrogen). Cada muestra se incubó durante 50 min a 42°C. El cDNA obtenido de la reacción de transcriptasa inversa se empleó en la reacción de PCR para cada una de las citocinas de interés (TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8). La reacción de PCR fue llevada a cabo de la siguiente forma: la mezcla de reacción de un total de 25 µL de volumen incluyó 3 µL de cDNA, 2.5 µL de amortiguador 10X (Tris-HCl 100mM pH 9.0, KCl 500 µM, MgCl₂ 15 mM, y gelatina 0.1%), 5 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq polimerasa. Los parámetros del termociclador para la amplificación fueron de 3 s a 94°C, 3 s a la temperatura de alineación (específico para cada pareja de iniciadores) y 10 s a 72°C por 35 ciclos. Posterior a la amplificación, las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 2%.

TNF α (5'TCTCGAACCCCGAGTGACAA-TATCTCTCAGCTCCACGCCA)

IL-1 β (5'GACACATGGGATAACGAGGC- 3'ACGCAGGACAGGTACAGATT)

IL-6 (5'ATGTAGCCGCCCCACACAGA-3'CATCCATCTTTTTTCAGCCAT)

IL-8 (5'ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG3'TTATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC)

Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa *Sigma Stat Software 3.1* (Sigma Stat Software). Los grupos fueron comparados utilizando *t* de student cuando las condiciones de normalidad fueron válidas y de mediante la U de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Valores de $P \leq 0.05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

1. Caracterización molecular de los aislados de DEN-2

Inicialmente se llevó a cabo la secuenciación de los aislados TAB5322 y CAM7786. La cepa viral empleada para los experimentos descritos y analizados en este trabajo fue la cepa TAB5322, obtenida a partir de un caso hemorrágico.

La comparación nucleotídica del dominio III de la proteína E viral de ambos aislados reveló seis variaciones entre ambas secuencias en las posiciones 87, 246, 249, 279, 375 y 429. Las secuencias obtenidas a partir de dichos aislados se muestran a continuación y se resalta las posiciones en la que se encontró discrepancias a nivel nucleotídico. Estos resultados fueron verificados mediante la secuenciación de ambas cadenas y su posterior comparación por ClustalW/MEGA 3.1. Esta secuencia representa los nucleótidos que codifican para el dominio III de la proteína de envoltura los cuales pueden ser utilizados para definir el genotipo al que pertenece la cepa viral analizada. La secuencia de ambos aislados se presenta a continuación con sus respectivos números de acceso perteneciente a la base de datos “*GeneBank*”:

```
1 atggacaaac tacagctcaa aggaatgtca tactctatgt gtacaggaaa gtttaaatt
61 gtgaaggaaa tagcagaaac acaacaTgga acaatagtta tcagagtaca atatgaaggg
121 gacggtctc catgtaagat ccctttgag ataacagatt tggaaaaaag acacgtctta
181 ggtcgcttga ttacagttaa cccaatcgta acagaaaaag atagcccagt caacatagaa
241 gcagaGccTc cattcggaga cagctacatc atcataggGg tagagccggg acaattgaaa
301 ctcaattggt ttaagaaggg aagtccatc ggccaaatgt ttgagacaac aatgagagga
361 gcaaagagaa tggcTatitt aggtgacaca gcctgggact ttggatccct gggaggagtg
421 ttacatcCa taggaaaggc ctctccacc
```

GENEBANK ACCESION NUMBER: AY603661

1 aatggacaaa ctacagctca aaggaatgtc atactctatg tgtacaggaa agtttaaat
61 tgtgaaggaa atagcagaaa cacaacaCgg aacaatagtt atcagagtac aatatgaagg
121 ggacggttct ccatgtaaga tccctttga gataacagat ttggaaaaaa gacacgtctt
181 aggtcgcttg attacagtta acccaatcgt aacagaaaaa gatagcccag tcaacataga
241 agcagaAccC ccattcggag acagctacat catcataggA gtagagccgg gacaattgaa
301 actcaattgg ttaagaagg gaagttccat cggccaaatg tttgagacia caatgagagg
361 agcaaagaga atggcCattt taggtgacac agcctgggac tttgatccc tgggaggagt
421 gtttacatctI ataggaaggc ctctccacca

GENEBANK ACCESION NUMBER: AY603662

Para determinar el genotipo viral al cual pertenecían los aislados virales, americano o asiático, se realizó el análisis filogenético de las secuencias obtenidas por el método de máxima parsimonia con 1000 repeticiones y utilizando secuencias de la región de interés reportadas previamente en la base de datos del *GenBank*. En la figura 6 se muestra el árbol filogenético de los virus. Es importante hacer notar que en las cepas usadas en este estudio no se observaron mutaciones debidas al cultivo en la línea celular C6/36 en los diferentes pases analizados. Al comparar el agrupamiento de las cepas virales, se observó que nuestros aislados pertenecen al genotipo asiático relacionado con casos de DH. Se observa que los aislados TAB5322 y CAM7786 son más divergentes que los genotipos americanos y asiáticos, pero guardan una relación estrecha con cepas venezolanas (MARA4) y mexicanas (200787/1983) previamente reportadas. Es importante hacer referencia a que estos datos deben ser confirmados por lo cual sugerimos secuenciar una región de mayor tamaño para definir la relación de dicho aislado con genotipos asiáticos.

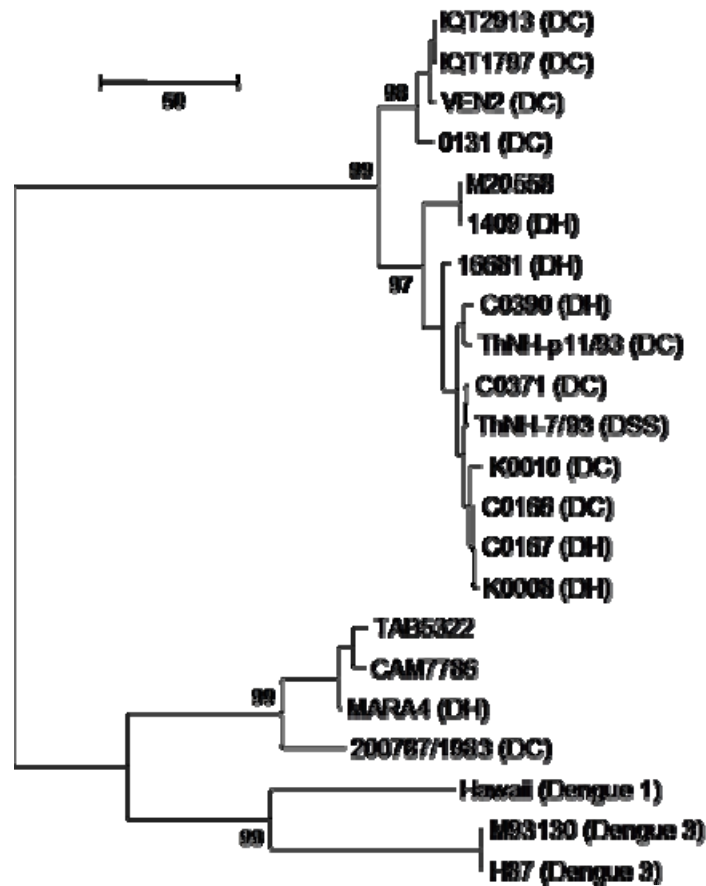


Figura 6. Análisis filogenético de cepas del virus del dengue serotipo 2. El árbol filogenético fue construido con el método de máxima parsimonia en el que se muestra la relación del aislado CAM7786 y el aislado TAB5322 con virus pertenecientes al genotipo americano y asiático. Cepas pertenecientes al genotipo americano: IQT2913, IQT1797, VEN2 y 0131. Cepas de genotipo asiático: M20558, 1409, 16681, C0390, ThNH-p11/93, C0371, ThNH-7/93, K0010, C0166, C0167 y K0008. Cepa 200787/1983, aislado viral mexicano con características neurotrópicas. Aislados representantes de los serotipo 1 (Hawaii) y serotipo 3 (M93139 y H87) fueron incluidos como cepas referencias.

Se estandarizó un método de citometría para determinar simultáneamente la expresión de proteína E viral y los marcadores de identidad (CD3, CD14) de las células blanco de la infección por virus del dengue. Para este propósito, inicialmente se evaluaron mediante *cell*-ELISA los anticuerpos monoclonales que se emplearían

en la citometría y para después estandarizar la citometría en la línea C6/36 de células de *Ae. albopictus*, por ser ésta una línea altamente susceptible a la infección por virus del dengue.

2. Estandarización de metodología en células C6/36

2.1 *cell*-ELISA

Se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos en contra la proteína E de cada uno de los serotipos virales (ATCC). En los ensayos de reacción cruzada para los cuatro anticuerpos monoclonales y para un anticuerpo genérico que reconociera a todos los serotipos virales (anti-complejo dengue), se pudo observar que cada uno identificó únicamente a su serotipo homólogo y, en el caso del anticuerpo anti-dengue, se obtuvo reacción positiva para los cuatro serotipos.

Para este proyecto únicamente se emplearon los anticuerpos anti-complejo dengue y anti-DV2 (fig. 7). Se pudo observar el reconocimiento específico por parte del anticuerpo anti-DV2, el anticuerpo no mostró reacción cruzada con los otros serotipos (datos no mostrados).

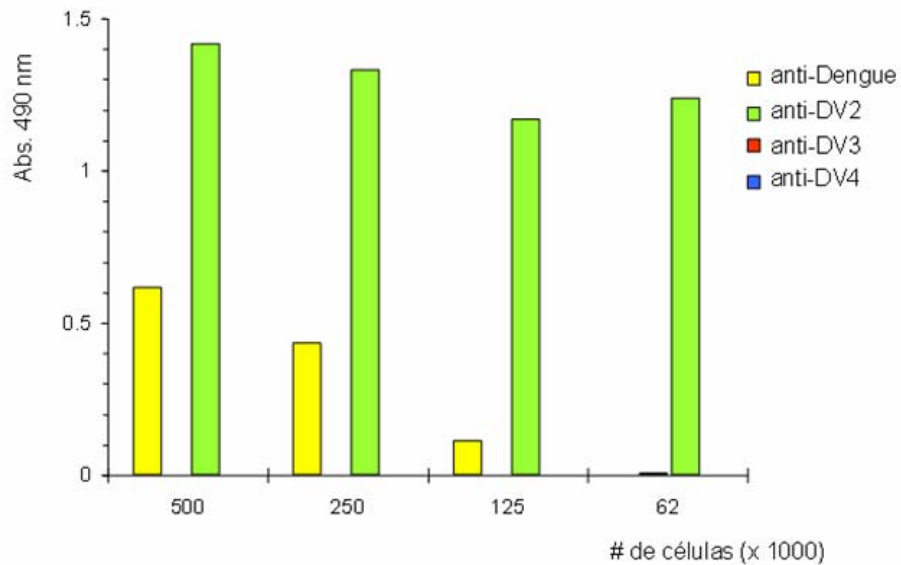


Figura 7. Reconocimiento de los anticuerpos monoclonales anti-proteína E del virus del dengue. Las células C6/36 infectadas con DEN-2 fueron fijadas a placas de ELISA a las concentraciones descritas. Sobrenadantes de las clonas productoras de los anticuerpos monoclonales correspondientes fueron posteriormente evaluados. Como blancos de la lectura a 490 nm se usaron pozos con PBS.

2.2 Citometría de flujo

El método de citometría de flujo para la detección de antígenos virales fue estandarizado en células C6/36 y posteriormente adaptado para células humanas. Los resultados de la estandarización de este método con dos MOI (1 y 10) se muestran en la figura 8. Se puede observar el desplazamiento de los histogramas debido al aumento en la intensidad de fluorescencia, el cual es proporcional a la expresión de la proteína E viral en la membrana celular. No se observaron diferencias en la intensidad o porcentaje de células positivas en relación a la multiplicidad de infección, probablemente a consecuencia del tiempo prolongado de infección (7 días). Simultáneamente en estas mismas células se realizaron ensayos

de inmunofluorescencia indirecta, método empleado como estándar de oro, obteniéndose los mismos valores de positividad. En la figura 9 se muestran los resultados representativos de células infectadas y no infectadas evaluadas por inmunofluorescencia indirecta.

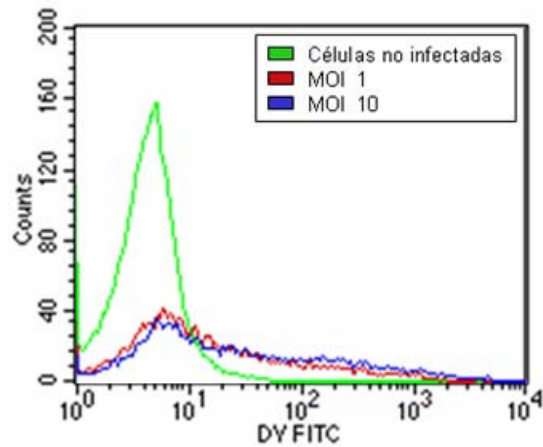


Figura 8. Identificación de la proteína E del virus del dengue en células C6/36 infectadas. Las células C6/36 infectadas con DEN-2 a las MOI de 1 y 10 fueron cosechadas al séptimo día postinfección y analizadas por citometría de flujo.

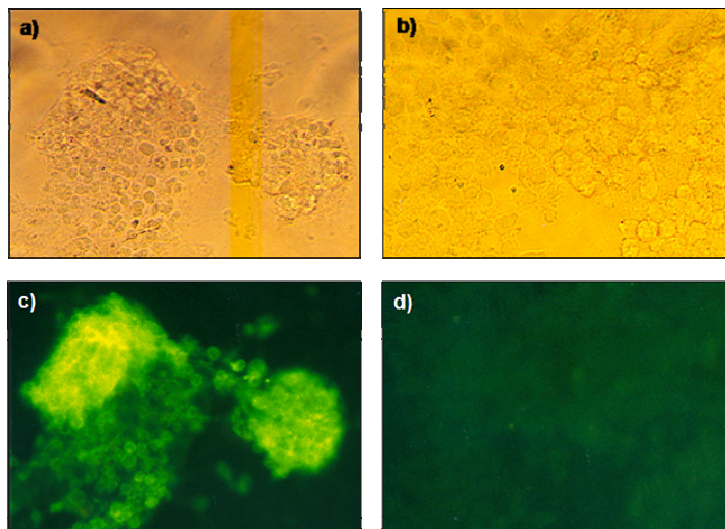


Figura 9. Inmunofluorescencia indirecta para la detección de la proteína de envoltura del virus del dengue en células C6/36. Monocapas confluentes de células C6/36

fueron infectadas con virus del dengue a una MOI de 1 y cosechadas al séptimo día postinfección para después ser procesadas por el método convencional de inmunofluorescencia. a) células infectadas, campo claro; b) células no infectadas, campo claro; c) células infectadas; d) células no infectadas.

Para determinar la dinámica de aparición de antígenos virales en la superficie de células C6/36 infectadas se realizó una cinética de infección cuyos resultados se muestran en la figura 10 y se resumen en la tabla 1. Nuestros datos sugieren que es posible detectar a las células infectadas desde las 24 h después de la inoculación del virus cuando se emplearon MOI superiores a 10. Para el caso de MOI menores a 10, las muestras se volvieron francamente positivas hasta después de 72 h de infección.

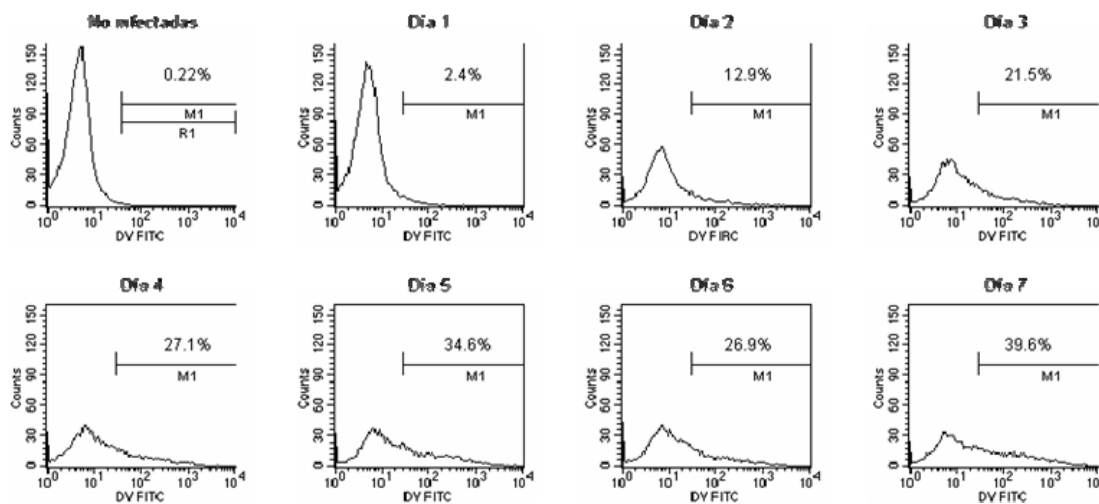


Figura 10. Cinética de infección del denguevirus-2 en células C6/36. Las células C6/36 infectadas con DV-2 a MOI de 1, se evaluaron por citometría para la identificación de la proteína E del virus del dengue a los días especificados. Los porcentajes de células positivas a la expresión de la proteína E se indican en cada panel.

Los datos obtenidos por nuestro método fueron corroborados por inmunofluorescencia indirecta (prueba estándar) así como por RT-PCR para la

detección del RNA viral (Lanciotti et al., 1992). Los resultados de citometría fueron confirmados por RT-PCR, corroborando así la infección en estas células (tabla 1). En contraparte, los datos obtenidos por la inmunofluorescencia se tornaron positivos hasta el quinto día postinfección. En consecuencia con citometría es posible detectar resultados positivos con un considerable ahorro en tiempo con respecto al método convencional de inmunofluorescencia indirecta.

Tabla 1. Validación del método de citometría de flujo. Las células fueron analizadas por citometría de flujo y los datos obtenidos fueron corroborados por RT-PCR.

Día	MOI	% células positivas	RT-PCR
1	0	0.4	-
	1	0.6	+
	10	2.6	+
2	0	0.2	-
	1	4	+
	10	9	+
3	0	0.1	-
	1	16.7	+
	10	19.2	+
4	0	0.3	-
	1	17.9	+
	10	21.7	+
5	0	0.2	-
	1	17.7	+
	10	24	+
6	0	0.1	-
	1	16.9	+
	10	13.9	+
7	0	0.1	-
	1	19.6	+
	10	24.9	+

El análisis por *cell*-ELISA de las células empleadas en el experimento anterior y a lo largo de la cinética de infección se muestra en la fig. 11. Se observó un incremento en el valor de densidad óptica con respecto al tiempo de infección.

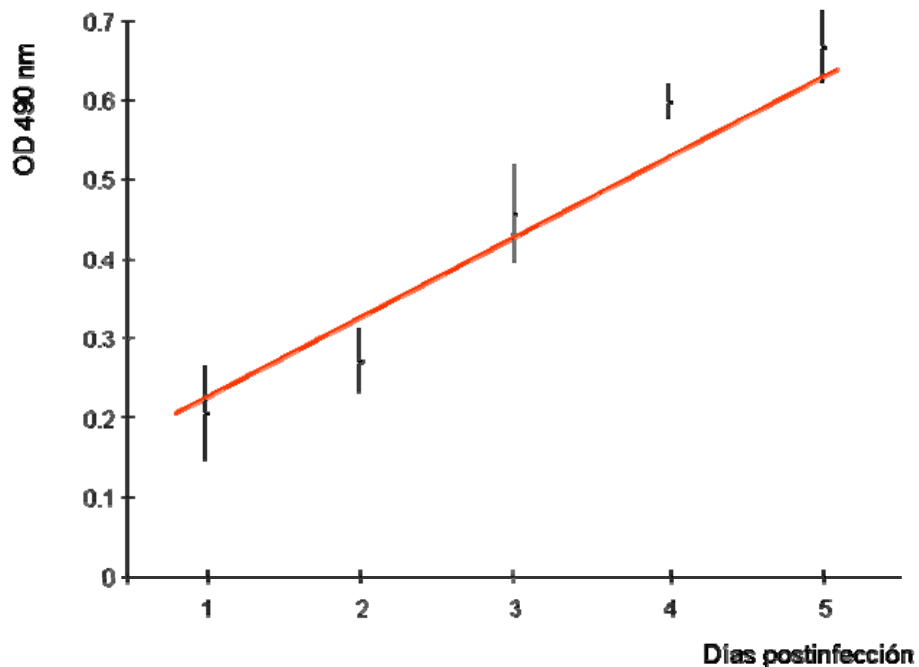


Figura 11. Cinética de aparición de proteína E en células C6/36 infectadas con el virus DEN-2 mediante *cell*-ELISA. Las células infectadas fueron cosechadas a los tiempos indicados y procesadas por *cell*-ELISA para la detección de la proteína E del virus del dengue por ELISA indirecto con anticuerpos monoclonales anti DEN-2.

Se realizaron diversos esfuerzos para incrementar la sensibilidad del método de citometría por considerar que el número de linfocitos expresando en sus superficies antígenos virales en infecciones naturales podría resultar limitado debido a que las células CD3+ no son el blanco preferido del virus del dengue. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales empleados en este estudio resultaron ser demasiado lábiles ya que al ser conjugados a biotina o fluoresceína perdieron su

capacidad de reconocimiento. El uso de la tiramida en el sistema amplificación tampoco resulto el adecuado (datos no mostrados).

Para determinar la eficiencia del método de citometría se analizaron muestras clínicas obtenidas de pacientes con sospecha de infección por dengue. Las muestras fueron procesadas por el método convencional de inmunofluorescencia indirecta y los resultados comparados con los datos arrojados por la citometría de flujo. En la tabla 2 se aprecian que los resultados fueron idénticos en 13 de las 16 muestras; las muestras 1004 y 1008 fueron negativas por fluorescencia indirecta pero positivas por citometría y RT-PCR, la muestra 1013 fue positiva por inmunofluorescencia y confirmada positiva por citometría y RT-PCR. Tres muestras (1014, 1015 y 1016) resultaron ser negativas tanto por citometría como por inmunofluorescencia, sin embargo, los datos de RT-PCR revelaron que estas muestras fueron positivas para el RNA viral.

Tabla 2. Validación del método de citometría de flujo en muestras clínicas. Las muestras fueron procesadas simultáneamente por inmunofluorescencia indirecta, citometría y RT-PCR.

Muestra	IF	Citometría	RT-PCR	
			cadena +	cadena -
1001	+	+	+	+
1002	+	+	+	+
1003	+	+	+	+
1004	-	+	+	+
1005	+	+	+	+
1006	+	+	+	+
1007	+	+	+	+
1008	-	+	+	+
1009	+	+	+	+
1010	+	+	+	+
1011	+	+	+	+
1012	+	+	+	+
1013	+	-	-	-
1014	-	-	+	+
1015	-	-	+	+
1016	-	-	+	+

2.3 Determinación del intermediario de la replicación (IR)

Aunque el método de citometría fue capaz de identificar la presencia de antígenos virales en la superficie de la célula hospedera, esto no necesariamente refleja una infección activa del virus, ya que estos antígenos pueden ser adsorbidos a la membrana citoplásmica y por lo tanto proporcionar falsos positivos durante el ensayo. Por este motivo, decidimos desarrollar un sistema para la identificación de la cadena negativa de RNA que es sintetizada únicamente durante la replicación viral. Inicialmente nuestros ensayos fueron referidos a la línea celular C6/36, en la cual pudimos identificar ambas especies de RNA (RNA viral y RNA intermediario).

El sistema para la detección de ambas especies de RNA fue diseñado de tal forma que la cadena negativa es evidenciada como una banda de 511 pb y la cadena positiva como un producto de 119 pb. La carga viral tuvo una influencia significativa en la cantidad de producto generado durante la amplificación de dichos

fragmentos (fig. 12). Las células no infectadas no produjeron ninguna banda como resultado de la amplificación. La cinética de producción de la cadena negativa mostró que la aparición del intermediario de replicación se lleva a cabo a tiempos tan cortos como 30 min (datos no mostrados). En nuestros resultados, se observa la ausencia del intermediario de replicación en los sobrenadantes de los cultivos en etapas tempranas de la infección (datos no mostrados).

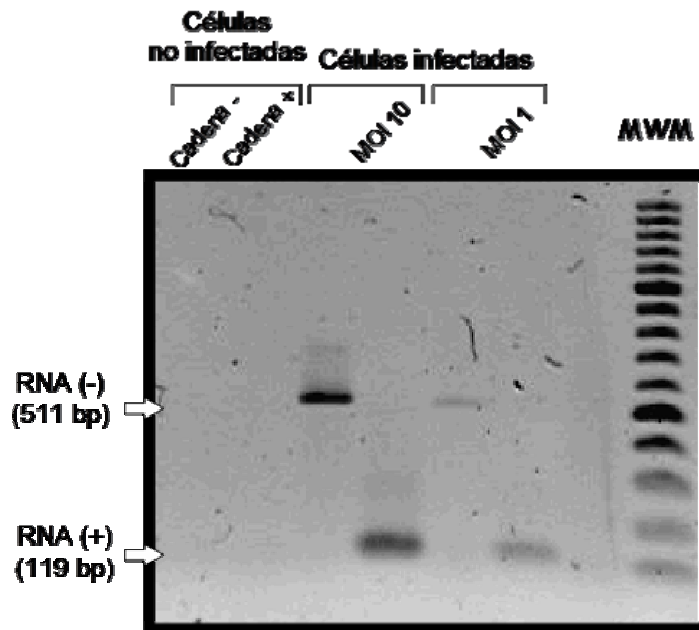


Figura 12. RT-PCR para la identificación de la cadena positiva y negativa del virus del dengue. Las células fueron infectadas a MOI de 1 y 10 y posteriormente sometidas a RT-PCR para la identificación específica de cada cadena. Marcadores de peso molecular (MWM) de 100 pb.

3. Infeccion experimental en células humanas

3.1 Infeccion en células T y monocitos

Al contar con la metodología estandarizada para la determinación de la infección por virus del dengue en células humanas, se procedió a realizar los

ensayos de citometría para la detección de antígeno viral en la membrana celular. Los ensayos de infección en células T (CD3+) y monocitos (CD14+) humanos de 8 donadores aparentemente sanos, se realizaron en células activadas con fitohemaglutinina y no activadas, con el objeto de evaluar si el estado de activación tiene efecto en la capacidad de infección del virus en células permisivas. Las muestras fueron analizadas para dos colores por citometría de flujo, empleando como marcadores de identidad anticuerpos monoclonales anti-CD3 (fig.13) y anti-CD14 (fig.14). En el caso de las células CD3+, los resultados mostraron un porcentaje de infección de 5.5%, sin embargo, en el caso de las células CD3 negativas se pudo observar una tinción positiva independiente de la infección, probablemente debido a la reacción cruzada existente entre el segundo anticuerpo y la inmunoglobulina de superficie de los linfocitos. Las células CD14 positivas mostraron un porcentaje de positividad de 42.9 y 41.4 para el caso de células no activadas y activadas, respectivamente. Los controles de células no infectadas y de segundo anticuerpo no rebasaron el 2.5% de positividad.

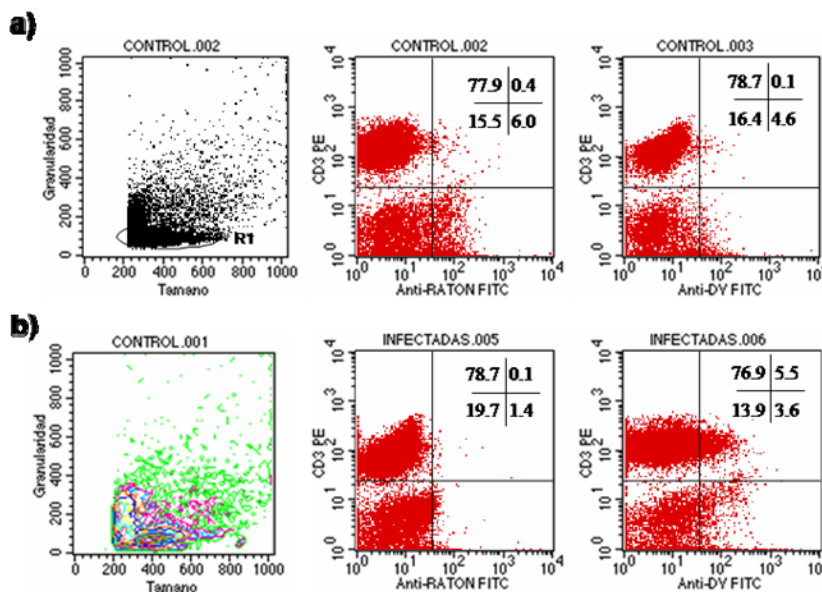


Figura 13. Detección de la proteína E del dengue virus en la superficie de linfocitos infectados. Las células mononucleares totales de donadores no-inmunes fueron activadas

con PHA e infectadas a una MOI de 10 y analizadas por citometría de flujo para dos colores empleando anticuerpos anti-DV-anti-Ig de ratón-FITC y anti-CD3-PE. a) Celulas no infectadas, b) células infectadas. Los paneles del centro muestran las tinciones de control para el segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón FITC).

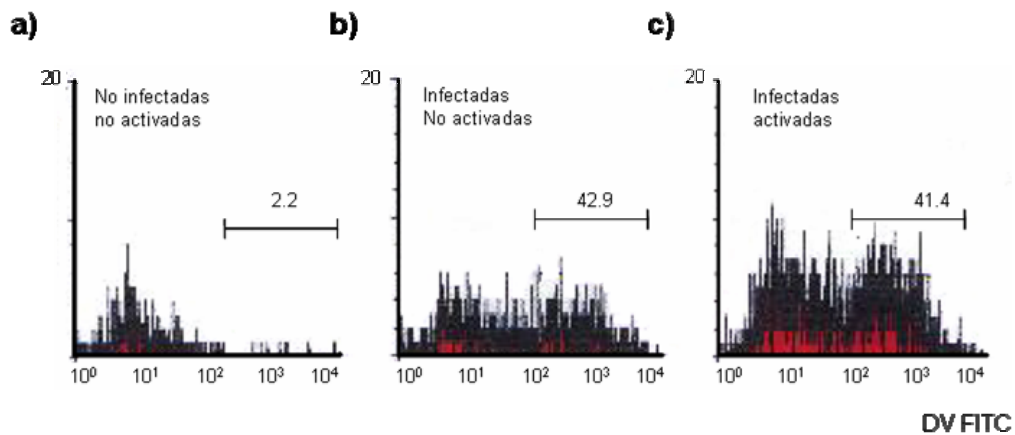


Figura 14. Tinción de superficie para la proteína del dengue virus-2 en células CD14+. Las células mononucleares totales fueron infectaron con una MOI de 10 y se analizaron para dos colores por citometría de flujo; anti-DEN-2-anti Ig de ratón-FITC y anti-CD14-PE. **a**, células no infectadas; **b**, células sin activar e infectadas; **c**, células activadas e infectadas.

El análisis de ocho muestras provenientes de diferentes donadores mostró que el número de células positivas a la tinción para la proteína del virus del dengue es independiente del estado de activación (fig. 15), ya que las diferencias observadas no alcanzaron significancia estadística.

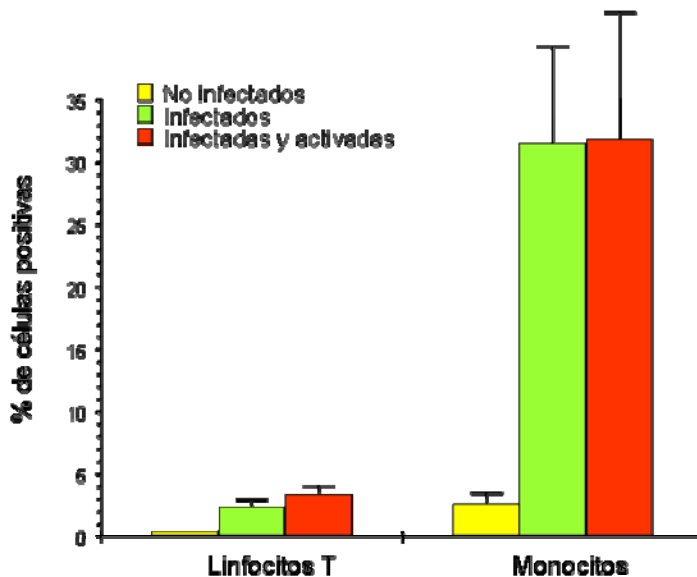


Figura 15. Detección de la proteína E del virus del dengue DEN-2 en células humanas. Células mononucleares periféricas provenientes de 8 donadores no inmunes fueron infectadas con virus DEN-2 a una MOI de 10. El porcentaje de células positivas a la tinción para la proteína de envoltura del dengue virus-2 en linfocitos T (células CD3+) y monocitos (células CD14+) es mostrado con su respectiva desviación estándar.

El *cell*-ELISA en células humanas no pudo ser empleado debido al alto valor de fondo obtenido en el ensayo, esto probablemente debido a la presencia de los receptores para inmunoglobulinas característicos de diversas poblaciones encontradas en las células mononucleares humanas (datos no mostrados) y por lo tanto no se fue empleado en la identificación de la infección en células humanas.

La tabla 3 resume los resultados de cuatro diferentes muestras en las que se realizaron citometría de flujo para la identificación de antígeno viral en células CD14+ y CD3+ y RT-PCR. Como se puede apreciar, existe una total concordancia entre los resultados obtenidos mediante citometría y RT-PCR.

Tabla 3. Determinación de la infección por virus del dengue en células humanas. Las células mononucleares de sangre periférica de donadores aparentemente sanos fueron infectadas y analizadas por citometría de flujo y RT-PCR para la detección del RNA viral.

Muestras	Citometría		RT-PCR
	CD14	CD3	
I	+	+	+
II	+	+	+
III	+	+	+
IV	+	+	+

3.2 Infecciones en poblaciones celulares enriquecidas

Aunque la determinación de antígeno viral en la superficie de la membrana celular de células T (CD3+) sugiere la posibilidad de que los linfocitos T sean blanco de la infección por virus del dengue, resulta de gran importancia discernir si dicha tinción es debida a la replicación del virus en células T o solamente por la unión inespecífica a la membrana del linfocito de partículas virales generadas en otras estirpes celulares. Para responder a esta pregunta se procedieron a realizar ensayos de RT-PCR específicos para la detección de la cadena negativa del virus en linfocitos T enriquecidos. Como se puede observar en la figura 16, panel "a", el porcentaje de células infectadas no varió significativamente con respecto a los experimentos previos con células no enriquecidas, sin embargo, es importante resaltar que la susceptibilidad a la infección varió de muestra a muestra (datos no mostrados).

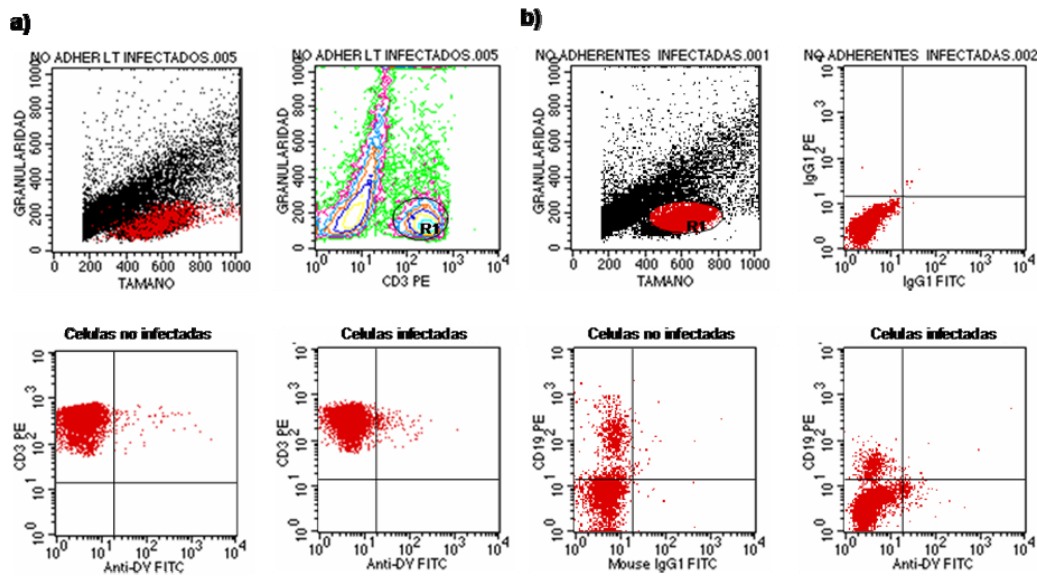


Figura 16. Detección de la proteína E del DEN-2 en poblaciones celulares no adherentes. Células no adherentes fueron enriquecidas a partir de células mononucleares totales, las células fueron infectadas con una MOI de 10 y analizadas por su expresión de antígeno viral de superficie. a) células CD3+ b) células CD19+.

La población de células adherentes también fue analizada por citometría de flujo y los datos se muestran en la figura 17. En la gráfica de granularidad contra tamaño, se puede observar el enriquecimiento de la fracción correspondiente a los monocitos, los cuales son claramente positivos a la tinción de superficie para la identificación de la proteína de envoltura del virus del dengue.

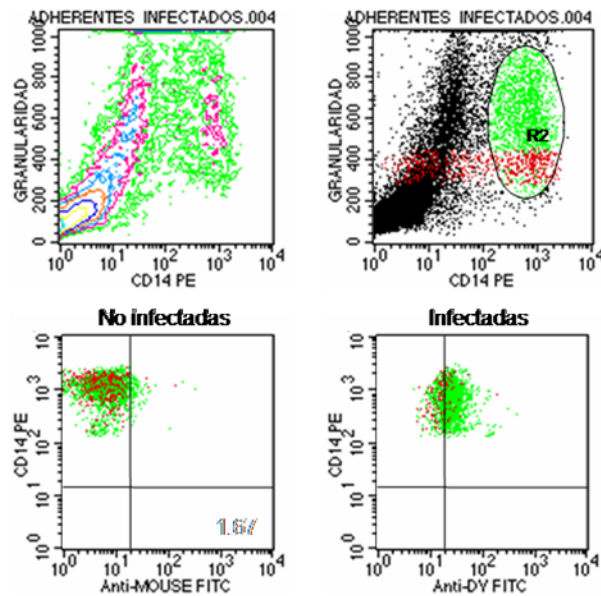


Figura 17. Detección de la proteína E del DEN-2 en poblaciones celulares adherentes. Las células adherentes se obtuvieron a partir de células mononucleares totales, fueron infectadas con una MOI de 10 y la expresión de proteína de envoltura viral fue evaluada por citometría de flujo con anti-DEN2-anti-Ig de ratón-FITC y anti-CD14-PE.

3.3 Determinación del IR en poblaciones celulares enriquecidas.

El RNA total obtenido de las poblaciones celulares enriquecidas e infectadas fue utilizado para la detección específica del intermediario de replicación. La figura 18 muestra los resultados obtenidos en este experimento donde se puede observar la banda correspondiente al intermediario de reacción tanto en la fracción adherente como la no adherente de células infectadas, ninguna banda fue evidente en células no infectadas. Como controles positivo y negativo se usaron RNA total de células C6/36 infectadas y no infectadas, respectivamente.

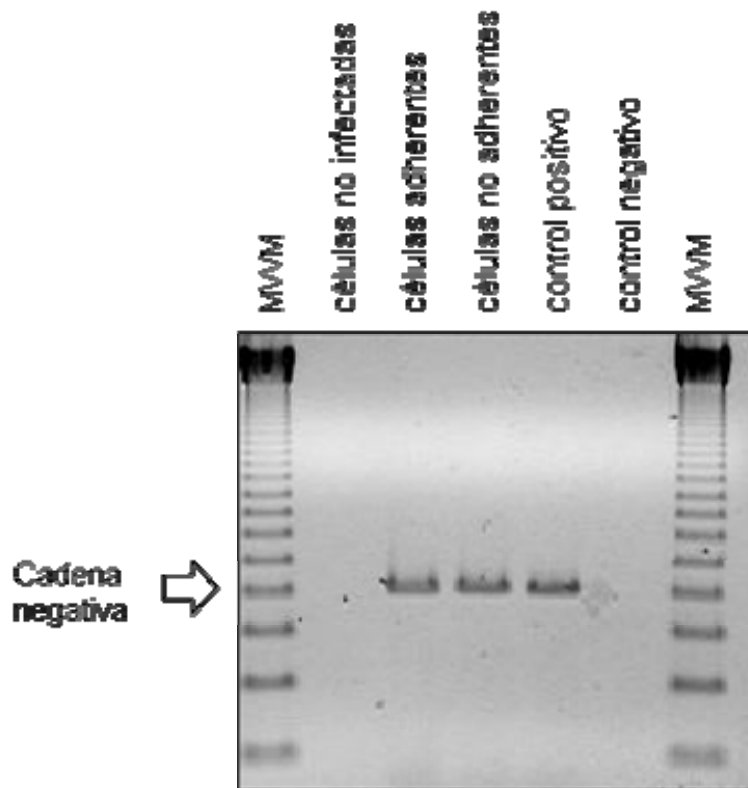


Figura 18. Identificación del intermediario replicativo del DEN-2 en poblaciones celulares enriquecidas. Células adherentes y no adherentes fueron infectadas con virus del dengue a una MOI de 10, el RNA total extraído fue amplificado específicamente para la detección de la cadena negativa (IR) del virus del dengue DEN-2 mediante RT-PCR.

4. Análisis de muestras clínicas naturalmente infectadas

Con la colección de técnicas ya estandarizadas se procedió a la recolección de muestras clínicas naturalmente infectadas para su estudio en el laboratorio. Se procedió a contactar a las autoridades de salud locales de áreas endémicas de dengue que estuviesen reportando casos de dengue en ese momento y que pudieran ser colectadas y transportadas por vía terrestre en un tiempo razonable a nuestro laboratorio, sin comprometer la integridad de las células sanguíneas. Como

resultado se estableció un protocolo de investigación con la Jurisdicción de Salud de Coatzacoalcos, Veracruz en la localidad de Cosoleacaque.

4.1 Condiciones de transporte de muestras clínicas

La limitante más importante en el algoritmo para la obtención de muestras clínicas era el tiempo de transporte que debería resistir las células en sangre total antes de ser procesadas. Para resolverlo se procedió a evaluar diferentes condiciones para el transporte de dichas muestras. Para este efecto se obtuvo sangre completa de donadores aparentemente sanos en tubos con heparina y ácido cítrico a diferentes tiempos en intervalos de 24 h, las cuales fueron conservadas a temperatura ambiente y refrigeración por cinco días. A temperatura ambiente, las células comenzaron a deteriorarse después de las 24 h. La figura 19 muestra los resultados obtenidos en las células con ACD y conservadas en refrigeración donde se observa que durante cinco días mantuvieron su morfología, a pesar de la generación de un escaso *debris* debido a la muerte celular.

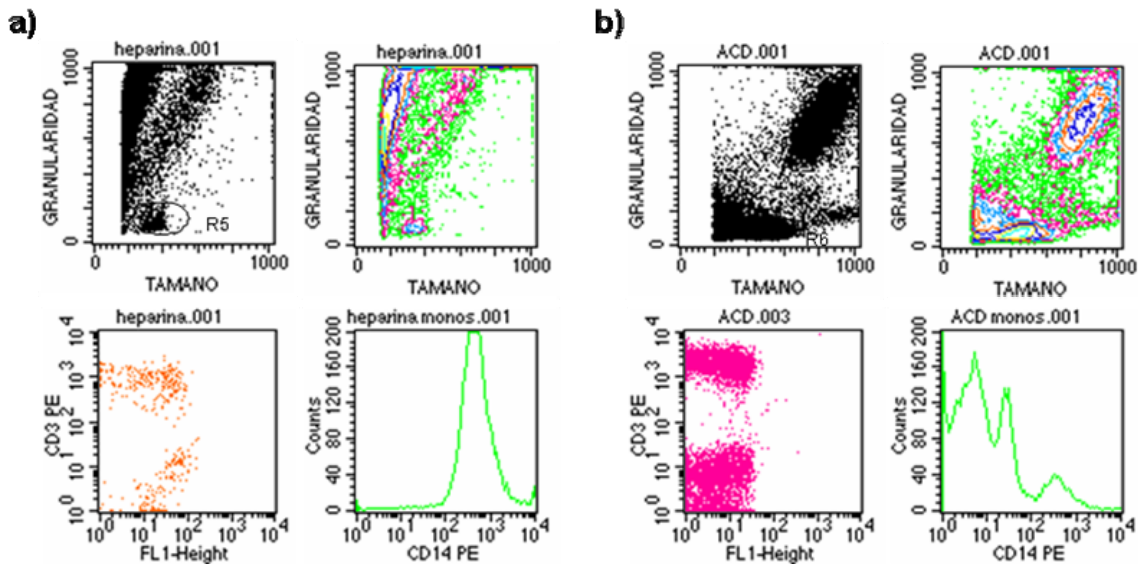


Figura 19. Efecto del tiempo sobre células de sangre completa. Células de sangre completa fueron colectadas de donadores aparentemente sanos en tubos con heparina (a) o ACD (b) para ser conservadas en refrigeración por cinco días. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD14 y adquiridas en un FACSORT.

4.2 Determinación de infección en muestras clínicas

Las muestras obtenidas en campo y transportadas a la Ciudad de México fueron inmediatamente procesadas por citometría de flujo y RT-PCR. Se recibieron 14 muestras provenientes Cosoleacaque de pacientes con diagnóstico clínico de dengue. La confirmación de la infección por virus del dengue mediante RT-PCR sólo fue establecida en cuatro de estos especímenes. Estas cuatro muestras fueron procesadas por citometría par la detección de antígeno viral de superficie en las diferentes poblaciones celulares y en ninguna de ellas fue posible la detección del antígeno de superficie en las poblaciones celulares analizadas (datos no mostrados).

4.3 Activación celular en muestras clínicas

Al activar las células sanguíneas de las cuatro muestras positivas con el antígeno de dengue 2 y evaluar su respuesta medida por la expresión de CD69, se pudo observar un porcentaje significativo de células CD4 y CD8 activadas como respuesta al estímulo antígeno específico (fig. 20). Los datos de activación en este grupo de muestras se resumen en la figura 21, donde se puede observar que los valores de activación son muy similares en las cuatro muestras y aunque se observó un mayor porcentaje de células CD8+ que células CD4+ específicas para el antígeno de dengue, la diferencia no es significativa.

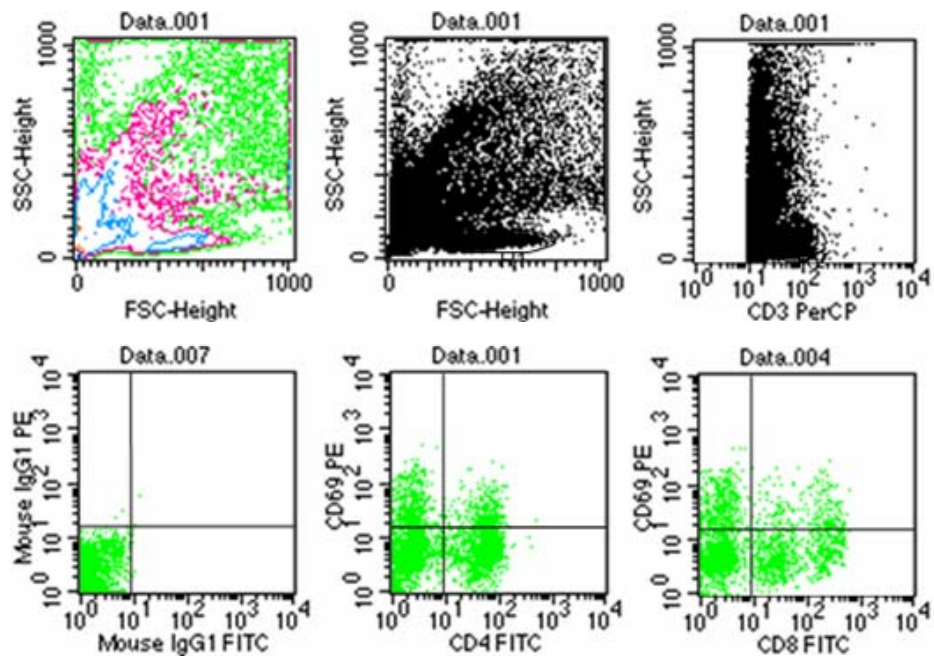


Figura 20. Activación antígeno específico. Las células mononucleares fueron aisladas de sangre total y activadas con antígeno de dengue por 12 h. Las células fueron cosechadas y procesadas por citometría de flujo para determinar la expresión de CD69 (PE) en linfocitos CD4 y CD8 (FITC).

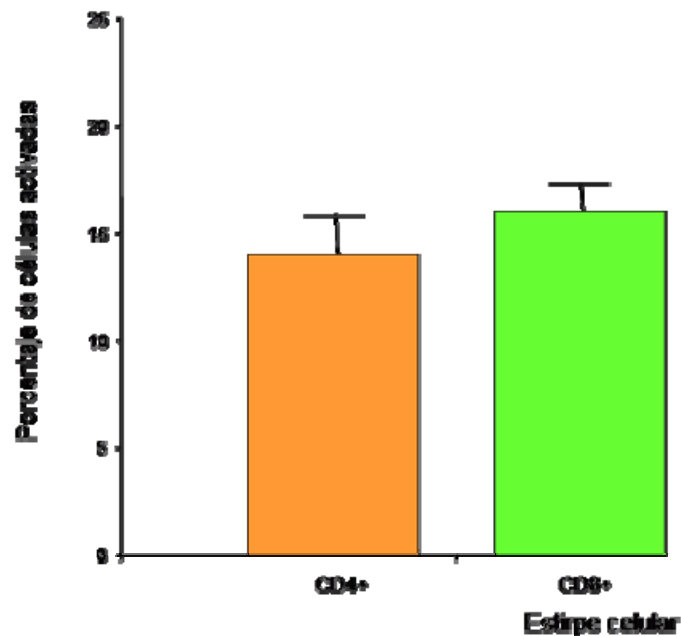


Figura 21. Activación antígeno-específica en muestras clínicas. Las cuatro muestras positivas a la detección de RNA viral fueron activadas con antígeno de dengue 2 durante 12 h y después procesadas por citometría de flujo. Los datos representan la media del porcentaje de células activadas para linfocitos CD4+ y CD8+.

4.4 Detección de citocinas proinflamatorias en muestras clínicas

El RNA total extraído de las cuatro muestras positivas fue utilizado para la detección del RNA mensajero de cuatro citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α) que han sido reportadas como importantes en el desarrollo de casos hemorrágicos (Atrasheuskaya et al., 2003; Suharti et al., 2003; Suharti et al., 2002). Los datos de estos experimentos se muestran en la figura 22. Se puede observar que las cuatro muestras fueron positivas para todas las citocinas determinadas lo cual concuerda con los datos reportados en otros estudios donde la presencia de estas citocinas ha sido confirmada.

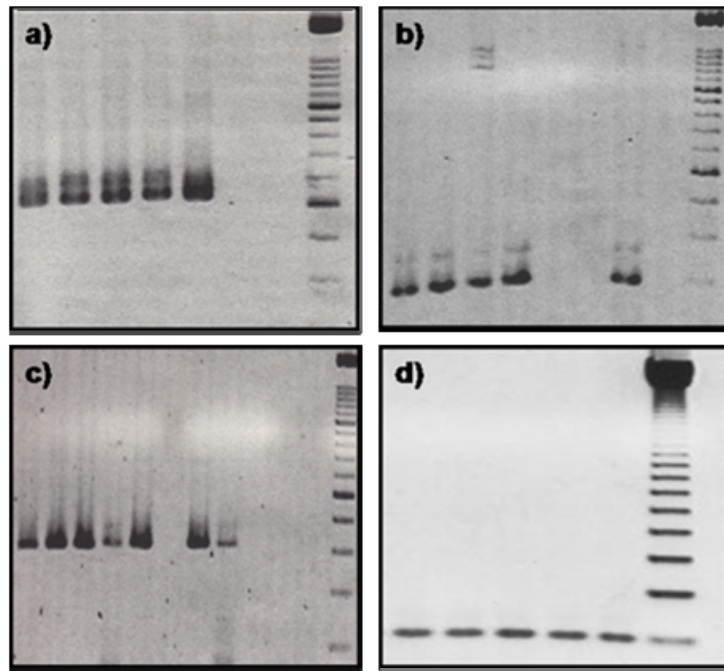


Figura 22. Identificación de RNA mensajero de citocinas. Células mononucleares fueron aisladas a partir de sangre periférica de pacientes con dengue. El RNA fue extraído y sometido a RT-PCR para la identificación de cada una de las citocinas. Los productos de amplificación fueron resueltos en geles de agarosa al 2%. a) IL-1 β , b) IL-6, c) IL-8 y d) TNF- α .

DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo por objetivo establecer si las poblaciones celulares CD3+ son blanco de la infección por el virus del dengue al ser experimentalmente infectadas y durante el curso natural de la infección, así como analizar la respuesta de citocinas provenientes de pacientes con dengue.

Durante el curso de este proyecto, únicamente se manejó al serotipo DEN-2 debido a que este fue el predominante en el año del 2002 en México (Lorono-Pino et al., 2004). Inicialmente se procedió al aislamiento y caracterización molecular y serológica de un aislado viral endémico representativo de las cepas virales circulantes en el país. Los ensayos serológicos permitieron la serotipificación del aislado el cual resultó ser del serotipo 2. Como fue ya mencionado, las cepas DEN-2 del virus del dengue han sido clasificadas en dos genotipos, americano y asiático, asociadas con diferentes presentaciones clínicas en humanos (Rico-Hesse et al., 1997)(Rico-Hesse, 2003). Las cepas del genotipo americano no han sido hasta ahora involucradas en casos hemorrágicos, a diferencia de las asiáticas que están relacionadas con epidemias de dengue hemorrágico (Rico-Hesse et al., 1998; Rico-Hesse et al., 1997) (Lanciotti et al., 1997; Mangada and Igarashi, 1998; Rico-Hesse et al., 1997; Uzcategui et al., 2001). La caracterización molecular y el análisis filogenético de los aislados virales aquí estudiados revelaron que las cepas pertenecían al genotipo asiático. Esta caracterización estuvo basada en la secuencia de un fragmento de 450 bp correspondiente a las posiciones 1785 a la 2235 del genoma viral en la región localizada en el dominio III de la proteína de envoltura. Esta proteína presenta una alta tasa de mutación y la región usada ha sido empleada extensivamente para el estudio molecular y evolutivo del virus (Rico-Hesse, 1990; Rico-Hesse, 2003; Rico-Hesse et al., 1998; Rico-Hesse et al., 1997).

Es importante mencionar que los aislados presentaron dos inserciones en el fragmento estudiado, que son características de los serotipos DEN-1 y DEN-3 pero

no de la vasta mayoría de los serotipos DEN-2. Estos datos sugieren fuertemente que los aislados podrían ser el resultado de eventos de recombinación entre los serotipos circulantes en un momento dado en una misma región. Esto deberá ser estudiado y analizado con mayor profundidad y buscando otras posibles recombinaciones en otras regiones genómicas. El “fenotipo recombinante” de estos aislados presenta grandes similitudes con la cepa 200787, la cual es neurotrópica y que fue recuperada de un caso de dengue en el estado de Guerrero en 1983 (Ruiz et al., 2000). Los eventos de recombinación han sido reportados para otros muchos virus incluyendo el caso del virus del dengue, así los datos de secuencias del genoma completo del DEN-1 han demostrado que la cepa S275/90 (un aislado obtenido en Singapur) es el producto de la recombinación de dos cepas aisladas en dos regiones geográficas diferentes (Tolou et al., 2001). Otros grupos han informado la existencia de procesos de recombinación entre regiones de las proteínas de prM y E, así como en la unión de la proteína E y la proteína NS1. También se conocen eventos de recombinación para el serotipo DEN-2, Uzcategui et al, identificaron regiones de recombinación al analizar los genes de las proteínas de cápside y prM en la cepa MARA4, la cual guarda una estrecha relación con los aislados descritos en este trabajo y con la cepa 200787 (fig. 6) y que resultó ser un producto de la recombinación de cepas autóctonas de Venezuela (genotipo americano) y cepas de origen asiático (Uzcategui et al., 2001). Estos hallazgos sugieren que los procesos de recombinación podrían jugar un papel importante en la generación de diversidad genética con implicaciones importantes en la biología del virus (Holmes et al., 1999; Tolou et al., 2001; Uzcategui et al., 2001; Worobey et al., 1999). La posibilidad de que en infecciones naturales ocurran eventos de recombinación está condicionada a la co-infección de dos serotipos o genotipos diferentes en el mismo individuo, situación observada en diferentes estudios con diferentes serotipos del virus del dengue (Aziz et al., 2002; dos Santos et al., 2003; Gubler et al., 1985; Laille et al., 1991; Lorono-Pino et al., 1999; Wang et al., 2003).

La patogenia del DH no ha sido completamente aclarada y aunque estudios epidemiológicos, *in vitro* y en algunos modelos experimentales sugieren la participación de un proceso inmunopatológico que deriva en el proceso hemorrágico, los mecanismos por los cuales se desarrollan los cuadros hemorrágicos no han sido del todo explicados (Chaturvedi et al., 2006a; Chaturvedi et al., 2000; Chaturvedi et al., 2006b; Halstead, 1988; Kurane and Ennis, 1992; Kurane et al., 1990a). Es muy probable que en el desarrollo de cuadros hemorrágicos participen factores inmunológicos, virales, entomológicos y ambientales (fig. 23) (Armstrong and Rico-Hesse, 2001; Armstrong and Rico-Hesse, 2003; Chaturvedi et al., 2006a; Chaturvedi et al., 2000; Chaturvedi et al., 2006b; Cologna et al., 2005). Los genotipos asiáticos están comúnmente asociados con presentaciones más severas de la enfermedad y los estudios correspondientes apoyan la hipótesis de que las diferentes variantes genéticas tienen capacidades distintas para producir DH (Leitmeyer et al., 1999)(Cologna and Rico-Hesse, 2003; Diamond et al., 2000). Esta variabilidad nucleica del genoma viral también ha sido observada entre los serotipos DEN-1, DEN-3 y DEN-4, lo que ha permitido la genotipificación de los virus por medio de análisis filogenéticos (Klungthong et al., 2004; Pires Neto et al., 2005; Uzcategui et al., 2003). Es importante resaltar que en el continente americano ha habido un desplazamiento de las cepas americanas por las de origen asiático, lo que ha resultado en la aparición de un mayor número de casos de dengue causados por genotipos asiáticos (Rico-Hesse et al., 1997; Singh and Seth, 2001). El desarrollo de DH es un fenómeno multifactorial por lo que no es de sorprender que un virus del genotipo asiático pueda aislarse de un caso de DC, en donde factores del hospedero, del vector así como del ambiente participan en la modulación clínica de la expresión del desarrollo viral.

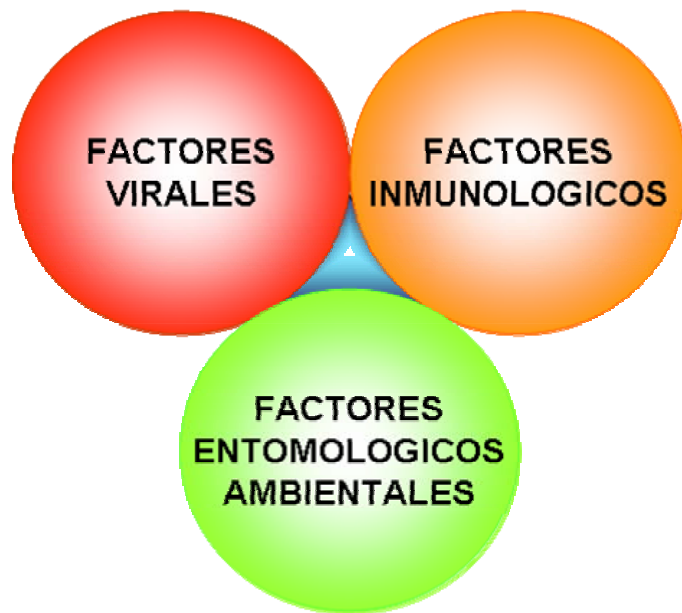


Figura 23. Factores implicados en el desarrollo de cuadros hemorrágicos. El dengue hemorrágico es el resultado de la interacción de factores inmunológicos, virales, entomológicos y ambientales que favorecen la permeabilidad vascular que conducen a los cuadros clínicos del dengue hemorrágico.

La determinación de antígenos virales en la superficie de la célula hospedera ha sido un método ampliamente empleado como un medio para identificar las células blanco de la infección. En reportes previos se han demostrado la presencia de la proteína de envoltura en la superficie de la célula hospedera (Kao et al., 2001; Lambeth et al., 2005; Ng and Corner, 1989; Sanchez et al., 2006; Sydow et al., 2000; Vazquez et al., 1995). En este trabajo utilizamos dos métodos basados en la detección de la proteína E. El primer método fue un sistema tipo ELISA de captura de anticuerpos, el cual resulto ser rápido y sencillo de realizar ya que utiliza directamente células completas de mosquito C6/36 infectadas, línea celular altamente permisivas a la infección por virus del dengue (Humphery-Smith and Vincendeau, 1993). Este tipo de ensayos con células completas como antígeno han sido empleados en la detección de antígenos bacterianos. Nuestro sistema utilizó las ventajas de estos ensayos por ser sencillos, rápidos de realizar, permiten la preparación de las placas por anticipado y su conservación en refrigeración por

varios días. La posibilidad de emplear este sistema en el diagnóstico rutinario de dengue en muestras clínicas está siendo evaluado actualmente en nuestro laboratorio. El segundo método es un sistema de citometría para identificar a la proteína E expresada en la membrana de la célula hospedera. Estos ensayos de citometría han sido ampliamente utilizados para la diversos antígenos (virales, bacterianos, etc), incluyendo la detección de antígenos del virus del dengue (Kao et al., 2001; Lambeth et al., 2005; Sanchez et al., 2006; Sydow et al., 2000). La citometría de flujo, además de demostrar antígenos en la célula hospedera, también identifica la estirpe celular con los anticuerpos monoclonales correspondientes (marcadores de identidad). Nuestro sistema resulto muy útil para el escrutinio de células de diversos orígenes (Talavera et al., 2004). Esta doble capacidad de reconocer la infección y la identidad celular convierte a la citometría en una herramienta muy poderosa para el diagnóstico de casos sospechosos, confiriéndole una utilidad que pocas técnicas pueden combinar. Más aún, el método arrojó resultados alentadores para su uso en el diagnóstico de dengue y cuando se comparó su eficiencia con la de la inmunofluorescencia indirecta convencional en células C6/36 infectadas, se pudo observar que los datos concordaron en 13 de las 16 muestras evaluadas, similar a los datos reportados por otros grupos (Kao et al., 2001; Sydow et al., 2000). Las discrepancias en tres muestras (1004, 1008 y 1013), dos negativas por inmunofluorescencia pero positivas por citometría y RT-PCR, puede explicarse como falsos negativos atribuibles a la propia técnica de inmunofluorescencia, situación que concuerda con los datos de Kao y col, quienes encontraron que la sensibilidad de la citometría fue mayor que la de la inmunofluorescencia (Kao et al., 2001). La tercera muestra discrepante (1013), positiva por inmunofluorescencia pero negativa por citometría y RT-PCR, puede considerarse como un falso positivo. Resulta importante resaltar que otras tres muestras (1014, 1015 y 1016), negativas tanto por inmunofluorescencia como por citometría, resultaron positivas en la detección por RT-PCR del intermediario de replicación y del genoma viral (estándar de oro) por lo que se consideraron falsos negativos para inmunofluorescencia y citometría. La posibilidad de usar al método

de citometría como parte del diagnóstico de dengue requiere de un estudio comparativo que incluya un mayor número de muestras de casos sospechosos.

La cinética de infección en células de mosquito demostró que la carga viral está directamente relacionada con la expresión de antígenos virales. Esto debe ser un parámetro a considerar debido a que de paciente a paciente, el número de partículas virales varía ampliamente lo cual puede conducir a resultados falsos negativos, sobre todo cuando las muestras se evalúan prematuramente antes de que se lleve a cabo la expresión completa de antígenos virales. Este estudio comparativo demostró que la inmunofluorescencia requiere de un mayor número de días para la correcta identificación de la infección viral (cinco días postinfección), lo cual es diferente de lo que reportado por otros autores (Kao et al., 2001) que informan que la inmunofluorescencia da resultados positivos a las 24 h postinfección; esto podría explicarse por la variación de líneas celulares de laboratorio a laboratorio.

La proporción de células infectadas en infecciones naturales puede ser muy limitada (Scott et al., 1980). Considerando que en las muestras clínicas el número de células que expresan antígeno E podría ser muy reducido, exploramos el empleo de un sistema de amplificación como el de anticuerpos biotinados o el sistema de amplificación de la tiramida (datos no mostrados). Desafortunadamente, los anticuerpos monoclonales empleados en este estudio (anti-DEN-2; clona 3H5 ATCC) resultaron ser muy lábiles y como resultado del proceso de marcaje perdieron la capacidad de reconocimiento a su ligando. Este es un fenómeno reportado con anticuerpos tratados con reactivos similares a los de nuestro sistema de marcado (Hoyer-Hansen et al., 2000; Panyutich et al., 1993). Por lo anterior fue imposible utilizar sistemas alternos para elevar la sensibilidad analítica de nuestro sistema.

La identificación de antígenos en la superficie de células no necesariamente es indicativa de la replicación activa del virus (Rothman, 1997) ya que el antígeno detectado podría solamente estar adsorbido a la membrana. Debido a que la citometría pone de manifiesto la presencia de antígenos y no el proceso infeccioso activo, nosotros decidimos usar un método alternativo para poner de manifiesto la infección activa. El virus del dengue requiere para su replicación de la síntesis de una cadena negativa de RNA como molde para la generación de nuevas cadenas positivas, por lo tanto la determinación de estos intermediarios replicativos es una forma de evidenciar la infección activa (Anwar et al., 2006; Vaughan et al., 2002). Nuestro sistema de RT-PCR está basado en una amplificación asimétrica que permite la identificación específica de las dos especies de RNA. Este sistema de detección del intermediario de replicación resultó ser un método sencillo y fácil de aplicar en diferentes tipos celulares (Limon-Flores et al., 2005).

Es interesante el hecho de que la síntesis de las especies de RNA viral pudieron ser identificadas en células infectadas a tiempos tan cortos como 30 min (datos no mostrados). Aunque estos resultados concuerdan con lo reportado por Liu et al (Liu et al., 1997), resulta sorprendente el que la traducción del genoma viral y el procesamiento de la poliproteína, así como la asociación con membranas reticulares, se lleven a cabo en minutos. Se deben realizar más estudios para establecer la dinámica de síntesis de las especies virales durante el proceso replicativo.

Se ha observado que la intensidad de la infección por el virus del dengue varía de persona a persona (Cologna, et al 2006). Las infecciones experimentales en células humanas reveló que los monocitos son el linaje predilecto para la infección, esto concuerda con datos publicados que confirman la infección en monocitos en muestras clínicas de pacientes con dengue (Sydow et al., 2000). Con respecto a las células T, únicamente una fracción pequeña de los linfocitos expresó antígeno viral de superficie. Aunque la infección en células T no ha sido aún

confirmada en infecciones naturalmente, las líneas celulares de linfocitos T, como células Jurkat y HSB-2 y clonas derivadas de células T con fenotipo CD4+ y CD8+ son permisivas a la infección experimental. (Kurane et al., 1990b; Mentor and Kurane, 1997). Esto, en conjunto con los datos de linfopenia en pacientes con dengue, podría sugerir que las células T podrían ser blanco de la replicación viral en las infecciones naturales (Azeredo et al., 2001; Green et al., 1999). El hecho de que un pequeño porcentaje de células T expresa los antígenos virales podría significar que alguna subpoblación en particular, aún no identificada, es la permisiva a la infección. Desde luego, se requieren de más estudios para identificar la o las subpoblaciones de células T implicadas en la infección por el virus del dengue.

Nosotros pudimos observar que de donador a donador hay variaciones importantes en la proporción de células infectadas, lo que probablemente es debido a la susceptibilidad diferencial en cada individuo, tal vez de fondo genético, que de igual forma podrían jugar un papel importante en la presentación clínica. Se reconocen diferencias significativas en el grado de infección en células dendríticas de donadores sanos con diversas cepas de virus del DEN- 2 (Cologna et al., 2005), que es atribuido a la posible existencia de factores aún no identificados en el hospedero.

En otros virus, el grado de activación celular previo a la infección ha sido reportado como un factor importante en la permisividad de la infección (Bishop et al., 1992; Shapira-Nahor et al., 1997). En nuestra experiencia el estado de activación en estas poblaciones celulares no tuvo un efecto significativo en la permisividad a la infección por el virus del dengue.

En infecciones experimentales, el tropismo del virus por monocitos es mayor que por los linfocitos T, aún en poblaciones enriquecidas. En los experimentos de facilitación aquí realizados con células T y el anticuerpo monoclonal 3H5, no se observó un incremento en la infección en células CD3+, aún a diluciones más allá

del punto de neutralización del anticuerpo (datos no mostrados). Esto concuerda con lo reportado (Halstead et al., 1984b), que diferentes líneas celulares tienen capacidades para facilitar su infección, independientemente si los anticuerpos son neutralizantes o no. En este trabajo se empleó un anticuerpo monoclonal neutralizante (3H5) y una cepa viral de genotipo asiático (TAB5322), la cual tiene una estrecha relación con la cepa *New Guinea C*. Esta cepa, de acuerdo con la clasificación de Halstead, pertenece al grupo II que incluye virus que no facilitan su infección con anticuerpos neutralizantes. Por lo tanto, no es de sorprender la ausencia de facilitación de la infección con la cepa TAB5322 y el anticuerpo monoclonal 3H5.

Debido a la diferencia en susceptibilidad de los linfocitos y los monocitos, donde éstos resultan ser los más favorecidos para la replicación del virus, obliga al desarrollo de métodos que puedan cuantificar la progenie viral producida por cada una de las estirpes celulares evaluadas. (Chen et al., 2001; Chien et al., 2006; Chutinimitkul et al., 2005; de Oliveira Poersch et al., 2005; Gomes-Ruiz et al., 2006; Johnson et al., 2005). Para tal propósito, en este trabajo se diseñó un método de RT-PCR competitivo y cuantitativo para la detección de ambas cadenas de RNA que resultó ser altamente sensible (Vaughan et al., 2002).

El porcentaje de positividad de RNA viral en las muestras clínicas de casos con datos clínicos muy sugestivos de dengue, estudiados en este trabajo, fue sorpresivamente bajo (25%). Estos casos sospechosos fueron obtenidos en Cosoleacaque, perteneciente a la Jurisdicción de Coatzacoalcos, Veracruz, que en el año de 2002 tuvo el segundo mayor número de casos de dengue del estado (607 casos), sólo por debajo de San Andrés Tuxtla (663 casos). Ya que el RT-PCR para identificación del virus es altamente sensible y se considera como el estándar de oro, los casos negativos por dicha técnica deben aceptarse como falsos positivos en el diagnóstico clínico. Estos errores pueden en parte relacionarse con la falta de homogeneidad por parte de los médicos al aplicar la definición operativa de casos

de dengue. Durante la realización del estudio de campo, también se observó que con frecuencia hay errores por parte de los médicos encargados de la detección y selección de casos en cuanto a la diferenciación de casos DC y DH que, de acuerdo con la NOM y con las recomendaciones de la OMS, se basa inicialmente en datos como la prueba del torniquete, la hemoconcentración y la trombocitopenia. Así, pudimos identificar diferencias importantes en la forma de realizar e interpretar la prueba del torniquete, el concepto de trombocitopenia también tuvo discrepancias (50,000 plaquetas/mm³, contra el valor recomendado de 100,000 plaquetas/mm³). Esto refleja que lo establecido en las normas oficiales no necesariamente concuerda con la presentación de los casos clínicos, observación que ha llevado a que diferentes autores sugieran la necesidad de reevaluar las definiciones operativas de DC y DH (Deen et al., 2006; Martinez et al., 2005; Rigau-Perez, 2006) con base en lo observado en varios países, incluyendo México donde se han detectado casos de DC con manifestaciones hemorrágicas, sin trombocitopenia (Navarrete-Espinosa et al., 2005). En la actualidad, las definiciones operativas de dengue son muy sensibles pero poco específicas, lo cual las hace útiles para el tamizaje de casos presuntivos pero carecen de utilidad en la diferenciación con otros padecimientos febriles, lo cual hace indispensable el apoyo de laboratorio para confirmar la etiología de la infección (Martinez et al., 2005).

El método de citometría de flujo no detectó la presencia de antígenos virales en la superficie de células mononucleares obtenidas de casos de dengue confirmados por RT-PCR. Esto probablemente fue debido al número limitado de células que expresaban el antígeno viral en infecciones naturales (Rothman, 1997; Scott et al., 1980). Alternativamente, el método de citometría podría no haber sido lo suficientemente sensible para demostrar estos antígenos en una población limitada de células que expresan dichas moléculas. Cabe resaltar que la identificación de la proteína E se realizó mediante una tinción de superficie, lo cual podría haber reducido la sensibilidad del método. Esta sensibilidad podría mejorarse notablemente si se realizara la búsqueda de antígeno en células permeabilizadas ya

que así se podrían identificar moléculas intracelulares que aún no han sido exportadas a la membrana celular. Los datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio utilizando este enfoque, sugieren que la tinción intracelular rinden mayores intensidades de fluorescencia en células infectadas, en comparación de células no permeabilizadas.

Los datos de activación, medida por la expresión de CD69, de células obtenidas de paciente, mostró la existencia de clonas CD4+ y CD8+ específicas para antígenos de dengue. Estos datos concuerdan con lo publicado por otros grupos que han observado la presencia de clonas T reactivas en pacientes con dengue (Azeredo et al., 2006; Chen et al., 2004; Green et al., 1999; Liu et al., 2002; Shresta et al., 2004; van der Most et al., 2003). La presencia de estas clonas específicas en estos pacientes, apoya los resultados obtenidos por RT-PCR y sugieren una infección activa.

Como se ha mencionado anteriormente, es posible que el desarrollo de mecanismos pro-hemorrágicos sea debido al incremento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias que pudieran tener un efecto en el endotelio favoreciendo así la hemorragia (Chaturvedi et al., 2006a; Chaturvedi et al., 2006b; Fink et al., 2006). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros, donde se ha observado que citocinas proinflamatorias con acciones vasodilatadores tales como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α , participan de forma importante en el desarrollo de los cuadros hemorrágicos. El desarrollo de DH/SCD probablemente es debido a la producción exacerbada de citocinas y mediadores de la inflamación, originada por una super-infección en monocitos y otras estirpes celulares, y que es favorecida por el fenómeno de infección facilitada mediada por anticuerpos. Estos eventos podrían contribuir en el cuadro de DH ya que la progenie viral puede ser fagocitada por macrófagos que adquieren la infección y/o que se activan en respuesta a los virus internalizados de esta manera, incrementando así los niveles séricos de citocinas y mediadores pro-hemorrágicos (Kurane and Ennis, 1992).

En conclusión, los resultados de este trabajo sugieren la capacidad del virus del dengue para infectar linfocitos T de sangre periférica en infecciones experimentales, fenómeno que podría jugar un papel importante para la proliferación viral y la producción de citocinas que, bajo condiciones particulares de carga viral, predisposición y genotipo viral, pueden desencadenar procesos hemorrágicos. La replicación en infecciones naturales del virus en células T y la identificación de la subpoblación particularmente involucrada, requiere de más estudios que puedan confirmar el tropismo del virus del dengue en individuos naturalmente infectados.

CONCLUSIONES

1. Las cepas virales TAB5322 y CAM7786 pertenecen al genotipo asiático, las cuales presentan dos inserciones encontradas en los serotipos 1 y 3 del virus del dengue, lo cual podría ser indicativo de un proceso de recombinación.
2. El RT-PCR es un método útil para la detección de la cadena negativa del RNA viral (intermediario replicativo) en células infectadas por virus del dengue.
3. Una subpoblación de células T humanas, aun por determinar, es blanco de la infección por virus del dengue en infecciones experimentales.
4. En infecciones experimentales, el virus del dengue presenta un tropismo mayor hacia monocitos que por células T.
5. La detección de antígenos virales en la superficie de células obtenidas de casos confirmados de dengue debe ser analizada con métodos más sensibles que permitan identificar dichos antígenos y las células que los expresan.
6. Las infecciones por dengue generan la producción de clonas T específicas con fenotipo CD4+ y CD8+.
7. Las células de pacientes con dengue presentan RNA mensajero de citocinas proinflamatorias con actividad vasodilatadora. tales como la $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ y $IL-8$.

PERSPECTIVAS

1. Secuenciar el genoma completo de las cepas TAB5322 y CAM7786
2. Realizar análisis moleculares para determinar si estos aislados son recombinantes genéticos entre virus del serotipo 2 y serotipos 1 y/o 3.
3. Secuenciar el genoma completo de las cepas virales aisladas de casos de dengue (Sequenom) y asociar su secuencia nucleotídica con la presentación de la enfermedad.
4. Incrementar la sensibilidad del método de citometría para la identificación de antígenos virales.
5. Llevar a cabo la detección integral de un mayor número de citocinas, quimiocinas y mediadores bioquímicos (Luminex) en muestras clínicas de pacientes con dengue.
6. Identificar a la(s) subpoblaciones de células T capaces de replicar al virus del dengue en infecciones naturales.

REFERENCIAS

- Alvarez, M., Guzman, M. G., Pupo, M., Morier, L., Bravo, J., and Rodriguez, R. (2001): Study of biologic attributes of Cuban dengue 2 virus after serial passage in primary dog kidney cells. *Int J Infect Dis* **5**, 35-9.
- An, J., Zhou, D. S., Zhang, J. L., Morida, H., Wang, J. L., and Yasui, K. (2004): Dengue-specific CD8+ T cells have both protective and pathogenic roles in dengue virus infection. *Immunol Lett* **95**, 167-74.
- Anderson, R., Wang, S., Osiowy, C., and Issekutz, A. C. (1997): Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol* **71**, 4226-32.
- Anwar, A., August, J. T., and Too, H. P. (2006): A stem-loop-mediated reverse transcription real-time PCR for the selective detection and quantification of the replicative strand of an RNA virus. *Anal Biochem* **352**, 120-8.
- Armstrong, P. M., and Rico-Hesse, R. (2001): Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* **1**, 159-68.
- Armstrong, P. M., and Rico-Hesse, R. (2003): Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* **68**, 539-44.
- Atrasheuskaya, A., Petzelbauer, P., Fredeking, T. M., and Ignatyev, G. (2003): Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**, 33-42.
- Avirutnan, P., Malasit, P., Seliger, B., Bhakdi, S., and Husmann, M. (1998): Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol* **161**, 6338-46.
- Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S., Komoltri, C., Thiemmecca, S., Auethavornanan, K., Jairungsri, A., Kanlaya, R., Tangthawornchaikul, N., Puttikhunt, C., Pattanakitsakul, S. N., Yenchitsomanus, P. T., Mongkolsapaya, J., Kasinrerak, W., Sittisombut, N., Husmann, M., Blettner, M., Vasanawathana, S., Bhakdi, S., and Malasit, P. (2006): Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* **193**, 1078-88.
- Azeredo, E. L., De Oliveira-Pinto, L. M., Zagne, S. M., Cerqueira, D. I., Nogueira, R. M., and Kubelka, C. F. (2006): NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol* **143**, 345-56.
- Azeredo, E. L., Zagne, S. M., Santiago, M. A., Gouvea, A. S., Santana, A. A., Neves-Souza, P. C., Nogueira, R. M., Miagostovich, M. P., and Kubelka, C. F. (2001): Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* **204**, 494-507.

- Aziz, M. M., Hasan, K. N., Hasanat, M. A., Siddiqui, M. A., Salimullah, M., Chowdhury, A. K., Ahmed, M., Alam, M. N., and Hassan, M. S. (2002): Predominance of the DEN-3 genotype during the recent dengue outbreak in Bangladesh. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **33**, 42-8.
- Bhamarapavati, N., and Sutee, Y. (2000): Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* **18 Suppl 2**, 44-7.
- Bielefeldt-Ohmann, H. (1998): Analysis of antibody-independent binding of dengue viruses and dengue virus envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes. *Virus Res* **57**, 63-79.
- Bishop, S. A., Williams, N. A., Gruffydd-Jones, T. J., Harbour, D. A., and Stokes, C. R. (1992): Impaired T-cell priming and proliferation in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Aids* **6**, 287-93.
- Blaney, J. E., Jr., Durbin, A. P., Murphy, B. R., and Whitehead, S. S. (2006): Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. *Viral Immunol* **19**, 10-32.
- Boonpucknavig, S., Vuttiviroj, O., Bunnag, C., Bhamarapavati, N., and Nimmanitya, S. (1979): Demonstration of dengue antibody complexes on the surface of platelets from patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* **28**, 881-4.
- Brinton, M. A., Kurane, I., Mathew, A., Zeng, L., Shi, P. Y., Rothman, A., and Ennis, F. A. (1998): Immune mediated and inherited defences against flaviviruses. *Clin Diagn Virol* **10**, 129-39.
- Budd, R. C. (2001): Activation-induced cell death. *Curr Opin Immunol* **13**, 356-62.
- Budd, R. C. (2002): Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* **109**, 437-41.
- Burke, D. S., and Kliks, S. (2006): Antibody-dependent enhancement in dengue virus infections. *J Infect Dis* **193**, 601-3; author reply 603-4.
- Chakravarti, A., and Kumaria, R. (2006): Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res* **123**, 25-30.
- Chaturvedi, U., Nagar, R., and Shrivastava, R. (2006a): Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**, 155-66.
- Chaturvedi, U. C., Agarwal, R., Elbishbishi, E. A., and Mustafa, A. S. (2000): Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**, 183-8.
- Chaturvedi, U. C., Nagar, R., and Shrivastava, R. (2006b): Macrophage & dengue virus: Friend or foe? *Indian J Med Res* **124**, 23-40.
- Chen, H. C., Lai, S. Y., Sung, J. M., Lee, S. H., Lin, Y. C., Wang, W. K., Chen, Y. C., Kao, C. L., King, C. C., and Wu-Hsieh, B. A. (2004): Lymphocyte activation and hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus. *J Med Virol* **73**, 419-31.
- Chen, R. F., Yeh, W. T., Yang, M. Y., and Yang, K. D. (2001): A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **30**, 1-7.

- Chien, L. J., Liao, T. L., Shu, P. Y., Huang, J. H., Gubler, D. J., and Chang, G. J. (2006): Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol* **44**, 1295-304.
- Chutinimitkul, S., Payungporn, S., Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. (2005): Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. *J Virol Methods* **129**, 8-15.
- Cologna, R., Armstrong, P. M., and Rico-Hesse, R. (2005): Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* **79**, 853-9.
- Cologna, R., and Rico-Hesse, R. (2003): American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* **77**, 3929-38.
- Corner, L. C., and Ng, M. L. (1987): The influence of higher temperature on dengue-2 virus infected C6/36 mosquito cell line. *Can J Microbiol* **33**, 863-9.
- D'Arcy, A., Chaillet, M., Schiering, N., Villard, F., Lim, S. P., Lefeuvre, P., and Erbel, P. (2006): Purification and crystallization of dengue and West Nile virus NS2B-NS3 complexes. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**, 157-62.
- Daughaday, C. C., Brandt, W. E., McCown, J. M., and Russell, P. K. (1981): Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect Immun* **32**, 469-73.
- de Oliveira Poersch, C., Pavoni, D. P., Queiroz, M. H., de Borba, L., Goldenberg, S., dos Santos, C. N., and Krieger, M. A. (2005): Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *J Clin Virol* **32**, 272-7.
- Deen, J. L., Harris, E., Wills, B., Balmaseda, A., Hammond, S. N., Rocha, C., Dung, N. M., Hung, N. T., Hien, T. T., and Farrar, J. J. (2006): The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* **368**, 170-3.
- Diamond, M. S., Edgil, D., Roberts, T. G., Lu, B., and Harris, E. (2000): Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* **74**, 7814-23.
- Diaz, F. J., Black, W. C. t., Farfan-Ale, J. A., Lorono-Pino, M. A., Olson, K. E., and Beaty, B. J. (2006): Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. *Arch Med Res* **37**, 760-73.
- dos Santos, C. L., Bastos, M. A., Sallum, M. A., and Rocco, I. M. (2003): Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **45**, 11-6.
- Edgil, D., Polacek, C., and Harris, E. (2006): Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J Virol* **80**, 2976-86.
- Fadilah, S. A., Sahrir, S., Raymond, A. A., Cheong, S. K., Aziz, J. A., and Sivagengei, K. (1999): Quantitation of T lymphocyte subsets helps to distinguish dengue hemorrhagic fever from classic dengue fever during the acute febrile stage. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **30**, 710-7.

- Falconar, A. K. (1997): 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**, 897-916.
- Falgout, B., Chanock, R., and Lai, C. J. (1989): Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *J Virol* **63**, 1852-60.
- Fan, W. F., and Mason, P. W. (1990): Membrane association and secretion of the Japanese encephalitis virus NS1 protein from cells expressing NS1 cDNA. *Virology* **177**, 470-6.
- Fink, J., Gu, F., and Vasudevan, S. G. (2006): Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol* **16**, 263-75.
- Gagnon, S. J., Zeng, W., Kurane, I., and Ennis, F. A. (1996): Identification of two epitopes on the dengue 4 virus capsid protein recognized by a serotype-specific and a panel of serotype-cross-reactive human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol* **70**, 141-7.
- Gomes-Ruiz, A. C., Nascimento, R. T., de Paula, S. O., and Lopes da Fonseca, B. A. (2006): SYBR green and TaqMan real-time PCR assays are equivalent for the diagnosis of dengue virus type 3 infections. *J Med Virol* **78**, 760-3.
- Green, S., Pichyangkul, S., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Nimmannitya, S., Nisalak, A., Kurane, I., Rothman, A. L., and Ennis, F. A. (1999): Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **180**, 1429-35.
- Gubler, D. J., Kuno, G., Sather, G. E., and Waterman, S. H. (1985): A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* **34**, 170-3.
- Guzman, M. G., Mune, M., and Kouri, G. (2004): Dengue vaccine: priorities and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2**, 895-911.
- Halstead, S. B. (1988): Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* **239**, 476-81.
- Halstead, S. B. (2002): Dengue hemorrhagic fever: two infections and antibody dependent enhancement, a brief history and personal memoir. *Rev Cubana Med Trop* **54**, 171-9.
- Halstead, S. B. (2003): Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* **60**, 421-67.
- Halstead, S. B., Larsen, K., Kliks, S., Peiris, J. S., Cardoso, J., and Porterfield, J. S. (1983a): Comparison of P388D1 mouse macrophage cell line and human monocytes for assay of dengue-2 infection-enhancing antibodies. *Am J Trop Med Hyg* **32**, 157-63.
- Halstead, S. B., Marchette, N. J., Diwan, A. R., Palumbo, N. E., and Putvatana, R. (1984a): Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. II. Attributes of virus cloned at different dog kidney passage levels. *Am J Trop Med Hyg* **33**, 666-71.

- Halstead, S. B., and O'Rourke, E. J. (1977a): Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* **265**, 739-41.
- Halstead, S. B., and O'Rourke, E. J. (1977b): Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* **146**, 201-17.
- Halstead, S. B., and Palumbo, N. E. (1973): Studies on the immunization of monkeys against dengue. II. Protection following inoculation of combinations of viruses. *Am J Trop Med Hyg* **22**, 375-81.
- Halstead, S. B., Porterfield, J. S., and O'Rourke, E. J. (1980): Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. *Am J Trop Med Hyg* **29**, 638-42.
- Halstead, S. B., Rojanasuphot, S., and Sangkawibha, N. (1983b): Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg* **32**, 154-6.
- Halstead, S. B., Venkateshan, C. N., Gentry, M. K., and Larsen, L. K. (1984b): Heterogeneity of infection enhancement of dengue 2 strains by monoclonal antibodies. *J Immunol* **132**, 1529-32.
- Ho, L. J., Wang, J. J., Shaio, M. F., Kao, C. L., Chang, D. M., Han, S. W., and Lai, J. H. (2001): Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol* **166**, 1499-506.
- Holmes, E. C., Worobey, M., and Rambaut, A. (1999): Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol Biol Evol* **16**, 405-9.
- Hotta, H., Hotta, S., and Homma, M. (1984): Effect of interferons on dengue virus multiplication in cultured monocytes/macrophages. *Biken J* **27**, 189-93.
- Hoyer-Hansen, G., Hamers, M. J., Pedersen, A. N., Nielsen, H. J., Brunner, N., Dano, K., and Stephens, R. W. (2000): Loss of ELISA specificity due to biotinylation of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* **235**, 91-9.
- Huang, Y. H., Lei, H. Y., Liu, H. S., Lin, Y. S., Liu, C. C., and Yeh, T. M. (2000): Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg* **63**, 71-5.
- Humphery-Smith, I., and Vincendeau, P. (1993): Absence of Fc receptors on *Aedes albopictus* C6/36 cells permissive for dengue virus 2. *Acta Virol* **37**, 202.
- Imbert, J. L., Guevara, P., Ramos-Castaneda, J., Ramos, C., and Sotelo, J. (1994): Dengue virus infects mouse cultured neurons but not astrocytes. *J Med Virol* **42**, 228-33.
- Ishak, R., Tovey, D. G., and Howard, C. R. (1988): Morphogenesis of yellow fever virus 17D in infected cell cultures. *J Gen Virol* **69 (Pt 2)**, 325-35.
- Johnson, B. W., Russell, B. J., and Lanciotti, R. S. (2005): Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* **43**, 4977-83.
- Kao, C. L., Wu, M. C., Chiu, Y. H., Lin, J. L., Wu, Y. C., Yueh, Y. Y., Chen, L. K., Shaio, M. F., and King, C. C. (2001): Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. *J Clin Microbiol* **39**, 3672-7.

- Khanna, M., Chaturvedi, U. C., Sharma, M. C., Pandey, V. C., and Mathur, A. (1990): Increased capillary permeability mediated by a dengue virus-induced lymphokine. *Immunology* **69**, 449-53.
- Khumthong, R., Angsuthanasombat, C., Panyim, S., and Katzenmeier, G. (2002): In vitro determination of dengue virus type 2 NS2B-NS3 protease activity with fluorescent peptide substrates. *J Biochem Mol Biol* **35**, 206-12.
- King, A. D., Nisalak, A., Kalayanrooj, S., Myint, K. S., Pattanapanyasat, K., Nimmannitya, S., and Innis, B. L. (1999): B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **30**, 718-28.
- Kliks, S. (1990): Antibody-enhanced infection of monocytes as the pathogenetic mechanism for severe dengue illness. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**, 993-8.
- Kliks, S. C., Nisalak, A., Brandt, W. E., Wahl, L., and Burke, D. S. (1989): Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* **40**, 444-51.
- Klungthong, C., Zhang, C., Mammen, M. P., Jr., Ubol, S., and Holmes, E. C. (2004): The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology* **329**, 168-79.
- Krishnamurti, C., Wahl, L. M., and Alving, B. M. (1989): Stimulation of plasminogen activator inhibitor activity in human monocytes infected with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* **40**, 102-7.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., and Strauss, J. H. (2002): Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**, 717-25.
- Kurane, I., Brinton, M. A., Samson, A. L., and Ennis, F. A. (1991): Dengue virus-specific, human CD4+ CD8- cytotoxic T-cell clones: multiple patterns of virus cross-reactivity recognized by NS3-specific T-cell clones. *J Virol* **65**, 1823-8.
- Kurane, I., and Ennis, F. A. (1988): Production of interferon alpha by dengue virus-infected human monocytes. *J Gen Virol* **69** (Pt 2), 445-9.
- Kurane, I., and Ennis, F. E. (1992): Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol* **4**, 121-7.
- Kurane, I., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Nisalak, A., Rothman, A. L., Livingston, P. G., Janus, J., and Ennis, F. A. (1990a): Human immune responses to dengue viruses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **21**, 658-62.
- Kurane, I., Kontny, U., Janus, J., and Ennis, F. A. (1990b): Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections. *Arch Virol* **110**, 91-101.
- Kurane, I., Rothman, A. L., Livingston, P. G., Green, S., Gagnon, S. J., Janus, J., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Nisalak, A., and Ennis, F. A. (1994): Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol Suppl* **9**, 59-64.
- Laille, M., Deubel, V., and Sainte-Marie, F. F. (1991): Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* **34**, 51-4.

- Lambeth, C. R., White, L. J., Johnston, R. E., and de Silva, A. M. (2005): Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *J Clin Microbiol* **43**, 3267-72.
- Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., and Vorndam, A. V. (1992): Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**, 545-51.
- Lanciotti, R. S., Gubler, D. J., and Trent, D. W. (1997): Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol* **78 (Pt 9)**, 2279-84.
- Lei, H. Y., Yeh, T. M., Liu, H. S., Lin, Y. S., Chen, S. H., and Liu, C. C. (2001): Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* **8**, 377-88.
- Leitmeyer, K. C., Vaughn, D. W., Watts, D. M., Salas, R., Villalobos, I., de, C., Ramos, C., and Rico-Hesse, R. (1999): Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* **73**, 4738-47.
- Leung, D., Schroder, K., White, H., Fang, N. X., Stoermer, M. J., Abbenante, G., Martin, J. L., Young, P. R., and Fairlie, D. P. (2001): Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. *J Biol Chem* **276**, 45762-71.
- Libraty, D. H., Young, P. R., Pickering, D., Endy, T. P., Kalayanarooj, S., Green, S., Vaughn, D. W., Nisalak, A., Ennis, F. A., and Rothman, A. L. (2002): High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **186**, 1165-8.
- Limon-Flores, A. Y., Perez-Tapia, M., Estrada-Garcia, I., Vaughan, G., Escobar-Gutierrez, A., Calderon-Amador, J., Herrera-Rodriguez, S. E., Brizuela-Garcia, A., Heras-Chavarria, M., Flores-Langarica, A., Cedillo-Barron, L., and Flores-Romo, L. (2005): Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. *Int J Exp Pathol* **86**, 323-34.
- Lin, Y. W., Wang, K. J., Lei, H. Y., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, H. S., Liu, C. C., and Chen, S. H. (2002): Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virol* **76**, 12242-9.
- Liu, C. C., Huang, K. J., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, H. S., and Lei, H. Y. (2002): Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection. *J Med Virol* **68**, 241-52.
- Liu, H. S., Lin, Y. L., and Chen, C. C. (1997): Comparison of various methods of detection of different forms of dengue virus type 2 RNA in cultured cells. *Acta Virol* **41**, 317-24.
- Lorono-Pino, M. A., Cropp, C. B., Farfan, J. A., Vorndam, A. V., Rodriguez-Angulo, E. M., Rosado-Paredes, E. P., Flores-Flores, L. F., Beaty, B. J., and Gubler, D. J. (1999): Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *Am J Trop Med Hyg* **61**, 725-30.
- Lorono-Pino, M. A., Farfan-Ale, J. A., Zapata-Peraza, A. L., Rosado-Paredes, E. P., Flores-Flores, L. F., Garcia-Rejon, J. E., Diaz, F. J., Blitvich, B. J., Andrade-Narvaez, M., Jimenez-Rios, E., Blair, C. D., Olson, K. E., Black, W. t., and

- Beaty, B. J. (2004): Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* **71**, 485-92.
- Malewicz, B., Anderson, L. E., Crilly, K., and Jenkin, H. M. (1985): Fetal rhesus monkey lung cells can be grown in serum-free medium for the replication of dengue-2 vaccine virus. *In Vitro Cell Dev Biol* **21**, 470-6.
- Mangada, M. N., and Igarashi, A. (1998): Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology* **244**, 458-66.
- Marchette, N. J., and Halstead, S. B. (1978): Phytohemagglutinin enhancement of dengue-2 virus replication in nonimmune rhesus monkey peripheral blood leukocytes. *Infect Immun* **19**, 40-5.
- Marchette, N. J., Halstead, S. B., and Chow, J. S. (1976): Replication of dengue viruses in cultures of peripheral blood leukocytes from dengue-immune rhesus monkeys. *J Infect Dis* **133**, 274-82.
- Marovich, M., Grouard-Vogel, G., Louder, M., Eller, M., Sun, W., Wu, S. J., Putvatana, R., Murphy, G., Tassaneeritthep, B., Burgess, T., Bix, D., Hayes, C., Schlesinger-Frankel, S., and Mascola, J. (2001): Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Invest Dermatol Symp Proc* **6**, 219-24.
- Marshall, J. S., King, C. A., and McCurdy, J. D. (2003): Mast cell cytokine and chemokine responses to bacterial and viral infection. *Curr Pharm Des* **9**, 11-24.
- Martinez-Barragan, J. J., and del Angel, R. M. (2001): Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J Virol* **75**, 7818-27.
- Martinez, R. A., Diaz, F. A., and Villar, L. A. (2005): [Evaluation of the World Health Organization clinical definition of dengue]. *Biomedica* **25**, 412-6.
- Mathew, A., Kurane, I., Rothman, A. L., Zeng, L. L., Brinton, M. A., and Ennis, F. A. (1996): Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. *J Clin Invest* **98**, 1684-91.
- Mentor, N. A., and Kurane, I. (1997): Dengue virus infection of human T lymphocytes. *Acta Virol* **41**, 175-6.
- Miller, S., Sparacio, S., and Bartenschlager, R. (2006): Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem* **281**, 8854-63.
- Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X. N., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., Sawasdivorn, S., Duangchinda, T., Dong, T., Rowland-Jones, S., Yenichitsomanus, P. T., McMichael, A., Malasit, P., and Screaton, G. (2003): Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* **9**, 921-7.
- Mongkolsapaya, J., Duangchinda, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S., Avirutnan, P., Jairungsri, A., Khemnu, N., Tangthawornchaikul, N., Chotiyarnwong, P., Sae-Jang, K., Koch, M., Jones, Y., McMichael, A., Xu, X., Malasit, P., and Screaton, G. (2006): T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol* **176**, 3821-9.

- Morens, D. M., Venkateshan, C. N., and Halstead, S. B. (1987): Dengue 4 virus monoclonal antibodies identify epitopes that mediate immune infection enhancement of dengue 2 viruses. *J Gen Virol* **68 (Pt 1)**, 91-8.
- Nagar, R., Chaturvedi, U. C., Mathur, A., and Kumar, A. (1986): Effect of dengue virus-induced cytotoxic factor on blood leucocytes of monkeys. *Indian J Med Res* **84**, 339-47.
- Navarrete-Espinosa, J., Gomez-Dantes, H., Celis-Quintal, J. G., and Vazquez-Martinez, J. L. (2005): Clinical profile of dengue hemorrhagic fever cases in Mexico. *Salud Publica Mex* **47**, 193-200.
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., and Despres, P. (2003): 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**, 723-8.
- Ng, M. L., and Corner, L. C. (1989): Detection of some dengue-2 virus antigens in infected cells using immuno-microscopy. *Arch Virol* **104**, 197-208.
- Nguyen, T. H., Nguyen, T. L., Lei, H. Y., Lin, Y. S., Le, B. L., Huang, K. J., Lin, C. F., Do, Q. H., Vu, T. Q., Lam, T. M., Yeh, T. M., Huang, J. H., Liu, C. C., and Halstead, S. B. (2006): Volume replacement in infants with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg* **74**, 684-91.
- Panyutich, A. V., Baturevich, E. A., Kolesnikova, T. S., and Ganz, T. (1993): The effect of biotinylation on the antigenic specificity of anti-defensin monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* **158**, 237-42.
- Peyrefitte, C. N., Pastorino, B., Grau, G. E., Lou, J., Tolou, H., and Couissinier-Paris, P. (2006): Dengue virus infection of human microvascular endothelial cells from different vascular beds promotes both common and specific functional changes. *J Med Virol* **78**, 229-42.
- Pires Neto, R. J., Lima, D. M., de Paula, S. O., Lima, C. M., Rocco, I. M., and Fonseca, B. A. (2005): Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Braz J Med Biol Res* **38**, 843-52.
- Pryor, M. J., Carr, J. M., Hocking, H., Davidson, A. D., Li, P., and Wright, P. J. (2001): Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* **65**, 427-34.
- Pryor, M. J., and Wright, P. J. (1993): The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. *Virology* **194**, 769-80.
- Puri, B., Nelson, W. M., Henchal, E. A., Hoke, C. H., Eckels, K. H., Dubois, D. R., Porter, K. R., and Hayes, C. G. (1997): Molecular analysis of dengue virus attenuation after serial passage in primary dog kidney cells. *J Gen Virol* **78 (Pt 9)**, 2287-91.
- Rachman, A., and Rinaldi, I. (2006): Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. *Acta Med Indones* **38**, 105-8.

- Ramos-Castaneda, J., Imbert, J. L., Ortega, A., and Ramos, C. (1994): Synaptophysin and neurofilament expression in neurons infected with dengue virus. *Arch Med Res* **25**, 215-7.
- Reyes-Del Valle, J., Chavez-Salinas, S., Medina, F., and Del Angel, R. M. (2005): Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* **79**, 4557-67.
- Rico-Hesse, R. (1990): Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* **174**, 479-93.
- Rico-Hesse, R. (2003): Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* **59**, 315-41.
- Rico-Hesse, R., Harrison, L. M., Nisalak, A., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Green, S., Rothman, A. L., and Ennis, F. A. (1998): Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **58**, 96-101.
- Rico-Hesse, R., Harrison, L. M., Salas, R. A., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C., Boshell, J., de Mesa, M. T., Nogueira, R. M., and da Rosa, A. T. (1997): Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* **230**, 244-51.
- Rigau-Perez, J. G. (2006): Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis* **6**, 297-302.
- Rosales-Leon, L., Ortega-Lule, G., and Ruiz-Ordaz, B. (2006): Analysis of the domain interactions between the protease and helicase of NS3 in dengue and hepatitis C virus. *J Mol Graph Model*.
- Rothman, A. L. (1997): Viral pathogenesis of dengue infections, pp. 245-271. In D. J. Gubler, and G. Kuno (Eds): *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, CABI Publishing, Cambridge, MA.
- Rothman, A. L., Kurane, I., Zhang, Y. M., Lai, C. J., and Ennis, F. A. (1989): Dengue virus-specific murine T-lymphocyte proliferation: serotype specificity and response to recombinant viral proteins. *J Virol* **63**, 2486-91.
- Ruiz, B. H., Sanchez, I., Ortega, G., Lopez, I., Rosales, L., and Medina, G. (2000): Phylogenetic comparison of the DEN-2 mexican isolate with other flavivirus. *Intervirology* **43**, 48-54.
- Salas-Benito, J. S., and del Angel, R. M. (1997): Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *J Virol* **71**, 7246-52.
- Sanchez-Burgos, G., Hernandez-Pando, R., Campbell, I. L., Ramos-Castaneda, J., and Ramos, C. (2004): Cytokine production in brain of mice experimentally infected with dengue virus. *Neuroreport* **15**, 37-42.
- Sanchez, V., Hessler, C., DeMonfort, A., Lang, J., and Guy, B. (2006): Comparison by flow cytometry of immune changes induced in human monocyte-derived dendritic cells upon infection with dengue 2 live-attenuated vaccine or 16681 parental strain. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**, 113-23.
- Sasao, F., Igarashi, A., and Fukai, K. (1980): Amino acid requirements for the growth of *Aedes albopictus* clone C6/36 cells and for the production of dengue and Chikungunya viruses in the infected cells. *Microbiol Immunol* **24**, 915-24.

- Scott, R. M., Nisalak, A., Cheamudon, U., Seridhoranakul, S., and Nimmannitya, S. (1980): Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **141**, 1-6.
- Shafee, N., and AbuBakar, S. (2002): Zinc accelerates dengue virus type 2-induced apoptosis in Vero cells. *FEBS Lett* **524**, 20-4.
- Shapira-Nahor, O., Marcus, H., Segall, H., Lubin, I., Slavin, S., Panet, A., and Reisner, Y. (1997): Human T cells recovered from human/Balb radiation chimeras are hypersensitive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **71**, 4495-501.
- Shresta, S., Kyle, J. L., Robert Beatty, P., and Harris, E. (2004): Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology* **319**, 262-73.
- Singh, U. B., and Seth, P. (2001): Use of nucleotide sequencing of the genomic cDNA fragments of the capsid/premembrane junction region for molecular epidemiology of dengue type 2 viruses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **32**, 326-35.
- Spaulding, A. C., Kurane, I., Ennis, F. A., and Rothman, A. L. (1999): Analysis of murine CD8(+) T-cell clones specific for the Dengue virus NS3 protein: flavivirus cross-reactivity and influence of infecting serotype. *J Virol* **73**, 398-403.
- Suharti, C., van Gorp, E. C., Dolmans, W. M., Setiati, T. E., Hack, C. E., Djokomoeljanto, R., and van der Meer, J. W. (2003): Cytokine patterns during dengue shock syndrome. *Eur Cytokine Netw* **14**, 172-7.
- Suharti, C., van Gorp, E. C., Setiati, T. E., Dolmans, W. M., Djokomoeljanto, R. J., Hack, C. E., ten, C. H., and van der Meer, J. W. (2002): The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost* **87**, 42-6.
- Suntharee, R., Charnchudhi, C., Sompop, A., Kanai, C., Igarashi, A., and Inouye, S. (1981): Isolation and identification of dengue viruses by combined use of C6/36 cells and the immune adherence hemagglutination test. *Jpn J Med Sci Biol* **34**, 375-9.
- Sydow, F. F., Santiago, M. A., Neves-Souza, P. C., Cerqueira, D. I., Gouvea, A. S., Lavatori, M. F., Bertho, A. L., and Kubelka, C. F. (2000): Comparison of dengue infection in human mononuclear leukocytes with mosquito C6/36 and mammalian Vero cells using flow cytometry to detect virus antigen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **95**, 483-9.
- Talavera, D., Castillo, A. M., Dominguez, M. C., Gutierrez, A. E., and Meza, I. (2004): IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol* **85**, 1801-13.
- Tassaneetrithep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D. L., Steinman, R. M., Schlesinger, S., and Marovich, M. A. (2003): DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* **197**, 823-9.

- Taweechaisupapong, S., Sriurairatana, S., Angsubhakorn, S., Yoksan, S., and Bhamarapavati, N. (1996): In vivo and in vitro studies on the morphological change in the monkey epidermal Langerhans cells following exposure to dengue 2 (16681) virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **27**, 664-72.
- Tolou, H. J., Couissinier-Paris, P., Durand, J. P., Mercier, V., de Pina, J. J., de Micco, P., Billoir, F., Charrel, R. N., and de Lamballerie, X. (2001): Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. *J Gen Virol* **82**, 1283-90.
- Uzcategui, N. Y., Camacho, D., Comach, G., Cuello de Uzcategui, R., Holmes, E. C., and Gould, E. A. (2001): Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol* **82**, 2945-53.
- Uzcategui, N. Y., Comach, G., Camacho, D., Salcedo, M., Cabello de Quintana, M., Jimenez, M., Sierra, G., Cuello de Uzcategui, R., James, W. S., Turner, S., Holmes, E. C., and Gould, E. A. (2003): Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol* **84**, 1569-75.
- van der Most, R. G., Murali-Krishna, K., and Ahmed, R. (2003): Prolonged presence of effector-memory CD8 T cells in the central nervous system after dengue virus encephalitis. *Int Immunol* **15**, 119-25.
- Vaughan, G., Olivera, H., Santos-Argumedo, L., Landa, A., Briseno, B., and Escobar-Gutierrez, A. (2002): Dengue virus replicative intermediate RNA detection by reverse transcription-PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**, 198-200.
- Vazquez, S., Pupo, M., Pelegrino, J. L., Morier, L., Castillo, A., Otero, A., and Guzman, M. G. (1995): [An immunoenzyme assay for the detection of monoclonal antibodies against the E and NS1 proteins of the dengue virus]. *Rev Cubana Med Trop* **47**, 122-6.
- Wang, S., He, R., Patarapotikul, J., Innis, B. L., and Anderson, R. (1995): Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology* **213**, 254-7.
- Wang, W. K., Chao, D. Y., Lin, S. R., King, C. C., and Chang, S. C. (2003): Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* **36**, 89-95.
- Wei, H. Y., Jiang, L. F., Fang, D. Y., and Guo, H. Y. (2003): Dengue virus type 2 infects human endothelial cells through binding of the viral envelope glycoprotein to cell surface polypeptides. *J Gen Virol* **84**, 3095-8.
- Welsh, R. M., and Rothman, A. L. (2003): Dengue immune response: low affinity, high febrility. *Nat Med* **9**, 820-2.
- WHO (1997): Clinical diagnosis, pp. 12-23: *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Winkler, G., Randolph, V. B., Cleaves, G. R., Ryan, T. E., and Stollar, V. (1988): Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology* **162**, 187-96.

- Worobey, M., Rambaut, A., and Holmes, E. C. (1999): Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7352-7.
- Wu, S. J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J. R., Brachtel, E., Putvatana, R., Louder, M. K., Filgueira, L., Marovich, M. A., Wong, H. K., Blauvelt, A., Murphy, G. S., Robb, M. L., Innes, B. L., Birx, D. L., Hayes, C. G., and Frankel, S. S. (2000): Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* **6**, 816-20.
- Zamree, I., Drakes, N., Rohani, A., and Lee, H. L. (2005): Sensitivity of *Aedes albopictus* C6/36 cells line for the detection and infectivity titration of dengue virus. *Trop Biomed* **22**, 217-9.