

64



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA DE
CELL-ELISA PARA DETECTAR MACROFAGOS DE
RATON INFECTADOS CON DENGUEVIRUS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
IRENE TORRES ACOSTA

ASESORA: Q. F. B. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ

282611



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.



VERDAD NACIONAL
AVANZA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

AT'N: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Implementación de una técnica de CELL-ELISA para detectar
macrófagos de ratón infectados con denguevirus.

que presenta la pasante: Irene Torres Acosta
con número de cuenta: 8754182-9 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 16 de febrero de 2000

- PRESIDENTE Q.B.P. Judith Martínez Zamitiz
- VOCAL Dra. Susana E. Mendoza Elvira
- SECRETARIO Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez
- PRIMER SUPLENTE M.enC. Victor M. Zendejas Buitrón
- SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. René Damián Santos

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS:

Porque nunca me ha abandonado en los tiempos de prueba y sufrimiento, porque sé que siempre esta presente a mi lado brindándome su apoyo, y porque Él es la fuerza que mueve mis acciones.

A MI PADRE: Rodolfo Torres Ponce

Por enseñarme que en la vida hay que hacerle mayor caso a las situaciones alegres y no a las tristezas que pudieran amargar nuestra existencia.

Por confiar en mí y darme su amor tan especial. Y sobre todo, GRACIAS por los buenos momentos.

A MI MADRE: Martha Acosta González.

Porque gracias a ella aprendí a conducirme por el camino del bien, y a ser como soy.

Por brindarme su apoyo en todos los aspectos, sus sabios consejos y por enseñarme que las cosas simples de la vida nos enseñan más que la escuela más prestigiosa.

A MIS AMIGOS:

**José C. Baxin Castellanos
Angélica Cruz Cruz
Antonio Guzmán
Marisa Martínez Sebastian
Gustavo Mirámon Peña
Jorge Mora Hernández
Claudia Rojas Hernández
Victoria Sosa Gómez
Patricia Revueltas Pellicer**

**Por su compañía salpicada de alegrías, reflexiones,
momentos difíciles compartidos, y más que nada por su apoyo
incondicional.**

A MI ASESORA:

ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

Por haberme brindado el apoyo y tiempo necesario para el desarrollo y terminación de esta tesis.

A RUBÉN RAMÍREZ GONZÁLEZ:

**Por su amor, cariño y comprensión. Porque
ha sabido darme su apoyo en cualquier momento.**

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	1
INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRAFICAS	3
INDICE DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN GENERAL	7
1. GENERALIDADES	9
1.1. Historia.	10
1.2. Características de los denguevirus.	11
1.2.1. Clasificación.	11
1.2.2. Agente etiológico de la infección con denguevirus.	12
1.2.3. Características microscópicas.	13
1.2.4. Características antigénicas.	16
1.2.5. Vectores.	17
1.3. Epidemiología.	20
1.4. Patogenia.	22
1.4.1. Fisiopatología.	22
1.4.2. Inmunopatología.	24
1.5. Diagnóstico.	27
1.6. Prevención y testigo.	32
1.7. Factores de riesgo.	33
1.8. Vacunas.	35
2. OBJETIVOS	38
2.1. Objetivo general.	39
2.2. Objetivos específicos.	39
3. MATERIAL Y MÉTODOS	40
Diagrama de flujo	40
3.1. Material.	41

3.1.1. Material biológico.	41
3.1.2. Material de laboratorio.	42
3.1.3. Aparatos.	43
3.1.4. Reactivos y soluciones.	44
3.2. Métodos.	45
3.2.1. Adaptación y propagación de los denguevirus en cultivos celulares.	45
3.2.1.1. Inoculación de los cultivos celulares con denguevirus.	45
3.2.1.2. Técnica de inmunofluorescencia directa.	46
3.2.1.3. Técnica de plaqueo para titulación viral.	47
3.2.1.4. Titulación viral por ELISA para captura de antígeno.	50
3.2.2. Inoculación viral en ratones.	52
3.2.2.1. ELISA para detección de IgG antidengue en sueros de ratón.	52
3.2.2.2. Separación de monocitos de sangre heparinizada con Ficoll-Hypaque.	55
3.2.3. Obtención y cultivo de macrófagos peritoneales.	56
3.2.4. Ensayo de CELL-ELISA.	57
3.2.5. Protocolo de infección de macrófagos con dengue 2.	60
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5. CONCLUSIONES	94
6. APÉNDICE	97
7. BIBLIOGRAFIA	104

INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRAFICAS

Cuadro 1. Clasificación de los flavivirus basado en la relación de sus complejos antigénicos establecidos por pruebas de neutralización cruzada con antisueros policlonales	12
Figura 1. Organización del genoma y regiones del RNA que codifican proteínas del virus del dengue	14
Cuadro 2. Proteínas de los denguevirus y su función	15
Figura 2. Figura esquemática de los viriones maduros e inmaduros	16
Figura 3. Mosquito del género <i>Aedes aegypti</i>	19
Figura 4. Mosquito del género <i>Aedes albopictus</i>	19
Figura 5. Diagrama que muestra la interacción de varios factores que pueden conllevar a la aparición del cuadro de FHD/SSD en sus formas epidémicas o endémicas	35
Figura 6. Mecanismo de la técnica de inmunofluorescencia directa.....	47
Figura 7. Esquema de la técnica de titulación viral por ELISA de captura de antígeno.....	51
Figura 8. Esquema de la técnica de ELISA para detección de IgG anti-dengue en suero de ratón.....	54
Figura 9. Esquema de la técnica de CELL-ELISA.....	59
Tabla 1. Resultados de la IF _D de los cultivos celulares infectados con denguevirus.....	62
Tabla 2. Resultados de la titulación viral por técnica de plaqueo empleando células BHK/21	64
Gráfica 1. Resultados de la titulación de los virus cosechados en el cuarto pase mediante ELISA de captura de antígeno.....	68
Cuadro 3. Cronograma de la cinética de infección <i>in vitro</i> con dengue 4 prototipo	70
Tabla 4. Resultados de la IF _D ; cinética de infección.....	71
Gráfica 2. Resultados del ELISA por captura de antígeno de la cinética de infección <i>in vitro</i> con dengue 4 prototipo que se practicó con los sobrenadantes de los tubos de cultivos celulares	72

Tabla 5. Resultado de la IF _D de practicada a sobrenadantes de cultivo celular en tubo, infectados con sueros de ratones inmunizados con denguevirus.....	75
Figura 6. Resultado del ensayo cualitativo de CELL-ELISA.....	77
Gráfica 3. Resultados de la prueba de CELL-ELISA para el día 1 después de la inoculación con denguevirus.....	79
Gráfica 4. Resultados de la prueba de CELL-ELISA para el día 2 después de la inoculación con denguevirus.....	82
Gráfica 5. Resultados de la prueba de CELL-ELISA para el día 3 después de la inoculación con denguevirus.....	83
Gráfica 6. Resultados de la prueba de CELL-ELISA para el día 4 después de la inoculación con denguevirus.....	84
Gráfica 7. Resultados de la prueba de CELL-ELISA para el día 5 después de la inoculación con denguevirus.....	85
Gráfica 8. Resultados de la prueba de CELL-ELISA practicada con macrófagos de ratones cepa BALB/C contra CD1 inmunizados con Den-2, al día 1 después de la infección con denguevirus.....	87
Gráfica 9. Resultados de la prueba de CELL-ELISA practicada con macrófagos de ratones cepa BALB/C contra CD1 inmunizados con Den-2, al día 2 después de la infección con denguevirus.....	88
Gráfica 10. Resultados de la prueba de CELL-ELISA practicada con macrófagos de ratones cepa BALB/C contra CD1 inmunizados con Den-2, al día 3 después de la infección con denguevirus.....	89
Gráfica 11. Resultados de la prueba de CELL-ELISA practicada con macrófagos de ratones cepa BALB/C contra CD1 inmunizados con Den-2, al día 4 después de la infección con denguevirus.....	90
Gráfica 12. Resultados de la prueba de CELL-ELISA practicada con macrófagos de ratones cepa BALB/C contra CD1 inmunizados con Den-2, al día 5 después de la infección con denguevirus.....	91

INDICE DE ABREVIATURAS

- INDRE. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico .
- ICTV. International Committee on Taxonomy of viruses.
- Den-1. Dengue serotipo 1.
- Den-2. *Dengue serotipo 2.*
- Den-3. Dengue serotipo 3.
- Den-4. Dengue serotipo 4.
- IF_D. Inmunofluorescencia directa.
- FA. Anticuerpos fluorescentes.
- DC. Dengue clásico.
- FHD. Fiebre hemorrágica del dengue. Dengue hemorrágico.
- SSD. *Síndrome de choque por dengue.*
- mm/Hg. Milímetros de mercurio.
- CID. Coagulación vascular diseminada.
- CD4. Linfocito T cooperador.
- CD8. Linfocitos T citotóxicos.
- TNF. Factor de necrosis tumoral.
- IL-6. Interleucina 6.
- IH. *Inhibición de la hemaglutinación.*
- ELISA. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Ensayo de inmunoabsorción enzimática.
- FC. Fijación de complemento.
- MAC-ELISA. Ensayo de inmunoabsorción enzimática utilizando anticuerpos monoclonales.
- PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- IgM. *Inmunoglobulina de la clase M.*
- PO₂. Presión de oxígeno.
- OMS. Organización Mundial de la Salud.
- EJ. Encefalitis japonesa.
- FA. Fiebre amarilla.
- PBS. Buffer de fosfatos-salina.
- ABTS. Sustrato 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina sulfonato).
- OPD. *Orto-fenilendiamina.*

SSB. Solución salina balanceada de Hanks.

CMC. Carboximetilcelulosa.

DMEM. Medio enriquecido modificado de Dulbecco.

CDC. Siglas en inglés del Centro de Testigo de Enfermedades (Testigo Disease Center) que se encuentra en Atlanta, Georgia.

MØ. Macrófago.

UFP. Unidades Formadoras de Placa.

CC. Cultivo Celular

RESUMEN GENERAL

Se trabajó con cultivos de células C6/36, los cuales se infectaron con Dengue 1, 2, 3 y 4 silvestres y prototipo, se hicieron pases virales subsecuentes y se practicó la prueba de IF_D a los sobrenadantes de los cultivos para comprobar la presencia del virus; para cuantificar el título viral se empleó la técnica de titulación por plaqueo utilizando cultivos de células BHK-21 y células VERO. También se utilizó la prueba de ELISA de captura de antígeno como otra alternativa para obtener el título viral.

Al serotipo que resultó con el título viral más alto se le practicó una cinética de infección *in vitro* utilizando tubos con cultivos de células C6/36 para tener un testigo de las condiciones apropiadas para el desarrollo de los denguevirus recuperados a partir de un cultivo celular.

Con la semilla viral, obtenida en las mejores condiciones (Den-2), se inocularon por vía intraperitoneal ratones susceptibles a la infección con denguevirus, a los cuales previamente se les tomó una pequeña muestra de sangre para utilizarla como testigo negativo. Una vez inoculados con Den-2, mediante punción cardíaca (hasta sangrar a blanco), se extrajo la mayor cantidad de sangre posible para ver si en un modelo murino es posible encontrar IgG en sangre periférica en los primeros días de infección. La muestra sanguínea se dividió en tres partes; una para ver si es posible obtener macrófagos circulantes mediante la técnica de Ficoll-Hypaque, otra parte para practicar un ELISA para detección de IgG antidengue y la última para infectar tubos con cultivo celular, porque se sabe que el virus se encuentra en circulación.

A los mismos ratones se les extrajeron macrófagos de la zona del peritoneo, los cuales se purificaron, para probar si es posible hacer una prueba de inmunoanálisis enzimático, donde se utiliza al antígeno propio de los denguevirus expuesto en la superficie de esta célula. En este ensayo denominado CELL-ELISA se buscó detectar la presencia de macrófagos infectados con denguevirus, fijando éstos a una placa de poliestireno donde, al adicionar un anticuerpo monoclonal, o bien sueros de pacientes que hayan presentado dengue, se produce una reacción antígeno-anticuerpo, este complejo es, a su vez, reconocido por un anticuerpo de ratón o humano anti IgG, según sea el caso, conjugado a la enzima peroxidasa, la cual se hace reaccionar con su sustrato correspondiente poniéndose de manifiesto la reacción.

En los ratones se evaluaron los días de incubación del virus necesarios para infectar los macrófagos, También se estimó el tiempo necesario para que éstos se adhieran a la placa de poliestireno, las diluciones óptimas de los sueros (diluciones de

IgG) para obtener buenos resultados y las diluciones adecuadas de las partículas virales (UFP/mL) inoculadas a los ratones. También se hizo el ensayo con dos cepas de ratones distintas: BALB/C y CD1 con el fin de evaluar cual es más susceptible a la infección con denguevirus.

Lo anterior fue con el propósito de evaluar la posibilidad de adaptar la enfermedad del dengue a un modelo murino para, posteriormente, estudiar algunas características inmunológicas de la enfermedad, y para contar con una prueba de diagnóstico más específica que tenga la capacidad de detectar antígenos presentados por el macrófago.

1. GENERALIDADES

1.1. HISTORIA

Las primeras noticias de dengue en América son de 1663 cuando los colonizadores franceses informaron de una extraña dolencia que llamaron *coupe de barre*. En 1780 B. Rush describió clínicamente la enfermedad del dengue por primera vez cuando sobrevino una gran epidemia en Filadelfia, Pensilvania, durante esa epidemia se empleó el término de *breakbone fever* o *dandy fever* para describir la enfermedad que ahora conocemos como dengue [1].

De 1826 a 1828 ocurrieron otras epidemias aún más graves de enfermedades similares al dengue en el sur de los Estados Unidos y en los estados de la cuenca del Caribe, lugar donde se introdujo a la literatura médica el vocablo "dengue" como una traducción del swahili: *dinga, dyenga* o *ki denga pepo* que describe "un golpe súbito o ataque repentino similar a un calambre, causado por un espíritu maligno"

Antiguamente se consideraba al dengue como una enfermedad con pocas consecuencias clínicas. A partir de 1906 se comenzó a comprender mejor la transmisión del dengue y se estableció que el vector que transmitía la enfermedad era el mosquito *Aedes aegypti*, posteriormente esto fue comprobado por Cleland y cols. en 1919 [6]. No fue sino hasta la década de 1940 - 1950 que se reconoció a la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y el síndrome de choque del dengue (SSD) como las más serias complicaciones causadas por el virus del dengue. Esto se comprobó gracias a que en estos años se adaptaron los virus de dengue a animales de laboratorio [1].

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS DENGUEVIRUS

1.2.1. CLASIFICACIÓN

El virus del dengue y sus cuatro serotipos han sido reclasificados (cuadro 1) junto con los otros miembros de este género (Alfavirus, Pestivirus y Rubivirus) en la Familia Flaviviridae , género Flavivirus dentro de los arbovirus del grupo B.

Antes de esta clasificación, el International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), en 1974 los clasificó dentro del género flavivirus, Familia Togaviridae . Sin embargo se reclasificaron tomando en cuenta las siguientes razones.

1.- En las células infectadas por flavivirus no se ha detectado RNA_m subgenómico de 26S que corresponde a la porción 3' del genoma que codifica para proteínas estructurales.

2.- En sistemas de traducción libres de células el RNA de los flavivirus genera sólo proteínas estructurales, mientras que el RNA genómico de los Alfavirus genera proteínas no estructurales.

3.- El tamaño de los Flavivirus es de aproximadamente 45 nm y el de los otros géneros 50-70 nm.

Basados en estos criterios se creó la Familia Flaviviridae (cuadro 1), la que incluye a más de 60 virus y la cual fue aprobada por el ICTV en 1984, el prefijo de la familia se deriva de *flavus* (amarillo) y refiere a la especie tipo, que es el virus de la fiebre amarilla.

El virus del dengue al ser igualmente un virus transmitido por artrópodos pertenece al grupo de los Arbovirus (subgrupo B). El término arbovirus (del inglés arthropod-borne viruses) agrupa a los agentes causales de algunas enfermedades epidémicas y enzoóticas más importantes de la patología infecciosa de origen viral [5].

FAMILIA:	FLAVIVIRIDAE
GENERO:	FLAVIVIRUS Fiebre amarilla Alfuy Apoi Vampiro Dakar Dengue 1, 2, 3, 4 Ilheus Encefalitis Japonesa Enfermedad del Bosque Kyansanur Encefalitis del Valle de Murray Fiebre Hemorrágica de Omsk Powassan Río Bravo Rocio Encefalitis de San Luis Vampiro de Entebbe Oeste del Nilo Zika Uganda Usutu 44 miembros más

FUENTE: Westaway EG. *Flaviviridae*. *Intervirology* 24:183-192 (1985)

Cuadro 1. Clasificación de los flavivirus.

1.2.2. AGENTE ETIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN CON DENGUEVIRUS

Los primeros estudios sobre el agente etiológico causante de la enfermedad de dengue se hicieron a partir de 1906, cuando Bancroft sugirió que dicho agente era transmitido por el mosquito *Aedes aegypti*. Un año después, Ashburn y Carrig encontraron que el agente etiológico era filtrable y ultramicroscópico. En 1919, Cleland y Col. confirmaron lo expuesto por Bancroft [6].

Sabin y col. lograron aislar por primera vez el virus en voluntarios inoculados con suero de pacientes [7]. Distinguieron dos serotipos diferentes (Hawái y New Guinea ahora llamados dengue 1 y dengue 2, respectivamente). Posteriormente, los virus dengue

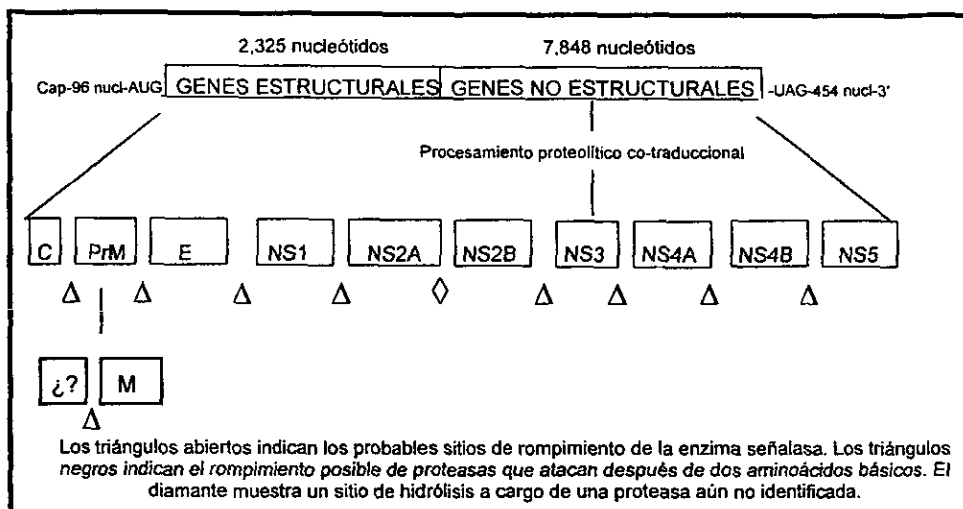
3 y dengue 4 fueron identificados a partir de cepas virales aisladas durante las epidemias de fiebre hemorrágica en las Filipinas por Hammon y cols.

Más adelante, Kimura y Hotta [8] fueron los primeros en reportar la adaptación de las cepas de denguevirus en ratones albinos suizos. Independientemente, Sabin y Schlesinger adaptaron las cepas Hawaii (dengue 1) en ratones de dos semanas de edad y demostraron que las cepas adaptadas mantenían las mismas características serológicas de las cepas silvestres. Sin embargo, observaron que algunos virus adaptados al ratón, estaban atenuados en cuanto a su capacidad para enfermar a humanos [9].

1.2.3. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Los flavivirus son pequeños virus esféricos de 45 a 55 nm de diámetro, su genoma es de RNA de cadena única, con peso molecular de 4 millones de daltones, su genoma se encuentra rodeado por una nucleocápside icosaédrica o isométrica de unos 30 nm de diámetro. A su vez, la nucleocápside está cubierta por una envoltura lipídica.

El RNA del virus del dengue (Figura 1) tiene un coeficiente de sedimentación de 42S, peso molecular de 3.3×10^6 y con extremo 5' cubierto; tiene una polaridad positiva y puede ser traducido *in vitro* [10]. El análisis de la secuencia del DNA_c, obtenido a partir del RNA usando transcriptasa inversa, fue primero realizada para el virus de la fiebre amarilla [11] y después se ha usado para secuenciar el de otros flavivirus: Den-1, Den-2, Den-3, Den-4, de la encefalitis japonesa, de la encefalitis del Oeste del Nilo y de la encefalitis de San Luis, entre otros.



Fuente: HENCHAL EA, PUTNAK JR. The dengue viruses. Clin. Microbiol Rev. 1990,3:376-396 [31].

FIGURA 1. Organización del genoma y regiones del RNA que codifican proteínas del virus del dengue 1.

El proceso por el cual los denguevirus y otros flavivirus adquieren su envoltura membranaral comienza cuando éstos emergen de la célula hospedera, tal vez a partir de las membranas del retículo endoplásmico [31]. Después de que el denguevirus penetra dentro de la célula ocurre la fusión con la membrana de la célula blanco. Se ha demostrado que la fusión esta regulada por proteínas de la envoltura viral [12].

Rice y col. [11] propusieron la nomenclatura para las proteínas de los flavivirus (Cuadro 2). El virión maduro contiene tres proteínas estructurales: proteína C de la nucleocápside o core; proteína M asociada a la membrana y proteína E de envoltura. Además, el virus intracelular inmaduro tiene la proteína prM, que es precursora de la proteína M (Fig. 2). Las proteínas virales derivan de un polipéptido precursor único o poliproteína.

NOMBRE	GLICOSILACION	KDa	FUNCION
C	no	13.5	Nucleocápside
prM	si	22	Precursora de la proteína M
M	no	8	Proteína de la membrana
E	si (1)	51-60	Proteína de la envoltura
Ns1	si	48	¿Ensamblaje viral?
NS2a	no	20	¿Procesadora de la NS1?
NS2b	no	14.5	Desconocida
NS3	no	70	Proteasa/¿NTPPasa?
NS4a	no	16	Desconocida
NS4b	no	27	Desconocida
NS5	no	105	¿RNA Polimerasa?

(1) La proteína E está glicosilada en los denguevirus, pero no en el resto de los flavivirus.

Cuadro 2. Proteínas de los denguevirus y su función

Los genes que codifican estas proteínas están en el extremo 5' del genoma, y abarcan un poco más de un cuarto de la capacidad del RNA viral y su orden es: C-prM(M)-E (Figura 1).

La glicoproteína E (51-60 kDa) es el componente principal de la envoltura y es un homotrímero. A esta molécula están asociados los dominios funcionales responsables de la neutralización del virus, de la hemaglutinación de eritrocitos de ganso, de la fusión celular y de la interacción con receptores específicos de la célula del hospedero

Se han identificado siete proteínas no estructurales: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5 (Cuadro 2). La NS1 es la que puede tener mayor importancia *inmunológica* puesto que las células infectadas que la expresan, se convierten en blanco para la citólisis inmunológica [12].

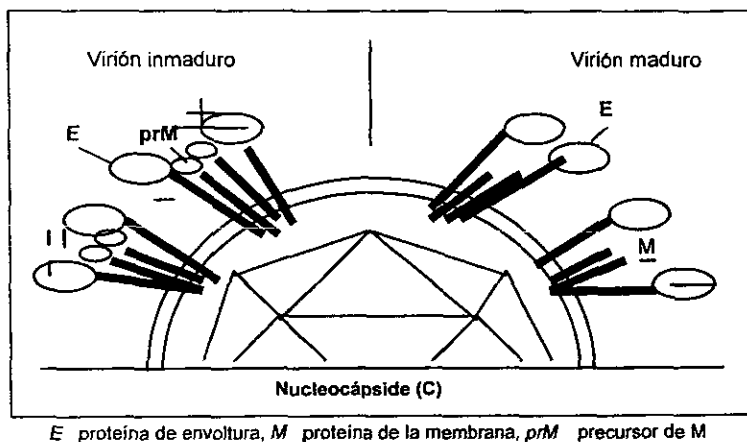


Figura 2. Figura esquemática de los viriones maduros e inmaduros.

1.2.4. CARACTERÍSTICAS ANTIGÉNICAS

El primer informe sobre epítomos específicos del complejo fue hecho por Smithburn [13]. Russell y col. hallaron un epítomo específico del complejo en la proteína no estructural NS1 (antígeno soluble fijador del complemento). Con un ensayo de neutralización por reducción en placa, De Madrid y Porterfield [14] definieron que los denguevirus y sus serotipos constituyen un complejo único de virus. Más adelante, Henchal y col. [15], usando anticuerpos monoclonales, identificaron un complejo de epítomos. Puesto que la FHD y el SSD sólo se han asociado con reacciones inmunológicas del complejo dengue, seguramente, estos determinantes juegan un papel importante en la Inmunopatología de la enfermedad [16].

1.2.5. VECTORES

En el Continente Americano, los vectores de los denguevirus son el *Aedes aegypti* (Fig. 3) y el *Aedes albopictus* (Fig. 4), aunque en México únicamente está presente el primero, en la mayoría del país, y el segundo en el norte del país.

Actualmente se conocen varias especies de vectores de denguevirus distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Todas son mosquitos de la familia Culicidae, género *Aedes*, concretamente especies del subgénero *Stegomyia* y del grupo *Stegomyia scutellaris*. La mayoría se distribuyen en Asia y África. El *Aedes aegypti* (Fig. 3) se considera como el vector principal.

Aedes aegypti es una especie originaria de la región etiope que se cree fue traída al Nuevo Mundo tan pronto se iniciaron los viajes europeos de exploración y de conquista [17].

Esta especie se encuentra distribuida en las áreas tropicales y subtropicales del mundo. Por su parte, la distribución está limitada altitudinalmente; cerca de la línea ecuatorial puede encontrarse a gran altura, por ejemplo en Colombia a 2,200 m con una temperatura media anual de 17° C. En zonas geográficas más alejadas del Ecuador, es raro que la especie se encuentre por encima de los 1,000 metros snm [18].

El *Aedes aegypti* es una especie predominantemente urbana, aunque se encuentra también en zonas suburbanas y rurales. Depositán sus huevecillos en áreas húmedas, no expuestas a la luz solar y sobre todo en agua limpia, también pueden desarrollarse y eclosionar en agua sucia o contaminada. Un sitio ideal para la reproducción del mosquito lo constituyen los desechos donde se acumula agua de lluvia [17].

Aedes aegypti adquiere la infección al picar a un individuo enfermo desde antes de la aparición de la fiebre y durante la etapa febril. Existe un periodo mínimo de 6 a 8

días necesarios para que el mosquito reproduzca al virus en su tubo digestivo y se vuelva infectante y capaz de transmitir la infección y funcionar como vector el resto de su vida.

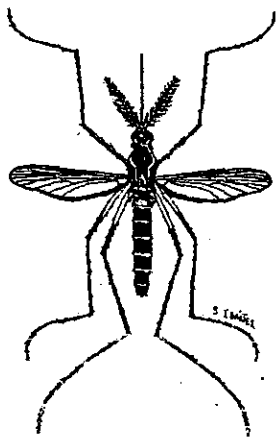


FIGURA 3. Hembra de *Aedes aegypti*. Vista dorsal

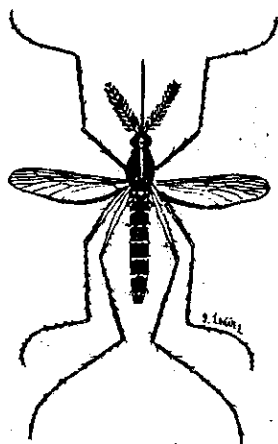


FIGURA 4. Hembra de *Aedes albopictus*. Vista dorsal.

1.3. EPIDEMIOLOGIA

Se desconocen los serotipos virales causantes de las primeras epidemias reportadas. Estudios serológicos en Panamá sugieren que el serotipo 2 fue el responsable del brote que ocurrió entre 1941-1942, aunque también estuvo presente el serotipo 3. El Dengue tipo 2 fue el primer virus aislado en la región americana (en Trinidad) en 1953.

En 1960, Hammon reportó el aislamiento de denguevirus de pacientes infectados en las Filipinas y subsecuentemente de pacientes en Bangkok [2].

El serotipo 3 fue el responsable de la mayor epidemia que se presentó a principios de la década de 1960, y el serotipo 2 durante la década de los sesenta y principios de la década de 1970.

En 1963, se realizó una campaña sanitaria emprendida por la Organización Panamericana de la Salud, logrando erradicar la fiebre amarilla en casi todo el Continente Americano. Gracias a esta campaña se eliminó casi totalmente el vector de dicha enfermedad, el mosquito *Aedes aegypti*. Sin embargo, cuatro años más tarde se volvió a detectar la presencia del vector.

En 1977 el dengue 1 se introdujo por primera vez a América, aunque, hay evidencias serológicas retrospectivas, que señalan que dicho serotipo pudo haber estado presente años atrás. El dengue virus se reintrodujo a México en diciembre de 1978 por la frontera sureste, importado de la epidemia de las islas del Caribe y los países de Centro América. En consecuencia, las costas de Chiapas se vieron afectadas por la enfermedad, la cual se propagó hacia la parte central del Istmo principalmente Ixtepec y Salina Cruz llegando a las costas del Golfo de México. Además, el virus también se introdujo a través de Belice y Quintana Roo. De 1980 a 1982 se reportaron brotes en 19 estados del país, y en 1983 ya eran 23 los estados afectados. En 1981 el virus ya se encontraba en Guerrero y en la parte sur de Sinaloa. En los siguientes seis años, la transmisión se

diseminó en la mayoría de los estados del país aislándose en las diferentes epidemias los serotipos 1,2 y 4.

En 1978 se presentó un brote de dengue clásico causado por el serotipo 1 en la ciudad de Tapachula, Chiapas, y poco tiempo después el padecimiento se había diseminado a todo el territorio nacional. Desde ese año y hasta 1997, 29 entidades federativas han reportado la ocurrencia de casos. El padecimiento se ha presentado ininterrumpidamente desde 1978 hasta la fecha, en 1980 se presentó el mayor número de casos (51,406), la tendencia ha sido a la disminución de casos [4].

La primera epidemia de FHD en América sucedió en Cuba en 1981 con 344,203 casos de dengue, 10,312 casos de dengue hemorrágico y sólo 158 defunciones. En México, de 1980 a 1993 se han reportado 25 casos de dengue hemorrágico [3]. El primer caso de dengue hemorrágico (DH) se presentó en 1984 en el estado de Yucatán.

En el año de 1994 se presentaron 30 casos (7 defunciones, tasa de letalidad de 23.3%). En agosto de 1995 el serotipo 3 penetró a la República Mexicana por el estado de Chiapas, afortunadamente, la patogenicidad de este serotipo no fue tan alta como se esperaba. Hasta la semana 47 de 1995 han ocurrido 266 casos con infección con Den-3 (161 confirmados, 105 en estudio, 21 defunciones, tasa de letalidad de 7.89%) .

El patrón de comportamiento de los casos indica un incremento durante los meses de octubre, noviembre y diciembre para 1994; en relación con 1995, el aumento inicia desde el mes de agosto aún cuando han ocurrido casos a lo largo de todo este año. En 1996 se registraron 19,835 casos de dengue clásico.

En 1997 se registraron 51166 casos de dengue clásico, doce estados han reportado la ocurrencia de casos de dengue hemorrágico y en diez de ellos se han presentado defunciones. Los estados con la mayor tasa de letalidad son Guerrero, Oaxaca y Veracruz . En 1998 hubo 23,129 casos confirmados de dengue clásico, hasta diciembre de 1999 se registraron 23,129 casos de dengue clásico [37].

1.4. PATOGENIA

Una vez que el vector deposita el virus en la piel, da inicio la replicación, lo mismo ocurre en el tejido linfático local.

En el dengue clásico sólo se han hecho estudios patológicos de la piel en sitios afectados por la erupción maculopapular o en las petequias, y se han encontrado cambios inespecíficos tales como edema endotelial y perivascular y, en las petequias, extravasación sanguínea [19].

1.4.1.- FISIOPATOLOGIA

Tal como ocurre en otras fiebres hemorrágicas virales, la célula blanco de los virus del dengue es el monocito o fagocito mononuclear, en cuyo interior se produce la replicación viral. Pero, a diferencia de las otras, en la FHD se produce un fenómeno inmunopatológico característico. Este consiste en un aumento de la infección mediado o favorecido por anticuerpos. O sea, la persona que tiene anticuerpos no neutralizantes contra alguno de los virus del dengue y resulta infectada por un nuevo virus (de un serotipo distinto al de la infección primaria) va a desarrollar una forma particular de inmunocomplejos (denguevirus/IgG) que van a facilitar la penetración de aquél en el fagocito mononuclear a través de receptor Fc. Esto va a resultar en una alta replicación viral, elevada viremia y la agresión del virus a muchas células del organismo. Esta inmunoamplificación del dengue durante una infección secundaria, confirmada en estudios seroepidemiológicos [20] y en el laboratorio [21] constituye el fundamento de la llamada teoría secuencial para explicar la FHD.

Los factores relacionados con el virus son muy importantes. Podría ser la capacidad de una determinada cepa viral de replicarse en los fagocitos mononucleares o de tener atributos antigénicos para optimizar la inmunoamplificación como antígeno de

superficie o sitios para su fijación y entrada al leucocito. Es por lo anterior, que es importante la caracterización de cada cepa viral, incluyendo su estudio genético[22].

Otros factores del hospedero, además de los anticuerpos heterotípicos preexistentes influyen y a veces determinan la aparición de la FHD: etnia, susceptibilidad genética, enfermedades crónicas infecciosas, así como la presencia de otros anticuerpos contra proteínas del virus, tanto de su envoltura (proteína E) como algunas no estructurales (NS3, NS5), también causan la inducción del interferon alfa y gama en los linfocitos humanos en respuesta a las células infectadas con los denguevirus [23].

Las hemorragias en el dengue son un fenómeno multicausal: diapédesis, trombocitopenia, alteración de los mecanismos de la coagulación y otros. Respecto a la trombocitopenia en particular, hoy se acepta que los mecanismos que la determinan en el curso de infecciones virales también pueden ser multifactoriales, entre ellos: a) la penetración del virus en las plaquetas o sus precursores los megacariocitos, los cuales ofrecen un medio adecuado para la replicación viral: mecanismo que en la década de los 60's fue propuesto para el dengue [24]; b) los virus pueden fijarse o adsorberse a las plaquetas provocando su agregación o degranulación, lo cual puede conducir a trombosis intravascular con depleción de plaquetas y factores de la coagulación y c) mecanismos de tipo inmunológico. El prototipo de un fenómeno hemorrágico inmuno-mediado en respuesta a la infección viral es la FHD [25]. Utilizando la inmunofluorescencia, se han encontrado inmunocomplejos antígeno dengue/inmunoglobulina G en las plaquetas hasta del 48% de los pacientes con FHD. Un alto porcentaje de estas plaquetas sensibilizadas son destruidas en el curso de una coagulación intravascular diseminada (CID), son removidas por el sistema macrófago/fagocítico, o se produce su lisis por la acción del complemento, tanto por activación de su vía clásica como por la alternativa.

La CID ha sido descrita en el dengue hemorrágico y considerada por varios autores como factor importante en la producción de sangrados.

Más recientemente se ha encontrado en pacientes con FHD anticuerpos de reacción cruzada contra el plasminógeno, los cuales podrían ser causa o contribuir a las hemorragias en las infecciones por dengue: se trata de anticuerpos contra la glicoproteína E de la envoltura del virus. El estudio de la secuencia de aminoácidos de esta proteína reveló grandes similitudes con las secuencias ya conocidas de una familia de factores de la coagulación, incluyendo la urokinasa, el factor X, la protrombina, el plasminógeno y su activador. Estos factores participan en la generación de fibrina o en la fibrinólisis [26].

Resumiendo, lo que va a caracterizar fisiopatológicamente al dengue hemorrágico o fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y lo va a diferenciar del dengue clásico es el aumento de la permeabilidad vascular. Esta va a ser también la causa del choque por dengue. Por eso, entre los criterios para considerar a un paciente como caso de FHD debe documentarse la hemoconcentración, bien mediante la elevación del hematócrito, la constatación de derrames serosos o la hipoalbuminemia, todos en corto tiempo de instalación y todos reversibles en horas o días. En el dengue clásico pueden aparecer sangrados, (generalmente discretos) y existir una disminución de la cifra de plaquetas, pero en el dengue hemorrágico la trombocitopenia es mucho más intensa, constatándose cifras iguales o inferiores a $100\ 000 \times \text{mm}^3$ [27].

1.4.2. INMUNOPATOLOGIA

Las infecciones virales son la principal causa de morbilidad y mortalidad en áreas tropicales y subtropicales del mundo. Los mecanismos inmunopatológicos en respuesta a estas infecciones pueden causar severas complicaciones, este es el caso de las infecciones por denguevirus, en efecto, la fiebre hemorrágica del dengue es una de estas complicaciones.

Como se dijo anteriormente, en infecciones primarias, el virus del dengue induce la formación de linfocitos T citotóxicos de memoria específicos de serotipo y también de

reacción cruzada entre serotipos. En las infecciones secundarias por denguevirus de distinto serotipo al que causó la infección primaria se produce una activación de linfocitos citotóxicos mucho más intensa y un número muy elevado de monocitos infectados. De aquí se hipotetiza que la rápida liberación de citocinas y mediadores químicos causada por la activación de células T y por la lisis mediada por los linfocitos T citotóxicos ocasiona la eliminación de plasma y las hemorragias que ocurren en la FHD.

Otra evidencia más de la activación de los linfocitos T es la presencia de Interleucina 2 e interferón gamma, los cuales se encuentran en infecciones de dengue. Es probable que la activación de monocitos y macrófagos en la FHD se deba a la acción del interferón gamma liberado por los linfocitos T [28].

También se activa el complemento con la correspondiente producción de anafilotóxicas (que contribuyen al síndrome de fuga capilar) y su acción final de lisis de células. Se han detectado partículas o antígenos virales en monocitos en riñón, tejido cutáneo, hígado, bazo, timo y pulmón, así como infiltrados mononucleares en las biopsias musculares de pacientes con mialgias durante el dengue. Los diferentes estados de diferenciación de una línea de células monocíticas influyen en su susceptibilidad a la infección por virus del dengue por lo que un posible mecanismo sería que los monocitos infectados participantes en la diapédesis por el aumento de la permeabilidad vascular pudieran diferenciarse lo suficiente durante este proceso como para liberar virus y citocinas en sitios localizados de los vasos sanguíneos. Todo lo anterior permitiría explicar la combinación variable de complicaciones sistémicas y localizadas en los pacientes con dengue hemorrágico con o sin choque por dengue [28].

También se han encontrado altos niveles de factor de necrosis tumoral (TNF) en pacientes con FHD [23], así como altos niveles de interleucina 6 (IL-6), la cual alcanza su máxima expresión entre el tercer y quinto día de la enfermedad. Los valores más altos de ambas citocinas coinciden con el tiempo y siempre se presentan el día del choque. Se

observa también que los niveles de IL-6 son normales un día antes y un día después del choque. En los adultos con FHD los niveles de TNF alfa e IL-6 son solamente moderadamente altos en comparación con los de los niños. Ambas citocinas son producidas por los monocitos/macrófagos y participan en la fisiopatología del choque, la sepsis, la meningococemia, la inflamación en general y la falla hepática fulminante.

Aunque el TNF alfa puede actuar como una molécula antiviral por ser capaz de proteger al hospedero del daño celular, se ha demostrado que es capaz de aumentar la permeabilidad vascular pulmonar [29] y participar en la interacción entre células inflamatorias y endoteliales, por lo cual, al menos algunas de las alteraciones clínicas y biológicas de la FHD pudieran explicarse por su acción. El TNF alfa y la IL-6 en niveles elevados están presentes en el choque por dengue y pudieran ser sus mediadores. Aunque los factores del hospedero como el genotipo y la edad pudieran influir en la producción de citocinas, los mecanismos encargados de la regulación de la respuesta al TNF aún no están debidamente aclarados, este aspecto pudiera influir en las particularidades de la evolución y pronóstico de cada paciente.

También en fecha reciente McGladdery y col. han encontrado niveles de óxido nítrico elevados en pacientes con FHD y/o choque por dengue, estadísticamente significativos respecto a los niveles de los pacientes que tenían fiebre por dengue solamente. Los autores consideran que el patrón de respuesta pudiera reflejar diferencias en la cinética de la respuesta individual de citocinas durante la inflamación aguda. El óxido nítrico se considera un mensajero intercelular, el cual en cantidades picomolares constituye un mediador de diversos procesos fisiológicos y en cantidades nanomolares, como respuesta a la estimulación por citocinas o endotoxinas, puede tener efectos fisiopatológicos graves como choque (en el síndrome séptico) y coma (en la malaria cerebral) [27].

1.5. DIAGNÓSTICO

Cabe mencionar, que el diagnóstico, clasificación y manejo de un caso probable de dengue en cualquiera de sus formas se basa en criterios clínicos, epidemiológicos y de laboratorio, a partir de cuadros probables según las definiciones operacionales.

Es muy importante diferenciar al dengue de otras infecciones virales o bacterianas cuando éste cursa por la etapa febril, teniendo en cuenta el cuadro clínico del paciente y las características epidemiológicas del lugar. Todas las enfermedades que cursan con fiebre y exantema pueden ser confundidas con el dengue.

El dengue tiene un periodo de incubación de 2 a 7 días y se inicia con el cuadro febril mencionado anteriormente. Las manifestaciones en los infantes se caracterizan por el cuadro febril, acompañado de enrojecimiento de la orofaringe, rinitis moderada, tos y molestias gastrointestinales leves, por lo que muchas veces se diagnostica como faringitis, influenza, sarampión u otras afecciones de vías respiratorias altas.

Debe tenerse en cuenta el carácter centrífugo del exantema del dengue a diferencia del sarampión y la rubéola en los cuales la erupción se extiende en sentido céfalo-caudal [27].

Para establecer un buen diagnóstico clínico conviene dividir la enfermedad causada por dengue en tres etapas: la etapa febril, la etapa crítica y la etapa de recuperación .

Generalmente la primera manifestación clínica es la fiebre de intensidad variable. La fiebre puede asociarse a cefalea o vómitos, así como dolores en el cuerpo como cualquier otra infección viral, sólo que en algunos pacientes adultos estos dolores son muy intensos. La fiebre puede durar de 2 a 7 días. En las primeras horas o días aparece exantema el cual generalmente tiene una distribución centrífuga y es de tipo rubeoliforme o escarlatiforme, sin características específicas.

Las manifestaciones antes mencionadas predominan durante las primeras 48 horas de enfermedad, por lo cual pudiéramos considerar esta como la etapa febril de la enfermedad, durante la cual no es posible conocer si el paciente va a permanecer con síntomas y signos de dengue clásico o si es apenas el comienzo de un dengue hemorrágico. A finales del segundo día o durante el tercer día pueden aparecer lesiones petequiales, sangrados en mucosa (epitaxis, gingivorragia, vómitos con pequeñas cantidades de sangre), melena y hematuria [27].

Entre el tercero y quinto día la fiebre desciende, el dolor abdominal aparece o se hace intenso y mantenido, se constata derrame pleural o ascítico, los vómitos aumentan en frecuencia y es esta la etapa crítica de la enfermedad por cuanto es el momento de mayor frecuencia de instalación del choque. Esta complicación es 4 ó 5 veces más frecuente que se presente en el momento de la caída de la fiebre o en las primeras 24 horas de la desaparición de ésta que durante la etapa febril de la enfermedad.

Más adelante puede instalarse un síndrome de distress respiratorio por edema pulmonar no cardiogénico con evidente ensombrecimiento del pronóstico.

La etapa de recuperación inicia después del choque, es aquí donde los sangrados disminuyen hasta desaparecer, el hidrotórax, ascitis o hidropericardio disminuyen rápidamente a la vez que la diuresis aumenta y se normaliza la función cardiovascular.

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones con denguevirus depende comúnmente del aislamiento del virus o bien, de la identificación de los anticuerpos específicos formados en respuesta al virus en cuestión.

Para la confirmación del diagnóstico etiológico se dispone de técnicas cuya utilización depende del momento de estudio del caso y los objetivos de la investigación.

En las infecciones primarias, el individuo afectado carece de anticuerpos específicos los cuales aparecen y aumentan paulatinamente en el curso de las primeras tres semanas de iniciado el cuadro febril. Estos anticuerpos pueden detectarse por las

técnicas de inhibición de la hemaglutinación (IH), de neutralización por reducción de placa y por ELISA.

La técnica de ELISA determina la presencia de IgM específica para dengue muy al inicio de la enfermedad o de IgG a partir de las dos primeras semanas de iniciado el cuadro. Si se busca cuantificar IgM por ELISA, se requieren dos muestras séricas, una colectada de preferencia en los cinco primeros días de iniciado el cuadro febril y otra 7 a 10 después de la fecha de inicio, o una tercera, tomada tres semanas después si se trata de otras determinaciones como IH, FC o neutralización. Es la técnica de primera elección para el diagnóstico, pero no identifica el serotipo del denguevirus causal.

La técnica de IH es útil para la cuantificación de IgG. La curva de anticuerpos IgG difiere si se trata de la primera infección por alguno de los serotipos del denguevirus o si es una infección sucesiva. En una infección primaria la respuesta es lenta, de poca intensidad y duración, mientras que en infecciones secundarias hay desarrollo rápido de anticuerpos con títulos elevados, y que persisten por más tiempo. Por lo tanto, para el diagnóstico de infección reciente por esta prueba se requiere la toma de muestras pareadas: una durante la primera semana de la enfermedad y la segunda en la cuarta semana de evolución.

Se requiere de muestra par cuando se trata de hacer diagnóstico, o de muestra única cuando se investiga el estado inmune. Un incremento o la seroconversión entre las dos muestras denota infección reciente. Un título que se conserva en las dos muestras denota infección pasada. Un resultado de <10 en ambas muestras, denota susceptibilidad a estos virus

Si las muestras son adecuadas, la técnica permite: a) establecer el diagnóstico de infección reciente, b) estimar si se trata de una primoinfección o infección secundaria, c) realizar estudios de seroprevalencia en la población, y por lo tanto, d) estimar el riesgo de presentación de formas graves [20].

En años recientes se han diseñado técnicas de Mac-ELISA [30] que cuantifica IgM específica para denguevirus; con esta prueba queda establecido sin lugar a dudas la distinción entre anticuerpos específicos IgM formados en la fase aguda, de los IgG de memoria, correspondientes a infecciones pasadas causadas por otro(s) serotipo(s); esta cualidad de la técnica es muy importante en el presente epidemiológico que vivimos en México, cuando en las comunidades están ocurriendo infecciones por los serotipos 2, 3 y 4, sobre infecciones pasadas causadas por el serotipo 1.

En algunas situaciones, las técnicas serológicas distinguen el serotipo causante de la infección, pero por lo general únicamente indican anticuerpos contra grupo y no para el serotipo. Esto último es de vital importancia pues el serotipo 4 de México se ha asociado ya con dengue hemorrágico, siendo necesario el diagnóstico precoz de la enfermedad más que nunca. Para definir el serotipo responsable de la infección es necesario aislar e identificar al virus.

Para la determinación de la presencia del virus y la identificación del serotipo se dispone del aislamiento viral en cultivos celulares y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Ya que la presencia del virus en la sangre es fugaz, para estas pruebas se requiere que las muestras para aislamiento sean tomadas antes del tercer día de haber iniciado el cuadro clínico y dentro de la primera semana para PCR. A partir del aislamiento viral es factible realizar la tipificación del genotipo, determinar su origen (topotipo) y la virulencia de la cepa [20].

Actualmente se han encontrado métodos de aislamiento que resultan ser más sensibles, tal es el caso de la inoculación intratorácica del virus en mosquitos del género *Aedes aegypti* o *T. splendens*, seguido de un periodo de incubación de 14 días a 30°C. De esta forma se logran detectar los antígenos en los mosquitos infectados mediante el

uso de anticuerpos monoclonales de referencia utilizando la técnica de inmunofluorescencia [20].

El continuo desarrollo de líneas celulares de mosquito simplifica enormemente el aislamiento del denguevirus. La línea clonada de *Aedes albopictus*, la C6/36, se desarrolló especialmente para obtener denguevirus y otros arbovirus con un alto título.

Mediante estos métodos se logra el aislamiento viral de un 20 a 65% de muestras serológicas de pacientes con dengue [20].

Los resultados serológicos pueden identificar infección reciente e infección pasada dependiendo la técnica empleada y de la clase de inmunoglobulinas que se está buscando. Los resultados serológicos en general pueden mostrar cruzamiento con infección con otros flavivirus que no son denguevirus, debido al gran cruce antigénico que existe entre ellos.

El empleo de reactivos cada vez más purificados, así como de anticuerpos monoclonales altamente específicos ayuda a solucionar este problema. Si se trata de ensayos inmunoenzimáticos, los resultados se dan en forma numérica señalando los valores de corte, o en forma literal como positivo y negativo según la interpretación de lo encontrado en las muestras.

Siempre que se encuentren anticuerpos IgM se tratará de una infección muy recientemente adquirida máximo de 6-8 semanas atrás. Se realiza el ensayo enzimático en muestra única.

1.6. PREVENCIÓN Y CONTROL

Para la prevención efectiva de las epidemias, el control debe ser continuo y permanente, sobre todo durante los periodos interepidémicos, cuando la densidad del mosquito es baja por la disminución de la precipitación pluvial y la menor disponibilidad de criaderos potenciales.

El enfoque del control debe dirigirse hacia el control del mosquito en sus diversas etapas de desarrollo. En primer lugar deben disminuirse los criaderos potenciales por medio de campañas de saneamiento básico y descacharrización, de preferencia antes y durante la época de lluvias. La participación comunitaria debe ser manifiesta y activa en esta fase del programa. Una vez disminuida la cantidad de criaderos para la oviposición, debe atacarse la fase larvaria por la aplicación de los insecticidas (Abate o Temephos) en todo recipiente que contenga agua.

Estas actividades deberán estar seguidas por las encuestas entomológicas que indicarán donde persisten altas densidades del vector y se requiere intensificar los esfuerzos. El ataque a la transmisión deberá enfocarse a la fase adulta realizando fumigaciones con Malatión a ultra bajo volumen.

Los altos costos y la dificultad técnica no favorecen el uso de insecticidas en el control de la transmisión pero esta actividad es necesaria cuando un brote o epidemia está en evolución [17].

1.7. FACTORES DE RIESGO.

Existen tres grupos de factores de riesgo que conllevan o predisponen a la aparición de la FHD/SSD en sus formas epidémicas o endémicas, éstos son los factores individuales, epidemiológicos y virales, los cuales hay que tomar en cuenta para delinear las futuras estrategias de vacunación y para planear las medidas de protección para evitar, hasta donde sea posible, que los individuos que son susceptibles no presenten las formas severas de la infección por denguevirus.

Los factores de riesgo individuales determinan la aparición de la FHD/SSD tanto en una persona en particular como en un grupo de personas de una población dada.

De las experiencias de epidemias pasadas (sobre todo la epidemia que hubo en Cuba en 1981 [32]), se han identificado los siguientes factores de riesgo individuales, tanto de casos severos como de casos fatales:

- preexistencia de anticuerpos antidengue;
- edad (mayor susceptibilidad en niños);
- sexo (alta frecuencia en mujeres adultas);
- raza (alta frecuencia en la raza caucásica); y
- enfermedades crónicas: *el asma, la anemia drepanocítica celular y la diabetes mellitus* son las enfermedades que con mayor frecuencia registran las personas (o que tengan antecedentes familiares de las mismas) que desarrollan los casos clínicos severos de dengue.

También es importante considerar la cepa del virus que circule durante una epidemia. En Cuba [32] se observó que el serotipo Den-2 se volvía más virulento en cuanto más pases sucesivos tenía en los hospederos humanos con el consiguiente incremento en la mortandad de los pacientes al final de la epidemia. El comportamiento de cada cepa viral será diferente según sean los factores individuales de cada persona o población dada.

La figura 5 muestra esquemáticamente la interacción que se puede dar entre los factores que predisponen la aparición de la FHD/SSD en sus formas epidémicas o endémicas. Si se da el caso de que se intercepten los tres grupos de factores de riesgo (área sombreada) se espera que el cuadro de FHD/SSD se presente en su forma epidémica.

En contraste, los casos esporádicos y las situaciones endémicas se dan cuando sólo algunas personas, o un grupo de la población presenta alguno de los factores de riesgo.

Lo anterior está de acuerdo con varios estudios epidemiológicos que se han hecho en los lugares donde se tuvieron epidemias y casos esporádicos del cuadro de FHD/SSD [32]

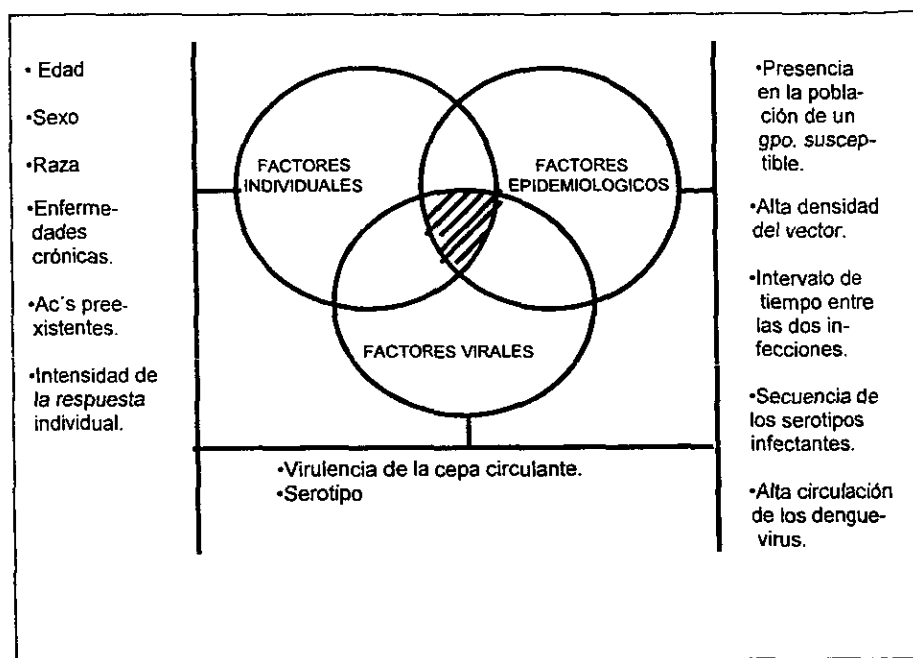


FIGURA 5. Diagrama que muestra la interacción de varios factores que pueden conllevar a la aparición del cuadro de FHD/SSD en sus formas epidémicas o endémicas.

1.8. VACUNAS

Desgraciadamente todavía no se cuenta con una vacuna específica que proteja contra la infección por denguevirus. Esto ha sido difícil aún en nuestros días, cuando se cuenta con grandes adelantos tecnológicos y de equipo y una abundante y eficiente colaboración internacional auspiciada por la OMS. Esta organización estableció en 1984 un "Programa de Desarrollo de Vacunas contra el Dengue" con el propósito de obtener una vacuna efectiva contra los cuatro serotipos y otra para la encefalitis japonesa (EJ), que juntos constituyen los principales problemas de salud en Asia. Este Comité ha alentado tanto la producción de vacunas de segunda generación usando tecnología de DNA recombinante como los programas de atenuación de virus por medio de los métodos

empíricos que ya han dado lugar a vacunas exitosas como es el caso de la protectora para la fiebre amarilla (FA).

Un primer enfoque para obtener una vacuna protectora es identificar una cepa inocua de reacción cruzada. Así, en 1988 Hoke y col. [33] estudiaron la inmunidad que se pudiera conferir para el dengue con el uso de la vacuna inactivada contra la EJ. En 65,224 niños vacunados con dos dosis de vacunas EJ, los índices de ataque para la FHD declinaron pero no significativamente y solamente se redujo la severidad de los casos de dengue. *Se concluyó que este procedimiento sólo puede tener un efecto benéfico limitado en la magnitud de la FHD.*

Una segunda opción son las vacunas inactivadas, las cuales no han podido desarrollarse debido a problemas en lograr la multiplicación eficiente de los virus en cultivos celulares certificados.

La tercera posibilidad son las vacunas con virus atenuados, sin embargo las cepas de este tipo obtenidas en los últimos 15 años, frecuentemente han resultado excesivamente atenuadas o, al contrario, no atenuadas.

Un serio problema con el uso de cualquier tipo de vacuna es que esta puede inducir una respuesta inmunológica que produzca anticuerpos que formen complejos con virus silvestres, éstos se asocian a receptores celulares para el Fc y así infecten fácilmente células diversas. El fenómeno descrito de *facilitación dependiente de anticuerpos*, se ha pensado que es fundamental en la patogénesis de la mayoría de los casos de FHD y SSD [34].

Como ejemplo de la obtención de una cepa atenuada vacunal, que además demuestra que no es labor fácil, es el trabajo realizado en 1984 por Halstead y col. [35] en el que describieron la variación en las características virales de una cepa de Den-4 a lo largo de su atenuación.

Un aspecto de gran importancia en el estudio de una vacuna para el dengue es que no resulte neurovirulenta, lo cual se ha tratado de medir por estudios en monos.

Una propiedad fundamental que debe caracterizar una buena vacuna contra el dengue es que produzca niveles bajos de viremia en los vacunados y que no pase a mosquitos vectores naturales que pudieran alimentarse en estos sujetos, con la subsecuente transmisión a otros individuos de una cepa que posiblemente pudiera haber revertido a su estado silvestre. Bancroft y col. [36] ensayaron la posibilidad de infectar mosquitos *Aedes aegypti* a partir de voluntarios que habían recibido experimentalmente una vacuna atenuada de Den-2 (PR159/S-1). Únicamente dos de 114 mosquitos que tomaron sangre virémica se infectaron con el virus vacunal. La cepa recuperada de los mosquitos y de la sangre de los voluntarios retuvieron sus características fenotípicas. Este experimento demostró que el vector puede infectarse naturalmente con virus vacunal y que retiene *in vitro* sus características.

2. OBJETIVOS

2. - OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

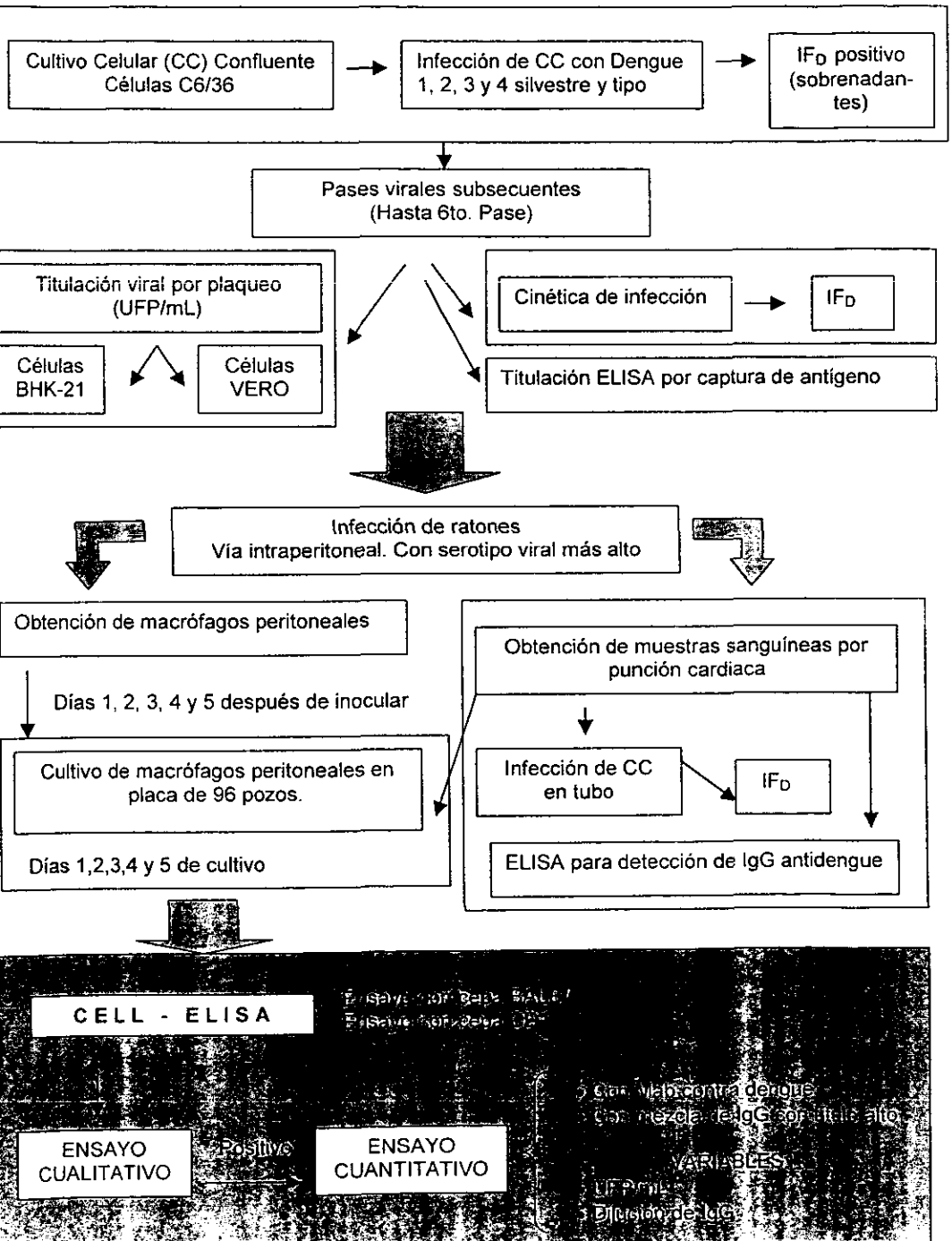
Replicar la enfermedad del dengue en un modelo murino que sirva posteriormente para estudiar los mecanismos inmunológicos que suceden a escala molecular durante una infección viral de este tipo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Llevar a cabo la infección de cultivos celulares de mosquito C6 /36 con virus del dengue, hasta lograr obtener semillas virales con un título alto apropiado para realizar una infección en ratones.
- Detectar macrófagos infectados con el virus del dengue en ratones que hayan sido previamente infectados por vía intraperitoneal; utilizando la técnica de CELL-ELISA para verificar si es posible detectar al antígeno propio del dengue.
- Evaluar experimentalmente las condiciones óptimas para el manejo de la técnica de CELL-ELISA.
- Determinar con qué cepa de ratones (BALB/C o CD1) se tiene mayor sensibilidad en la técnica de CELL-ELISA por su susceptibilidad a la infección.

3. MATERIAL Y METODOS

DIAGRAMA DE FLUJO



3.1. MATERIAL

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepas prototipo de Den-1 (Hawaii), 2 (New Guinea), 3(PR6) y 4 (H-241)*.
- Cepas silvestres de Den-1, 2, 3 y 4 (aislamientos obtenidos de pacientes en el INDRE).
- Anticuerpos monoclonales anti-dengue 1, 2, 3 y 4 *.
- Cultivos de células C6/36 (línea celular de mosquito *Aedes albopictus*).
- Cultivos de células BHK-21 (línea celular de riñón de hámster dorado sirio).
- Conjugado de antinflavivirus fluoresceinado *.
- Suero Fetal Bovino (GIBCO-BRL) .
- Medio de cultivo DMEM (medio mínimo esencial modificado por Dulbecco) adicionado con suero fetal bovino (SFB) clase: definido (GIBCO-BRL).
- Fluido ascítico hiperinmune contra dengue producido en ratón .
- Conjugado de anti-IgG sérico de ratón con peroxidasa (SIGMA).
- Conjugado de anti-IgG sérico de humano con peroxidasa (SIGMA).
- Antígeno de dengue preparado en cerebro de ratón lactante titulado por UHA. *
- Ratones machos adultos cepa CD1 y BALB/C de 20 a 30 g.

* Proporcionados por el CDC de Atlanta, Georgia.

3.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Pipetas estériles de 1, 2, 5 y 10 mL
- Vasos de precipitados de 50, 150, 250, 500 y 1000 mL
- Matraces volumétricos de 100, 250, 500, 1000 y 2000 mL
- Matraces erlenmeyer de 125, 250, 500 y 1000 mL.
- Probetas graduadas de 50, 100, 500, 1000 y 2000 mL.
- Tubos de ensaye de 13 x 100 de vidrio borosilicato.
- Viales de vidrio con tapón de rosca.
- Jeringas desechables de 1, 5 y 10 mL.
- Tubos graduados de plástico para centrifuga de 15 y 50 mL (fondo cónico).
- Bulbos de goma y perilla de seguridad.
- Placas de poliestireno de 24 pozos.
- Microplacas de poliestireno de 96 pozos tratadas para cultivo celular.
- Botellas para cultivo celular de 25, 75 y 150 cm² de área.
- Portaobjetos para FA (con pozos y cubierta de teflón) y cubreobjetos.
- Cámara húmeda.
- Vasos de Kopic.
- Cámara de lavado.
- Tubos Eppendorf de 0.5 y 1 mL.
- Micropipetas calibradas de 10, 50, 100, 200, 1000 y 6 x 200 µL.
- Equipo de disección.

3.1.3. APARATOS

- Autoclave (FAMSA Mod. GE3).
- Campana de flujo laminar (Forma Scientific Inc. Mod. 1100).
- Refrigerador a 4° C (Lab. Line Instruments, Inc. Frigid Cab).
- Ultracongelador a -70° C (REVCO Mod. A8520 UUV).
- Balanza analítica (Mettler H31) y granataria (Sartorius Basic Mod. BA 4100).
- Vortex (American Scientific Products. Mod. 58223-1).
- Microscopio de luz ultravioleta (Olympus BH2).
- Microscopio invertido (Zeiss).
- Microscopio óptico (Iroscope mod. M6-11PL).
- Centrifuga clínica (International Equipment Co. mod. K).
- Centrifuga refrigerada (Damon/IEC Division mod. DPR-6000).
- Horno de microondas (Goldstar).
- Agitador magnético (Corning mod. PC-353 Stirrer).
- Incubadora a 37 y 28° C (Precision Scientific mod. 6M).
- Incubadora con atmósfera de CO₂.
- Potenciómetro (Corning mod. pH 2000 plus).
- Lector de placas de ELISA (Bio-Rad mod. 3550).
- Impresora para lector de ELISA (Datapac mod. DP002).
- Pipeta automática (Drummond Scientific Co.).

3.1.4. REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Benzal al 10% con alcohol al 70%.

- PBS pH=7.2, 7.4 y 7.9.
- Acetona fría (4° C).
- Glicerol amortiguado.
- Tripsina-verseno (0.25%-0.5%).
- Carboximetilcelulosa al 3%.
- Naftol azul-negro (0.09%).
- PBS-gelatina pH=7.4 al 0.5 y 5%.
- PBS-tween pH=7.4 al 0.05%.
- Buffer de carbonatos a pH de 9.6, 0.1 M.
- Solución Salina Balanceada de Hanks y sol. salina fisiológica.
- Leche descremada en polvo.
- Sustrato de OPD (orto-fenilendiamina) con H_2O_2 o sustrato de ABTS (2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina sulfonato con H_2O_2).
- Acido citrico 0.1 M
- Citrato de sodio 0.1 M.
- Acido sulfúrico 2N.
- Eter
- Cloruro de amonio 0.17 M.
- Soln. de formol al 38% en PBS.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1 ADAPTACION Y PROPAGACION DE LOS VIRUS DEL DENGUE EN CULTIVO CELULAR.

El continuo desarrollo de líneas celulares de mosquito simplifica enormemente el aislamiento de los denguevirus. La línea clonada de *Aedes albopictus*, la C6/36, se desarrolló especialmente para obtener denguevirus y otros arbovirus con un alto título.

3.2.1.1. INOCULACION DE LOS CULTIVOS CELULARES CON DENGUEVIRUS

PROCEDIMIENTO

1. Se trabaja con células C6/36 (monocapa confluyente) y se les decanta el medio viejo (medio de crecimiento) y se inoculan con 1 mL de muestra (suero estéril como testigo (-) o virus a propagar).
2. Se elaboran botellas testigo:
 - a) Positivos: Se inocula una botella con cualquier serotipo de virus del dengue.
 - b) Negativos: Se incuba una botella de cultivo celular sin inocular.
3. Dejar que los virus se adsorban durante 2 horas a temperatura ambiente.
4. Agregar 5 mL de medio DMEM con 2% de suero fetal bovino a cada botella. Incubar a 28°C.
5. Al tercer día lavar y cambiar el medio por DMEM con 2% de suero fetal bovino y dejar hasta 7 días.
6. Se recomienda realizar prueba de inmunofluorescencia directa para comprobar la presencia del virus.

Pase viral:

7. Separar la monocapa celular con agitación fuerte.
8. Agregar a cada botella 0.5 mL de bicarbonato de sodio al 7.5% para elevar el pH.
9. Congelar y descongelar las botellas para liberar el virus y cosechar.

10. Inocular con la cosecha una nueva botella con células C6/36 (monocapa confluyente) y repetir los pasos anteriores hasta la nueva cosecha.

3.2.1.2.- INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

FUNDAMENTO

El principio de esta técnica es el mismo que para otros procedimientos inmunológicos que incluyen reacciones antígeno-anticuerpo. En este caso, las moléculas de anticuerpos se conjugan químicamente a los fluorocromos sin destruirse su especificidad inmunológica, y cuando se ponen en contacto con el antígeno homólogo se produce la reacción antígeno-anticuerpo. A la observación en el microscopio de luz ultravioleta, el complejo emite un color fluorescente que dependerá del fluorocromo empleado para conjugar los anticuerpos (Figura 6).

PROCEDIMIENTO

1. Tomar alicuotas de 1 mL de células infectadas de cada serotipo y colocarlos en tubos Eppendorf.
2. Centrifugar a 1500 r.p.m., 10 a 15 min. para concentrar.
3. Eliminar casi todo el sobrenadante (únicamente dejar un poco para resuspender la pastilla).
4. Colocar 12 μ L en cada pozo de los cubreobjetos con lámina de teflón y dejar que las gotas se sequen (aproximadamente 20 min).
5. En cada placa de FA, montar un testigo positivo (virus de dengue prototipo) y un testigo negativo el cual se prepara con cultivo celular no infectado.
6. Fijar con acetona fría (a 4° C) 20 min. Se deja secar al aire.
7. Colocar 10 a 12 μ L del conjugado fluoresceína-anti-flavivirus en cada pozo y se

incuba a 37° C en cámara húmeda. Se deja secar al aire.

8. Se lava con PBS pH=7.5 durante 15 minutos con agitación suave y constante.
9. Encender el microscopio de luz ultravioleta, 15 min. antes de la lectura. Se monta la laminilla para realizar la lectura colocando dos gotas de glicerol amortiguado (PBS-glicerina al 10%) con un cubreobjetos encima cuidando que no se formen burbujas. Interpretar resultados de acuerdo a los testigos.

T (+) células teñidas con el fluorocromo.

T (-) células no teñidas con el fluorocromo.

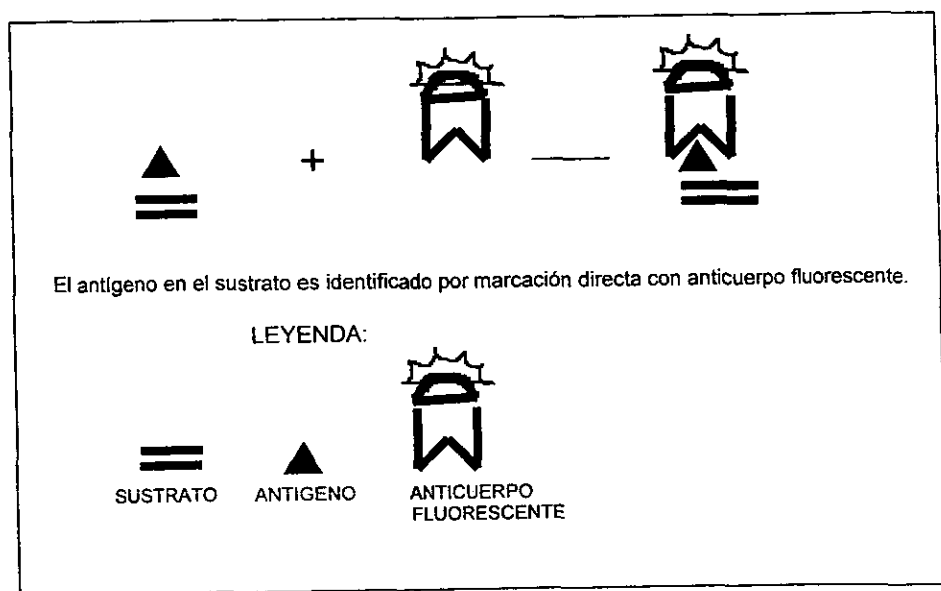


FIGURA 6. Mecanismo de la técnica de inmunofluorescencia directa.

3.2.1.3. TECNICA DE PLAQUEO PARA TITULACION VIRAL

FUNDAMENTO

Los virus citopáticos (aquellos que causan destrucción celular) forman placas o lesiones locales en varios sistemas indicadores tales como cultivos celulares (C.C.). El

número de placas que se formen será proporcional a la cantidad del virus presente.

La formación de placas se hará evidente gracias a la tinción previa de las células de la monocapa con colorantes vitales tales como el naftol azul-negro.

Si al virus estudiado se le da tiempo de que cause la destrucción celular y éste se mantiene con un medio de crecimiento adecuado se obtendrán buenos resultados.

PROCEDIMIENTO

Propagación de células BHK-21.

1. Descartar medio con monocapa confluyente de células crecidas (5 a 7 días).
2. Lavar con PBS a pH de 7.95.
3. Añadir de 3 a 5 mL de tripsina verseno (0.25%-0.5%).
4. Agregar 10 mL de medio de crecimiento (DMEM con 10% SFB).
5. Desprender las células de la botella usando pipeta.
6. Colocar la suspensión en un matraz Erlenmeyer con agitación leve continua.
7. Contar las células y ajustar la suspensión con 3 a 4 x 10⁵ células para una botella de 75 cm² más 30 mL de medio de crecimiento para obtener una concentración final de aproximadamente 10⁵ células por mL.
8. Incubar a 37 °C en atmósfera de CO₂ durante 5 a 7 días.

Preparación de la suspensión de células

1. Calcular la concentración para 3 x 10⁵ células/mL para 0.5 mL/pozo x 24 pozos por placa.
2. Se requieren 12 mL/placa + 1 mL = 13 mL/placa
3. Cuenta celular:

$$\frac{\text{Promedio celular} \times 10\,000 \text{ (factor cámara)} \times 10 \text{ (dil. con colorante)}}{\text{Número de células deseado}} = \text{Factor de dilución para la suspensión (con medio de crecimiento)}$$

INOCULACION

- 4.-Hacer la dilución, calculando el volumen y el número de células a utilizar.
- 5.-Inocular las células en la placa de 24 pozos e incubar 37 °C en atmósfera de CO₂ durante 5 a 7 días.

TITULACION

1. Trabajar en baño de hielo.
2. Preparar una serie de tubos por cada virus a titular marcados con 10⁻¹ a 10⁻⁶ o más alta.
3. Hacer diluciones decimales 0.1 + 0.9 mL con PBS al 0.5% de gelatina, pH= 7.95.
4. Descongelar rápidamente un vial de virus stock en baño María a 37°C y mezclar en vortex.
5. Tomar 100 µL para hacer diluciones descartando pipeta cada vez.
6. Usar 3 a 4 pozos por dilución del virus.
7. Inocular 50 µL de dilución por cada pozo de células.
8. Incubar 4 horas a 37 °C en 5% de CO₂.
9. Poner una capa de medio con carboximetilcelulosa sobre una charola con hipoclorito de calcio o de sodio y lavar con agua llenando los pozos.
10. Tefir los pozos con naftol azul-negro 0.5 mL/pozo.
11. Después de 4 horas a temperatura ambiente, lavar la placa con agua.
12. Contar el número de placas.
13. El título viral se lee en la dilución en donde se cuentan alrededor de 20 placas o más .

NOTA: También se hace la titulación viral por el ensayo de ELISA para captura de antígeno, para verificar con cual se obtienen mejores resultados.

Una vez que se tiene un título alto del virus (10⁻³) se procederá a inocular el lote de ratones.

3.2.1.4 TITULACIÓN VIRAL POR ELISA PARA CAPTURA DE ANTÍGENO

FUNDAMENTO

Se utiliza un anticuerpo anti-dengue obtenido de fluido ascítico hiperinmune (FAH) de ratón que se fija a los pozos de la placa de poliestireno, y luego se adicionan los sobrenadantes de los C.C. en diluciones triples (1:3 a 1:243), se incuban y se elimina el exceso de reactivos con lavados, las reacciones Ac-Ag (Ac antidengue-Ag de dengue presente en los sobrenadantes de los C. C.) que ocurren no son eliminadas por el lavado y quedan fijas en el pozo. Cuando se agregan anticuerpos anti-dengue conjugados con peroxidasa, ocurre otra segunda reacción que se hace visible gracias a la adición del sustrato que contiene H_2O_2 que reacciona con la peroxidasa para dar un compuesto colorido que se lee espectrofotométricamente (figura 7).

PROCEDIMIENTO

1. Lavar la placa una vez con PBS o agua destilada. Secar con un golpe leve.
2. Sensibilizar la placa con 100 μ L de FAH contra dengue, diluido 1:5000 en buffer de carbonatos 0.1 M a pH de 9.6. Incubar 2 hrs. a 37°C o toda la noche a 4°C.
3. Lavar la placa 3 veces con PBS.
4. Hacer diluciones seriadas del sobrenadante del cultivo que se titulará con factor 1:3 (hasta 1:243) en PBS-tween y colocar 100 μ L de cada dilución (hacerlo por duplicado). Incubar 3 hrs a 37°C.
5. Lavar como en el paso 3.
6. Agregar el conjugado (antidengue-peroxidasa) diluido 1:6000 en PBS-tween e incubar 2 hrs. a 37°C.
7. Lavar como en el paso 3.
8. Agregar 100 μ L de sustrato H_2O_2 /ABTS e incubar 30 min. a temperatura ambiente.
9. Colocar también un testigo negativo (células sin infectar) y uno positivo (antígeno

conocido diluido 1:10 inicialmente y luego con el factor 1:3 (hasta 1:243).

10. Leer a una longitud de onda de 410 nm. en un lector de ELISA.

10. Interpretación: la prueba es positiva si en la quinta dilución (1:81) se obtiene una lectura de 0.1.

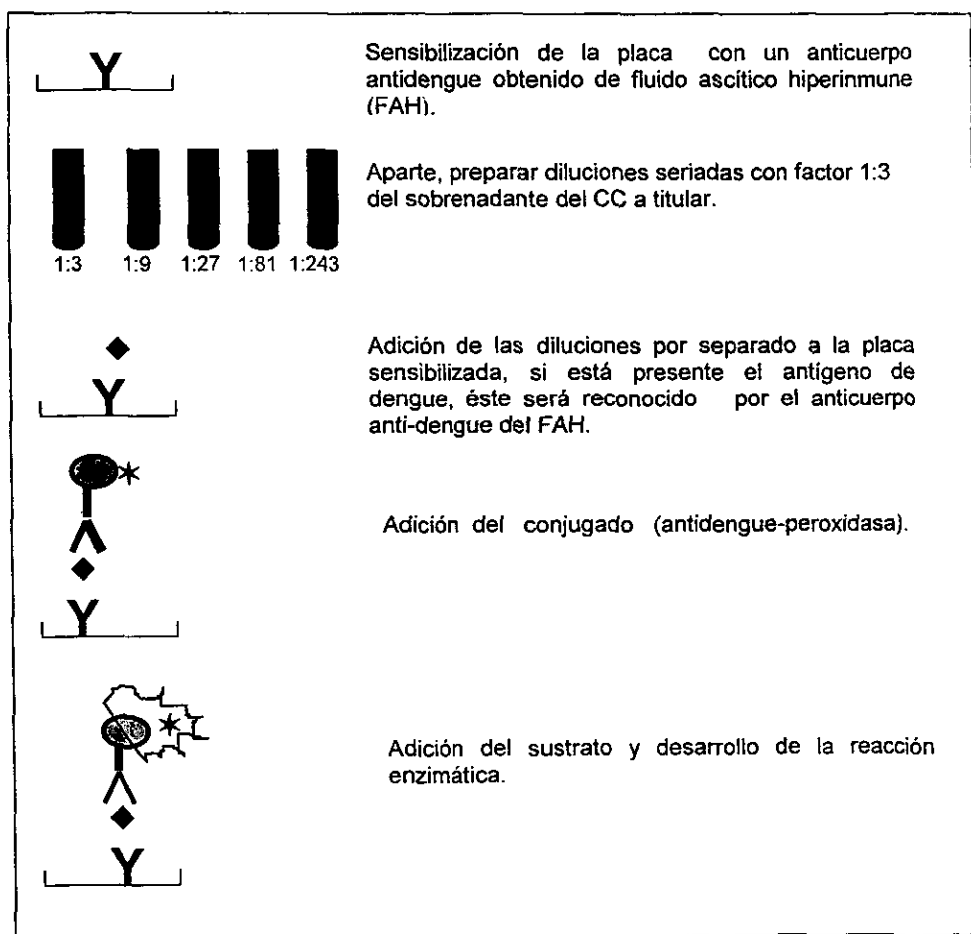


FIGURA 7. Esquema de la técnica de titulación viral por ELISA de captura de antígeno.

3.2.2. INOCULACION VIRAL EN RATONES.

La inoculación de los denguevirus se realizará por la vía intraperitoneal, utilizando el serotipo viral con más cuenta de partículas.

PROCEDIMIENTO

1. Desinfectar la zona del peritoneo del ratón donde se hará la punción.
2. Inocular a los ratones con 100 μ L de suspensión viral.

3.2.2.1.- ELISA PARA DETECCION DE IgG ANTI-DENGUE EN SUERO DE RATON

FUNDAMENTO:

Se utiliza un anticuerpo anti-dengue obtenido de fluido ascítico hiperinmune (FAH) de ratón que se fija a los pozos de la placa de poliestireno, y luego de bloquear los sitios inespecíficos de la placa con SFT se adiciona un antígeno de dengue preparado en cerebro de ratón lactante, posteriormente se agregan los sueros problemas, se incuban y se elimina el exceso de reactivos con lavados, las reacciones Ac-Ag-Ac (Ac antidengue-Ag de dengue-Ac IgG del suero) que ocurren no son eliminadas por el lavado y quedan fijas en el pozo. Cuando se agregan anti-anticuerpos anti-IgG marcados con peroxidasa, ocurre otra reacción que se hace visible gracias a la adición del sustrato de OPD que contiene H_2O_2 que reacciona con la peroxidasa para dar un compuesto de color amarillo que se lee espectrofotométricamente (figura 8).

PROCEDIMIENTO.

1. Lavar la placa una vez con PBS o agua destilada. Secar la placa con un golpe leve.
2. Sensibilizar añadiendo a cada pozo 100 μ L de FAH diluido en buffer de carbonatos.
3. Incubar toda la noche a 4° C. Almacenar hasta 10 días.
4. Lavar las placas 3 veces con PBS.
5. Bloquear llenando los pozos con 300 μ L de SFT al 3% en PBS-tween 0.05% e incubar por 1 hora a 37°C.

6. Diluir el antígeno (preparado en cerebro de ratón lactante y titulado por UHA) en SFT al 3% en PBS-Tween 0.05% y adicionar 100 μ L a cada pozo.
7. Incubar 1 hora a 37°C.
8. Lavar las placas 3 veces con PBS.
9. Diluir la muestra (suero de ratón) en PBS-Tween al 3% de leche y adicionar 100 μ L a cada pozo.
10. Incubar 1 hora a 37°C.
11. Lavar las placas tres veces con PBS.
12. Diluir Anti-IgG antiratón conjugado a peroxidasa 1:15000 en PBS- Tween Leche al 3% y añadir 100 μ L del conjugado a cada pozo.
13. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente.
14. Lavar las placas 6 veces con PBS.
15. Agregar 100 μ L de sustrato OPD (4 mg de o-fenilendiamina, 5 mL de citrato de sodio 0.1 M, 5 mL de ácido cítrico 0.1 M y 4 μ L de H_2O_2) a cada pozo.
16. Dejar desarrollar el color a temperatura ambiente.
17. Leer las placas a 490 nm. Cada dilución de los sueros probados es blanqueada contra la dilución correspondiente del testigo negativo.
18. Se utiliza como testigo positivo un suero de ratón que tiene un título conocido de IgG.

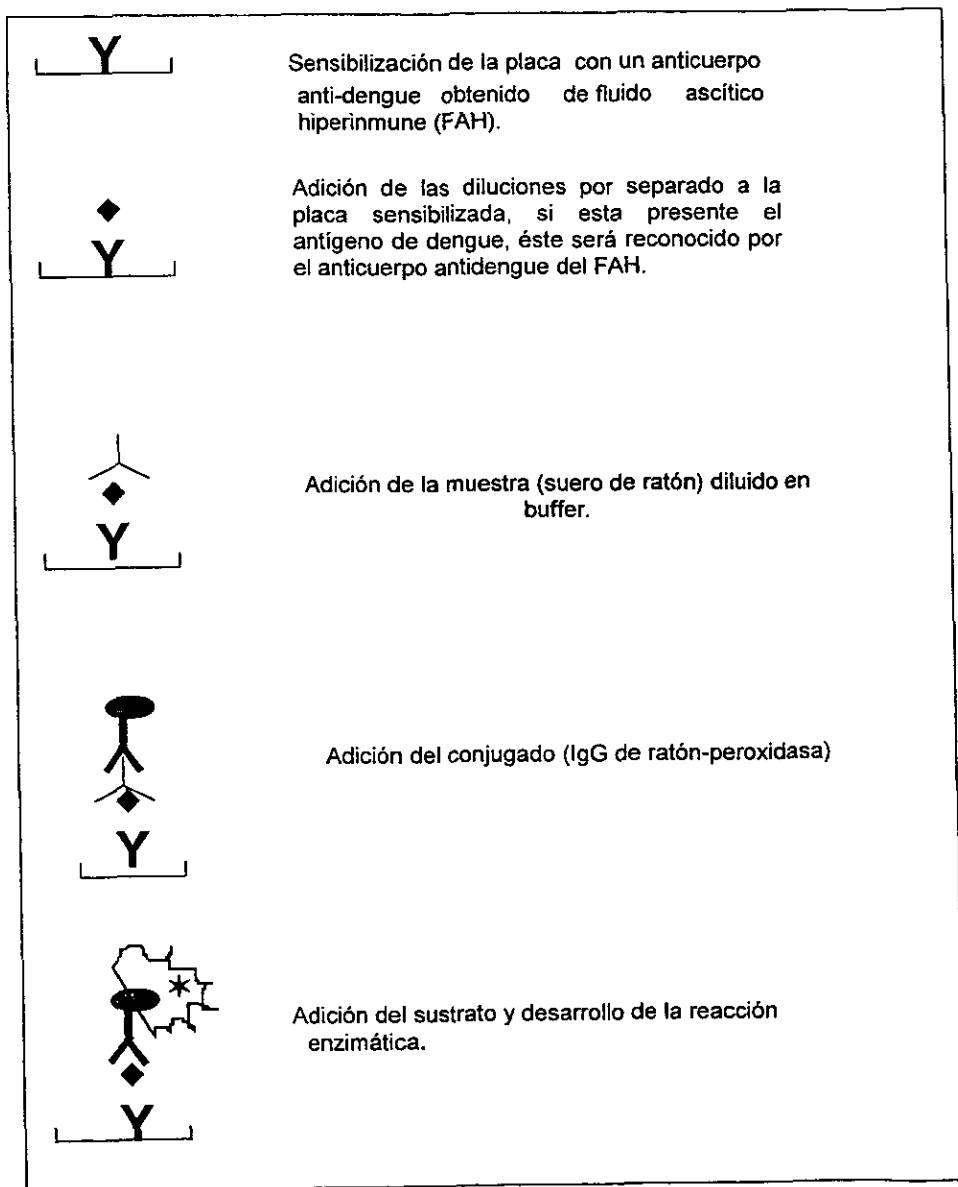


Figura 8. Esquema de la técnica de ELISA para detección de IgG antidengue en suero de ratón.

3.2.2.2. SEPARACION DE MONOCITOS DE SANGRE HEPARINIZADA POR TECNICA FICOLL-HYPAQUE

FUNDAMENTO

El reactivo de Ficoll-Hypaque tiene una densidad de 1.077 g/mL que es idéntica a la de linfocitos y monocitos. Este reactivo es una combinación de un polímero de sacarosa de alto peso molecular (Ficoll) y un compuesto orgánico yodado (diatrizoato de sodio; 3-5 bis acetilamino-2,4,6 ácido triyodobenzóico). Los granulocitos y eritrocitos que tienen una mayor densidad, cuando se centrifuga la sangre en el gradiente de Ficoll-Hypaque, pasan a través de éste formando un paquete en el fondo del tubo. Las plaquetas que tienen una densidad menor permanecen en la fracción plasmática y los mononucleares se localizan en la interfase.

PROCEDIMIENTO

- 1.- La muestra sanguínea obtenida por punción cardiaca se colocará en tubos Eppendorf con heparina.
- 2.- Aparte, colocar en otro tubo Eppendorf 0.5 mL de Ficoll-Hypaque.
- 3.- Diluir la sangre heparinizada con soln. de Hank volumen a volumen. Homogeneizar con pipeta Pasteur.
- 4.- La sangre diluida se vacía sobre el Ficoll-Hypaque lentamente y por la pared del tubo cuidando de que no se mezcle con el Ficoll-Hypaque.
- 5.- Centrifugar a 1,500 r.p.m. 15 min. a temperatura ambiente.
- 6.- Después de la centrifugación se aspiran los linfocitos que forman un anillo blanco sobre la interfase, con una pipeta Pasteur y se colocan en otro tubo.

3.2.3. OBTENCION Y CULTIVO DE MACROFAGOS PERITONEALES.

PROCEDIMIENTO

1. Sacrificar los ratones, previamente inmunizados, en cámara de gases (éter).
2. Introducir los ratones en una cámara con benzal y dejarlos así aproximadamente 5 minutos.
3. Colocar los ratones boca arriba en una plancha de unisel y fijarlos con agujas en las patas.
4. Quitar piel en zona de peritoneo.
5. Con una jeringa inocular 5 mL. de solución salina balanceada de Hank, la cual debe estar a 4°C aproximadamente.
6. Dar masaje en zona de peritoneo, durante 3 minutos aproximadamente.
7. Con la misma jeringa extraer todo el líquido posible del peritoneo, cuidando de no tocar algún órgano.
8. Vaciar el líquido en tubos de centrifuga estériles, los cuales deben estar en baño de hielo, y lavar con solución salina fisiológica (SSF) estéril.
9. Si se observan eritrocitos en el botón, agregar cloruro de amonio 0.17 M para destruirlos y centrifugar a 5000 r.p.m. durante 5 minutos. Repetir si se siguen observando eritrocitos (Si se observa un color rojo).
10. Ya que se observa un botón blanco, resuspender en SSF estéril y lavar por última vez.
11. Después de centrifugar, tirar el sobrenadante y resuspender en DMEM.
12. Hacer el conteo y ajuste en número de células.
- 13.- Agitar con el vortex y colocar en placas de poliestireno de 96 pozos.
14. Incubar las placas a 37°C.

3.2.4. ENSAYO DE CELL-ELISA

FUNDAMENTO

La prueba se fundamenta en la utilización de macrófagos de ratones infectados con denguevirus, que se adhieren a los pozos de una placa de poliestireno y se fijan con formol, lavándose para eliminar el exceso de reactivos. Posteriormente se bloquean los sitios inespecíficos con gelatina PBS y se adiciona un anticuerpo monoclonal (o bien, un mezcla de IgG de título alto obtenido de pacientes), después de incubar, las reacciones Ag-Ac que hayan ocurrido no son eliminadas por el lavado y quedan fijas en el pozo. Cuando se añade un anticuerpo de ratón (o humano anti-IgG), según sea el caso, conjugado a la enzima peroxidasa, ocurrirá una segunda reacción entre el anticuerpo monoclonal (ó IgG) y el anticuerpo anti-IgG. La reacción se revela finalmente, con un sustrato de la enzima, que al ser transformado forma un producto colorido, este color puede evaluarse a simple vista o ser cuantificado por medio de un espectrofotómetro (figura 9).

PROCEDIMIENTO

1. Preparación de la placa:

- a) Vaciar el medio de cultivo de los pozos, los cuales tienen adheridos los macrófagos infectados con virus.
- b) Lavar la placa un minuto, sin agitar, con PBS a pH de 7.4
- c) Debe trabajarse con testigos negativos: macrófagos sin infectar, y otros, sin añadir el anticuerpo monoclonal pero con el mismo tratamiento.

2.- Fijación:

- a) Agregar 100 μ L de solución de formol-PBS pH=7.0
- b) Dejar la microplaca a 4° C hasta el día siguiente.

3.- Bloqueo:

- a) Lavar dos veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, durante un minuto sin agitación.
- b) Bloquear con 200 μ L de gelatina al 5% en PBS.
- c) Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.

4.- Adición del anticuerpo:

- a) Lavar tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, durante un minuto sin agitación.
- b) Adicionar 100 μ L de anticuerpo monoclonal antidengue diluido 1:10 en PBS, o en su defecto, usar un mezcla de IgG de título alto.
- c) Incubar a 4°C toda la noche.

5.- Adición del conjugado:

- a) Lavar tres veces con PBS-Tween al 0.05%, un minuto sin agitación.
- b) Agregar 100 μ L de IgG sérica anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano (diluida 1:10 000 en PBS/AB).
- c) Si se usó la mezcla de IgG utilizar el conjugado de IgG anti-humano con peroxidasa.

6.- Adición del sustrato:

- a) Lavar cinco veces con PBS-Tween, durante un minuto y sin agitación.
- b) Adicionar 100 μ L de sustrato de H₂O₂ / diclorhidrato de ortofenilendiamina.
- c) De 5 a 10 minutos después de agregar el sustrato verificar un color amarillo comparado con el blanco de los testigo negativos.
- d) Detener la reacción con 100 μ L en cada pozo, de H₂SO₄ 2N. Leer a 490 nm.

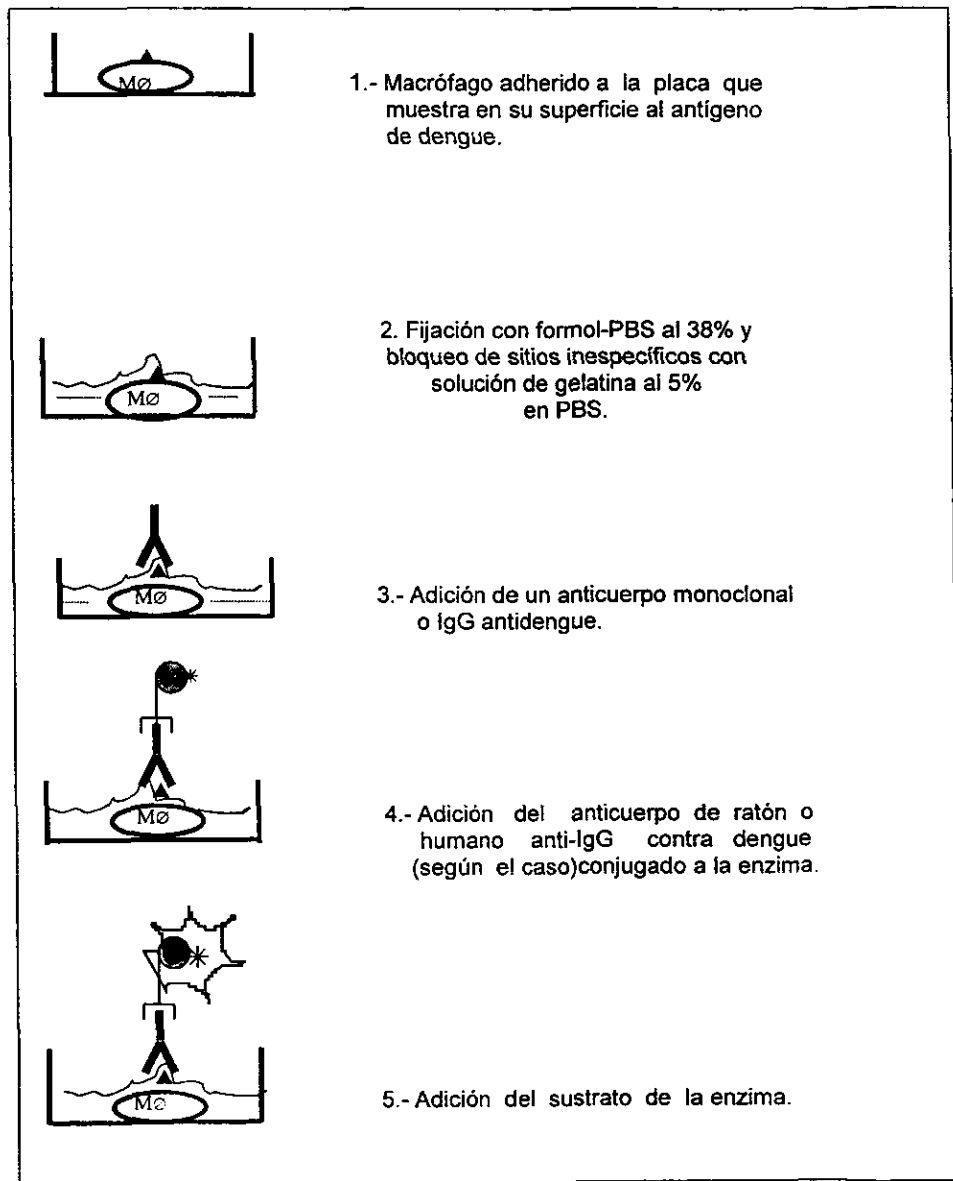
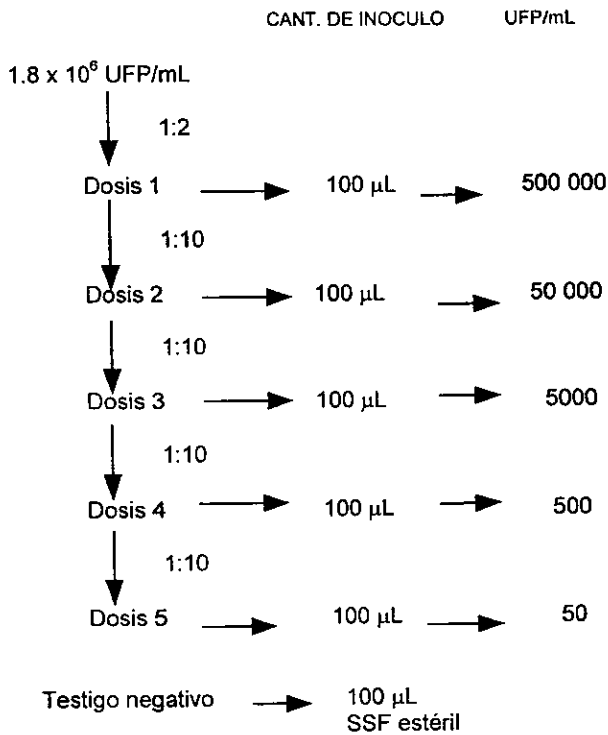


FIGURA 9. Esquema de la técnica de CELL-ELISA

3.2.5. PROTOCOLO DE INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS CON DENGUE

Se trabajará con Den-2 con un título de 1.8×10^6 UFP/mL, se hacen 5 diluciones diarias (usando como diluyente SSF estéril), de las cuales se inoculan $100 \mu\text{L}$ a 5 ratones por día trabajando con un testigo negativo. Se ajusta previamente a 1×10^6 UFP/mL partiendo de 1.8×10^6 UFP/mL. Las diluciones se hacen de la siguiente manera:



4. RESULTADOS Y DISCUSION

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Uno de los objetivos principales del presente trabajo fue el de recuperar denguevirus serotipos 1, 2, 3 y 4 a partir de cepas prototipo y silvestres, utilizando para la infección cultivos de células C6/36, las cuales son líneas celulares clonadas obtenidas a partir de mosquitos del género *Aedes albopictus*, esto con el fin de tener cultivos con altos títulos virales para poder hacer los ensayos de infección siguientes.

Se hicieron infecciones subsecuentes en los CC, y después de realizar cada pase viral se practicaban ensayos de IF_D a los sobrenadantes de los cultivos para comprobar la presencia del virus. La tabla 1 muestra los resultados de estos ensayos. La prueba de inmunofluorescencia es un ensayo inmunológico en donde se lleva a cabo una reacción típica antígeno-anticuerpo; cuando éstos últimos se conjugan con fluorocromos no se destruye su especificidad inmunológica, lo que garantiza la presencia del antígeno correspondiente; en este caso, el de los denguevirus.

PASE No.	SEROTIPO	RESULTADO
1° pase a 5° pase	Den 1 tipo	positivo
	Den 2 tipo	positivo
	Den3 tipo	positivo
	Den4 tipo	positivo
	Den 1 silv.	positivo
	Den 2 silv.	positivo
	Den 3 silv.	positivo
	Den 4 silv.	positivo

Tabla 1. Resultado de IF_D de los cultivos celulares infectados con denguevirus.

Una vez comprobado que se tiene al antígeno del dengue en los sobrenadantes de los CC se procede a cuantificar el título.

La tabla 2 recaba los resultados de la titulación viral por la técnica de plaqueo

practicada a los virus cosechados a partir del tercer pase, empleando células BHK-21, esto con el fin de cuantificar el título viral.

A los virus cosechados en el primer y segundo pases virales se les practicó únicamente la prueba de IF_D, porque se consideró que hasta un tercer pase era posible alcanzar dicho título, por lo que a partir del tercer pase se procedió a titular el virus empleando la técnica de plaqueo con cultivo de células BHK-21 (líneas celulares de riñón de hámster recién nacido), las cuales resultan ser susceptibles a la infección con denguevirus, produciendo efecto citopático con la consiguiente aparición de placas líticas en la monocapa celular, las cuales se hacen evidentes gracias a la tinción previa de las células con naftol azul-negro.

PASE No.	SEROTIPO	D I L U C I O N						UFP/mL
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
		Número de placas observadas:						
3er. pase	Dengue 1 tipo	/	/	/	/	/	/	Sin título*
	Dengue 2 tipo	>20	>20	4	/	/	/	1.2x10 ⁵
	Dengue 3 tipo	>20	>10	/	/	/	/	1.6x10 ⁴
	Dengue 4 tipo	<10	2	/	/	/	/	2.2x10 ³
	Dengue 1 silv.	>20	<10	/	/	/	/	3.8x10 ³
	Dengue 2 silv.	>20	>20	/	/	/	/	2.2x10 ⁴
	Dengue 3 silv.	>20	<10	/	/	/	/	1.8x10 ⁴
	Dengue 4 silv.	>20	5	/	/	/	/	1.2x10 ⁴
4to. pase	Dengue 1 tipo	>20	>20	>20	/	/	/	1.0x10 ⁶
	Dengue 2 tipo	>20	>20	>20	11	/	/	1.8x10 ⁶
	Dengue 3 tipo	>20	>20	17	/	/	/	1.2x10 ⁶
	Dengue 4 tipo	>20	>20	>20	10	/	/	2.6x10 ⁶
	Dengue 1 silv.	>20	>20	/	/	/	/	3.6x10 ⁴
	Dengue 2 silv.	<10	/	/	/	/	/	1.2x10 ⁴
	Dengue 3 silv.	>20	>20	>20	7	/	/	1.8x10 ⁶
	Dengue 4 silv.	>20	6	4	/	/	/	8.0x10 ⁴
5to. pase	Dengue 1 tipo	10	/	/	/	/	/	Sin título*
	Dengue 2 tipo	13	/	/	/	/	/	Sin título*
	Dengue 3 tipo	3	/	/	/	/	/	Sin título*
	Dengue 4 tipo	15	/	/	/	/	/	Sin título*
		* No se observó la formación de placas, por lo que no se pudo cuantificar el título, el cual se obtiene con base a las unidades formadoras de placa (UFP).						

Tabla 2. Resultados de la titulación viral por técnica de plaqueo empleando células BHK-21.

Como se puede apreciar, en el tercer pase se tienen aún títulos virales bajos, inclusive el serotipo Den-1 tipo no presentó placas y los demás serotipos únicamente tuvieron cantidades menores de 10⁴ UFP/mL, por lo que se hizo el cuarto pase, en el cual ya se hace evidente el incremento de las UFP, siendo el más alto el serotipo Den-4 tipo (2,6 x 10⁶ UFP/mL) y el más bajo el serotipo Den-2 silvestre (1.2 x 10⁴ UFP/mL). Luego se procedió a hacer el quinto pase para intentar aumentar el título viral, sin

embargo, el número de placas fue menor que en el pase anterior y no fue posible obtener los títulos virales. No obstante, se repitió un quinto pase con el serotipo Den-4 tipo ($2,6 \times 10^6$ UFP/mL) y también se obtuvieron títulos bajos.

Cabe mencionar que aunque las placas en la monocapa celular sí eran evidentes, no eran muy fáciles de apreciar, y se tenía cierta dificultad para el conteo de éstas, por lo que se intentó hacer el ensayo con otro tipo de células susceptibles; en este caso se usaron las células VERO (líneas celulares de riñón de mono verde africano). Así, se realizó la titulación por plaqueo del serotipo Den-4 del cuarto pase utilizando células VERO y BHK-21 en dos ensayos por separado, esto para comparar y probar con cual de las dos se obtienen mejores resultados. La tabla 3 muestra los resultados de ambos ensayos.

Tabla 3
RESULTADO DE LA TITULACION POR PLAQUEO DE DEN-4 USANDO CELULAS BHK-21 Y VERO

CELULAS BHK-21		CELULAS VERO		
No. de placas	10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}	UFP/mL	10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}	UFP/mL
		5 4 2 / / /	4×10^4	>20 >20 2 / / /

El criterio que se debe seguir para obtener las UFP/mL es: el título del virus se lee en la dilución en donde se cuentan 20 placas. En los ensayos que se practicaron empleando las células BHK-21 se tenía el inconveniente de que era muy difícil contar cantidades de 10 o más placas sobre la monocapa celular debido a que no estaban bien definidas, por lo que se tomaba en cuenta la última dilución en donde se presentaran placas (siendo más diluido el virus, será menor el número de placas), por lo que se

seguía la siguiente relación:

número de placas _____ en 50 μ L de dilución viral
 x _____ ¿cuántas se tendrán en 1000 μ L?

y la cantidad que se obtiene se multiplica por el factor de dilución del virus en donde se formaron esas placas.

En ambos ensayos, tanto con células BHK-21 como con células VERO se formaron dos placas en la dilución viral de 10^{-3} ; por lo que se obtiene:

2 placas _____ están en 50 μ L de dilución viral
 X _____ ¿cuántas tendré en 1000 μ L?

obtenemos 40 UFP que multiplicadas por el factor de dilución (en donde se formaron las placas), que en este caso es 1:1000 obtenemos:

$$40 \times 1000 = 40\,000 = 4 \times 10^4 \text{ UFP/mL}$$

O utilizando la fórmula para obtener las unidades formadoras de placa (UFP):

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{Número de placas líticas} \times \text{Dilución}}{\text{Volumen de inóculo.}}$$

Tenemos 20 placas líticas en la dilución 10^2 y utilizamos un volumen de inóculo de

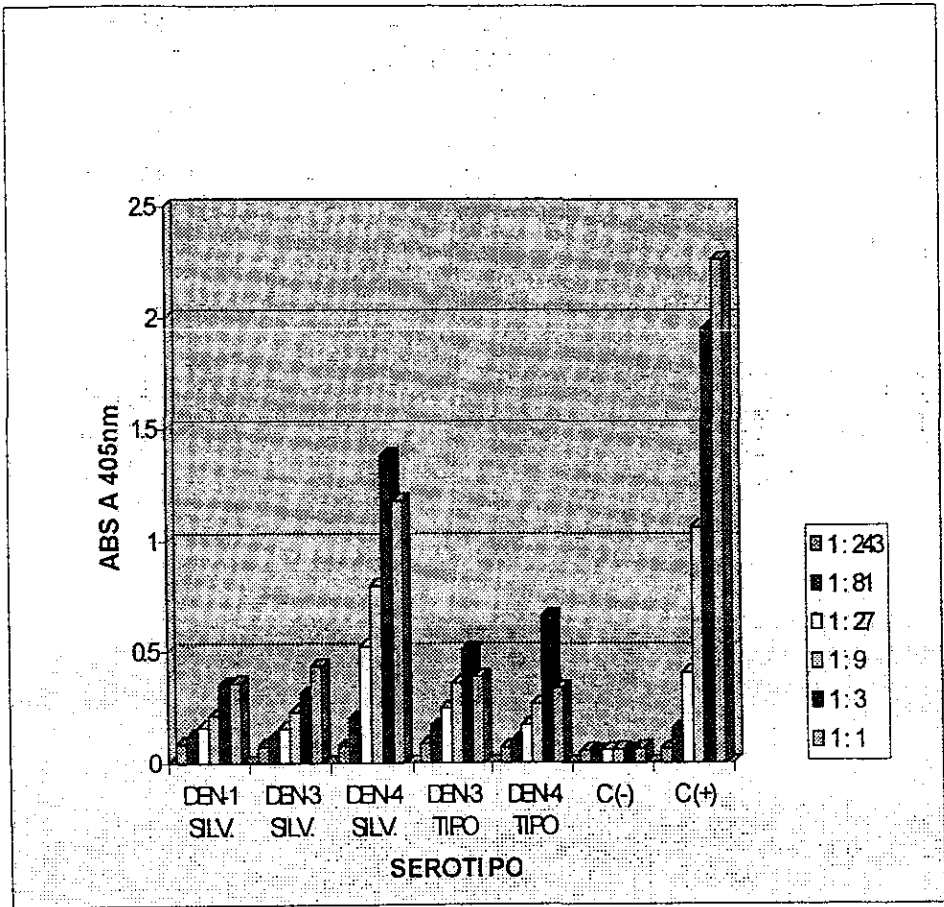
0.05 mL :

$$\text{UFP/mL} = \frac{20 \text{ placas líticas} \times 10^2}{0.05 \text{ mL}} = \frac{4 \times 10^4}{0.05} \text{ UFP/mL}$$

En este caso se obtienen las mismas UFP/mL en los dos ensayos, sin embargo, al emplear las células VERO se pueden leer más de 20 placas en las diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} , y que las placas aparecen bien definidas, por lo que resulta más conveniente el empleo de las células VERO en lugar de las BHK-21 las cuales se venían usando convencionalmente.

Sin embargo, como otra alternativa para obtener el título viral se probó la técnica de ELISA de captura de antígeno.

Para practicar este último ensayo se trabajó con sobrenadantes de CC infectados con denguevirus, los resultados se muestran en la gráfica 1, donde se trabajó con 5 serotipos del cuarto pase: Den-1, Den-3 y Den-4 silvestres y Den-3 y Den-4 tipo, junto con un testigo negativo y uno positivo (cabe mencionar que del cuarto pase se obtuvieron los títulos virales más altos); de cada serotipo se hicieron 5 diluciones triples (1:1, 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 y 1:243).



Gráfica 1. Resultado de la titulación de los virus cosechados en el cuarto pase por ELISA de captura de antígeno.

Se observa que la respuesta tiende a aumentar en función de la concentración de antígeno en los serotipos Den-1 y Den-3 silvestres y el testigo positivo (el cual fue una muestra serológica de un paciente con dengue confirmado por PCR). Sin embargo, en los serotipos Den-4 silvestre, Den-3 y den-4 tipo y en el testigo negativo y muy poco en el serotipo Den-1 silvestre, la relación directamente proporcional entre la respuesta y la concentración del antígeno se mantiene hasta la dilución 1:81, ya que en la dilución 1:1 la lectura es menor que en la dilución 1:3.

Este comportamiento similar que se observa en casi 4 de los 5 serotipos ensayados nos indica que con la dilución 1:3 se obtienen mejores resultados, es decir, que da lecturas altas, incluso, que las obtenidas en la dilución 1:1.

No obstante, para tener un testigo de las condiciones apropiadas para el desarrollo de los denguevirus recuperados a partir de un C.C., se corrió una cinética de infección *in vitro*, empleando el serotipo Den-4 tipo; el cual tuvo un título de 2.6×10^6 UFP/mL (por técnica de plaqueo) en este ensayo se infectaron 8 tubos (del tubo A al tubo H), con cultivos confluentes de células C6/36. El cronograma se muestra en el cuadro 3, donde se indica el número de días que duró la cinética, día de inoculación de todos los tubos, días en que se les practicó la IF_D a cada uno y el ELISA por captura de antígeno. Estos ensayos se hicieron con el fin de evaluar cuantos días eran necesarios para que el virus penetrara a las células y con la prueba de IF_D se logró estimar si realmente había células infectadas liberadas al medio.

		TUBO A	TUBO B	TUBO C	TUBO D	TUBO E	TUBO F	TUBO G	TUBO H
		Inoculo viral	Inoculo viral	Inoculo viral	Inoculo viral	Inoculo viral	Inoculo viral	Inoculo viral	Inoculo viral
		IF _D							
DIA EN QUE SE HACE EL ELISA	DIA 1	ELISA	IF _D						
	DIA 2		ELISA	IF _D					
	DIA 3			ELISA	IF _D				
	DIA 4				ELISA	IF _D			
	DIA 5					ELISA	IF _D		
	DIA 6						ELISA	IF _D	
	DIA 7							ELISA	IF _D
	DIA 8								ELISA

CUADRO 3. Cronograma de la cinética de infección in vitro realizada con el serotipo Den-4 tipo del cuarto pase.

Un día después de practicar la IF_D se corrió el ELISA para ver si había la suficiente producción o liberación del antígeno al medio de cultivo. La tabla 4 recaba los resultados de la IF_D que se practicó a cada tubo de C.C. a diferentes días después de la inoculación viral y muestra el porcentaje aproximado de células infectadas (células que mostraban fluorescencia).

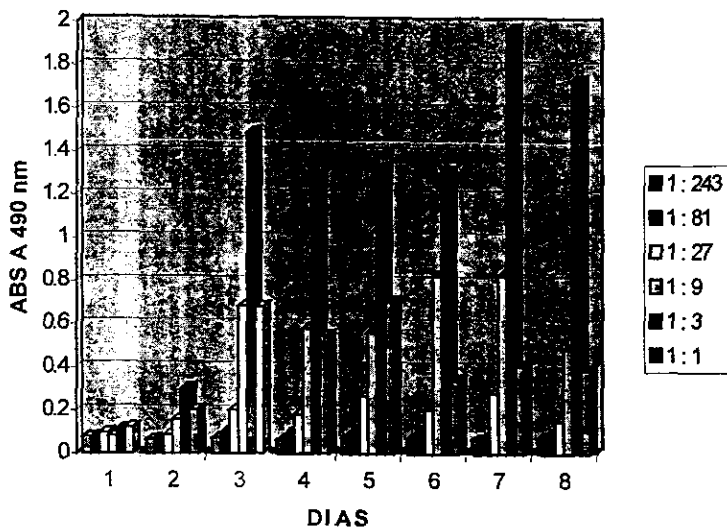
DIA	RESULTADO
1	(+) 60%
2	(++) 70%
3	(++) 75%
4	(+++) 100%
5	(+++) 100%
6	(++) 70%
7	(++) Dañadas
8	(++) Dañadas

Tabla 4 . Resultados de IF_D: Cinética de infección.

Aquí se puede apreciar que la cantidad de células infectadas va aumentando y que en el día 5 de inoculación se observa el 100% de las células infectadas, y que ya en el sexto día comienza a disminuir de 100 a 70% aproximadamente, y que para los días 7 y 8 las células comienzan a dañarse.

De lo anterior se puede decir que la infección de las células por el virus sigue un comportamiento gaussiano, en donde los días óptimos, donde hay un 90 y un 100% de células infectadas son los días 4 y 5 respectivamente.

La gráfica 2 nos muestra los resultados de la prueba de ELISA por captura de antígeno que se practicó durante la cinética de infección realizada con los sobrenadantes de los 8 tubos con CC.



Gráfica 2. Resultado de la prueba de ELISA por captura de antígeno de la cinética de infección in vitro con dengue 4 prototipo que se practicó con los sobrenadantes de los tubos de cultivos celulares.

Se ensayaron 6 diluciones triples de los sobrenadantes de los cultivos: 1:1, 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 y 1:243. Debe tomarse en cuenta que el día 1 es en realidad el día 3 después del día de inoculación viral, el día 2 sería el día 4 después de la inoculación y así sucesivamente hasta llegar al día 8 que sería en realidad el día 10 después de la inoculación viral. En esta gráfica se aprecia que ya en el día 1 hay liberación de antígeno al medio de cultivo casi en la misma proporción que el día 2; sin embargo, para el día 3 la cantidad de antígeno se incrementa notablemente desde la dilución 1:9, y que en la dilución 1:3 se observan lecturas casi al doble de las de 1:9 y por el contrario, en la dilución 1:1 hay un decremento, registrándose lecturas similares o incluso menores que las obtenidas en la dilución 1:9. Este mismo patrón se observa del día 3 al día 8, pero en el día 7 se observan las máximas lecturas sobre todo para la dilución de 1:3, la cual alcanza casi una absorbancia de 2; sin embargo, en el día 8 las lecturas comienzan a disminuir.

Por todo lo anterior, se puede tomar al día 7 (día 9 después del día de la inoculación viral) como el día óptimo, es decir, el día en que se tiene la máxima producción y liberación de antígeno al medio de cultivo.

Por otra parte, es importante mencionar que la característica de las lecturas altas que se obtienen con la dilución 1:3 de este ensayo, se repitió también en la prueba anterior de titulación viral por ELISA de captura de antígeno (gráfica 1).

Una vez que se establecieron los parámetros adecuados para obtener la semilla viral, se escogió uno de los serotipos con un título viral más alto; en este caso se trabajó con Den-2 silvestre del cuarto pase, el cual tuvo un título de 1.8×10^6 UFP/mL, para realizar la infección de los ratones, a los cuales se les inoculó 5 diferentes diluciones de las partículas virales: 5, 50, 500, 5000 y 50 000 UFP/mL. Utilizándose la vía intraperitoneal, con el fin de tener la mayor cantidad posible de macrófagos infectados, ya que es en el peritoneo donde se tiene la mayor concentración de éstos.

No obstante, se quería probar si en un modelo murino era posible encontrar IgG en sangre periférica en los primeros días de infección, por lo que a los mismos ratones infectados se les tomó muestra sanguínea por punción cardiaca hasta sangrarlos a blanco, con el propósito también, de tener listo al animal para la obtención de los macrófagos peritoneales. Contando previamente con suero preinmune.

El volumen total de la muestra sanguínea se dividió en tres partes. Una parte se utilizó para obtener macrófagos circulantes mediante la técnica de Ficoll-Hypaque, otra para obtener suero para montar un ELISA para detección de IgG antidengue, y la última parte se usó para infectar tubos con C.C.

A simple vista, la cantidad de macrófagos que se obtiene por la técnica de Ficoll-Hypaque fue muy pequeña, aún así, con éstos se infectaron 5 tubos con cultivos confluentes de células C6/36, a los cuales se les practicó prueba de IF_D a los 3 días después de la inoculación con los macrófagos infectados.

En otro ensayo por separado, se usó suero para infectar 5 tubos también, a los cuales se les hizo el mismo tratamiento que a los anteriores. Los resultados de éstos dos ensayos se muestran en la tabla 4.

NUMERO DE TUBO	UFP/mL	RESULTADO IF _D
1	5	NEGATIVO
2	50	NEGATIVO
3	500	NEGATIVO
4	5000	NEGATIVO
5	50 000	NEGATIVO

Tabla 5. Resultados de la IF_D practicada a los sobrenadantes de los CC infectados con sueros de ratones infectados con denguevirus.

Todos los resultados que se obtuvieron de las IF_D fueron negativos. Esto quiere decir que el virus no es fácil de recuperar en muestras de sangre periférica de ratones infectados, y que inclusive, la cantidad de macrófagos infectados resulta ser mínima y poco adecuada para este tipo de ensayos.

No obstante, se utilizó una parte de la muestra sanguínea obtenida por punción cardiaca para separar suero para montar un ensayo de ELISA para detección de IgG antidengue, con el fin de comprobar si había anticuerpos circulantes en cantidad suficiente para este tipo de ensayos. Los resultados de la prueba de ELISA practicada a los sueros obtenidos por punción cardiaca fueron negativos (datos no mostrados). Esto significa que no hay la cantidad suficiente de IgG circulantes pues el ensayo no las detecta.

Es importante mencionar que en un modelo murino no se puede obtener muestra sanguínea suficiente para realizar este tipo de ensayos, por lo que se seguirán haciendo los ensayos subsecuentes utilizando los macrófagos obtenidos de la zona del peritoneo (zona en que se sabe se tiene la mayor concentración de macrófagos cuando ha habido una infección vía intraperitoneal).

Por otra parte, se realizó un primer ensayo cualitativo de CELL-ELISA, empleando macrófagos purificados, los cuales se extrajeron de la zona del peritoneo de los ratones infectados con los denguevirus que alcanzaron el título más alto (en este caso se infectaron con Den-2 silvestre del 4to. pase, el cual alcanzo un título de 1.8×10^6

UFP/mL). Si el virus penetró al macrófago, éste tiene la capacidad de exhibir en su superficie de determinantes antigénicos propios de este virus. Es por lo anterior que a la prueba se le denomina "CELL-ELISA", puesto que el antígeno que reaccionará con el anticuerpo correspondiente está en la superficie celular del macrófago.

Para llevar a cabo la prueba cualitativa, las muestras de macrófagos se recolectaron a los días 1, 2 y 3 después de la inoculación de los denguevirus en los ratones. Después de la recolección se sembraron inmediatamente en placas de poliestireno de 96 pozos tratadas para C.C. ; el ensayo cualitativo en el cual no se midieron las absorbancias sino que únicamente se observó el cambio de color y se tomó como positivo la aparición de un color amarillo en comparación con el incoloro del testigo negativo se hizo por triplicado y con dos testigo negativos por cada día. La disposición de las muestras en los pozos y los resultados del ensayo se muestran en la figura 10.

Día de infección	Disposición de los pozos	Testigo negativo
1	A1, A2, A3	A5, A6
2	C1, C2, C3	C5, C6
3	E1, E2, E3	E5, E6

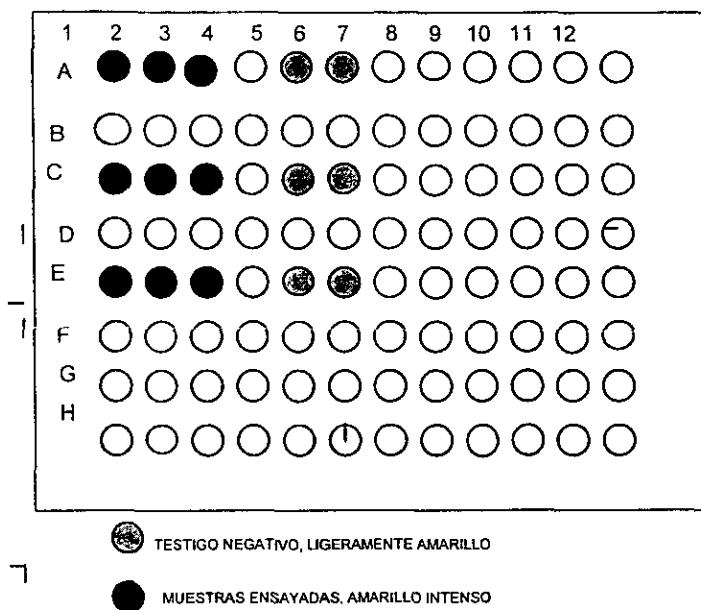


FIGURA 6. Resultado del ensayo cualitativo de CELL-ELISA

Los resultados obtenidos fueron muy claros, puesto que en los pozos donde se colocaron las muestras de macrófagos infectados, se vio claramente una reacción positiva al formarse una coloración amarilla que evidencia la formación del complejo antígeno-anticuerpo-anti anticuerpo marcado con fluoresceína. Mientras que en los testigo negativos no se nota esta coloración.

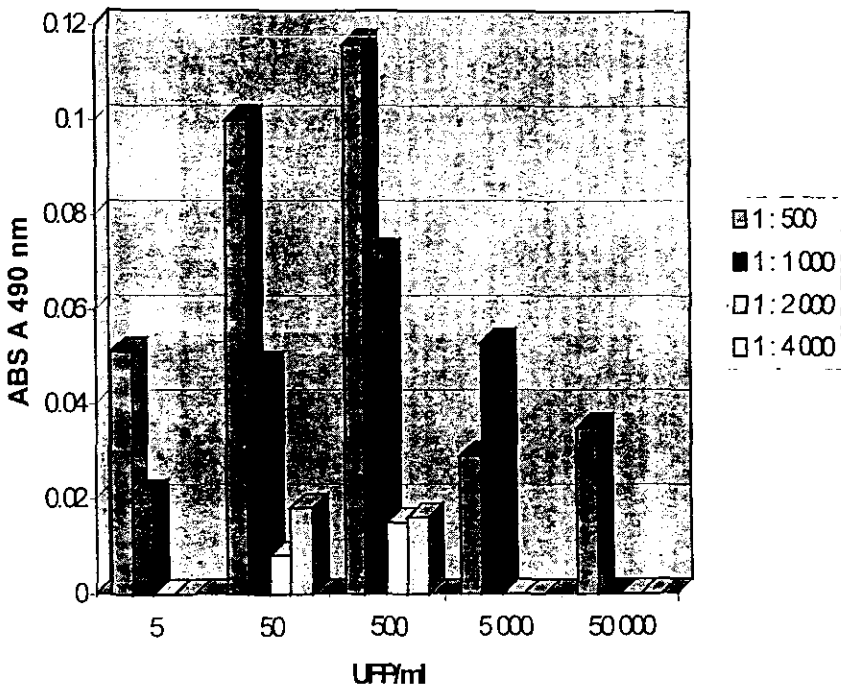
Una vez comprobado que el CELL-ELISA cualitativo si da resultado, se procedió a montar el ensayo cuantitativo (donde se tomaron las lecturas de las absorbancias de cada muestra ensayada). En éste, se varió la cantidad de UFP/mL y se usó una mezcla de IgG's humanas purificadas, con un título de 1:5, en lugar de utilizar el anticuerpo monoclonal que se utilizó en la prueba cualitativa, esto con el fin de verificar si era posible trabajar a estas condiciones sin utilizar el anticuerpo monoclonal, el cual es de un elevado

costo.

Para efectuar este ensayo, se hizo el cultivo en las placas de poliestireno de los macrófagos recién obtenidos, y para asegurar que se mantuvieran viables se les adicionó un medio de mantenimiento que proporcionara los nutrientes necesarios.

Se manejaron muestras que fueron tomadas en los días 1 a 5 después de la inoculación viral en los ratones para ver que día era el óptimo. También se probaron 4 diluciones dobles de IgG ; 1 :500, 1 :1000. 1 :2000 y 1 :4000 para ver si era posible obtener buenos resultados con el anticuerpo diluido, y también se manejaron diluciones decimales de las UFP/mL inoculadas a los ratones : 5, 50, 500, 5000 y 50 000 UFP para observar con cual había mejor respuesta inmune, la cual se reflejaría con lecturas altas.

La gráfica 3 muestra los resultados que se obtuvieron del CELL-ELISA con macrófagos extraídos 1 día después de haber inoculado los denguevirus al ratón.



Gráfica 3. Resultados de la prueba de CELL-ELISA para el día 1 después de la inoculación con denguevirus.

Aquí podemos observar que la dilución de IgG de 1 :500 es con la que se obtienen mejores resultados ; inclusive con 500 UFP/mL alcanza una lectura de 0.116 y con 50 UFP/mL alcanza una lectura de 0.1, estos valores resultan aceptables con ensayos de este tipo. Sin embargo, las diluciones de IgG de 1 :2000 y 1 :4000 no arrojan resultados satisfactorios. En cuanto a la dilución de partículas virales, se observa que con 500 UFP/mL se tienen buenos resultados.

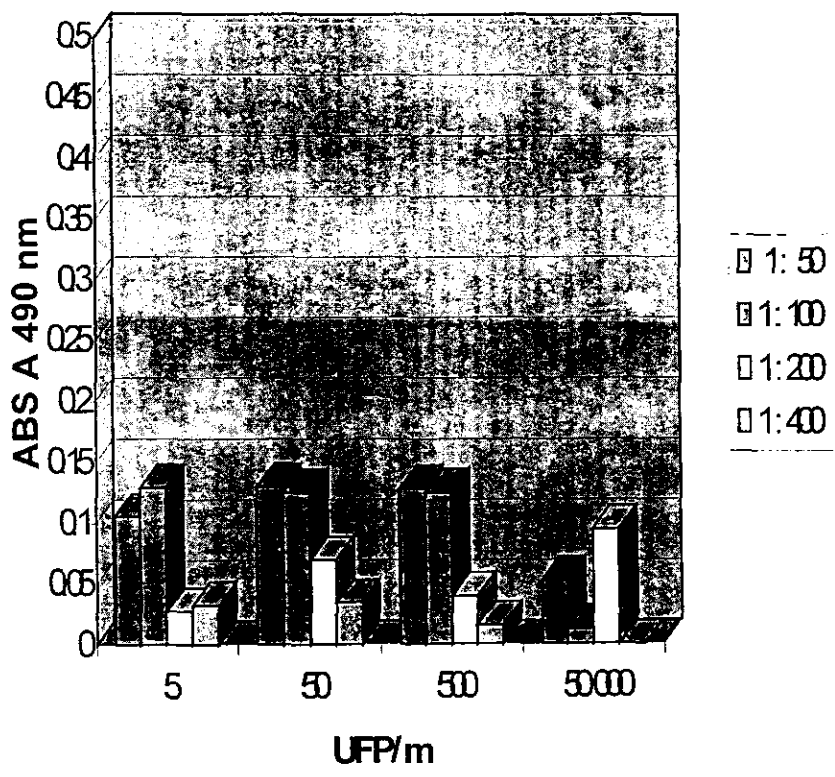
En la gráfica 4 se reportan los resultados del CELL-ELISA con macrófagos tomados al segundo día después de la infección. Y se observa que en las diluciones de partículas virales de 50 y 500 UFP/mL las lecturas son proporcionales a la cantidad de IgG presente. No obstante, en los ensayos con 5 y con 50 000 UFP/mL hay discordancias en esta proporción. Es por lo anterior que se toman como óptimas las diluciones virales de 50 y 500 UFP/mL.

El siguiente ensayo de CELL-ELISA con macrófagos del día 3 después de la inoculación, se hizo únicamente con la dilución de IgG de 1 :500, porque era la dilución que daba las lecturas más altas y que sigue un patrón de comportamiento similar en todos los ensayos. Los resultados, que se reportan en la gráfica 5, donde además se corrió un testigo negativo, muestran que desde la dilución de 5 UFP/mL hasta la de 500 UFP se tiene una relación directamente proporcional a las lecturas obtenidas ; y ya en las diluciones de 5000 y 50 000 UFP/mL las lecturas comienzan a descender. Es importante mencionar que en la dilución de partículas virales de 500 UFP se obtiene una lectura muy alta (0.487) que es casi el triple de las otras lecturas.

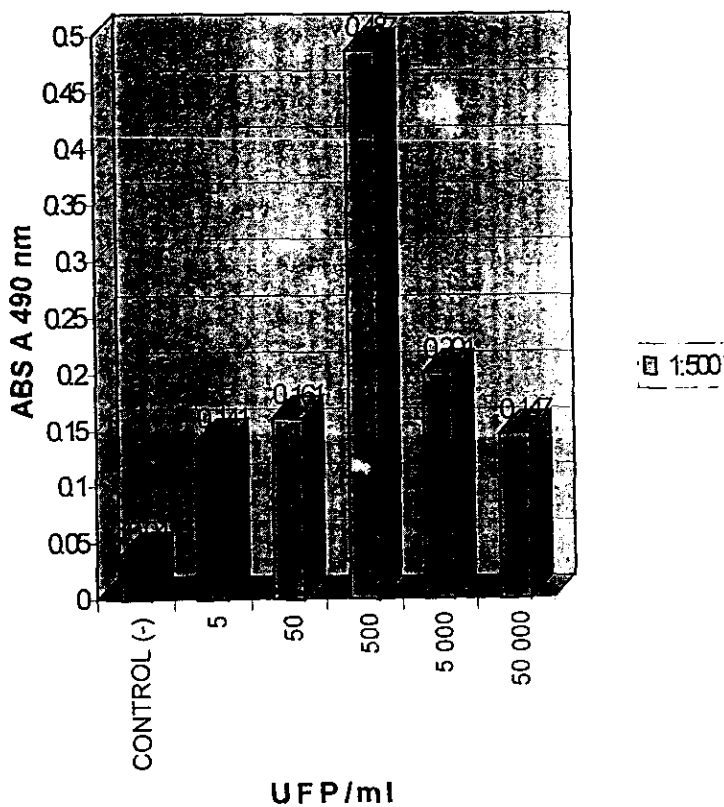
En el ensayo siguiente, con macrófagos obtenidos el día 4 después de la infección (gráfica 6), se observa un decremento en las lecturas, sobre todo en la de la muestra con 500 UFP/mL, pues en el ensayo anterior (gráfica 5) se tuvo una lectura de 0.487, y en este ensayo su lectura fue de 0.13.

En el último ensayo practicado con macrófagos extraídos 5 días después de la

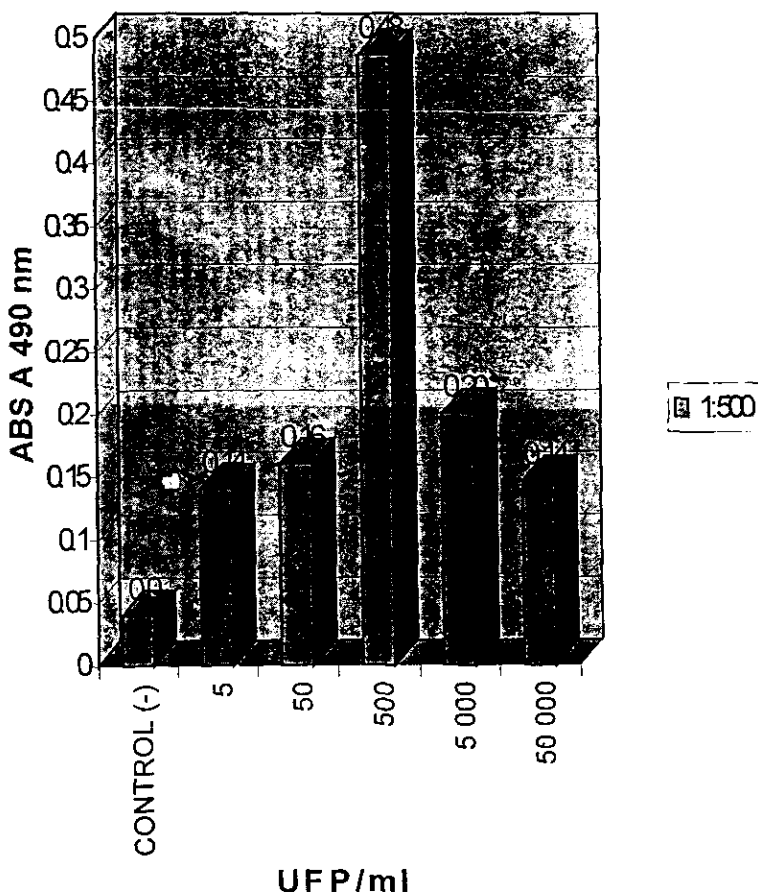
infección, únicamente se registraron lecturas con 5 UFP/mL usando una dilución de IgG de 1 :500, con 500 UFP/mL con dilución de IgG de 1 :500 y 1 :1000 y con 5000 UFP con dilución de IgG de 1 :1000. Como se puede apreciar en la gráfica 7, los resultados no guardan proporción alguna entre lecturas y concentraciones.



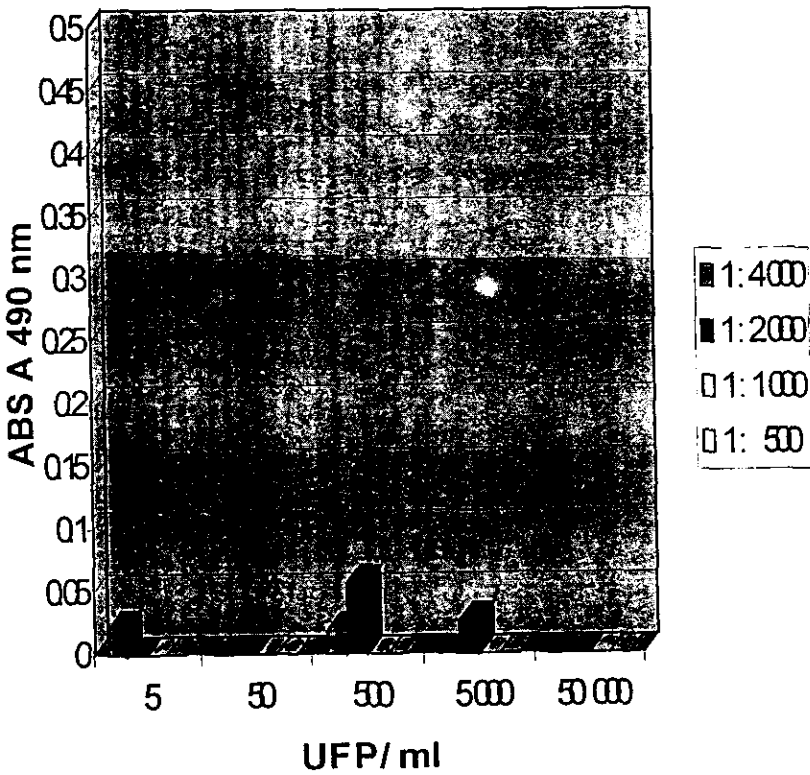
Gráfica 4. Resultados de la prueba de CELL-ELISA del día 2 de inoculación.



Gráfica 5. Resultados de la prueba de CELL-ELISA del día 3 después del día de la inoculación de denguevirus.



Gráfica 6. Resultados de la prueba de CELL-ELISA del día 4 después de la inoculación.



Gráfica 7. Resultados de la prueba de CELL-ELISA del día 5 después de la inoculación con denguevirus.

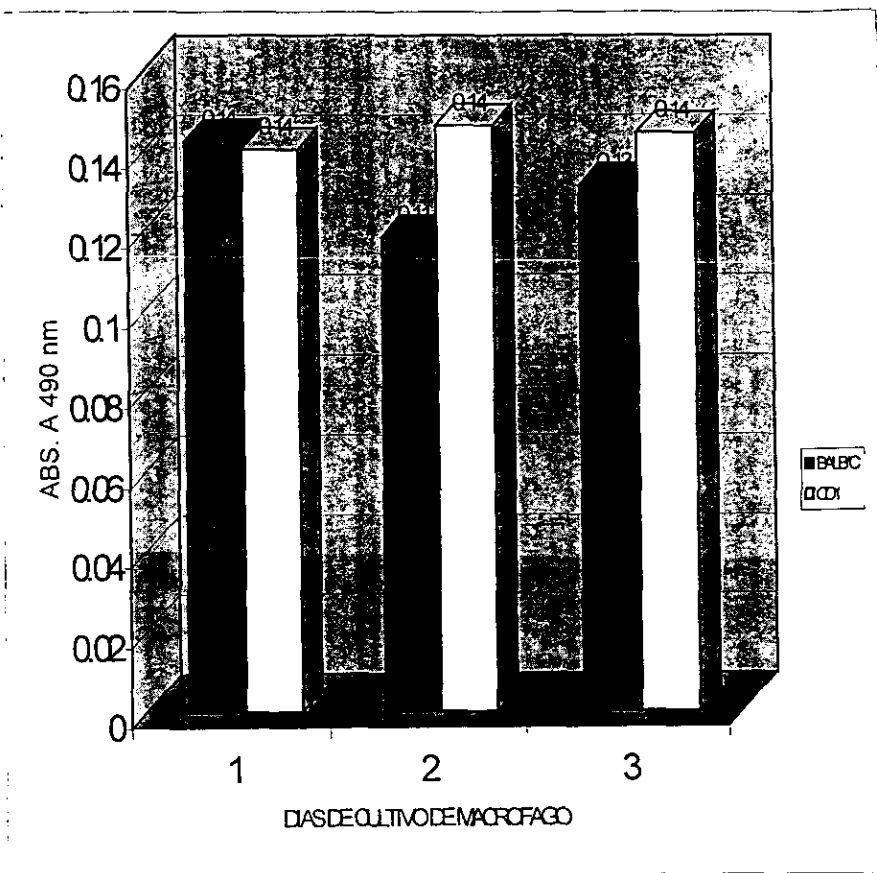
Al analizar los 5 gráficos en conjunto (gráficas 3, 4, 5, 6 y 7) vemos que se tienen mejores resultados al practicar las pruebas de CELL-ELISA utilizando una dilución de IgG de 1 :500, puesto que este anticuerpo no da buenos resultados utilizándolo muy diluido, y que la dilución de partículas virales óptima resulta ser la de 500 UFP/mL. En cuanto a este último parámetro se debe tener en cuenta que en la mayoría de los ensayos se sigue un comportamiento tipo campana de Gauss, es decir, que las lecturas van aumentando paulatinamente hasta llegar a alcanzar una mayor lectura, la cual disminuye posteriormente.

En lo referente a los días de obtención de los macrófagos, el día 3 después de la *inoculación de los denguevirus* a los ratones, fue el que dio las lecturas más altas, por lo que se considera como el día óptimo para extraer los macrófagos.

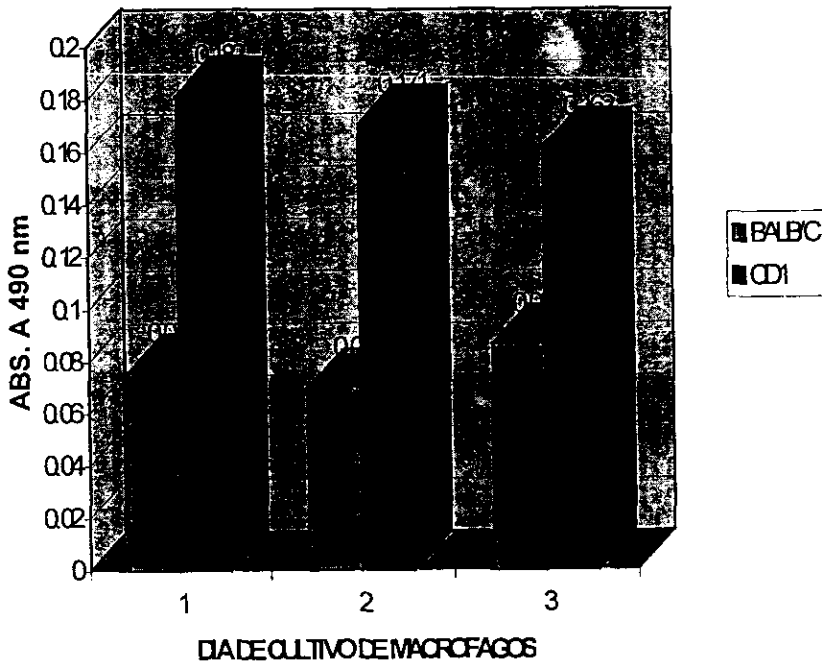
Con base a los parámetros óptimos anteriores se hicieron otros ensayos de CELL-ELISA pero utilizando cepas de ratones singénicos (BALB/C) y ratones de cepa abierta (CD1), para ver al utilizar ratones genéticamente similares es posible obtener mejores resultados.

Al igual que en el ensayo anterior los macrófagos se extrajeron de 1 a 5 días después de la infección. También se manejaron de 1 a 3 días de cultivo de macrófagos después de sembrarlos en las placas para ver cuantos días podían resistir ya fijados en las placas.

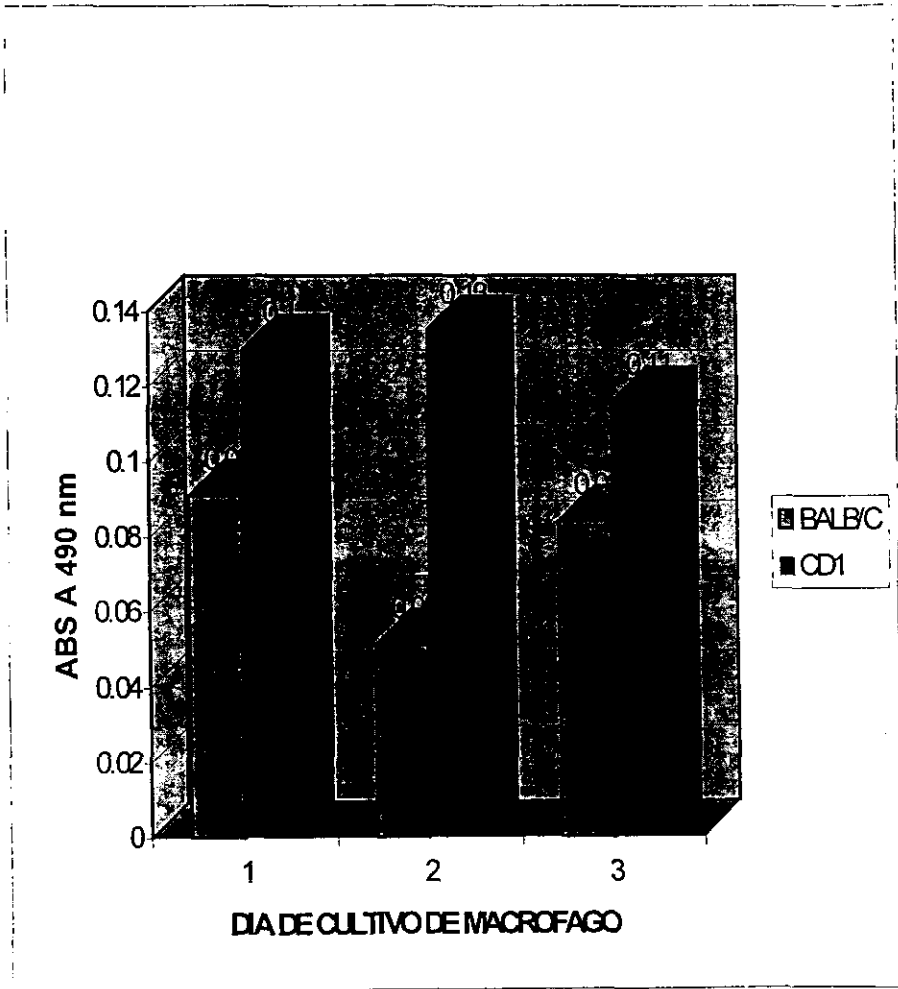
Las *gráficas 8, 9, 10, 11 y 12* muestran la respuesta que se obtiene con las dos cepas de ratones ensayadas, analizándose del día 1 al día 5 después de la infección con denguevirus.



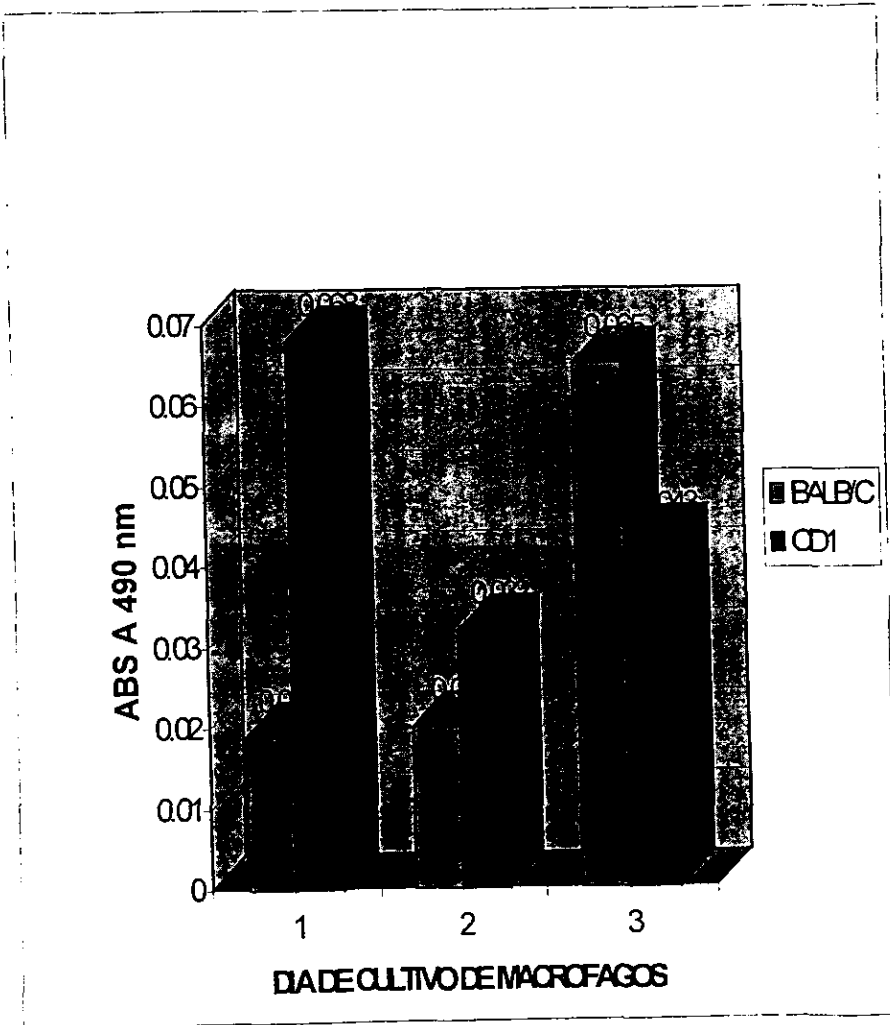
Gráfica 8. Resultados de la prueba de CELL-ELISA practicada con macrófagos de ratones cepa BALB/C contra CD1 inmunizados con Den-2, al día 1 después de la infección con denguevirus.



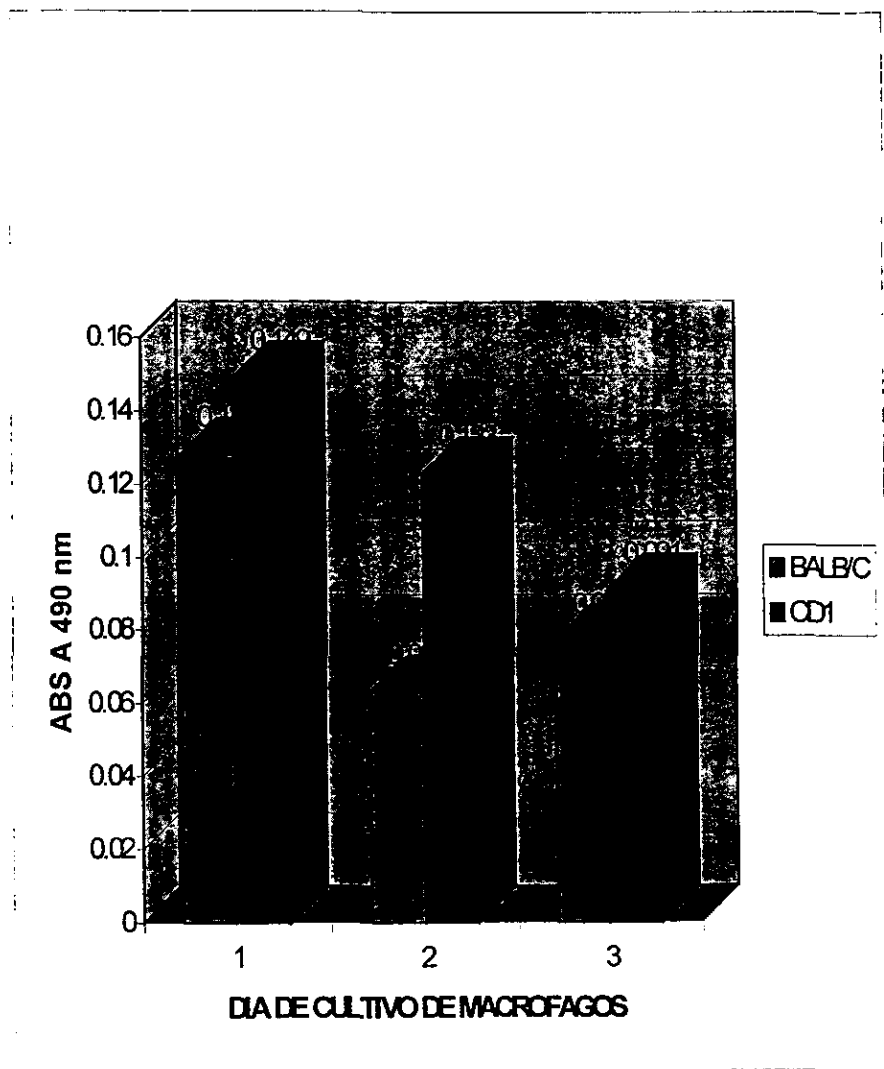
Gráfica 9. Resultados de la prueba de CELL-ELISA practicada con macrófagos de ratones cepa BALB/C contra CD1 inmunizados con Den-2, al día 2 después de la infección.



Gráfica 10. Resultados de la prueba de CELL-ELISA practicada con macrófagos de ratones cepa BALB/C contra CD1 inmunizados con Den-2, al día 3 después de la infección.



Gráfica 11. Resultados de la prueba de CELL-ELISA practicada con macrófagos de ratones cepa BALB/C contra CD1 inmunizados con Den-2, al día 4 después de la infección.



Gráfica 12. Resultados de la prueba de CELL-ELISA practicada con macrófagos de ratones cepa BALB/C contra CD1 inmunizados con Den-2, al día 5 después de la infección.

En el día 1 de cultivo de macrófagos las dos cepas casi dan la misma lectura : $CD1 = 0.141$ y $BALB/C = 0.148$, pero en los días 2 y 3 de cultivo hay un incremento en las lecturas que se obtienen con CD1.

El CELL-ELISA de los macrófagos que se obtuvieron 2 días después de la infección muestra una gran diferencia entre las lecturas de BALB/C y CD1. En la gráfica 10 se puede apreciar que las lecturas de CD1 se incrementan casi al doble de las de BALB/C. Así, en el día 1 de cultivo de macrófagos, BALB/C da una lectura de 0.076 y CD1 da 0.182 ; en el día 2 BALB/C da 0.07 y CD1 da 0.171 ; y al día 3, BALB/C da una lectura de 0.087 y CD1 da 0.162. Como se puede apreciar, en este ensayo, se obtuvieron mejores resultados con la cepa CD1 que con la BALB/C, y que el día 1 de cultivo resulta ser con el que se tienen lecturas más altas.

Se observan casi los mismos resultados con el ensayo que se hizo con los macrófagos obtenidos 3 días después de infectados los ratones. En la gráfica 11 se aprecia el incremento de las lecturas obtenidas por CD1 : en el día 1 de cultivo de macrófagos, BALB/C da una lectura de 0.091 y CD1 da 0.13 ; en el día 2 BALB/C da 0.051 y CD1 da 0.135 y en el día 3, BALB/C da 0.081 y CD1 da una lectura de 0.116.

En la gráfica 12 se muestran los resultados de la respuesta de BALB/C y CD1 en el día 4 después de obtener los macrófagos. En los días de cultivo de macrófagos 1 y 2 se sigue observando el incremento de la respuesta de CD1 : En el día 1 BALB/C da una lectura de 0.019 y CD1 da 0.068 (aquí la diferencia es muy grande), y en el día 2 de cultivo BALB/C da 0.02 y CD1 da 0.032. Sin embargo, en el día 3 de cultivo de macrófagos BALB/C da una lectura mayor (0.065) que CD1 (0.043).

En el día 5 después de obtener los macrófagos (gráfica 13) también se obtienen lecturas mas altas con CD1 que con BALB/C. Así, en el día 1 de cultivo de macrófagos BALB/C da una lectura de 0.126 y CD1 da 0.149, en el día 2, BALB/C da 0.063 y CD1 da 0.123, y al día 3 BALB/C da 0.077 y CD1 da 0.091.

De todo lo anterior, en lo referente a cual cepa es la más apropiada, se puede decir que con la cepa abierta CD1 se obtienen mejores resultados, los cuales se reflejan en lecturas altas. Y que se trabaja mejor cultivando los macrófagos en el día 1 después de extraerlos, aunque no hay mucha variación si se cultivan al día 2 y 3.

Se puede explicar lo anterior teniendo en cuenta que los ratones CD1 al ser de cepa abierta responden mejor a una infección con denguevirus, ya que la enfermedad del dengue no esta ligada a algún factor genético. Los macrófagos infectados con denguevirus de ratones BALB/C al ser de una cepa singénica no responden de igual forma que como responderían los macrófagos humanos.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Se lograron recuperar los cuatro serotipos de los virus del dengue cepas prototipo y silvestre, utilizando para ello cultivos de células C6/36; las cuales resultaron ser altamente susceptibles a la infección con éstos virus, ya que se obtuvieron títulos virales apropiados para realizar los ensayos que se practicaron en este trabajo.

En cuanto a las técnicas empleadas para hacer la titulación viral, se puede decir que se perfeccionaron las condiciones del manejo y tratamiento de variables tales como qué pase viral es el apropiado para obtener una mayor recuperación del virus, el tipo de célula con que se puede practicar mejor la titulación; además de que se probaron dos técnicas de titulación, siendo la titulación por ELISA de captura de antígeno la que resultó ser más efectiva en cuanto a tiempos y resultados.

Se alcanzó el grado de infección en los ratones necesario para recuperar macrófagos marcados con el antígeno del dengue, los cuales resultaron idóneos para practicar un ensayo de CELL-ELISA. Con este ensayo se comprueba que se lleva a cabo el reconocimiento del antígeno expuesto en la superficie de dichos macrófagos.

Además, se concluye que al emplear la cepa de ratones CD1 se tienen mejores resultados en la técnica de CELL-ELISA mostrando mayor susceptibilidad a la infección.

Sin embargo, para evaluar la sensibilidad y especificidad de la prueba es necesario continuar con más estudios que involucren medidas estadísticas que midan los parámetros antes mencionados.

Con todo lo anterior, podemos señalar que para las infecciones con denguevirus, el uso de los modelos murinos se empleará más a futuro para evaluar el comportamiento inmunológico experimental molecular tal como la evaluación de: niveles de citocinas (IL-6, INF- α , β y γ , TNF, y otras posiblemente involucradas). La participación relevante de las

plaquetas en FDH y sus consecuencias, la generación e importancia de las clases de Inmunoglobulinas, la activación de los macrófagos y linfocitos y sobre todo la presentación de antígeno por macrófagos y conocer los péptidos relevantes que son presentados por estos macrófagos y que representan a nivel molecular los verdaderos epítopos inmunológicamente importantes.

Con el comportamiento y aplicación de estas técnicas se facilitará la instalación del estudio del dengue, en un modelo animal sencillo y económico que nos llevará a contestar preguntas acerca de la enfermedad sobre todo a nivel molecular; no olvidando la importancia que representan los síntomas y las pruebas inmunológicas actuales que se evaluaron aquí.

6. APENDICE

PREPARACION DE SOLUCIONES**BENZAL AL 10% CON ALCOHOL AL 70%**

Benzal 100 mL
Etanol..... 700 mL
Agua..... 200 mL

Soln. para desinfectar superficies.

DMEM/10% SFB (MEDIO DE CRECIMIENTO)

DMEM 2X 500 mL
SFB..... 100 mL
Bicarbonato..... 10 mL
Agua..... completar a 1000 mL

8% BAPBS

NaCl..... 8 g
KCl..... 0.2 g
Na₂HPO₄..... 0.9 g
KH₂PO₄ 0.105 g
Albúmina 80 g
Agua completar a 1000 mL

DMEM / 0.4 ALBUMINA BOVINA (MEDIO DE MANTENIMIENTO)

DMEM 2X.....	500 mL
8% BAPBS	50 mL
Bicarbonato	15 mL
Penicilina-estreptomicina	1 mL
Agua	Completar a 1000 mL

PBS pH=7.4

NaCl.....	4 g
KCl.....	0.10 g
NaH ₂ PO ₄	0.455 g
KH ₂ PO ₄	0.06 g
Agua desionizada.....	500 mL
Ajustar pH	

FTA BUFFER

Cloruro de sodio.....	7.65 g
Fosfato disódico.....	1.269 g
Fosfato monosódico.....	0.1 g
Fosfato monopotásico.....	0.2113 g

PBS-GELATINA

FTA-buffer.....	186 g
Gelatina.....	0.1 g

Agua desionizada....200 mL

FORMOL-PBS pH=7

Formaldehido 38%.....100 mL

Fosfato sódico dibásico.....6.5 g

Fosfato sódico monobásico.....4 g

Agua desionizada..... 900 mL

GELATINA AL 5% EN PBS

Gelatina.....5 g

PBS pH=7.4.....100 mL

TWEEN 20 AL 0.05% EN PBS

Tween 20.....0.05 mL

PBS pH= 7.4.....100 mL

FOSFATO DIBASICO 0.2 M

Fosfato dibásico.....1.432 g

Agua.....20 mL

ACIDO CITRICO 0.1 M

Acido cítrico.....0.420 g
 Agua.....20 mL

DICLORHIDRATO DE O-FENILENDIAMINA

O-Fenilendiamina.....2.5 mg
 Acido cítrico 0.1 M.....1.5 mL
 Fosfato dibásico 0.2 M.....1.62 mL
 Peróxido de hidrógeno.....10 µL

CLORURO DE AMONIO AL 0.17 M

Cloruro de amonio.....4.53 g
 agua.....500 mL

SOLUCION SALINA EQUILIBRADA DE HANKS 10X

SOL. A

NaCl.....40 g
 KCl.....2 g
 MgSO₄·7H₂O.....1 g

Se disuelven 0.70 g de CaCl₂ en 30 mL de agua desionizada y lentamente se agregan a la solución de las otras sales precipitadas, agitando constantemente. Añadir una cantidad suficiente de agua destilada para aumentar el volumen total a 250 mL.

Adicionar la soln. b.

SOLN. B

Na₂ HPO₄0.30 GKH₂ HPO₄

Glucosa.....5.0 g

Rojo de fenol.....0.05 g

Se mezclan con agua bidestilada para obtener 250 mL.

MEDIO CON CARBOXIMETILCELULOSA

SFT.....25 mL

Medio MEM.....25 mL

CMC al 3%.....100 mL

Penic-Strept.....2.5 mL

Bicarbonato 7.5%.....3.5 mL

Agua desioniz.....250 mL

CARBOXIMETILCELULOSA (CMC) AL 3%

CMC.....3 g

Agua desion.....100 mL

NAPTOL BLUE-BACK

Naptol.....0.9 g

Acetato de sodio anhidro.....13.6 g

Acido acético glacial.....60 mL

Agua desion. aforar a1000 mL

BUFFER DE CARBONATOS A pH = 9.6

Solución A: Bicarbonato de sodio 1.0 M84 g/1000 mL agua

Solución B: Carbonato de sodio 1.0 M 100 g/1000 mL agua

Agregar 45.3 mL de sol. A con 18.2 mL de sol. B.

Añadir agua destilada c.b.p. 1000 mL

Ajustar pH a 9.6

LIQUIDO DE HAYEN

Dicloruro de mercurio.....0.5 g

Cloruro sódico.....1 g

Sulfato sódico.....5 g

Agua destilada aforar a200 mL

LIQUIDO DE TURK

Acido acético glacial.....1 mL

Soln. al 1% de azul de metileno...1 mL

Agua destilada aforar a100 mL

7. BIBLIOGRAFIA

1. HALSTEAD SB. Dengue hemorrhagic fever; a public health problem and field for research. WHO Bull. 1980, 58: 1-21.
2. BELSHE RB. Capítulo: Dengue. En: Textbook of Human Virology. Second Edition. Edit. Mosby Year Book. E. U. 1991. pp 649-662.
3. GOMÉZ DH, IBAÑEZ S-BERNAL. Dengue. Segunda Unidad. En: VALDESPINO GJ, VELASCO CO, ESCOBAR GA (Eds). INDRE. Enfermedades Tropicales en México. Enfermedades virales. Capítulo 2. 1994. pp 85-97.
4. GUBLER DJ. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: prospects for the year 2000. Chapter in Dengue Hemorrhagic Fever. World Hlth. Org Monog. p. Thongcharoeng, Ed. New Delhi, India. 1990. pp 19-27.
5. HERNANDEZ FC. Comparación entre las técnicas de MAC-ELISA e Inhibición de la hemaglutinación utilizadas en el diagnóstico de dengue en México en el año de 1990. TESIS. 1993.
6. CLARKE DH, CASALS J. Arboviruses, Group B. In: Hosfall FL, Tamm I (Eds.): Viral and rickettsial diseases of man. Ed. 4. Philadelphia, Lippincott, 1965, pp 606-658.
7. SABIN AB. Research on dengue during World War II. Am J Trop Med Hyg. 1952, 1: 30-50.
8. HOTTA S. Dengue and related hemorrhagic diseases. St. Louis: Warren H. Green. Inc, 1969. pp 36-44.
9. MOODY C, DYER A, *et al.*, Epidemiologic, clinical and administrative observations on dengue in Jamaica 1977. In: Dengue in the Caribbean. PAHO Scientific publication 1977, 375:11-18.
10. STOLLAR V, SCHLESINGER RW, STEVENS TM. Studies on the nature of dengue viruses. III. RNA synthesis in cell infected with type 2 dengue virus. Virology 1967, 33: 650-658.

11. RICE CM, LENCHES EM, EDDY SR, SHIN SJ, SEETS RL, STRASS JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 1985, 229: 726-733.
12. HEINZ, F. X., AUER G., STIASNY K., HOLTZMANN H. The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. *Arch Virol.* 1994 [suppl] 9: 339-348.
13. SMITHHURN KC. Antigenic relationship among certain arthropod-borne viruses. *J. Immunol.* 1954, 72: 376-388.
14. De MADRID AT, PORTERFIELD JS. The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J. Gen. Virol.* 1974, 23: 91-96.
15. HENCHAL EA, HENCHAL LS, SCHLESINGER JJ. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunised mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J. Gen. Virol.* 1988, 69: 2101-2107.
16. ZARATE ML. *Problemas para lograr una vacuna.* Vacunas Ciencia y Salud. Capitulo 31. I.N.D.R.E. Subsecretaria de Coordinación y Desarrollo. 1992, pp 395-405.
17. IBAÑEZ-BERNAL S. Nuevo registro altitudinal de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) en México. *Folia Entomol Mex*, 1987,72:163-164.
18. NELSON MJ. *Aedes aegypti*. *Biología y Ecología.* Washington DC: OPS, 1986. pp 1-50.
19. KUBERSKI T, ROSEN L, REED D, MATAIKA J. Clinical and laboratory observations on patients with primary and secondary dengue tipo 1 infection with hemorrhagic manifestations in Fiji. *Am J Trop Med Hyg.* 1977, 26: 775-783.
20. GOMEZ-DANTES H, MONTESANO C, TAPIA C. Dengue y dengue hemorrágico: cuadro clínico, diagnóstico y vigilancia epidemiológica. *Enf Inf y Micr* 1995; 15(3) 135-143.
21. HALSTEAD SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenic cascade. *Rev Infect Dis.* 1989, 11:5830-5839.

22. CHUNGUE E, DEUBEL V, CASSAR O, LAILLE M, MARTIN PM. Molecular epidemiology relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. *J Gen Virol.* 1993; 74: 2765-2770.
23. KURANE I, MEAGER A, ENNIS FA. Induction of interferon alpha and gamma from human lymphocytes by dengue virus infected cells. *J Gen Virol.* 1986; 67:1653-1661.
24. NELSON ER. Dengue Fever: a thrombocytopenic disease?. *JAMA.* 1964; 190: 99-103.
25. NOGUEIRA RM, ZAGNER SM, MARTINS IS, LAMPE E, MIAGOSTOVICH MP, SCHATZMAYR HG. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86: 269.
26. MARKOFF LJ, INNIS BL, HOUGHTEN R, HENCHAL LS. Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J Infect Dis.* 1991; 164:294-301.
27. MARTINEZ T, E. Dengue y dengue hemorrágico: aspectos clínicos. La Habana, Cuba. 1995.
28. KURANE I, ROTHMAN AL, LIVINGSTON PG, GREEN S, GAGNON SJ, JANUS J, INNIS BL. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol.* 1994 [suppl] 9: 59-64.
29. MESTAN J, DIGEL W, MITTNACHT S, HILLEN H, BLOHM D, MOLLER A. Antiviral effects of recombinant tumor necrosis factor *in vitro*. *Nature.* 1986; 323: 816-818.
30. INNIS BL, NISALAK A, NIMMANNITYA S, KUSALERDCHARIYA S, CHONGSWASKI V, SUNTAYAKORN S, PUTTISRI P. An Enzyme-Linked Immunosorbent assay to characterize dengue infection where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Med Hyg.* 40:418-427, 1989.
31. HENCHAL EA, PUTNAK JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* Vol. 3. No. 4: 376-396

32. KOURI G, GUZMAN M, BRAVO J, TRIANA C. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bulletin of the World Health Organization*. 1989. 67 (4):375-380.
33. HOKE CH. Protection against Japanese Encephalitis by inactivated vaccines. *New Engl J Med*. 1988, 319: 608-614.
34. KLIKS SC, NISALAK A, BRANDT WE, WAHL L, BURKE DC. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1980, 40: 444-451.
35. HALSTEAD SB, ECKELS KH, PUTVATANA R, LARSEN LK, MARCHETTE NJ. Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. IV. Characterization of a vaccine candidate in fetal rhesus lung cells. *Am J Trop Med Hyg*. 1984, 33: 679-683.
36. BANCROFT WH, SCOTT RM, ECKELS KH, HOKE CH, SIMMS TE, JESRANI KDT, SUMMERS PL, DUBOIS DR, TSOULOS D, RUSSELL PK. Dengue virus type 2 vaccine: reactogenicity and immunogenicity in soldiers. *J Infect Dis*. 1984, 149: 1005-1010.
37. DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Información Preeliminar. Boletín de la Dirección General de Epidemiología. Semana 53 de 1998 y Semana 52 de 1999.