

Agradecimientos

A Dios, al que le pedí todos los días para que todo saliera bien.

Este es un día muy importante en mi vida porque empecé de técnico y hoy ya estoy discutiendo mi maestría fue realmente difícil llegar hasta aquí atravesé en el camino grandes dificultades, que me iban quitando a veces las ganas de terminar pero muchas personas me alentaron entre ellas mi mamá, mi esposo, mi hija y su novio y a mis amistades que me recordaban todos los días lo importante que es superarse y perseguir nuestro sueño y otras que me ayudaron con sus conocimientos y habilidades entre ellas están las muchachitas de anatomía patológica y la Dra. Virginia con su vasta experiencia me asesoró que aunque después se cambió de tema me ayudaron muchísimo en aquel momento. Los compañeros del Bioterio que realmente sin ellos no hubiera podido realizar nada fueron más que importante en mi tesis especialmente a Ramón, a Alienys, que aunque ya no estaba aquí no deje de pedirles sus consejos y asesoría: no se libró de ser mí ni a distancia. A Oney, Aina y Eglis todos colaboraron mucho con la realización de varios de los objetivos de mi tesis. A mis tutores que fue un verdadero honor trabajar con ellos porque aprendí mucho que hicieron grandes esfuerzos para que todo saliera dentro de todas las cosas pendientes, e hicieron un espacio para mí, sobretodo Ana que tiene una capacidad enorme para estar en mil cosas pero se esforzó mucho, mucho tratando de que yo entendiera los principios de la inmunología y solo ella y yo sabemos todo lo que tuvimos que esforzarnos para que este trabajo se pudiera terminar. En un futuro sería muy bueno seguir trabajando juntas. A Susana que fue siempre mi ejemplo a seguir porque como yo empezó de técnico y hoy es dos veces Dra en Ciencias. Ojala tenga fuerzas (importante: no ahora) para hacer mi doctorado. Ella además me prestó su tiempo y su casa y en nombre de nuestra amistad a última hora me sirvió de gran ayuda. A la Dra. Lupe por su apoyo y por empujarme en todo momento que había que terminar: gracias, porque es un placer trabajar con ella y es un ejemplo a seguir para todos.

En fin agradecerles a todos los que han hecho posible este sueño y sin más que decir:

Sinceramente, Muchas gracias

Resumen

Los virus del Dengue y el Zika son flavivirus antigénicamente relacionados transmitidos al hombre por mosquitos *Aedes aegypti*. A pesar de la importancia de estos como patógenos humanos, aún no existe tratamiento específico o vacuna eficaz para su control. Resulta de gran interés evaluar la respuesta inmune cruzada que ellos generan por su posible impacto en la patogenia de las enfermedades que ellos causan, y aplicación directa en el diseño y evaluación de candidatos vacunales. En el presente trabajo caracterizamos la respuesta inmune inducida por la infección por estos flavivirus en el modelo murino. Para esto se determinaron los niveles de los anticuerpos inducidos en ratones Balb/c inoculados con los mismos. Se evaluó la respuesta inmune celular específica y de reactividad cruzada frente a antígenos virales. Los resultados mostraron la inducción de una respuesta humoral y celular específica pero también cruzada entre estos flavivirus. Ambos virus indujeron anticuerpos IgG, siendo los mayores niveles frente al Dengue y a predominio de la subclase IgG2a, mientras que en el Zika predominó la IgG1. Tras el cultivo de las células del bazo de los ratones inoculados con el virus Dengue se indujeron los mayores niveles de TNF α , predominando el IFN γ en las células TCD4+ en la respuesta cruzada frente al Zika. Por su parte, en los ratones inoculados con Zika los mayores niveles de IFN γ se produjeron frente a este virus por células TCD8+. Los resultados de la presente investigación tienen implicaciones en el diseño y evaluación de vacunas frente a estos flavivirus.

Índice

I Introducción	1
Objetivos.....	3
Objetivo General	3
Objetivos Específicos.....	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
II.1. Características Generales de los virus DEN y ZIK.....	4
II.2. Proteínas virales de DEN y ZIK	6
II.2.1 Proteínas estructurales	6
II.2.2. Proteínas no estructurales	7
II.3. Epidemiología del DEN y el ZIK	10
II.4. Cuadro clínico del DEN.	12
II.5. La respuesta inmunitaria a virus DEN	12
II. 5.1. Inmunidad innata	12
II.5.2. Respuesta mediada por anticuerpos	13
II.5.3. Respuesta mediada por células.....	14
II.6. Patogénesis del DEN.....	16
II.7. Cuadro clínico de ZIK	19
II.8. Respuesta inmune a ZIK.....	20
II.8.1. Respuesta mediada por células.....	20
II.9. Patogénesis de la infección por ZIK.	21
II.10. Estudios en modelos murinos de la infección por DEN y ZIK.....	24
II.11. Desarrollo de vacunas contra el DEN y ZIK	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
III.1 Tipo de Estudio.....	28
III.2 Universo y muestra de Estudio.....	28
III. 3. Cepas Virales.....	29
II.3.1. Titulación de los virus DENGUE y ZIKA por micro-método en células Vero IBSC.29	
II.4. Esquema de inoculación viral en el modelo murino.	29
III.4.1. Observación de signos de enfermedad	30
III.5. Colecta de sangre.....	30
III.6. Determinación de la respuesta inmune humoral.....	30
III.6.1 ELISA subclases de IgG.....	30
II.7. Determinación de la respuesta inmune celular	31
II.7.1 Aislamiento de las células del bazo de los ratones inoculados.....	31
III.7.2 Cuantificación de citoquinas en sobrenadante de cultivo de células del bazo estimulados con el virus.....	32
III.7.3 Detección de citoquinas intracelulares y marcadores de superficie celular por citometría de flujo.....	33
IV Resultados y discusión	35
IV.1 Descripción de la morbilidad en los ratones inmunizados con DEN y ZIK	35
IV.2 Respuesta de anticuerpos en ratones inoculados con virus DEN o ZIK.	36
IV 3. Respuesta de células del bazo de los ratones inoculados con los virus DEN y ZIK.....	44
Conclusiones.....	59

Recomendaciones.....	60
Referencias bibliográficas.....	61

I Introducción

El virus zika (ZIK) es un flavivirus que ha re-emergido recientemente como un problema de salud a nivel mundial. La infección causa en el humano una enfermedad febril leve, pero se ha asociado a malformaciones congénitas en neonatos y al Síndrome de Guillain-Barré en adultos. En los últimos dos años se ha expandido por el continente americano llegando a millón y medio de reportados en esta área (Hamel et al., 2016).

Los virus del dengue (DEN), complejo formado por 4 serotipos virales (DEN-1, DEN-2, DEN-3, y DEN-4) es también un flavivirus que, como el ZIK, causa una enfermedad febril en humanos, pero en una proporción de personas, al exponerse en infección secundaria a un serotipo diferente del de la primoinfección, se ha asociado al fenómeno de inmuno-amplificación dependiente de anticuerpos y a la liberación masiva de citoquinas pro-inflamatorias que llevan a la extravasación de plasma y al cuadro grave de la enfermedad, constituyendo un importante problema de morbimortalidad en la actualidad, en que unos 2.5 billones de personas están en riesgo de contraer la infección y se reportan anualmente más de 50 millones de casos con 21 mil muertes (Bhatt et al., 2013).

Ambos virus están estrechamente relacionados desde el punto de vista antigénico por su gran homología de secuencias aminoacídicas de sus proteínas. Además, comparten el mismo vector transmisor (mosquito *Aedes aegypti*) y co-circulan en las mismas áreas geográficas. Es por eso que es común encontrar casos de infección por ZIK en individuos inmunes a DEN, o infección por DEN en individuos inmunes a ZIK, e incluso no puede descartarse la posibilidad de una co-infección concurrente de ambos virus en un mismo individuo.

Puesto que ambos virus comparten un 52–57% de su secuencia aminoacídica total, la respuesta inmune que estos inducen también tiene un alto grado de reactividad cruzada en su reconocimiento.

Se ha reportado recientemente que la transferencia pasiva de anticuerpos anti-DEN en animales potencian la patogénesis de la infección por ZIK (Bardina et al., 2017) Por su parte, la exposición previa a ZIK aumenta significativamente la viremia de DEN 2 en monos (George et al., 2017) .La

participación de la respuesta inmune anti-viral en la patogénesis de la enfermedad grave o en las secuelas o complicaciones de estas, obliga a la comunidad científica internacional a la caracterización exhaustiva de los mecanismos involucrados en esta inmuno-patogenia y contraponerlos a los mecanismos que participan en la protección. Solo así se podrá avanzar con paso seguro en la obtención de candidatos vacunales que no representen un riesgo para la población y sean eficaces en la prevención de estas infecciones.

La ausencia de modelos animales idóneos para el estudio de la patogénesis de estas enfermedades, o para la evaluación de formulaciones vacunales, obliga a la caracterización de la infección y de la respuesta inducida por esta en modelos asequibles que nos permitan lograr una aproximación al entendimiento de estos fenómenos, aunque no de la forma más idónea por no ser reproducibles los eventos vinculados a la infección que acontecen en el humano. De ahí que será necesaria la integración de diferentes aproximaciones a partir de estudios *in vivo* y *ex vivo* en humanos, experimentos *in vitro* con líneas celulares y modelos animales, para avanzar en el conocimiento de estas enfermedades.

El presente trabajo se propuso evaluar la respuesta inmune frente a la infección por virus ZIK en el modelo murino, comparándola con la respuesta inmune inducida por el virus DEN, y determinar la reactividad cruzada en el reconocimiento de anticuerpos y células T entre ambos flavivirus.

Objetivos

Objetivo General

- Caracterizar la respuesta inmune humoral y celular inducida por la infección por los DEN y ZIK en el modelo murino.

Objetivos Específicos

- Determinar los niveles y especificidad de los anticuerpos inducidos en ratones Balb/c inoculados con DEN o ZIK por vías intraperitoneal y subcutánea.
- Evaluar la respuesta inmune celular específica y de reactividad cruzada frente a antígenos de DEN o ZIK inducida en ratones inoculados con los virus.
- Identificar por citometría de flujo las subpoblaciones de linfocitos T murinos que expresan IFN γ en respuesta a la estimulación con virus DEN o ZIK.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Características Generales de los virus DEN y ZIK

El DEN y el ZIK son enfermedades febriles agudas de origen viral transmitidas al hombre por la picadura de un mosquito infectado que actúa como vector de los virus y constituyen en la actualidad enfermedades importantes desde el punto de vista de morbilidad y mortalidad (Gubler, 1998).

Ambos virus pertenecen a la familia *Flaviviridae* género flavivirus. En el caso del complejo DEN está constituidos por cuatro serotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, para los cuales se ha descrito una homología de secuencia de un 70% aproximadamente. Esta homología es mayor para DEN-1, DEN-3 y DEN-4, no así para DEN-2, el cual parece diferir en su origen evolutivo (Monath, 1997). En el ZIK se ha reportado un único serotipo (Zhang et al., 2017).

Como flavivirus, estos son virus esféricos de aproximadamente 40 a 60 nm de diámetro. Su genoma está protegido por una cápside proteica, la cual está rodeada por una envoltura lipoproteica que presenta pequeñas proyecciones. Su densidades de 1,23 cm³, y tiene un coeficiente de sedimentación de 210S. Debido a la presencia de envoltura lipídica estos virus son susceptibles a las lipasas y solventes lipídicos como el cloroformo y la acetona, los que llevan a la inactivación (destrucción de la infectividad) de estos agentes. En general, los flavivirus son sensibles a los pH ácidos y temperaturas elevadas, luz ultravioleta, irradiación gamma, y diferentes desinfectantes como alcohol, yodo, fenol, cloro entre otros (Schlesinger, 1977).

Los viriones del DEN y del ZIK están constituidos por un genoma de ácido ribonucleico (ARN) rodeado por una nucleocápside de simetría icosaédrica, de 30 nm de diámetro, la cual está constituida por la proteína C y una envoltura lipídica de 10 nm de grosor. La bicapa lipídica tiene 2 proteínas asociadas, una de membrana (M) y otra de envoltura (E), que da lugar a las proyecciones que sobresalen de la superficie de los viriones (figura II.1). Las partículas virales que son liberadas al medio extracelular no pueden distinguirse de las que se encuentran en las vesículas intracelulares. Estas últimas, las partículas inmaduras, contienen exclusivamente la

proteína precursora prM sin procesar en vez de la M, y son menos infecciosas que las que son liberadas (Schlesinger, 1977).

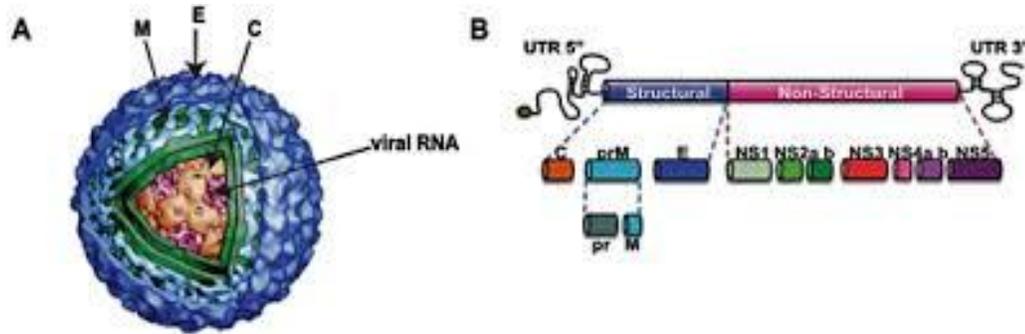


Figura II.1. Representación esquemática del virus y del genoma viral que codifica para las diferentes proteínas (Boletín OMS, 2000)

El genoma de ARN es de simple cadena y polaridad positiva, estructurado como un ARN mensajero (ARNm) y compuesto por aproximadamente 11000 pares de bases (pb), de las cuales, un poco más de 10000 pb se integran en un único marco de lectura abierto (ORF *del inglés*- open reading frame) flanqueado en los extremos 5' y 3' por regiones no codificantes (UTR *del inglés*- untranslated regions). Estas UTR 5' y 3' contienen elementos conservados de estructura secundaria del ARN que son esenciales para la replicación eficiente y la traducción del ARN viral (Wang, He, & Anderson, 1999).

El procesamiento co- y post- traduccional del polipéptido por peptidasas, proteasas celulares y virales así como por glicosiltransferasas celulares produce 3 proteínas estructurales hacia el extremo N-terminal, la proteína de la cápside (C), la proteína E y la proteína M y 7 proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (NS *del inglés* Non Structural) (Figura 11.1). El orden de las moléculas en la región codificable ha sido determinado como: NH₂ - ANCHC - C - prM - E - NS1 - NS2A - NS2B - NS3 - NS4A - NS4B - NS5 - COOH, donde ANCH y prM son precursores de C y M respectivamente (Barba-Spaeth et al., 2016b; P. Yang, Kautner, Koh, & Lam, 1994).

II.2. Proteínas virales de DEN y ZIK

II.2.1 Proteínas estructurales

El virión maduro contiene 3 proteínas estructurales: C: proteína de la nucleocápside o núcleo; M: proteína asociada a la membrana; y E: la proteína de la envoltura. El virus inmaduro intracelular contiene una proteína llamada prM, precursor de la M.

La proteína C es el primer polipéptido viral sintetizado, de 11 kDa. Es altamente básico, se cree que esta característica influye en su interacción con el ARN. El precursor glicosilado prM da lugar a M durante la etapa de maduración viral. Este evento parece ser crucial y terminal para la morfogénesis del virión (Heinz & Stiasny, 2012). El segmento prM del amino terminal es secretado al medio extracelular. El corte proteolítico ocurre un poco antes o coincidiendo con la liberación del virión, pues prM y M se encuentran en viriones intracelulares y extracelulares, respectivamente. Los anticuerpos contra prM pueden mediar la inmunidad protectora, quizás por neutralización de los viriones liberados que contiene proteínas prM no procesadas (Osatomi & Sumiyoshi, 1990; Plevka et al., 2011; Vazquez et al., 2002).

La proteína E es la mayor proteína en la superficie de los viriones de Flavivirus (53 kD) y también la más conservada del género. Es una proteína de fusión que media tanto la unión a receptor celular como la fusión de membranas (Y. Chen, Maguire, & Marks, 1996). Cada proteína E contiene tres dominios estructurales: el dominio I (DI) forma un barril de hojas β y es el dominio central el cual está involucrado en la organización estructural de la envoltura; el dominio II (DII) un dominio de dimerización y el tercer dominio (DIII) un dominio inmunoglobulínico los cuales están relacionados con la interacción con el receptor celular (Mazumder et al., 2007). Esta constituye la principal proteína desde el punto de vista antigénico, contiene epítopes reconocidos por anticuerpos neutralizantes y mediadores de ADCC, involucrados en la protección, así como epítopes implicados en el reconocimiento de anticuerpos que median la patogenicidad.

II.2.2. Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales comprenden tres cuartas partes de la poliproteína de los virus DEN y ZIK, y participan en la replicación y expresión del genoma viral. Además, participan en el ensamblaje de la partícula viral, liberación y evasión de la respuesta inmune del hospedero, entre otras funciones (Avirutnan et al., 2006).

La proteína NS1 es una glicoproteína no estructural que presenta un peso molecular de 43-48 kDa, dos sitios de glicosilación en su región N-terminal y doce residuos de cisteína conservados que forman seis enlaces disulfuro (Lee et al., 2017). La glicoproteína NS1 presenta un mosaico de determinantes antigénicos específicos de serotipo y también algunos de reactividad cruzada, de complejo y de grupo. Se cree que intervenga en el ensamblaje del virión. Esta proteína existe asociada a la célula, en su superficie o en formas no víricas extracelulares. Se ha observado protección frente a la infección por DEN, al ocurrir lisis mediada por anticuerpos, de células infectadas con el virus que expresan la proteína NS1 en la superficie celular (Schlesinger, 1977). Las funciones de NS1 no han sido completamente dilucidadas, evidencias experimentales sugieren que esta proteína pudiera estar involucrada en la replicación del ARN viral, específicamente en la maduración del virión cooperando en la conservación de una conformación apropiada de la proteína E inmadura (Sampath & Padmanabhan, 2009). En la NS1 la diferencia entre ese componente del ZIK y los del DEN y del Nilo Oriental radica en la distribución de las cargas eléctricas (positiva o negativa) en su superficie (Brown, 2016). Esos cambios pueden afectar a la forma en que el patógeno interacciona con proteínas del hospedero, según los investigadores, creen que la proteína pueda servir para mejorar el diagnóstico y el desarrollo de medicamentos antivirales.

Por otra parte una participación de la forma extracelular de la proteína NS1 del DEN en los mecanismos de evasión y patogenia viral se ha sugerido (Lee, et al., 2017). Uno de los eventos propuestos donde participa la proteína NS1 es en la unión de anticuerpos anti-NS1 a las plaquetas y a las proteínas de la cascada de la coagulación. Se demostró que los anticuerpos anti-NS1 reconocen la proteína disulfidoisomerasa en las plaquetas formando un complejo, el cual impide la agregación plaquetaria. En otros estudios también se describió la asociación de elevados títulos

de anticuerpos anti-NS1 con las funciones de la coagulación (M. C. Chen et al., 2009), lo cual sugiere que los anticuerpos anti-NS1 pudieran estar implicados en el desarrollo de eventos hemorrágicos en las formas severas de la enfermedad. Por otra parte se ha planteado que la proteína NS1 antagoniza al componente C4 del complemento lo que permite la protección de partículas de DEN a partir de la neutralización dependiente del complemento (Avirutnan et al., 2010; Avirutnan et al., 2011).

La proteína NS1 presente en la membrana de las células infectadas por DEN induce una respuesta inmune de anticuerpos específicos que la hacen blanco del complemento o de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Lindenbach & Rice, 1999). Por esta razón algunos autores han planteado la posibilidad de utilizar la proteína NS1 como un candidato vacunal debido a la alta inmunogenicidad y a la protección que induce en animales experimentales frente a otros flavivirus (Amorim et al., 2010)

La proteína NS2 está constituida por 2 proteínas, la NS2a y la NS2b. La primera se ha identificado como una proteína hidrofóbica de 20-22 kDa de peso molecular, esta se localiza en los supuestos sitios de replicación del ARN, donde participa en el reclutamiento de los tripletes de ARN necesarios para la replicasa que se encuentra unida a la membrana (Lanciotti, Gubler, & Trent, 1997). Además, presenta varios dominios de transmembrana que se requieren para el procesamiento proteolítico del extremo C-terminal de NS1 (Chambers, McCourt, & Rice, 1989). La proteína NS2b se requiere para el funcionamiento como cofactor en el complejo NS2b-NS3 con actividad proteasa a partir de una región en su dominio de 40 aminoácidos (Lindenbach & Rice, 2001). Este complejo es responsable, junto con la peptidasa señal del hospedero, del procesamiento de las uniones entre las proteínas no estructurales y de mediar la ruptura proteolítica del precursor E-prM-C (FitzSimmons & Shah, 2016; Yamshchikov & Compans, 1994).

La proteína NS3 tiene un peso molecular de 70 kDa, se sugiere que sea una proteasa viral activa en el procesamiento postraducciona de la poliproteína, o un componente de la polimerasa viral de ARN o una proteína con ambas actividades enzimáticas (Heinz & Stiasny, 2012; Krishna Murthy, Judge, DeLucas, Clum, & Padmanabhan, 1999). Esta proteasa específica de serina

procesa el precursor de poliproteína en proteínas maduras, junto con la peptidasa señal del hospedero, y requiere de NS2b como cofactor. Recientemente se ha descrito su estructura cristalina, la cual, combinada con los sustratos peptídicos de su sitio activo, ha sugerido que residuos están involucrados en el reconocimiento del sustrato, así como la base estructural para explicar los efectos de mutaciones sobre la actividad enzimática, lo cual es útil para el desarrollo de inhibidores específicos como terapéutica contra el DEN y otras proteasas de los flavivirus (Monath, 1997)

La NS3 es una proteína multifuncional debido a que posee funciones de actividad proteasa, helicasa y ARN trifosfatasa. Además está involucrada en el procesamiento del polipéptido viral durante la replicación del DEN y en la formación de la caperuza del ARN genómico, en el proceso de maduración viral. Además, en el DEN es la mayor fuente de epítomos de células T, estimulando la respuesta celular CD4+ y CD8+ (Rothman, 2009) estando además implicada en la inducción de apoptosis en células infectadas (Ramanathan et al., 2016; C. F. Wu, Wang, Sun, Hu, & Syu, 2003).

La proteína NS4 se deriva de dos proteínas: NS4a y NS4b, proteínas hidrofóbicas pequeñas (16kD y 27kD respectivamente). Se piensa que estas unidades sean cofactores del complejo enzimático de replicación del ARN, la proteína NS5 se piensa que es la polimerasa viral de ARN dependiente de ARN (Osatomi & Sumiyoshi, 1990). NS4a está implicada en la replicación del ARN viral a través de su interacción con NS1 (Muller & Young, 2013). NS4b es una proteína de membrana que se localiza con NS3 en los presuntos sitios de replicación de ARN (C. F. Wu, et al., 2003).

La proteína NS5 tiene un peso molecular de 103 a 104 kDa y es una de las proteínas más conservadas entre los *flavivirus*. Es una proteína básica que funciona como ARN polimerasa ARN dependiente y también como metiltransferasa (Egloff et al., 2007). NS5 induce la transcripción y traducción de la IL-8, la cual está involucrada en la patogénesis de la enfermedad (Medin, Fitzgerald, & Rothman, 2005). Un trabajo reciente mostró que cientos de eventos de recombinación alternativa de transcriptos celulares se vieron afectados. En particular, se observó un aumento de retención de intrones, consistente con una disminución de la eficiencia del proceso

de recombinación. Dentro de los transcritos afectados, se identificó un número de factores inducidos por el interferón que vieron reducida su expresión, sugiriendo que la modulación del splicing de dichos factores contrarresta la respuesta antiviral. La proteína NS5 se piensa que es la polimerasa viral de ARN dependiente de ARN (Iglesias, Filomatori, & Gamarnik, 2011; Osatomi & Sumiyoshi, 1990).

II.3. Epidemiología del DEN y el ZIK

En el 2013 la OMS clasificó al DEN como la enfermedad viral transmitida por mosquito más importante del mundo (Bartenschlager & Miller, 2008; Holmes & Twiddy, 2003). Existe evidencia de transmisión del DEN en 128 países (Zulueta et al., 2006). Se estima, que viven 2 mil millones de personas en áreas de riesgo de transmisión, 390 millones de personas se infectan anualmente, de ellos 500 000 desarrollan formas graves y fallecen alrededor de 20 000. Durante las epidemias la tasa de infección puede llegar del 80 al 90 % de las personas susceptibles y la mortalidad puede superar al 5 % (Holmes & Twiddy, 2003; Morens & Halstead, 1990; Zulueta, et al., 2006).

Según estimados de la OPS de 2013, el 14% de las infecciones agudas por DEN reportadas en el mundo ocurren en las Américas representando unos 13 a 18 millones de infecciones, de ellas cerca de la mitad ocurren en Brasil y México (Fang, Wu, Wu, Zhang, & An, 2013). Actualmente 61 países de la región de las Américas y el Caribe están afectados por la circulación y transmisión del DEN estando presentes en la región los cuatro serotipos virales. Solamente 3 de América Latina no reportan transmisión Uruguay, Chile continental y Argentina (Y. Chen, et al., 1996; Lozach et al., 2005).

En Cuba, en 1977-78 ocurrió una epidemia de FD (causada por el serotipo Den-1). En ese momento dicho serotipo se encontraba circulando en diferentes países de la región, lo que dio lugar a que se produjera una pandemia (Mas, 1978). La FHD fue reportada en las Américas en el año 1981, cuando se presenta una gran epidemia de FHD en Cuba, debido al serotipo Den-2 y en el marco de la cual se reportan 158 personas fallecidas y cerca de 10 000 casos con el cuadro grave de la enfermedad (Kouri, Guzman, Bravo, & Triana, 1989).

En 1997 se produce otra gran epidemia de FHD pero circunscrita a la provincia de Santiago de Cuba después de 16 años sin transmisión en el país. Nuevamente el serotipo 2 se presentó con un saldo de 3 012 casos confirmados por el laboratorio y 12 adultos fallecidos. Varios factores favorecieron la reinfestación del *Aedes aegypti* en la provincia y por tanto la reemergencia del virus (Valdes et al., 1999b). Esta epidemia fue controlada rápidamente evitando su extensión.

Un pequeño brote fue detectado en la provincia de Ciudad de la Habana con una duración de tres meses en el año 2000, el cual mostró la introducción del serotipo 4 (Den-4) y fueron detectados 138 casos confirmados por el laboratorio (Leguia et al., 2017)

Entre junio del 2001 y marzo del 2002 el dengue fue detectado en un brote limitado nuevamente a la provincia de Ciudad de La Habana, con la circulación del serotipo 3. El sistema de vigilancia identificó 12889 casos confirmados serológicamente, incluyendo 78 con manifestaciones severas de FHD/SCD y tres defunciones (Pelaez et al., 2004).

En años posteriores estos eventos fueron pocos documentados, aunque se pudieron identificar dos grandes epidemias en los años 2006 y 2014 afectando varias provincias del país. También la situación epidemiológica se muestra cambiante con la circulación de todos los serotipos virales y con la presencia de más de un serotipo circulando en un mismo brote (Guzman, Alvarez, & Halstead, 2013; Guzman & Kouri, 2009).

El virus ZIK fue aislado por primera vez en 1947 en Uganda. Desde 2007, países de América, Asia, África y Oceanía han detectado la transmisión local del virus (Smith & Mackenzie, 2016). En el 2013, una gran epidemia ocurrió en Polinesia francesa, con cerca de 30.000 casos sintomáticos (Musso et al., 2014).

El brote epidémico actual debido al ZIK comenzó en Brasil en Mayo del 2015 y desde entonces se ha reportado en 31 países y territorios en América. Esta epidemia ha afectado a casi 1,5 millones de personas en Brasil. El 80% de los casos son asintomáticos (Hamel, et al., 2016).

En Cuba se reporta el primer caso confirmado de ZIK en la semana epidemiológica 11 del 2016 (PAHO/WHO, 2016). Desde entonces, la transmisión se ha extendido a varias provincias del país, causando un reporte creciente de casos.

II.4. Cuadro clínico del DEN.

El DEN es una enfermedad muy dinámica, a pesar de ser de corta duración (no más de una semana en casi el 90% de los pacientes). El curso de la enfermedad del DEN pasa por tres etapas clínicas: la etapa febril (única para la inmensa mayoría de los enfermos), la etapa crítica y la etapa de recuperación (Martinez, 2008). Cada uno de los cuatro serotipos puede causar un espectro de enfermedades que va desde infecciones clínicamente inaparentes hasta enfermedades potencialmente letales. De acuerdo a la gravedad de la enfermedad la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó el DEN de la siguiente manera: forma asintomática y forma sintomática (fiebre indiferenciada, Fiebre DEN (FD, es el DEN Clásico), Fiebre Hemorrágica del DEN (FHD) (grado I y II) y Síndrome de Choque por DEN (SCD) (grado III y IV) (WHO, 1997).

En los últimos años ha sido cuestionada la utilidad de esta clasificación, por considerarla rígida, demasiado dependiente de resultados de laboratorio y no inclusiva de enfermos de DEN con otras formas de gravedad, tales como la afectación particular del Sistema Nervioso Central (encefalitis), del corazón (miocarditis) o del hígado (hepatitis grave). Tampoco era útil para el manejo clínico de los enfermos. Esta nueva clasificación se ha definido como DEN y DEN grave teniendo en cuenta los signos de alarma como pródromo del cuadro severo (WHO, 2010).

II.5. La respuesta inmunitaria a virus DEN

II. 5.1. Inmunidad innata

La respuesta inmune innata, al parecer, tiene un importante papel protector durante la infección con el virus del DEN (Paes et al., 2005). Uno de los componentes fundamentales de este tipo de respuesta son los interferones (IFNs) α y β que se ha demostrado que, in vitro, son capaces de inhibir la propagación de la infección (Yen, Chen, Lin, Shieh, & Wu-Hsieh, 2008).

Entre los componentes principales de la inmunidad innata se encuentran las células asesinas naturales (NK, -del inglés- natural killers) las cuales son altamente productoras de IFN γ . Una actividad temprana de las células NK pudiera ser importante en la eliminación de la infección primaria por el virus DEN (Azeredo et al., 2006; Clyde, Barrera, & Harris, 2008). Durante la infección estas son reclutadas rápidamente en órganos y tejidos infectados, por factores quimioatrayentes producidos por las células infectadas y macrófagos residentes activados. Los macrófagos, además, constituyen una fuente principal de los IFNs α/β los que, una vez en el sitio de la inflamación, inducen la proliferación de las células NK, la citólisis de células infectadas por virus mediada por dichas células asesinas y la secreción de quimoquinas. En el sitio de la infección además predominan las células dendríticas (CD) las cuales inducen también la activación de las células NK (Basu & Chaturvedi, 2008; Clyde, et al., 2008).

El aumento del porcentaje de las células NK activadas ha sido asociado al desarrollo de la FD, mientras que un menor porcentaje ha sido asociado con las formas severas de la enfermedad (Azeredo, et al., 2006). La respuesta inmune innata, al parecer, tiene un importante papel protector durante la infección con virus DEN (Halstead, 2007).

II.5.2. Respuesta mediada por anticuerpos

La conjugación de mecanismos de neutralización viral, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, -del inglés- antibody dependent celular cytotoxicity) y activación del complemento son invocados en la respuesta protectora frente al virus DEN.

Los anticuerpos Nt son considerados como el mecanismo protector más importante contra la infección por el virus DEN, por lo que la inducción de niveles elevados de los mismos es el principal objetivo de los candidatos vacunales. Las principales evidencias al respecto se obtuvieron a partir de los estudios realizados en niños tailandeses nacidos de madres inmunes al virus, que resultaron protegidos frente a la infección por DEN hasta los cinco meses de edad cuando aún persistían los anticuerpos Nt transferidos a través de la placenta (Halstead, Udomsakdi, Scanlon, & Rohitayodhin, 1969). Los anticuerpos Nt homotípicos pueden permanecer de por vida en los individuos luego de su infección. Tanto es así, que se detectaron niveles de anticuerpos Nt en muestras de suero colectadas 40 y hasta 60 años después de la

infección (Halstead, 1974; Imrie, Meeks, Gurary, Sukhbaatar, et al., 2007; Okuno et al., 1983). Hasta el presente, no se conocen con exactitud los títulos de anticuerpos Nt necesarios para proteger frente a la infección con cada uno de los serotipos, aunque se han propuesto títulos entre 10 y 100 (Hombach et al., 2005)

Además de la neutralización, los anticuerpos contra el virus DEN pueden participar en otros mecanismos protectores frente a la infección. En un estudio prospectivo realizado en niños tailandeses, la ADCC detectada en los plasmas colectados previo a la enfermedad se correlacionó de manera inversa con la carga viral durante la infección secundaria subsecuente por el virus DEN 3 (Laoprasopwattana et al., 2007)

La formación de inmunocomplejos (IC) entre la proteína E del virus DEN y los anticuerpos pueden activar el complemento. La vía clásica de este sistema puede ser activada durante la infección primaria por este virus (Kuberski & Rosen, 1977). En correspondencia con ello, moléculas de IgM específicas al virus han sido encontradas en esta fase de la infección (Davis & Shulman, 1989). Durante la infección secundaria, también ocurre activación de la vía clásica del complemento. Muy interesante es el hecho que las subclases IgG1 e IgG3, las más importantes activadoras del complemento durante una respuesta secundaria, son las subclases de IgG más producidas en los casos de individuos que desarrollan las formas más graves de la infección (Jefferis & Kumararatne, 1990).

II.5.3. Respuesta mediada por células.

Las células T ejercen dos funciones principales: (1) la producción de citoquinas que juegan un papel crucial en la regulación de las funciones inmunológicas, el desarrollo de una respuesta anti-viral eficaz, y la activación de células T CD8+, macrófagos y células B, y (2) la lisis de células infectadas. Tanto los linfocitos T CD4+ como los CD8+ son capaces de eliminar células infectadas por mecanismos citotóxicos, lo que contribuye a la recuperación de la infección (Rothman, 2009).

Aunque el papel patogénico de las células T CD4+ y CD8+ se ha caracterizado con profundidad, el papel protector de estas poblaciones celulares es menos conocido. No obstante, varios estudios

especulan la inducción de una respuesta inmune mediada por células en individuos inmunizados con candidatos vacunales atenuados u obtenidos por vía recombinante, como resultado de la no correlación entre la generación de una respuesta de anticuerpos Nt y la protección frente al reto viral (Green et al., 1993; Guy et al., 2008; S. F. Wu et al., 2003). Los estudios realizados por van der Most y cols. (2000, 2003), con un virus recombinante que contiene la cepa vacunal atenuada 17D del virus de la fiebre amarilla que expresa las proteínas prM y E del virus DEN 2, constituyen el primer indicio sobre el papel protector de las células T CD8+ frente al reto intracraneal en ratones (van der Most, Murali-Krishna, & Ahmed, 2003; van Der Most, Murali-Krishna, Ahmed, & Strauss, 2000).

Por otra parte, (Yauch et al., 2009) publicaron que la inmunización con epitopos de las proteínas C, NS2A, NS4B y NS5, generó células productoras de IFN γ con actividad citotóxica, y que mediaron la disminución de la carga viral in vivo tras el reto en un modelo de ratones C57BL/6 transgénicos, que no expresan el receptor para los IFN α/β . En el mismo año, (Gil et al., 2009) analizaron el papel de las poblaciones celulares CD4 y CD8 positivas en la protección contra el virus del DEN en el modelo de encefalitis viral en ratones. En este estudio se demostró, que la protección conferida frente al serotipo homólogo depende de las células CD8+. Además, esta población celular proliferó tras la estimulación in vitro con el virus homólogo y junto a la población CD4+, fue la responsable de la secreción de IFN γ .

El IFN γ es producido fundamentalmente por linfocitos T activados y células NK y tiene receptores virtualmente sobre todas las células del organismo. Ejerce un sin número de efectos biológicos, entre ellos se destacan que es el principal activador de los macrófagos y también activa las células endoteliales, estas dos actividades son la base del papel pro-inflamatorio de esta citoquina. La función reguladora de esta molécula sobre la fase antígeno-específica deriva de su efecto sobre las células presentadoras de antígeno y sobre los linfocitos B y T. El IFN γ aumenta la expresión de moléculas MHC en las células presentadoras tanto profesionales como facultativas y sus efectos sobre la proliferación y la diferenciación de las células B y T son complejos. Este es un marcador de las células de fenotipo Th1, las cuales se asocian a la

respuesta inmune contra patógenos intracelulares. Su papel en el control de la infección por virus DEN también ha sido demostrado (Diamond et al., 2000).

II.6. Patogénesis del DEN

El virus del DEN es un virus linfotrópico, lo que es de gran importancia en la patogenia de la FHD/SCD. La infección con un serotipo del DEN provee inmunidad homóloga de larga duración, pero sólo hay protección cruzada transitoria contra los otros serotipos, lo que hace posible una infección secuencial (Bastin et al., 1981).

En relación con la patogenia de la enfermedad se han planteado algunas hipótesis para explicar el cuadro grave:

La hipótesis sobre el fenómeno de ADA, propuesto por Halstead expresa que: la respuesta inmune humoral a una infección primaria por un determinado serotipo origina anticuerpos Nt, capaces de proteger al individuo contra el virus homólogo y, en menor medida, contra serotipos heterólogos (Halstead et al., 1970). Durante una infección secundaria se formarían IC cuyos anticuerpos serían menos eficientes en la neutralización de la partícula viral. Estos IC, formados fundamentalmente por anticuerpos de subclases IgG1 e IgG3, serían internalizados, por las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos), al interactuar con los receptores Fc γ tipo I (CD64) y II (CD32) en ellas presentes. Se favorecería, de esta manera, la diseminación viral, ya que estos IC entran a las células hospederas más rápido que los viriones no acomplexados (Dejnirattisai et al., 2010). Se ha demostrado que los anticuerpos contra las proteínas prM y E facilitan la unión eficiente y la entrada de las partículas inmaduras a células que expresen el receptor Fc, los cuales están presentes en las células B, en las células dendríticas y en los monocitos-macrófagos fundamentalmente, dianas de la infección por el virus DEN (Dejnirattisai, et al., 2010). El incremento de la replicación viral durante las infecciones secundarias heterotípicas, desencadena procesos donde participa activamente el sistema monocito-macrófago y que concluyen en el aumento de la permeabilidad vascular responsable de los síntomas severos de la enfermedad (Guzman, et al., 2013).

De acuerdo con los eventos que ocurren después de la infección celular a través de la ADA, se determinó que esta vía de infección modifica los mecanismos antivirales intracelulares de la inmunidad innata y adaptativa (Chareonsirisuthigul, Kalayanaroj, & Ubol, 2007). La infección mediada por la ADA suprime la producción de IL-12 e IFN γ , lo que conduce a una respuesta inmune de células T cooperadoras tipo 2, descrita en los pacientes con FHD (Chaturvedi et al., 1999) Así mismo, esta vía de infección incrementa la producción de IL-10, que actúa en la inhibición de la producción del óxido nítrico, conocido como un mecanismo antiviral importante de la inmunidad innata (Chareonsirisuthigul, et al., 2007).

En la hipótesis sobre la reactividad cruzada de células T (Rothman, 2010) los daños inmunológicos por dicha reactividad cruzada son, con frecuencia, rasgos de la enfermedad por Flavivirus. La hipótesis plantea que tras la infección secundaria heterotípica se activan principalmente los clones de células T de memoria, estimulados en respuesta a la infección primaria, los que generan la producción de una serie de citoquinas inflamatorias que participan en el desarrollo de la FHD/SCD (Rothman & Ennis, 1999). Más tarde se demostró que efectivamente las células T de reactividad cruzada activadas durante la infección secundaria reconocen epítomos con diferencias de pocos aminoácidos entre los cuatro serotipos del DEN y que después de la activación estas sufren el proceso de apoptosis en el período agudo de la enfermedad. Estos linfocitos T de memoria no son capaces de proliferar ni de secretar IFN γ por lo que se retarda la eliminación del virus y se incrementan los títulos virales (Mongkolsapaya et al., 2003). En trabajos posteriores se demostró la participación de las citoquinas inflamatorias secretadas por las células T de memoria tras la infección heterotípica, en el incremento de la permeabilidad vascular y en la extravasación de plasma (Screaton & Mongkolsapaya, 2006).

La hipótesis sobre la virulencia de las cepas planteada por (Rosen, 1977) .expone que la virulencia de las distintas cepas de los cuatro serotipos del virus puede aumentar cuando estos agentes pasan repetidamente por el hospedero humano. De esta forma, las cepas más virulentas son las responsables de los síntomas graves que se observan en la FHD/SCD. (Leitmeyer et al., 1999) reportaron la existencia de diferencias estructurales entre las cepas de origen asiático y americano del virus DEN 2, que están correlacionadas con la virulencia y la patogenicidad.

Durante las infecciones secundarias, las cepas de DEN 2 pertenecientes al genotipo asiático han sido asociadas al desarrollo de las formas severas mientras que las cepas de genotipo americano han sido asociadas al desarrollo de las formas leves de la enfermedad

Por otra parte, determinadas secuencias de infección han sido correlacionadas con el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. La infección secuencial DEN 1/DEN 2 o DEN 1/DEN 3 ha sido asociada con epidemias de FHD (Alvarez et al., 2006; Bhattacharya, Maitra, Ganguly, Bhattacharya, & Sinha, 2013; Kouri, Guzman, & Bravo, 1987). En el señalaron que la secuencia de infección DEN 3/DEN 2 también está asociada con el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. En la epidemia de 1980 en Tailandia, la secuencia de infección DEN 1/DEN 2 mostró un riesgo de desarrollo de FHD 500 veces mayor que la infección primaria por el serotipo 2. Para la secuencia DEN 3/DEN 2 el riesgo de desarrollo de la FHD fue 150 veces mayor, y en el caso de la secuencia DEN 4/DEN 2 de 50 veces (McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000). En la segunda epidemia cubana de FHD ocurrida en el año 1997 y causada por una cepa del serotipo 2 de genotipo asiático se comprobó la secuencia de infección DEN 1/DEN 2 en el 98% de los casos graves y en el 92% de los fallecidos (Valdes et al., 1999a).

La otra hipótesis se refiere a un cambio fenotípico rápido, la selección de mutantes de escape a la neutralización. Como consecuencia del proceso de maduración de la afinidad, los anticuerpos generados en la primera infección son capaces de reconocer determinantes antigénicos mayoritarios comunes en la superficie de la partícula viral del serotipo infectante. De esta forma son eliminadas, en su mayoría, las partículas virales durante la segunda infección y, en consecuencia, los individuos desarrollan un cuadro clínico benigno o, en muchos casos, asintomático. Sin embargo, en otros casos partículas virales escapan a la neutralización, pues en el proceso de síntesis de sus proteínas estructurales, no son expresados aquellos determinantes comunes al serotipo causal de la primera infección. Cuando son transmitidas, y de forma mayoritaria se multiplican en otros individuos con igual historia primaria de infección y por tanto con igual repertorio de anticuerpos Nt, son capaces de desarrollar en éstos el cuadro más severo de la enfermedad. Los anticuerpos predominantes en dichos individuos son, por tanto, anticuerpos que al no poder neutralizar la infección, por medio de su región Fc se unen a

diferentes tipos celulares donde encuentran los receptores correspondientes y, de esta forma, se desarrolla el proceso de ADA (Guzman et al., 2000).

La hipótesis integral planteada por Kourí, es la hipótesis más completa pues plantea al DEN como un fenómeno inmunopatológico multifactorial donde deben ser integrados múltiples factores para su comprensión: factores de riesgos individuales (presencia de anticuerpos anti-DEN, edad, sexo, raza, portador de enfermedades crónicas), epidemiológicos (vector e intervalo entre infecciones) y factores relacionados con el virus (serotipo y virulencia de la cepa), los que, como consecuencia de su interacción, conllevan al desarrollo de la forma grave de esta enfermedad (Kouri, et al., 1987).

II.7. Cuadro clínico de ZIK

Se trata de una enfermedad viral autolimitada, de leve intensidad y evolución benigna. En el 80% de los individuos la infección es asintomática. La enfermedad está caracterizada por fiebre, cefalea, erupción cutánea maculopapular pruriginosa, hiperemia conjuntival (conjuntivitis) no pruriginosa y no purulenta, artralgia/artritis (con edema, especialmente de las pequeñas articulaciones de las manos y de los pies), mialgias, cefalea, dolor de espalda y manifestaciones digestivas (dolor abdominal, diarrea, estreñimiento).

La astenia después de la infección parece ser frecuente. Por primera vez se reporta en un brote de ZIK en la Polinesia Francesa 73 casos de síndrome de Guillain-Barré y otras afecciones neurológicas asociado a la infección, en una población de aproximadamente 270 000 habitantes, lo que representa una grave complicación de la infección por este virus ⁽⁸⁾. El Síndrome de Guillain Barré incluye daño a los nervios periféricos por pérdida de mielina, disfunción muscular y mialgias. La infección prenatal se ha asociado por primera vez en la epidemia en Brasil (2015) a microcefalia y otras malformaciones congénitas en los neonatos hijos de madres infectadas durante la gestación. (Hamel et al., 2016).

II.8. Respuesta inmune a ZIK

La replicación viral desencadena una respuesta inmune antiviral innata con producción de interferón de tipo 1. Tres días después del inicio del cuadro clínico se evidencia el aumento de monocitos pro-inflamatorios activados en la sangre, constatándose hacia el quinto día una disminución transitoria de las células dendríticas mieloides.

Los anticuerpos IgM son detectados al día 6-7 después del debut clínico, persistiendo entre 100 y 170 días. Las células B y plasmablastos aumentan tras la primera semana. Los niveles de anticuerpos neutralizantes son detectables en pocas semanas, pero los mayores títulos se asocian a infecciones previas por flavivirus (Lai et al., 2017).

II.8.1. Respuesta mediada por células

La activación de células T CD4 y CD8 T ha sido demostrada en humanos infectados con ZIK. Las células T CD4 se activan y diferencian a células efectoras, ocurriendo una expansión sustancial de células efectoras T V δ 2 en los primeros días del cuadro clínico. Se ha comprobado una modulación de la respuesta de las células T CD4+ con reducción de la producción de IFN- γ por estas células (Cimini et al., 2017). Los linfocitos T CD4+ de memoria reconocen péptidos de las proteínas C, prM, E, y NS5 del virus ZIK. Las células T CD8+ son activadas masiva e intensamente en un grupo de pacientes (Lai, et al., 2017). La frecuencia de células T CD8+ que co-expresan los marcadores de activación CD38 y HLA-DR son similares en ZIK que en DEN, sugiriendo que una moderada activación celular se asocia a actividad protectora y a un curso leve de la enfermedad. Hay expresión de marcadores apoptóticos en las células T, pero se desconoce su papel. La reducción en la expresión de IFN γ en las células T CD4+ es centro de atención para futuras investigaciones. Los porcentajes de células T CD4 y CD8+ que expresan IL-2 e IL-17 no difieren con la infección por DEN. Las células T efectoras V δ 2 expresan granzima B, por lo que se presume su actividad citotóxica.

II.9. Patogénesis de la infección por ZIK.

En la actualidad se conoce poco acerca de la patogénesis de la infección por ZIK, sin embargo, se presume que ocurre replicación viral en las células dendríticas cercanas al sitio de infección después de la inoculación del virus por la picadura de un mosquito, se produce entonces una subsecuente propagación hacia los nódulos linfáticos y luego hacia el torrente sanguíneo. La viremia se observa generalmente de tres a cuatro días de la aparición de los síntomas. El virus es detectable en sangre días antes de la aparición de los síntomas y hasta once días después. El virus ha sido también detectado en muestras de orina, saliva y esperma de individuos infectados (Gupta et al., 2016).

Como en el caso de otros *flavivirus*, en el mosquito, ZIK puede replicarse en las células epiteliales y subsecuentemente en glándulas salivares. Después de un período de incubación de 5-10 días, ZIK se encuentra en la saliva del mosquito, de esta manera puede infectar a otro humano. Cuando el mosquito infectado con ZIK introduce su saliva dentro de la piel del humano, el virus puede infectar a los queratinocitos epidérmicos, fibroblastos de la piel en las capas subcutáneas y a las células de Langerhans (Gupta, et al., 2016).

Las células de Langerhans contienen DC-SIGN, el cual funciona como receptor permitiendo la entrada del virus. La infección de los fibroblastos primarios de la piel es asociada con la regulación de la expresión de ARN mensajero los cuales son reconocidos en la respuesta inmune innata que se origina a raíz de la infección por virus ARN (Hamel et al., 2015). Esto es seguido por la potenciación de la expresión de interferón α y β . Los interferones tipo I y II pueden suprimir la carga viral de las células infectadas. Las células de la piel que están infectadas pueden presentar vacuolación citoplasmática y edema en el estrato granuloso. Después de la replicación en células del tejido local y en la región de los nódulos linfáticos, ZIK puede entonces diseminarse por vía sanguínea hacia otros órganos y tejidos incluyendo el sistema nervioso central, los músculos esqueléticos, el miocardio, así como en hígado, riñón, corazón y bazo. El virus es altamente neurotrópico, puede causar degeneración neuronal e infiltración celular. El

neotropismo y la persistencia de ZIK explican determinadas anomalías fetales como la microcefalia y las complicaciones neurológicas (Hamel, et al., 2016).

La proteína NS5 del ZIK degrada a STAT2 en forma proteosoma-dependiente (Grant et al., 2016), evadiendo la acción del IFN tipo I de la respuesta innata frente al virus. Esto pudiera favorecer la amplia y rápida diseminación de la infección por los tejidos en el humano.

El análisis de las células T V δ 2 pudieran ser importantes en la patogénesis asociada a la microcefalia en los fetos y al Síndrome de Guillain Barré en los adultos. Estas células pudieran implicarse también en el daño e inflamación placentaria correlacionada con las malformaciones fetales congénitas encontradas en la infección por ZIK (Cimini, et al., 2017).

II.9. Respuesta inmune cruzada entre ambos flavivirus: DEN y ZIK.

Los anticuerpos, originados ante una infección por un Flavivirus, pueden proveer inmunidad ante la infección por virus homólogos. En ocasiones los anticuerpos de reactividad cruzada pueden complicar el diagnóstico de otros Flavivirus (Swanstrom et al., 2016) Se ha demostrado la capacidad de anticuerpos monoclonales (AcM) aislados en humanos, que han sufrido infección previa por DEN de neutralizar cepas de ZIK en cultivo de células. No obstante, es importante señalar que en estudios recientes se plantea que algunos anticuerpos que son capaces de neutralizar virus in vitro, no necesariamente pueden hacerlo in vivo (Swanstrom, et al., 2016; Tang et al., 2016) .

El límite de neutralización cruzada de ZIK con suero primario positivo a DEN es atribuido a la respuesta tipo específica que muestra una infección primaria por DEN. Después de una infección secundaria los anticuerpos de respuesta del virus son propensos a mantener una respuesta tipo específica, la cual genera mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes a varios serotipos de DEN (Fagbami, 1979) .

Los estudios han demostrado que la infección de las células que expresan el receptor Fc γ (Fc γ R) en presencia de anticuerpos de donantes inmunes a flavivirus puede aumentar significativamente la tasa de infección (Halstead, 2003).

En caso de infecciones por DEN, la ADA es una de las varias hipótesis propuestas para explicar el aumento de la gravedad de la enfermedad asociadas a infecciones heterotípicas repetidas (Kliks, Nisalak, Brandt, Wahl, & Burke, 1989; Vaughn et al., 2000). Estos estudios son importantes desde el punto de vista epidemiológico, ya que la gran mayoría de las regiones que han reportado casos de ZIK también experimentan brotes de DEN. Aunque oportunamente, los hallazgos de estos estudios no son totalmente sorprendentes, dadas las similitudes biológicas significativas y los epítopes abundantes compartidos entre los dos virus.

Los estudios de reactividad cruzada entre sueros de ZIK y DEN mostraron en análisis de sueros policlonales, que estos pueden no revelar el origen de las respuestas de anticuerpos o la proporción relativa de anticuerpos específicos de tipo frente a anticuerpos de reactividad cruzada. Especialmente en las poblaciones experimentadas con flavivirus, la posibilidad de múltiples grupos independientes de anticuerpos que contribuyen a la aparente reactividad cruzada del suero, en lugar de un grupo común que reconoce tanto DEN como ZIK, que tampoco puede descartarse fácilmente (Priyamvada et al., 2016).

Más recientemente, varios estudios han abordado la cuestión de la reactividad cruzada inmunológica de DEN-ZIK mediante la prueba de sueros de individuos infectados con ZIK contra DEN, o sueros de DEN contra ZIK. En un estudio de este tipo, los sueros de pacientes con ZIK pre-inmune tanto de DEN como de DEN pre-inmune fuertemente unidos a ZIK así como a DEN, con anticuerpos reactivos cruzados dirigidos tanto a proteínas E como a NS1 (Jefferis & Kumararatne, 1990; Rothman, 2009). Las cuatro muestras de pacientes en este estudio procedían casos primarios de ZIK, donde la infección se produjo durante el viaje a las zonas ZIK endémicas. Del mismo modo, los estudios que examinaron el suero de DEN secundario de las regiones endémicas han mostrado una reactividad cruzada con ZIK, tanto en la unión como en la neutralización del virus (Halstead, Udomsakdi, Singharaj, & Nisalak, 1969; Rothman, 2009; S. F. Wu, et al., 2003)

El ZIK se está extendiendo a áreas de hiper-endemicidad de DEN por lo tanto, es probable que las personas expuestas a ZIK alberguen células T de memoria reactiva con DEN preexistentes (Yauch, et al., 2009). Dada la similitud antigénica entre estos virus la reactividad cruzada

informada para ZIK de los anticuerpos específicos de la envoltura de DEN (Gil, et al., 2009) es probable que se produzca el reconocimiento reactivo cruzado de ZIK por células T específicas de DEN preexistentes. La identidad de secuencia entre DEN y ZIK oscila entre el 44% y el 56% para la envoltura de proteínas estructurales y la cápsida, respectivamente, hasta el 68% para las proteínas no estructurales más conservadas NS3 y NS5. La homología entre péptidos de células T CD8 + inmunogénicos de DEN y la secuencia de ZIK correspondiente es evidente. Sin embargo, un estudio reciente informó la falta de reactividad cruzada entre las células T CD4 + específicas de la proteína NS1 de ZIK y la proteína NS1 de DEN.

Se necesitan estudios para evaluar más a fondo el alcance y las implicaciones del reconocimiento cruzado de epítopes de células T CD4 + y CD8 + en individuos inmunes a DEN y ZIK. Dada la alta homología entre DEN y ZIK, el conocimiento que hemos adquirido sobre la respuesta de células T a DEN puede proporcionar información sobre la naturaleza de la inmunidad de células T para ZIK. La superposición geográfica de las infecciones por DEN y ZIK resalta la necesidad de comprender el impacto de la inmunidad preexistente a DEN (adquirida mediante infección natural o vacunación) sobre la inmunidad protectora y / o la inmunopatología durante la infección por ZIK (Diamond, et al., 2000).

II.10. Estudios en modelos murinos de la infección por DEN y ZIK

Una de las principales dificultades en el estudio de la infección por los virus del DEN y ZIK en seres humanos y en el desarrollo de una vacuna es la ausencia de un modelo animal adecuado que desarrolle todo el espectro de estas enfermedades, especialmente el DEN hemorrágico y síndrome de choque del DEN.

En un estudio realizado por (Barth et al., 2006) en ratones Balb/c que fueron infectados intraperitonealmente con serotipo 2 del virus DEN no-neuroadaptado, se mostraron lesiones endoteliales multifocales, reclutamiento de plaquetas y se detectó antígeno del virus del DEN en los hepatocitos y en el endotelio capilar del área de la vena lobular central. Además las pruebas de función hepática mostraron altos niveles de actividad de la enzima transaminasa aspartato y

alanina transaminasa. La viremia se observó entre los días 2 y 11 de aislamiento en la línea de células de mosquito C6/36, sin embargo, los ratones no mostraron ningún signo de morbilidad ni aumento de la mortalidad (Paes, et al., 2005).

En algunos estudios se analizaron otras vías de inoculación, como la intravenosa entre ellos está (K. J. Huang et al., 2000) donde se mostraron resultados donde los ratones inoculados por vía intravenoso con DEN-2 no adaptado presentaron una transitoria trombocitopenia y anticuerpos antiplaquetarios y se demostró que tales alteraciones fueron notablemente reducidas en los ratones BALB/c o B6 con respecto a otras especies ya utilizadas.

Avances en esta rama pudieron evidenciarse con el estudio de ratones consanguíneos BALB/c de cuatro semanas de edad sensibilizado con (haplotype H-2d DEN -2), a los cuales se les inoculó una dosis letal del virus DEN tipo 2 (cepa P23085(Zellwe et.,al 2010)En sus primeras manifestaciones clínicas mostraron una tendencia a arquear la espalda, la ondulación de la piel y se observó desaceleración de la actividad física hacia el día 4 post-inoculación (pi) (C. Y. Huang et al., 2000). La presencia del virus DEN-2 en la sangre fue confirmada el día 2 pi por el método de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) confirmando replicación de virus en todos los animales. Dentro de los 5 y 6 días pi, todos los ratones mostraron enfermedad grave con anorexia y pérdida de peso que termina en parálisis de miembros y 100% de mortalidad. A los 7 días después de la inoculación el TNF-a, aumentó 24 h antes de la muerte. Además, los niveles séricos de interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL - 10, antagonista del receptor de IL - 1 y soluble TNF receptor que fue incrementándose continuamente durante la infección. En este tipo estudio se comprobó que los ratones BALB / c de 4 semanas de edad adaptados son modelos útiles para investigar la activación inmune el huésped en la infección por el virus DEN-2 (Zompi & Harris, 2012).

Los ratones SCID (con inmunodeficiencia severa combinada), que no producen células funcionales T y B y carecen de detección Inmunoglobulina (Ig), hacen posible el xeno-injerto de líneas celulares humanas susceptibles al DEN, y se han empleado para estudiar la infección viral in vivo (B. Lin, Cotton, Trent, & Wright, 1992; Y. L. Lin et al., 1998). Este modelo ha sido útil para la prueba de fármacos y vacunas (Zompi & Harris, 2012).

Posteriormente se han empleado otras cepas de ratones con genes silenciados como los ratones AG129 deficientes del gen del receptor de IFN α/β y γ , que han demostrado ser útiles en el estudio de la patogénesis y la inmunología de la infección por DEN. Se han publicado hallazgos en este modelo sobre la replicación viral en células y tejidos que son comparables a la infección en el humano, incluyendo el fenómeno de ADA (Williams, Zompi, Beatty, & Harris, 2009).

Los estudios de modelos animales en ZIK han demostrado que se requiere adaptación previa en el modelo en el ratón para generar una enfermedad reproducible. (Rubin, Greene, & Baden, 2016) demostraron que la aparición de la enfermedad y la mortalidad se desarrollaban en ratones que carecían del receptor alfa del interferón (IFN) (ratones A129) de una manera dependiente de la edad, pero no en ratones inmunocompetentes con edad similar. En los ratones A129, la viremia alcanzó un pico de ~10⁷ unidades formadoras de placa / ml al día 2 postinfección (pi) y alcanzó títulos altos en el bazo al día 1. ZIK se detectó en el cerebro en el día 3 pi y causó signos de enfermedad neurológica, incluyendo temblores al día 6 pi. También se observó una replicación robusta en los testículos. En este modelo, todos los ratones infectados en edad joven (3 semanas) sucumbieron a la enfermedad al día 7 pi. Los ratones más viejos (11 semanas) mostraron signos de enfermedad, viremia y pérdida de peso pero se recuperaron a partir del día 8. Además, los ratones AG129, que carecen tanto de las respuestas de IFN de tipo I como de II, apoyaron una cinética de infección similar a los ratones A129. Esta caracterización de una cepa ZIK de origen asiático en un modelo murino es uno de los pocos estudios del ZIK y demostró morbimortalidad dependiente de la edad, podría proporcionar una plataforma para probar la eficacia de antivirales y vacunas.

II.11. Desarrollo de vacunas contra el DEN y ZIK

Actualmente, no se dispone aún de una vacuna contra el DEN. La obtención de una formulación vacunal está limitada por la existencia de cuatro serotipos, el fenómeno de la ADA, la ausencia de un modelo animal que reproduzca adecuadamente la enfermedad, y el poco conocimiento que se tiene de la etiopatogenia de la misma. Los principales retos para el desarrollo de una vacuna son inducir inmunidad protectora de larga duración contra los cuatro serotipos del virus y no sensibilizar al individuo frente a una infección secundaria por un virus heterólogo

(Chokephaibulkit & Perng, 2013; Miller, 2010; Whitehead, Blaney, Durbin, & Murphy, 2007). Teniendo en cuenta estos aspectos, el proceso de desarrollo de las diversas estrategias para la obtención de candidatos vacunales (Guzman, Mune, & Kouri, 2004; Murphy & Whitehead, 2011), incluye vacunas vivas atenuadas, vacunas de subunidades recombinantes, vacunas inactivadas, vacunas de ADN y basadas en vectores virales. La vacuna contra el virus del DEN que se encuentra más avanzada su evaluación hasta el momento consiste en la sustitución de los genes prM/E de los cuatros serotipos sobre la vacuna viva atenuada de fiebre amarilla (ChimeriVax) (Guirakhoo et al., 2001). La evaluación de la formulación tetravalente ChimeriVax en monos indujo anticuerpos Nt, sin embargo, los animales desarrollaron viremia (generalmente causada por el serotipo 4) (Guirakhoo et al., 2002). También se demostró la seguridad de la respuesta inmune celular inducida por la formulación tetravalente, marcada por la ausencia de un patrón tipo Th2 y con predominio de secreción de IFN γ con respecto a TNF α (Guy, et al., 2008). Dos ensayos clínicos Fase III fueron llevados a cabo en más de 30 000 niños en cinco países de Asia y América. La eficacia general del ensayo clínico en la región asiática fue de un 56.5% y de un 60% para América (Capeding et al., 2011).

Frente al ZIK se han desarrollado recientemente varios candidatos vacunales que se están evaluando en modelos experimentales, e incluyen vacunas de subunidad, vacunas de ADN y vacuna de virus inactivado. Dos de estas formulaciones han avanzado en su evaluación en monos y están evaluándose en fase I.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Todo el trabajo experimental se ajustó a las regulaciones éticas internacionales para el manejo y cuidado de los animales de experimentación y las buenas prácticas para el trabajo con animales de laboratorio dentro de las que se encuentran:

- * Guías establecidas por la Unión Europea para la utilización de animales con propósitos científicos.
- * Guía establecida por el CECMED para la constitución y funcionamiento de los experimentos.
- * Guía para la aplicación de un Punto final humanitario.

En el diseño de los experimentos se siguió el principio de las 3 Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) enunciado por Russell & Burch (Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Methuen & Co Ltd, London, England. 1959).

III.1 Tipo de Estudio

Observacional, descriptivo, experimental.

III.2 Universo y muestra de Estudio

El universo de estudio fue conformado por grupos de ratones (Balb/c) adultos sanos, que fueron atendidos y procesados en el Bioterio del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, cumpliendo con las guías internacionales y nacionales ya estipuladas en nuestro instituto y manteniendo las condiciones óptimas para hacerlo y evitando todo daño innecesario.

Cada grupo de animales fue formado por 10 animales dependiendo del virus a inocular y la vía de inoculación empleada, resultando en 5 grupos: 2 para virus dengue (uno vía intraperitoneal y otro vía subcutánea), 2 para virus ZIKA (uno vía intraperitoneal y otro vía subcutánea), y un grupo control.

III. 3. Cepas Virales

Los antígenos virales para las inoculaciones, estimulaciones y para los experimentos de medición de respuesta celular en ratones, se prepararon a partir del sobrenadante de cultivo de células Vero infectadas con la cepa de DEN-2 A15 8p/vero y ZIK 221/2016 4 p/vero. El sobrenadante se concentró por centrifugación a 80 000 gravedades durante 4 h a 4°C. El precipitado viral se resuspendió en tampón fosfato salino (NaCl 100 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7,2) (PBS). La concentración viral se determinó por titulación en células Vero NIBSC (de células de riñón de hámster recién nacido). El control negativo se preparó a partir del sobrenadante de células Vero NIBSC no infectadas y reconstituido en medio MEM-E, se hicieron alícuotas que fueron guardadas a -70°C, y se determinó el título viral por conteo del número de placas (Alvarez Vera et al., 1998).

II.3.1. Titulación de los virus DENGUE y ZIKA por micro-método en células Vero IBSC.

Se realizaron diluciones seriadas de ambos virus utilizando medio Hanks + 0.5% STF, desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁷ en viales y de forma aséptica, se agitaron vigorosamente y se mantuvieron 1h a 37°C. Se prepararon las placas de 24 pozos con la suspensión de células Vero añadiendo 0.5 mL en cada pozo y se dejaron en reposo 1 hora a temperatura ambiente. Después de transcurrido el tiempo se añadieron 50uL de cada dilución viral en las placas conteniendo las células Vero, utilizando 3 pozos por cada dilución. Se incubaron las placas por 4 h a 37°C en incubadora de CO₂ al 5%. Posteriormente se añadieron 0,5 mL de medio con carboximetilcelulosa (CMC). El pH del medio para DEN 1, 3 y 4 era 8-8,5, y para DEN 2 entre 7- 8,5. Se incubaron las placasa 37o C por 8 días para el DEN 4, 5 días para el ZIK, en incubadora de CO₂ 5%. Después se descartó el medio y se lavaron las placas suavemente con agua corriente. Se tiñeron las células con Naftol Blue Black (NBB) añadiendo 0.5 mL por pozo. Después de 30 minutos se lavaron nuevamente con agua corriente, realizando posteriormente el conteo las placas virales. Se determinó el título de los virus como unidad formadora de placas (ufp).

II.4. Esquema de inoculación viral en el modelo murino.

Se emplearon 50 ratones BALB/c varones, de 6 semanas de vida, con un peso de 18 a 20g, separados en grupos de 10 y con suministros diarios de agua, comida y una temperatura optima de

alrededor de 25 grados estos animales son suministrados por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (Cenpalab, La Habana, Cuba). Los ratones se manipularon de acuerdo a las Guías para el Trabajo con Animales de Laboratorio del IPK.

Se inocularon en grupos de 10 ratones por diferentes vías intraperitoneal (IP) y subcutánea (SC) con una suspensión viral de 150 μ l que contenía 10^6 ufp del ZIK y DEN. Se incluyó un grupo control que fue inoculado solo con medio.

III.4.1. Observación de signos de enfermedad

Después de la inoculación viral, se realizó un seguimiento diario en la búsqueda de la presencia de algún signo de enfermedad. Se consideraron signos leves de enfermedad el erizamiento o enlentecimiento del animal y como signos graves, la parálisis, la pérdida del equilibrio y la inmovilidad, comparando con el grupo control.

III.5. Colecta de sangre

Al día 15 después de cada inoculación con los dos virus se realizó la colecta de la sangre a todos los ratones, incluyendo el grupo control, de forma aséptica en el seno retro-orbital por punción del plexo orbital y con el uso de capilares estériles para estudios de respuesta inmune.

III.6. Determinación de la respuesta inmune humoral

III.6.1 ELISA subclases de IgG

Se siguió el método de ELISA de inhibición desarrollado por (Vazquez, Bravo, Perez, & Guzman, 1997) con algunas modificaciones. Placas de poliestireno de 96 pozos (MICROLON, Greiner bio-one, Germany) fueron sensibilizadas con anticuerpos IgG humano anti-Dengue o anti-zika (obtenidos mediante la precipitación con sulfato de amonio a partir de sueros humanos con altos títulos IgG anti DEN o ZIK, laboratorio de Arbovirus del IPK) a una concentración de 10 μ g/mL en solución de recubrimiento carbonato bicarbonato pH 9.5 e incubadas toda la noche a 4°C. Posteriormente se bloquearon con 150 μ l por pozo con suero albumina bovina (SAB) al 1% en PBS-T. Se dejaron 1 hora de incubación a 37°C, lavándose después 3 veces con PBST. Seguidamente se añadieron 100 μ l por pozo de una dilución 1/50 en PBS-T de antígeno de DEN 2 y

se incubaron a 37°C por 1h. Posteriormente se añadieron 100uL por pozo de una dilución 1/50 en PBS-T de antígenos de DEN-2 y ZIKA obtenidos por el método de sacarosa (Clark & Casals, 1958). Se lavaron nuevamente y se adicionaron los sueros diluidos en PBS-T desde 1:20 hasta 1:1280 (diluciones al doble), incluyendo además un control positivo y un control negativo en las mismas condiciones. Incubándose a 37°C por 1h. Se lavaron nuevamente y se adicionaron los conjugados anti-subclases de ratón (anti-IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3) marcados con biotina (kit ABD serotec) diluidos 1/2000 en diluyente razón de 100 uL/pozo y se incubaron las placas 1 h a 37°C, después de lavar, se añadieron 100 uL/pozo sustrato se añadieron 100 µL a los pocillos de una solución compuesta por 25mg de ortofenilendiamina (OPD) con 4 µL de H₂O₂ en 10 mL de solución tampón fosfato citrato (pH 5) y se incubó durante 30 minutos a TA. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 12.5% y la lectura de la densidad óptica (DO) se realizó a una longitud de onda 492 nm en un lector de placas de ELISA (Biomeriëux, Francia).

Criterio de positividad: Una dilución de suero fue considerada positiva cuando la relación DO (dilución de suero)/DO (control negativo del suero) es mayor o igual a dos. Los resultados fueron expresados como la DO del suero a la dilución en cuestión.

Las muestras de suero de los ratones se emplearon en el ensayo como pools de sueros por grupos de animales, o sea, según el virus inoculado o la vía de inoculación, realizando las diluciones seriadas de estos pools en el ensayo.

II.7. Determinación de la respuesta inmune celular

II.7.1 Aislamiento de las células del bazo de los ratones inoculados

Se realizó la extracción de los bazos de los ratones del estudio en condiciones asépticas por incisión lateral izquierda y disección del órgano. Fueron obtenidas las células por perfusión o macerado de los bazos con solución de Hank modificada (sin calcio ni magnesio, suplementada con Penicilina 100 UI/mL y Estreptomicina 100 ug/mL) a 4°C y se procedió al lavado de las células por centrifugación a 400g (1800 rpm) por 10 minutos. Después de resuspendidos los botones celulares se sometieron a la lisis de eritrocitos por choque osmótico con tampón de hemólisis (NH₄Cl 0.15M, Tris 9.9mM pH 7.2) a 4°C por 10 minutos. Las células fueron lavadas 2 veces en iguales

condiciones y fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 suplementado (STF 10%, Glutamina 100mM, Peni-estrepto 100UI-100ug/ml). Posteriormente las células fueron contadas en cámara de Neubauer con colorante Turk violeta, medida su viabilidad con Tripán azul y ajustadas a la concentración de 2×10^6 /ml en medio RPMI-1640 suplementado.

Se utilizó la fórmula:

$$\text{Céls/ml de medio} = \frac{\text{\# céls contadas} \times \text{dilución en colorante} \times 10^4}{\text{\# cuadrantes contados}}$$

cuadrantes contados

Cultivo de las células del bazo con los virus dengue y zika

Las células se dispensaron a razón de 100ul por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, fondo en U (Costar/Falcon). Fueron añadidos los antígenos (DEN y ZIK a una multiplicidad de 0.01) o medio en control de estimulación espontánea, en un volumen de 100 ul/pozo por triplicado.

Las placas fueron incubadas a 37°C, atmósfera húmeda, 5% de CO₂ durante 4 días, momento en cual fueron cosechados los sobrenadantes del cultivo celular para la determinación de la concentración de las citoquinas IFN γ , TNF α e IL-4.

III.7.2 Cuantificación de citoquinas en sobrenadante de cultivo de células del bazo estimulados con el virus

Los sobrenadantes de cultivo de células del bazo previamente estimulados con DEN y ZIK fueron analizados en relación a la concentración de IFN γ , TNF α y IL4 mediante un ELISA empleando anticuerpos monoclonales (Mabtech;Nacía, Sweden). El ensayo fue desarrollado por duplicado. y son descritas brevemente a continuación:

Se recubrieron las placas de 96 pozos con 100 uL mL/pozo del anticuerpo monoclonal de captura (anticuerpo anti-IFN γ o TNF α anti -IL4 según el caso), diluido en tampón de recubrimiento. Se sellaron las placas y se incubaron toda la noche a 4°C. Se aspiró el contenido de los pozos y se lavaron 5 veces con 300ul/pozo de tampón de lavado. Se bloquearon con 200ul/pozo de diluyente de ensayo (PBS con 10% SFB). Se realizaron lavados de la misma forma. Se diluyeron las muestras de

sobrenadante de cultivo de células del bazo y los estándares como se muestra en el manual del estuche. Se añadió 100 ul/pozo y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron lavados de la misma forma, Se añadieron 100 ul/pozo de la solución de detección consistente en, anticuerpo para la detección + reactivo estreptavidina-HRP, luego se sellaron las placas y se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora. Se realizaron lavados pero 10 veces. Se añadieron 100ul/pozo de la solución de sustrato [Tetramethylbenzidina (TMB) y H₂O₂). Se sellaron las placas y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad por 30 minutos. Se detuvo la reacción con 50ul /pozo de solución de parada (H₂SO₄ 2N, Ácido sulfúrico) y se realizó la lectura a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas (Biomeriéux, Francia).

Las muestras de sobrenadantes de cultivo de las células del bazo de los ratones se emplearon en el ELISA como pooles por grupos de animales según el virus y la vía de inoculación.

III.7.3 Detección de citoquinas intracelulares y marcadores de superficie celular por citometría de flujo

Las células del bazo fueron cultivadas en tubos de 2,5mL con los virus dengue a razón de 2×10^6 células/mL y una moi de 0.01 en medio RPMI 1640 suplementado. Tras una incubación de 12 horas a 37°C, atmósfera húmeda, 5% de CO₂, se añadió Monensina a 0,1 ug/mL (BD Pharmingen, EU), reactivo bloqueador del transporte intracelular, que ejerció su efecto durante las siguientes 6 horas. Seguidamente las células fueron cosechadas y se procedió al marcaje con anticuerpos monoclonales. Las células fueron lavadas y dispensadas en tubos FACS con AcMs específicos conjugados a fluorocromos (anti-CD4/APC, anti-CD8/FITC (MiltenyiBiotec, Alemania)). Tras incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, las células fueron lavadas 2 veces con 2 mL de Solución de lavado (PBS, 0,5% STF, 0.1% Azida sódica) 250 x g por 5 minutos. Luego se procedió a fijar las células con en 200 ul de solución de fijado (Paraformaldehído al 1% en PBS) y la permeabilización de sus membranas por la acción del reactivo PermWash (BD Pharmingen, EU). Después de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, fueron repetidos los lavados para proceder al marcaje con AcMs anti-IFN γ (anti- IFN γ /PE) (MiltenyiBiotec, Alemania) durante 30 minutos. Se repitieron 2 lavados y se resuspendieron las células en PBS para su posterior adquisición y análisis en el Citómetro de flujo MACSquant, de MiltenyiBiotec, Alemania. Los resultados se expresan en

porcentajes de células positivas para cada marcador. Del total de células que expresó la citoquina, se calcularon los porcentajes de estas que correspondieron a la subpoblación de linfocitos T CD4+ o a los linfocitos T CD8+.

Análisis de resultados:

Al trabajarse las muestras de suero y los sobrenadantes de cultivo por pooles según los grupos de animales empleados en el estudio, debido a la escasez de reactivos para la determinación de subclases de inmunoglobulinas y la cuantificación de citoquinas, por lo cual no fue posible el análisis estadístico de los resultados.

IV Resultados y discusión

El estudio de la respuesta inmune frente a un agente infeccioso permite un acercamiento al conocimiento de las bases celulares y moleculares de los eventos que se desencadenan en un organismo frente a la infección. Estos eventos se proponen la eliminación del agente con el control eficiente de la infección y la protección futura frente a contactos sucesivos con ese agente a lo largo de la vida. La defensa contra los virus se lleva a cabo mediante los mecanismos efectores de las inmunidades innata y adaptativa. El sistema inmunitario innato proporciona la defensa inicial frente a la infección, pero el adaptativo se encarga de una respuesta específica, más potente y mantenida. Lograr este tipo de respuesta específica y de memoria a largo plazo es el objetivo de la inmunización profiláctica contra las enfermedades virales, lo cual constituye un centro de atención para el control de estas enfermedades. Es por eso que los estudios experimentales para la evaluación de candidatos vacunales son una prioridad actual en la ciencia mundial.

Ante la ausencia de vacunas eficaces frente a los virus ZIK y DEN, agentes antigénicamente relacionados, es de gran interés la evaluación de nuevas formulaciones de inmunógenos en modelos animales, siempre sobre la base de la comparación con la inmunidad generada con los propios virus. Es por eso que la caracterización de la respuesta inmune humoral y celular frente a la infección con estos agentes en ratones BALB/c es el objetivo que ha perseguido la presente investigación. Para esto los ratones fueron inoculados por dos vías diferentes y evaluados los niveles de anticuerpos IgG (inmunoglobulinas de larga vida) alcanzados, y la respuesta de memoria de células T frente a ambos virus.

IV.1 Descripción de la morbilidad en los ratones inmunizados con DEN y ZIK

Como resultado de la inoculación de los ratones BALB /c con una primera dosis de los virus DEN-2 (cepa A15) y ZIK (cepa 221/2016) a un título de 10^6 ufp, se observó en los ratones inoculados con DEN por vía SC la tendencia a arquear la espalda en el 4to día post-inoculación (pi). Por otra parte, se observó en los ratones inoculados con ZIK por vía IP una ondulación de la piel y desaceleración de la actividad en el 5to y 6to día pi . En los días siguientes no se

observaron otras manifestaciones de enfermedad o alteraciones conductuales. Tampoco hubo desarrollo de morbilidad en los animales después de la segunda dosis de inoculación por ninguna de las dos vías.

La ausencia de signos relevantes de enfermedad en los ratones es un rasgo que caracteriza la infección por estos virus en ratones inmunocompetentes. En un estudio previo realizado en ratones CD1 inmunocompetentes inoculados con ZIK por vía SC (Haddow et al., 2012) ninguno de los animales desarrolló signo de enfermedad. El desarrollo de un modelo animal adecuado para la infección por DEN utilizando diferentes vías de inoculación también se ha visto obstaculizado por el bajo nivel o la falta de replicación del virus en ratones de tipo salvaje. Solo la vía de inoculación intracerebral conduce a encefalitis y mortalidad en estos animales (Zompi & Harris, 2012).

Alternativamente, los PNH pueden sostener la replicación viral en tipos de células relevantes y desarrollar viremia y una respuesta inmune robusta, sin embargo, no desarrollan una enfermedad manifiesta o signos clínicos evidentes (Barth, et al., 2006; Tang, et al., 2016) La ausencia de un adecuado modelo animal que imita la enfermedad por DEN o ZIK constituye una gran barrera técnica para la investigación vinculada a la evaluación de un tratamiento o vacuna frente a estas entidades.

IV.2 Respuesta de anticuerpos en ratones inoculados con virus DEN o ZIK.

Una vez inoculados los 4 grupos de ratones con los virus: 2 grupos con DEN y dos grupos con ZIK por las vías SC e IP respectivamente, se realizó la extracción de sangre a los 15 días después de la primera dosis viral administrada, permitiendo la obtención del suero y la determinación de anticuerpos IgG séricos.

Después de la primera dosis de los virus, no hubo respuesta de anticuerpos detectable por el ELISA empleado.

Tras la segunda inoculación viral fueron detectables títulos de anticuerpos IgG, que variaron de acuerdo a la vía de inoculación y el virus inoculado, lo cual se muestra en las Figuras IV.1 y IV.2

Mediante el ensayo inmunoenzimático de subclases de IgG se determinaron los niveles de las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 específicas anti-DEN y anti-ZIK, permitiendo además detectar el grado de reactividad cruzada de los anticuerpos frente a ambos flavivirus.

Títulos de Acs

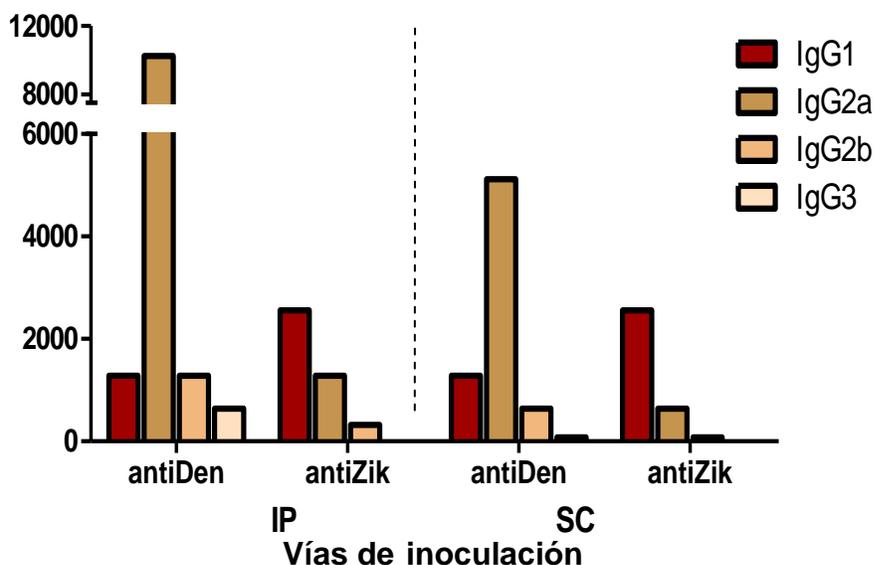


Figura IV.1 Subclases de IgG anti-DEN y anti-ZIK en sueros de animales inmunizados con DEN por las vías IP o SC.

En la figura IV.1 se puede observar cómo se indujeron anticuerpos que fueron capaces de reconocer tanto el virus DEN como el virus ZIK en los animales inmunizados con DEN, predominando con los mayores niveles los anticuerpos específicos anti-DEN a los que reconocieron de forma cruzada al virus ZIK. Los niveles de anticuerpos específicos fueron mayores tras la inoculación por vía IP, al ser comparada esta vía con la vía SC.

La subclase de IgG predominante en la respuesta anti-DEN fue la IgG2a, y aunque fueron detectables anticuerpos específicos de las demás subclases (IgG1, IgG2b e IgG3), sus niveles fueron significativamente menores. La IgG2a se ha reconocido como la subclase que media de forma más eficiente las funciones biológicas de opsonización y fijación de complemento, así

como la ADCC en ratones (Puschnik et al., 2013). Su región Fc se une a receptores Fc γ R en la superficie celular con mayor afinidad, facilitando el reconocimiento de los inmunocomplejos por células fagocíticas, función decisiva en el aclaramiento viral de la circulación. La activación del sistema de complemento pudiera contribuir a la lisis de células infectadas, pero también de partículas virales. La ADCC, por su parte, permite tras el reconocimiento específico de las proteínas virales en la superficie de las células, que la región Fc de la IgG reaccione con los Fc γ R de las células NK y una vez activadas, estas descarguen sus armas citotóxicas, eliminando las células infectadas. En el dengue se ha reconocido este mecanismo importante en la protección mediada por anticuerpos. La IgG2a en el ratón se ha vinculado a un patrón de respuesta T cooperadora Th1 sobre la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos (Barba-Spaeth et al., 2016a).

Por su parte, la reactividad de los anticuerpos de forma cruzada con el virus ZIK se detectó mayormente para anticuerpos IgG1, con menores niveles de IgG2a y 2b e indetectables de IgG3. La subclase IgG1 en el ratón se ha asociado a un patrón de citoquinas Th2, y sus funciones biológicas son mucho menos eficientes en la eliminación de células infectadas por virus o inmunocomplejos de la circulación (Zompi, Montoya, Pohl, Balmaseda, & Harris, 2012).

La recombinación con cambio de clase de las células B de IgM a IgG depende de la interacción de estas células con las células T CD4⁺ cooperadoras (Th). Aunque la interacción de moléculas entre membranas de ambas células es necesaria (CD40L-CD40), para iniciarse el proceso de cambio de isotipo de inmunoglobulina se asume que las citoquinas que provienen de las células T son las que determinan si la célula B cambia su síntesis hacia IgG1 o hacia IgG2a. El IFN- γ y la IL-4 son las citoquinas claves en esto, procedentes de células T que desarrollan un patrón de respuesta Th1 o Th2. Por señalización a través de la molécula STAT6, la IL-4 conduce al cambio de clase para la respuesta a predominio de IgG1, mientras el IFN- γ se contrapone a la IL-4, promoviendo una respuesta de IgG2a en el ratón (Jegerlehner et al., 2007)

En la Figura IV.2 se muestran los resultados de los títulos de anticuerpos IgG en ratones inoculados con el virus ZIK.

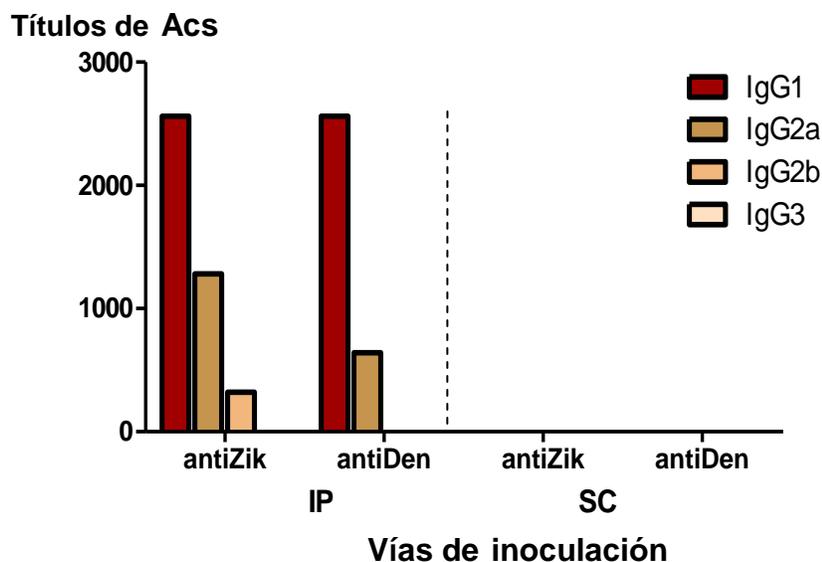


Figura IV.2 Subclases de IgG anti-ZIK y anti-DEN en sueros de animales inmunizados con ZIK por las vías IP o SC.

Los animales inoculados con el virus ZIK por vía IP indujeron una respuesta de anticuerpos detectables no solo frente al propio virus, sino también fueron capaces de reconocer al virus DEN de forma cruzada. Sin embargo, los niveles de anticuerpos alcanzados con la inoculación de este virus fueron mucho menores que los logrados con el virus DEN por la misma vía y dosis de inoculación.

Previamente Grant, et al, 2016 estudiaron la activación de las células B en ratones inmunizados con ZIK, no detectando cambios significativos en la activación o diferenciación de estas células al comparar con los controles, pero si constataron niveles bajos de Acs a partir de los 7 días post-inoculación, que aumentaron ligeramente hacia los 14 y 21 días.

La subclase de IgG predominante fue IgG1 tanto para la respuesta específica como para la cruzada. Por su parte, la vía SC de inoculación del virus ZIK no indujo respuesta de anticuerpos detectables.

Las razones por las cuales no se detectaron anticuerpos en los ratones inoculados subcutáneamente con ZIK, o fueron menores los niveles en los ratones inoculados con DEN, no se conocen. Pudiera deberse a un despliegue más eficaz de los mecanismos de respuesta innata temprana por esta vía, que limiten la replicación viral y logren un control precoz de la infección con menor impacto sobre la respuesta adaptativa humoral (Grant, et al., 2016). Grant y cols, 2016 reportaron recientemente que aunque en humanos la proteína NS5 del ZIK inhibe la respuesta de IFN tipo I en humanos, en ratones esto no sucede, lográndose una potente respuesta de IFN y el control de la infección, lo cual pudiera ser más eficaz en la vía SC que en la IP, considerando que en la vía IP podrían estarse burlando barreras importantes de los mecanismos de defensa innata. Además, pudiera influir en el resultado la población de macrófagos peritoneales susceptibles como células diana para la infección viral tras la inoculación, y que esta vía induce la activación de células B productoras de Acs que habitan a ese nivel, lo que pudiera explicar una activación de estas y mayor respuesta de Acs por esa vía (Abbas).

Similar a los resultados de este trabajo, (Wen & Shresta, 2017a) encontraron que el virus ZIK induce anticuerpos que reconocen al ZIK de forma específica y al virus DEN de forma cruzada, pudiendo inducir ADA en los ratones. (Chang et al., 2013) demostraron que entre los flavivirus patógenos al hombre, ZIK y DEN son los más relacionados por compartir un mayor nivel de homología en la secuencia aminoacídica de sus proteínas, lo cual explica el alto grado de reactividad cruzada en la respuesta inmune.

Si tenemos en cuenta los resultados de nuestro trabajo por la evidente reactividad cruzada encontrada, tanto los anticuerpos anti-DEN pudieran mediar inmunoamplificación frente al ZIK, como los anticuerpos anti-ZIK frente al DEN. Sin embargo, en este fenómeno están implicados diversos factores que determinan su aparición como son la especificidad de los anticuerpos, las subclases de anticuerpos que predominan y los receptores Fc a los cuales estos se unen para mediar la entrada de los virus a las células.

Es conocido que los anticuerpos que reconocen las proteínas E y prM del virus DEN pueden mediar ADA al unirse a otros serotipos virales (Guzman, Garcia, & Kouri, 2006). Ambas proteínas tienen secuencias compartidas entre estos flavivirus, donde tanto epítopes lineales como

conformacionales de células B condicionan la reactividad cruzada de los anticuerpos que reconocen los virus infectivos y que, al no mediar su neutralización, pudiera mediar ADA. Por otra parte, las diferentes subclases de IgG se han evaluado para su capacidad de mediar ADA en la infección viral. Para el DEN los AcMs murinos IgG1, IgG2a, e IgG2b específicos a la proteína de envoltura E de DEN 2 y DEN 4 amplifican la infección viral cuando las células dianas expresan los receptores Fc compatibles (Jegerlehner et al., 2007). Los macrófagos murinos expresan dos tipos de receptores Fc: Fc γ RI y Fc γ RII, que unen IgG.

En humanos, sin embargo, hay 3 tipos de receptores de IgG: Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII. Se ha reportado la participación fundamentalmente del Fc γ RII en el fenómeno de ADA, y en menor medida el Fc γ RI (Souza et al., 2009).

Las variantes alélicas del receptor Fc γ RII humano definidas por un cambio aminoacídico en la posición del aa131 también tienen un impacto sobre la afinidad de unión de las Igs a este receptor, condicionando así mayor propensión al ADA en un grupo de individuos con más susceptibilidad de desarrollar la forma grave de la enfermedad por DEN (García et al., 2010).

El fenómeno de ADA asociado a la infección por DEN favorece el incremento en la internalización de partículas virales opsonizadas formando inmunocomplejo con la IgG, por el receptor II para el Fc de la IgG (Fc γ RII) en macrófagos y células dendríticas. Las resultantes del fenómeno de ADA tienen dos implicaciones importantes en la patogenia de la infección por DEN: el aumento de la multiplicación viral y carga viral, con una mayor diseminación de la infección en primer lugar, y en segundo lugar, la modulación de la respuesta inmune innata en las células diana de la infección, favoreciendo la síntesis de algunos mediadores y suprimiendo la expresión de otros (Ubol & Halstead, 2010). Interesantemente, la evidencia experimental indica que la infección por DEN de las células monocíticas humanas vía el receptor de Fc suprime la transcripción-traducción de los genes para IL-12 y promueve la expresión/síntesis de aquellos para IL-6, TNF α e IL-10. Asimismo, este tipo de infección también suprime la liberación de NO al bloquear la activación de STAT-1 y afectar al interferon regulatory factor 1 (IRF-1) que interviene en la producción de óxido nítrico sintasa inducible (Pacsa et al., 2000).

Existen varias publicaciones que sustentan el papel del efecto ADA en DEN entre los distintos serotipos, pero la gran mayoría de estas son estudios experimentales que a nivel celular o molecular tratan de demostrarlo y explicar sus implicaciones en la gravedad del cuadro clínico. Sin embargo, la evidencia más convincente desde el punto de vista clínico de la participación de los anticuerpos IgG en la patogénesis de la enfermedad por DEN deviene del hallazgo epidemiológico de la ocurrencia de FHD/SCD en el curso de la infección primaria en lactantes hijos de madres positivas a DEN (Jain & Chaturvedi, 2010). El paso de IgG anti-DEN por vía trans-placentaria condiciona un agravamiento en la evolución clínica del lactante que se expone por primera vez a una infección por DEN.

Está por comprobar si los anticuerpos anti-ZIK median ADA *in vivo* y si esto contribuye a la patogénesis de la infección por DEN. De ser así, pudieran inferirse las implicaciones que este fenómeno pudiera tener sobre el cuadro clínico de DEN, pudiendo ser comparables al efecto de la immuno-amplificación resultante entre serotipos del virus DEN. George, en 2017 demostraron que los anticuerpos anti-ZIK incrementan significativamente la viremia en monos inoculados con DEN-2 (George, et al., 2017). Este resultado es interesante, pero habría que demostrar su validez en humanos y en estudios epidemiológicos de poblaciones inmunes a ZIK que se exponen a DEN.

Si, por el contrario, los anticuerpos anti-DEN son capaces de mediar ADA para el virus ZIK, aparte del aumento de la carga viral durante la infección, no se conocen las implicaciones clínicas que esto pudiera tener.

A diferencia de lo que pasa en el DEN, el efecto posible del ADA en la enfermedad por ZIK no se ha demostrado aún. Aunque este fenómeno puede ser inducido en células *in vitro* y en ratones inmunocomprometidos, no existen evidencias que apoyen su contribución a la infección en primates o a la enfermedad en el humano.

Coincidente con lo reportado por Pantoja y cols en que no encontró evidencias del efecto del ADA en primates (Pantoja et al., 2017), recientemente Terzian y cols. (2017) publicaron un trabajo evaluando en humanos el posible efecto del fenómeno ADA para ZIK por inmunidad

previa a DEN (Terzian et al., 2017). En dicha investigación se estudia la asociación entre la presencia previa de anticuerpos anti-DEN en los pacientes, y la carga viral, patrón de citoquinas y sintomatología clínica desarrollada en los pacientes de ZIK. A pesar de los hallazgos *in vitro* que apoyan el ADA, los autores no encontraron evidencias de la que la presencia de anticuerpos anti-DEN propiciara un cambio en la evolución clínica ni en el resto de las variables estudiadas. Estos reportes sugieren que la inmunidad al DEN no parece tener una implicación patogénica sobre la infección por ZIK. No obstante, la extrapolación de resultados *in vitro* o de estudios experimentales no es conveniente por cuanto puede conllevar a conclusiones erradas.

Por otra parte, la implicación de la presencia de anticuerpos anti-DEN en las gestantes que se exponen al ZIK, y su impacto sobre la infección y complicaciones neurológicas en los hijos deberá ser evaluada. Tsunoda y cols. proponen diferentes mecanismos por los cuales los anticuerpos de reactividad cruzada pudieran mediar el daño neurológico ante una infección por ZIK (Tsunoda, 2016). Estos son: los anticuerpos de reactividad cruzada que reconocen el virus ZIK pudieran reconocer también antígenos neurales y causar Síndrome de Guillain Barré; los complejos anticuerpo-virus ZIK son transportados transplacentariamente al feto a través de los receptores Fc, resultando en infección fetal; y en tercer lugar, los inmunocomplejos virus-anticuerpo son captados por las terminaciones nerviosas y transportados por las neuronas al sistema nervioso central, con lo cual el virus entra a este sin pasar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, estas son hipótesis que tendrían que ser demostradas experimental y clínicamente para ser válidas.

Serán necesarios futuros estudios que esclarezcan estos fenómenos, por su impacto en la enfermedad y en el desarrollo de vacunas frente a estas entidades.

IV 3. Respuesta de células del bazo de los ratones inoculados con los virus DEN y ZIK

La respuesta inmunitaria celular desempeña un papel crítico en las infecciones víricas en general, siendo decisivos sus mecanismos efectores para el aclaramiento viral y la recuperación del paciente de una enfermedad viral (Wen & Shresta, 2017b).

La activación de las células T CD4⁺ con liberación de citoquinas aseguran la cooperación intercelular, y el despliegue de las funciones efectoras de los anticuerpos (favoreciendo la eliminación de partículas virales de la circulación) y de las células T CD8⁺ (garantizando la eliminación de células infectadas) (Xiang et al., 2009).

Para evaluar la respuesta inmune celular frente a los virus ZIK y DEN en los ratones BALB/c, procedimos al aislamiento y estimulación de las células del bazo con los virus. Después de 4 días de cultivo se cosecharon los sobrenadantes para medir las concentraciones de citoquinas liberadas por las células como resultado de la estimulación antigénica.

Las citoquinas cuantificadas fueron IFN γ , TNF α e IL4 con vistas a caracterizar el patrón de respuesta de las células T cooperadoras inducida por estos virus: IFN γ y TNF α pertenecientes a un patrón Th1 e IL4 perteneciente a un patrón Th2.

En la figura IV.3 se muestran los niveles de TNF α en el sobrenadante de cultivo de las células de bazo de los ratones inoculados con DEN (A) o con ZIK (B) en presencia de estos virus.

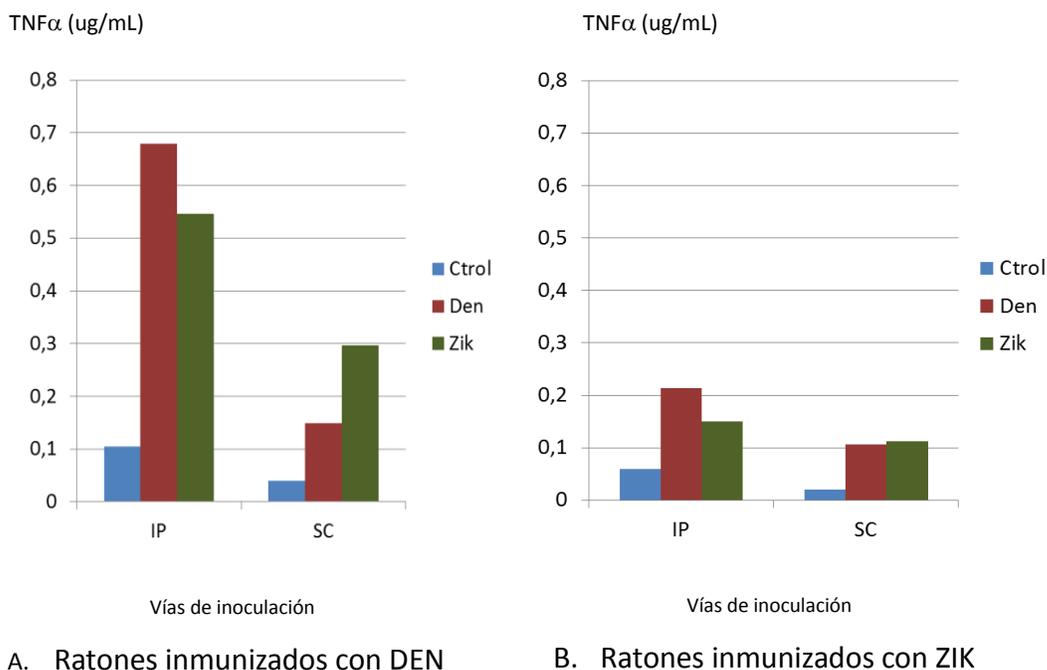


Figura IV.3 Niveles de TNF α en sobrenadantes de cultivo de células del bazo estimuladas con virus DEN y ZIK. A: Ratones inmunizados con DEN, B: Ratones inmunizados con ZIK.

Como se aprecia en la figura VI.3, los niveles de TNF α secretados por las células estimuladas fueron mayores en los ratones inoculados con DEN (Figura IV.3 A) que en los inoculados con ZIK (figura VI.4 B). Particularmente la vía IP indujo la respuesta celular que se asoció a los mayores niveles de TNF α , al comparar con la vía SC en los ratones inoculados con DEN. En la vía IP los niveles de TNF α fueron ligeramente mayores en la respuesta de memoria específica frente al propio virus DEN, con respecto a la respuesta cruzada frente al ZIK. Sin embargo, en el grupo de animales inoculados por vía SC el TNF α alcanzó mayores niveles en la respuesta cruzada frente al ZIK. Es interesante este resultado, aunque no podemos evaluar su significación estadística por haberse trabajado con pools de sobrenadantes de las células cultivadas.

En los ratones inoculados con ZIK, aunque el cultivo de las células de bazo indujo la secreción de TNF α , los niveles fueron notablemente menores por ambas vías de inoculación, que en el grupo de ratones inoculados con DEN por vía IP.

Varias células de la respuesta innata anti-viral son capaces de producir esta citoquina pro-inflamatoria. Entre estas los macrófagos y las células dendríticas son de las más importantes, en el inicio de la respuesta, y son a la vez dianas de la infección por DEN y ZIK. Una vez que interactúan los receptores PAMP y DAMP con el ARN viral o con moléculas de las células dañadas, comienza la activación celular. Es entonces que los TLR, los NLR y los RLR pueden inducir la expresión del gen del TNF, en parte por la activación del factor de transcripción NF-kB (Abbas).

El TNF α induce la producción de fiebre y de proteínas de fase aguda por el hígado, a la vez que activa las células endoteliales para facilitar el paso de M ϕ s y PMNs hacia los tejidos. Además estimula a los M ϕ s para que produzcan otras citoquinas, induciendo la síntesis de óxido nítrico (NO), factor activador de las plaquetas (PAF) y leucotrienos (Rojas, 2015.).

En el DEN en particular, tanto los monocitos como los linfocitos T son activados por la infección y secretan grandes cantidades de TNF α . Durante una infección secundaria heterotípica los linfocitos T de memoria liberan tras la activación cantidades exageradas de citoquinas pro-inflamatorias, entre las que destaca el TNF α (Dong et al., 2007). Las altas concentraciones en sangre de esta citoquina durante la infección secundaria se han asociado con la extravasación de plasma, el choque y las manifestaciones hemorrágicas en el paciente grave (Imrie, Meeks, Gurary, Sukhbataar, et al., 2007).

En la FHD se observan efectos sistémicos relacionados con los altos niveles de TNF α ; tal es el caso de la fiebre elevada y mantenida, que se ha asociado a la evolución a la gravedad en los pacientes, y el aumento en la permeabilidad vascular con salida de albúmina, lo cual se constata clínicamente con un incremento en el hematocrito, lipotimia e hipotensión. Además, se ha sugerido que la elevada concentración de TNF α pudiera participar en la inducción de apoptosis de células endoteliales y mediar así la pérdida de la integridad estructural del endotelio observada

en los casos graves. Adicionalmente, el TNF α actúa sobre el endotelio induciendo la expresión de INOS y la producción del NO que provoca vasodilatación. Estudios en ratones confirman que el TNF α juega un papel central en el desarrollo de las hemorragias y la caída de las plaquetas (Yen, et al., 2008).

Pérez y cols. encontraron en los pacientes de FHD cubanos una predisposición genética a la producción de altos niveles de esta citoquina a partir de la asociación de uno de los polimorfismos en el promotor de TNF (-308A), que afecta los niveles de expresión de TNF α , y se encuentra en el cuadro grave de la enfermedad (Perez et al., 2010).

Sierra y cols. por su parte encontraron niveles de expresión del gen de TNF α significativamente mayores en células mononucleares humanas enfrentadas *ex vivo* a un reto viral heterotípico con respecto al homotípico (Sierra et al., 2010).

Los resultados del presente estudio muestran una mayor secreción de TNF α en el sobrenadante de células estimuladas con reto heterotípico en el caso de los ratones inoculados por vía SC, no así en los de la vía IP, en que predominaron los niveles en el reto homotípico.

La vía de inoculación pudiera influir cualitativa y cuantitativamente en la respuesta alcanzada, pudiendo explicar esa diferencia.

De los resultados de este trabajo se infiere que la memoria de células T inducida por el virus DEN se asocia a una respuesta pro-inflamatoria más potente que en el ZIK.

Los escasos estudios realizados en pacientes de ZIK apoyan los resultados obtenidos en esta investigación. En un estudio cinético con muestras de pacientes de ZIK encontraron niveles de TNF- α sorprendentemente bajos comparados con los hallados de otras arbovirosis (Tappe et al., 2016).

Si tenemos en consideración la clínica de la infección por ZIK, donde la fiebre es casi inaparente y el curso de la infección generalmente leve, los resultados obtenidos en nuestro trabajo con

respecto a los niveles bajos de $TNF\alpha$ secretados por las células de animales inoculados con ZIK son explicables.

Con vistas a caracterizar la respuesta celular según los patrones de respuesta Th1 o Th2 nos propusimos cuantificar los niveles de las citoquinas características de estos patrones en los sobrenadantes de cultivo de las células del bazo de los ratones inoculados con los virus, al ser estimuladas con los antígenos virales *in vitro*. Las funciones biológicas de las células Th1 y Th2 están asociadas principalmente a la producción de citoquinas. La citoquina Th1 más representativa es el $IFN\gamma$, mientras que entre las citoquinas Th2 la más representativa es la IL-4 (Abbas, 2012).

En la Figura IV.4 se muestran los niveles de $IFN\gamma$ e IL-4 en sobrenadante de cultivo de células de bazo procedentes de ratones inoculados con DEN estimuladas *in vitro* con virus DEN y ZIK.

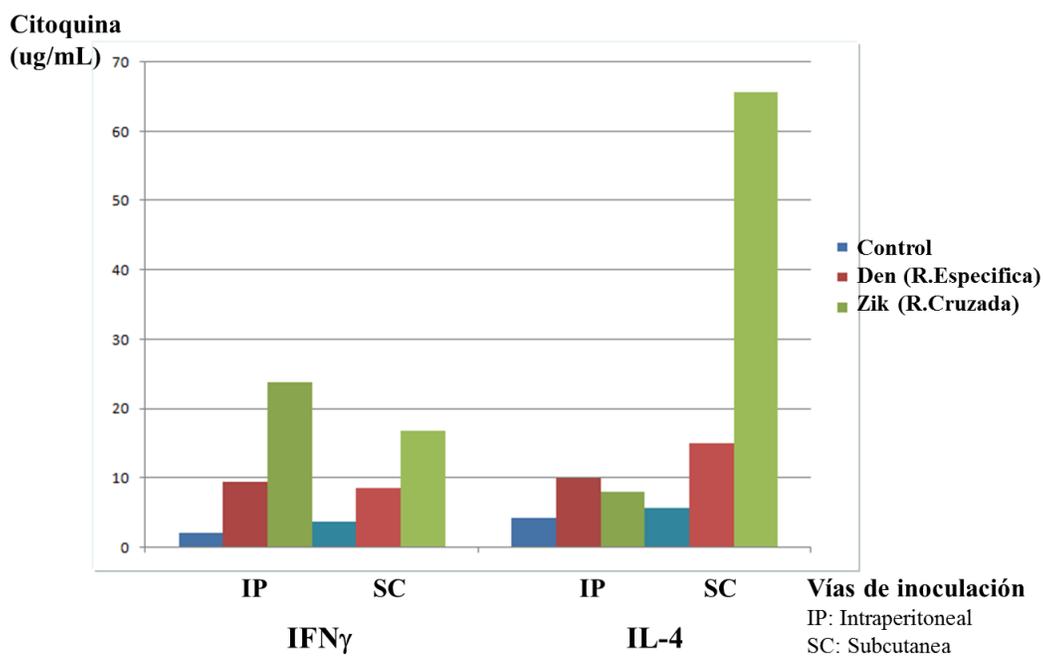


Figura IV.4 Niveles de IFN γ e IL-4 en sobrenadantes de cultivo de las células del bazo de ratones inoculados con DEN, estimulados *in vitro* con virus DEN y ZIK.

Como puede apreciarse en dicha figura, fueron detectables niveles de IFN γ en los sobrenadantes de cultivo, lo cual demuestra la activación de células Th1 de memoria en este experimento. Predominaron los niveles de la citoquina en animales inoculados por vía IP al comparar con la vía SC, sin embargo, no hubo grandes diferencias entre los grupos. Al comparar la respuesta específica con la de reactividad cruzada, los niveles de IFN γ mayores se observaron en la respuesta cruzada contra el virus ZIK (Sierra, et al., 2010). Esto apoyaría el hecho que, como pasa entre serotipos en el DEN, una respuesta heterotípica frente al ZIK pudiera inducir un incremento de la respuesta pro-inflamatoria.

En células T de individuos inmunes a DEN se ha reportado una mayor expresión de IFN γ en el reto heterotípico, tratándose de serotipos diferentes del complejo DEN. En nuestro caso la explicación del fenómeno pudiera ser la misma tratándose de células T que reconocen solo parcialmente el epítipo de la proteína viral de ZIK, lo cual, por afectación de la afinidad llevaría a una mayor liberación de citoquina pro-inflamatoria.(Zompi, et al., 2012) Sin embargo, los mayores niveles en la secreción de IFN γ por estas células frente al reto heterotípico no parece explicar el predominio de los niveles de IgG1 anti-ZIK en estos ratones inmunizados por vía IP con DEN.

El IFN γ es un importante regulador de la respuesta inmune adaptativa. Es producido por células T CD4⁺ Th1, aunque también lo producen células NK, NKT y T CD8⁺. Su efecto una vez liberado se ejerce sobre células que portan sus receptores IFN γ R1 y IFN γ R2. Entre ellas las células dendríticas, macrófagos, linfocitos B y T. El IFN γ causa un aumento de la expresión de moléculas MHC clase I y II sobre estas células, favoreciendo la presentación antigénica a células T. Además estimula intensamente el desarrollo de la respuesta de células T CD8⁺ durante una infección viral aguda. En su efecto sobre la actividad de estas células induce la expresión del inmunoproteosoma, proteínas transportadoras TAP, y moléculas MHC clase I, haciendo más visibles los péptidos virales para estas células. De esta forma, el IFN γ es esencial para el control

de la infección viral (Abbas, 2012). Aunque parece participar en la patogénesis de la enfermedad grave por DEN cuando su liberación es exagerada y masiva a la circulación, sin mecanismos reguladores oportunos que contrapongan su efecto, sin embargo, es imprescindible para el control de la infección y eficiente aclaramiento viral. De hecho algunos autores defienden la idea que es la mayor relación de citoquinas $TNF\alpha/IFN\gamma$, o sea, mayores niveles de $TNF\alpha$ y menores de $IFN\gamma$, lo que en realidad se asocia a la patogenia y una mayor severidad en la enfermedad por DEN (Mangada & Rothman, 2005; Soundravally et al., 2014). Esto, sin embargo, depende del momento del curso clínico de la enfermedad por DEN. Es conocido que las citoquinas son mediadores solubles de neo-síntesis en respuesta a estímulos celulares, que una vez liberados ejercen su acción por corto tiempo debido a su limitada vida media en circulación. Su rápido catabolismo hace que sus niveles sean muy variables y dinámicos durante el cuadro clínico de una infección aguda, lo cual dificulta su uso como biomarcadores.

En el ZIK por lo que se hace difícil seleccionarlo como biomarcador de severidad para su uso clínico. existen muy pocos reportes del papel de esta citoquina. Solo dos artículos reflejan su participación en la respuesta antiviral: uno en ratones (Cunha-Neto et al., 2017) y otro en humanos (Pardy et al., 2017). Ambos trabajos reportan una activación marcada de las células T CD8+, y la expresión por las células T CD8+ murinas del $IFN\gamma$, no constatándose un aumento importante de las células T CD4+ activadas.

El análisis de los niveles de IL-4 en los sobrenadantes de cultivo nos conduce a tratar de explicar un interesante hallazgo. Los niveles de esta citoquina se comportan en un rango no muy amplio de valores, sin grandes diferencias entre los grupos, con excepción de las células de los animales inoculados con DEN que fueron retadas con el ZIK, en que los niveles aumentaron significativamente. Recientemente Yang y cols. encontraron en ratones inmunizados con antígenos recombinantes de la proteína E del virus ZIK una respuesta celular a predominio de $IFN\gamma$ y también de IL-4, concomitante con unos niveles aumentados de IgG1, lo cual concuerda con los resultados encontrados frente al virus ZIK de nuestro estudio (M. Yang, Dent, Lai, Sun, & Chen, 2017). Además Tappe y cols. hallaron en un estudio cinético de citoquinas en pacientes, una respuesta a predominio Th2 en pacientes infectados con ZIK (Tappe, et al., 2016).

La IL-4 es una citoquina producida principalmente por linfocitos T CD4⁺, pero también por mastocitos activados. Esta induce la proliferación de linfocitos B, su síntesis de inmunoglobulinas y el cambio de clase a IgE, y a subclases como la IgG1 en el ratón. Si bien en nuestro caso se trata de ratones inoculados con DEN, cuyas células son estimuladas in vitro con ZIK, pudiera explicar en parte por qué la respuesta de anticuerpos que reconocen al ZIK son a predominio de la subclase IgG1.

En la figura IV.5 se muestran los niveles de IFN γ e IL-4 en sobrenadantes de cultivo de las células del bazo de los ratones inoculados con ZIK, estimuladas in vitro con virus ZIK (respuesta específica) y con DEN (respuesta cruzada).

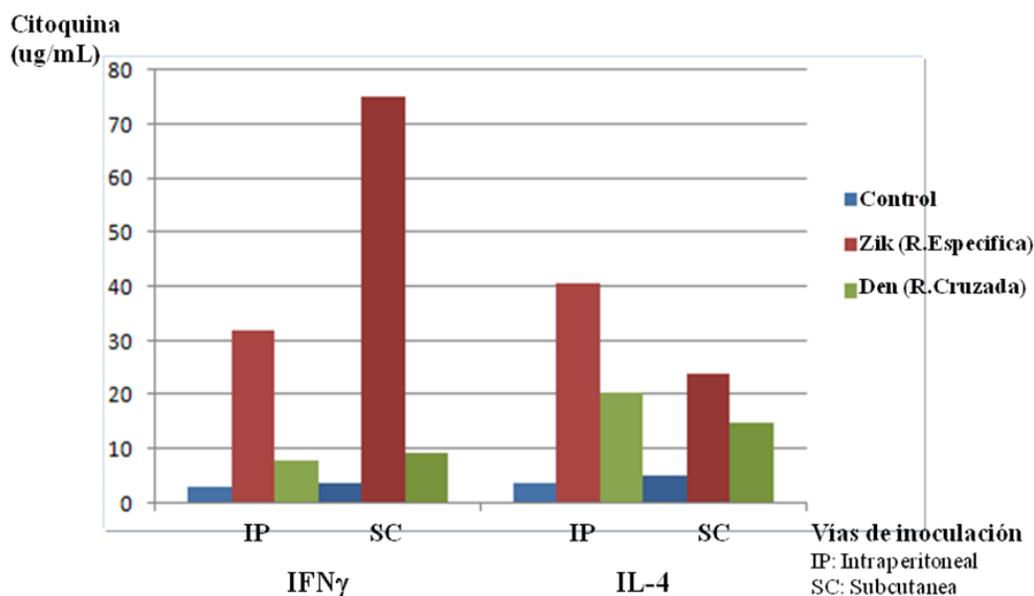


Figura IV.5. Niveles de IFN γ e IL-4 en sobrenadantes de cultivo de las células del bazo de los ratones inoculados con ZIK, estimuladas in vitro con virus ZIK (respuesta específica) y con DEN (respuesta cruzada).

Como puede apreciarse en la figura, en la respuesta específica anti-ZIK predomina notablemente la liberación de IFN γ en los ratones inoculados por vía SC, siendo tanto en estos, como en los

inoculados por vía IP, los niveles de esta citoquina mayores que los secretados en presencia de virus DEN en respuesta cruzada. Por otra parte, los niveles de IL-4 también predominaron en la respuesta específica frente al ZIK, siendo mayores en el grupo de ratones inoculados intraperitonealmente.

La potente respuesta celular encontrada en los ratones inoculados con ZIK por vía SC pudiera parecer en contraposición con la ausencia de respuesta humoral detectada en estos ratones. Sin embargo, la vía de inoculación pudiera condicionar un predominio de respuesta celular a humoral, en dependencia de la magnitud de la respuesta innata y las células y mediadores que participan en la presentación de antígenos virales a los linfocitos T. Por esta vía (SC) predominan notablemente los niveles de IFN γ a los de IL-4, mientras que en la respuesta inducida por la vía IP predominó la IL-4 al IFN γ .

Aunque no es aconsejable la comparación directa de los niveles entre distintas citoquinas pues sus efectos son el resultado de la acción sinérgica entre ellas en su interacción con otras muchas moléculas solubles y de membrana en el contexto biológico, estos niveles pudieran explicar el predominio de la subclase IgG1 en la respuesta humoral de los ratones inoculados con ZIK por vía IP. El predominio marcado de los niveles de IFN γ en la vía SC, si bien no explica la ausencia de anticuerpos en los ratones, sugiere un predominio evidente de la respuesta celular en ese grupo.

Para identificar las poblaciones de linfocitos T productoras de IFN γ se procedió a marcar las células de los distintos grupos de ratones estimuladas con los virus con AcMs anti CD4 y anti CD8 y luego con un AcM anti IFN γ , todos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo.

En el figura IV.6 se muestran los resultados expresados en % de las células T del bazo CD4+ o CD8+ que expresan la citoquina IFN γ intracelularmente.

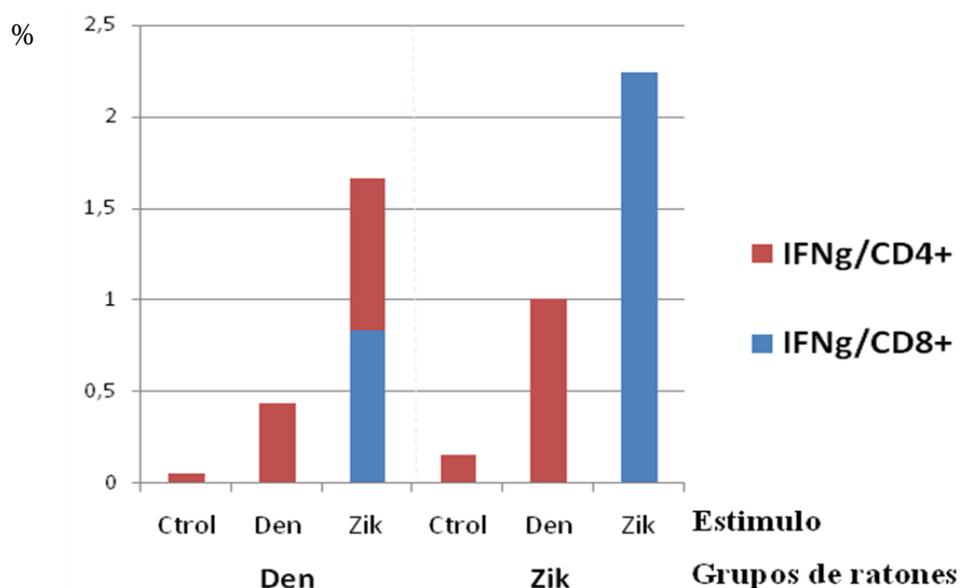


Figura IV.6 Expresión de IFN γ en linfocitos T CD4+ y CD8+ de ratones inoculados con virus DEN o ZIK tras ser estimulados *in vitro* con los virus. Resultados expresados en porcentajes.

En la figura se muestra un porcentaje mayoritario de células que expresan IFN γ en células estimuladas con el virus ZIK, tanto en ratones inoculados con ZIK (respuesta específica) como aquellos que habían sido inoculados con DEN (respuesta cruzada). Sin embargo, las poblaciones celulares que producen la citoquina divergen frente a uno y otro virus. Frente al virus DEN, se induce una respuesta productora de IFN γ en linfocitos T CD4+, mientras que frente al virus ZIK la respuesta productora de esta citoquina se constata en linfocitos TCD8+. Este interesante hallazgo tiene repercusiones funcionales importantes en la respuesta anti-viral.

Es conocida la intensa respuesta celular con activación de células T CD4+ y liberación masiva de citoquinas pro-inflamatorias que se induce en una infección secundaria heterotípica por virus DEN en el humano, y que se ha asociado a la evolución clínica hacia la gravedad las células T CD4+ son centro de la respuesta adaptativa y definen en buena medida la magnitud y calidad de la respuesta inmune específica, incluyendo la respuesta de anticuerpos (Lima, Rolland, Modjarrad, & Trautmann, 2017). Por otra parte, las células T CD8+ tienen una función predominante citotóxica crucial en la eliminación de células infectadas por virus y por tanto,

decisivas en la recuperación de la infección. Las células T CD8⁺ que expresan IFN γ son potencialmente citotóxicas (Wen et al., 2017).

Los resultados del presente estudio sugieren un predominio de respuesta CD4⁺ productora de IFN γ en ratones inmunizados con DEN que se exponen secundariamente de forma cruzada con el ZIK (similar a la respuesta heterotípica frente a otros serotipos del DEN). Por el contrario, la infección por ZIK induce una respuesta de memoria intensa en células T CD8⁺ que expresan IFN γ , compatible con una eficaz respuesta citotóxica frente a la infección homotípica (Abbas, 2012). El hecho de que en la respuesta de anticuerpos anti-ZIK predomine la subclase IgG1, sugerente de una respuesta Th2, y por otra parte se encuentre una potente activación de células T CD8⁺ también inducida por ese virus, compatible con una respuesta Th1, constituye una paradoja en los resultados de nuestro estudio. Habrá que profundizar en los mecanismos que expliquen esos resultados. No obstante, los resultados encontrados en el presente estudio son avalados por el hecho de que son compatibles con los de otros autores.

En el modelo murino Wen y cols. demostraron la inducción de una potente respuesta de células T CD8⁺ en ratones infectados con ZIK (Wen, et al., 2017) a pesar de que los niveles de IFN- γ y TNF- α no eran altos en ZIK con respecto a DEN. Pardy y cols también evidencian la potente respuesta de linfocitos T CD8⁺ inducida frente al ZIK en ratones (Pardy, et al., 2017).

También Cunha-Neto y cols en el transcurso de este año han publicado el hallazgo de una potente respuesta de células T CD8⁺ con expresión de IFN γ y granzima B en ratones inmunizados con ZIK, lo cual demuestra una vez más una eficaz respuesta citotóxica frente al ZIK (Cunha-Neto, et al., 2017) .

Además Cimini y colaboradores encontraron que la infección en humanos por ZIK induce una reducción de células T CD4⁺ que producen IFN γ al comparar con el DEN y una mayor proporción de células T CD8⁺ de memoria efectoras (Cimini, et al., 2017).

La potente respuesta inmune citotóxica inducida por el virus ZIK pudiera explicar la evolución clínica benigna en los pacientes que contraen esta infección, en los que la fiebre es infrecuente o

baja y hay una recuperación espontánea en la gran mayoría de los pacientes sin grandes complicaciones.(Pardi et al., 2017) El rash y el prurito se vuelven los signos clínicos más frecuentes en los pacientes, lo cual pudiera asociarse a manifestaciones cutáneas vinculadas a una respuesta tipo Th2, también observada en nuestro modelo. Es conocido que la IL-4 induce la síntesis de anticuerpos IgE, y que estos sensibilizan a los mastocitos de la piel para propiciar la aparición de erupciones cutáneas en algunas infecciones virales como el DEN (Avirutnan & Matangkasombut, 2013). Sería de interés en futuros estudios explorar los niveles de IgE inducidos por la infección por ZIK en el humano.

Sin embargo, no se conocen las posibles implicaciones de esta respuesta en la patogénesis de las complicaciones por ZIK. Si bien la respuesta de células T CD8+ citotóxicas es muy importante en el control de la infección, estas pudieran ser dañinas en el sistema nervioso central en la infección prenatal o en casos de Guillain Barré. Reportes recientes han divulgado otras manifestaciones neurológicas asociadas a la infección por ZIK que incluyen mielitis, meningoencefalitis y encefalitis fatal (Jennings & Mackenzie, 2016). Jurado y cols. encontraron una diseminación del virus ZIK en el sistema nervioso central de ratones deficientes de receptor de IFN α (Jurado et al., 2017). La infección de los astrocitos a ese nivel resultó en la ruptura de la barrera hematoencefálica y el marcado influjo de células T CD8+ efectoras. La actividad antiviral de estas células dentro del cerebro limitó marcadamente la infección en las neuronas, pero también conllevó al daño cerebral con la consecuente parálisis (Jurado, et al., 2017). O sea, que las mismas células que pueden controlar la infección eficientemente a nivel sistémico, pueden ser causantes de la neuropatología si el virus infecta el sistema nervioso central y hay ruptura de la barrera hemato-encefálica. Es por eso que los estudios para la caracterización de los mecanismos de respuesta inmune humoral y celular frente a estos virus deberán contribuir al esclarecimiento de su papel en la protección frente a la infección o en los mecanismos patogénicos de las complicaciones en las enfermedades que estos virus provoquen.

El papel de la reactividad cruzada entre los virus ZIK y DEN y cómo la inmunidad de las células T de DEN pre-existente modula las respuestas de las células T de ZIK ha sido abordada en estudios anteriores (Zompi, et al., 2012). En estos se reporta que las respuestas de células T

provocadas por una infección previa con DEN reconocen péptidos derivados de ZIK y que la exposición a DEN antes de la infección por ZIK influye en el tiempo, la magnitud y la calidad de la respuesta de células T (Zompi, et al., 2012). Las respuestas frente al ZIK se dirigen a diferentes secuencias proteicas que cruzan con las respuestas específicas de DEN, señalando que la infección previa con DEN o vacunación con vacunas por DEN reconocen péptidos derivados de ZIK (Halstead, 2003; Lima, et al., 2017). Las células T reactivas a ZIK en la fase aguda de la infección se detectan con mayor rapidez y en mayor magnitud en los pacientes inmunes a DEN. Por el contrario, la frecuencia de las células T reactivas a ZIK continúa aumentando en la fase de convalecencia en los pacientes no infectados con DEN, pero disminuye en los donantes pre-expuestos de DEN, compatible con un control más eficiente de la replicación de ZIK y/o eliminación del antígeno ZIK (Vaughn, et al., 2000).

La calidad de las respuestas también se ve influenciada por la exposición previa al DEN: las células T CD8+ específicas a ZIK en pacientes pre-expuestos al DEN regulan selectivamente la granzima B y la PD1 en comparación con los donantes que no han recibido DEN (Grifoni et al., 2017). Finalmente, se descubrió que las proteínas estructurales de ZIK (E, prM y C) son blancos principales tanto de las respuestas de células T CD4+ como CD8+, mientras que los epítopes de células T de DEN se encuentran principalmente en proteínas no estructurales lo cual tiene implicaciones para el diseño de vacunas contra esta amenaza global (Zompi, et al., 2012).

La identidad de secuencia entre DEN y ZIK oscila entre el 44% y el 56% para las proteínas estructurales E y la cápsida, respectivamente, hasta el 68% para las proteínas no estructurales más conservadas NS3 y NS5. La homología entre péptidos de células T CD8+ inmunogénicos de DEN y la secuencia de ZIK correspondiente es evidente. Sin embargo, un estudio reciente informó la falta de reactividad cruzada entre las células T CD4 + específicas de la proteína NS1 de ZIK y la proteína NS1 de DEN (Xu et al., 2012).

Se necesitan estudios para evaluar más a fondo el alcance y las implicaciones del reconocimiento cruzado de epítopes de células T CD4 + y CD8 + en individuos inmunes a DEN y ZIK. Dada la alta homología entre DEN y ZIK, el conocimiento que hemos adquirido sobre la respuesta de células T a DEN puede proporcionar información sobre la naturaleza de la inmunidad de células

T para ZIK. La superposición geográfica de las infecciones por DEN y ZIK resalta la necesidad de comprender el impacto de la inmunidad preexistente a DEN (adquirida mediante infección natural o vacunación) sobre la inmunidad protectora y / o la inmunopatología durante la infección por ZIK.

Discusión integrada

En la presente investigación se estudió la respuesta inmune inducida por los virus DEN y ZIK en ratones Balb/c. Se emplearon dos vías diferentes de inoculación con vistas a evaluar diferencias en la respuesta dependiendo de la vía. Se encontró que tanto el virus DEN como el ZIK inducen una respuesta específica frente al virus inoculado, pero también ambos virus indujeron una respuesta humoral y celular que reconoció de forma cruzada al otro flavivirus. Este reconocimiento cruzado puede tener implicaciones tanto en la infección por DEN como en la infección por ZIK, cuando los individuos que se exponen a estos virus tienen inmunidad previa a alguno de estos, fenómeno muy común por cuanto existe la co-circulación de estos virus en las mismas aéreas geográficas del mundo y son transmitidos al hombre por el mismo vector.

La respuesta de anticuerpos fue más intensa al DEN que al ZIK. La subclase de anticuerpo predominante en esa respuesta fue diferente para ambos virus, siendo la IgG2a la inmunoglobulina predominante frente al DEN, y la IgG1 la predominante frente al ZIK. Esto pudiera tener implicaciones en las funciones de estos anticuerpos, en su capacidad para activar complemento o mediar ADCC, pero además en su capacidad de mediar ADA. Aparentemente es más eficaz el anticuerpo anti-DEN (IgG2a) en mediar estas funciones, lo cual pudiera impactar negativamente en los pacientes inmunes a DEN que se exponen al ZIK.

En la respuesta celular predominó un patrón de respuesta pro-inflamatoria inducida por el virus DEN, y particularmente en la respuesta de memoria heterotípica frente al ZIK, la cual fue característica de las células T CD4+. Mientras que en la infección por ZIK se indujo una mayor respuesta Th2 y una potente respuesta homotípica de células T CD8+ que expresan IFN γ .

Estos resultados aportan al conocimiento de la inmunidad frente a las infecciones por estos flavivirus, y son de utilidad para la evaluación de candidatos vacunales frente a estos en el modelo murino.

Sin embargo, deberán contemplarse con reservas para su extrapolación al entendimiento de estas infecciones virales, los mecanismos de la respuesta inmune desencadenados frente a estos virus y las implicaciones de estos mecanismos en la patogénesis de las enfermedades que estos virus provocan. Serán necesarios por tanto los estudios en primates y humanos, puesto que el modelo murino alberga diferencias genéticas importantes.

Dilucidar el papel de esta respuesta en la inmunopatogenia de las infecciones cruzadas por DEN y ZIK es importante no solo por el conocimiento básico que aporta a la ciencia, sino también por sus probables implicaciones en la morbi-mortalidad de estas enfermedades. Es por eso que se impone el estudio y caracterización de la respuesta anti-viral en humanos, pero también los estudios epidemiológicos necesarios para conocer sus implicaciones reales en las enfermedades que estos virus provocan. Todo el conocimiento que derive de estas investigaciones tiene un impacto directo para el diseño y evaluación de candidatos vacunales.

Conclusiones

1. Se cuenta en el IPK con herramientas para el estudio de la respuesta inmune humoral frente al virus ZIK en el modelo murino.
2. La inoculación en ratones Balb/c de los virus DEN y ZIK induce una respuesta de anticuerpos IgG y una respuesta inmune celular específica y de reactividad cruzada entre estos virus.
3. El virus DEN induce mayores niveles de anticuerpos IgG que el virus ZIK en ratones balb/c, predominando la subclase IgG2a frente al DEN y la IgG1 frente al ZIK, lo cual pudiera influir en la capacidad de estos anticuerpos de mediar ADA.
4. El virus DEN induce una mayor respuesta pro-inflamatoria frente al reto viral heterotípico, mientras la infección por ZIK induce mayor respuesta en el reto homotípico, con posibles implicaciones en la patogénesis de ambas enfermedades en el humano.
5. El virus ZIK induce la expresión de IFN γ en células T CD8+, mientras que en el DEN esta citoquina la producen principalmente células de memoria CD4+, lo que parece asociarse al mejor curso clínico en la infección por ZIK en el hombre.

Recomendaciones

- Estudiar las implicaciones funcionales de la respuesta de anticuerpos específica y de reactividad cruzada entre los flavivirus: neutralización, ADCC o ADE.
- Evaluar la cinética de la infección por los DEN y ZIK en los tejidos de los ratones según la vía y dosis de inoculación.
- Caracterizar la respuesta específica y de reactividad cruzada frente a flavivirus en humanos

Referencias bibliográficas

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (Ed.). (2012). *Inmunología celular y molecular*. (7ma edición ed.).
- Alvarez, M., Rodriguez-Roche, R., Bernardo, L., Vazquez, S., Morier, L., Gonzalez, D., . . . Guzman, M. G. (2006). Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg*, 75(6), 1113-1117.
- Alvarez Vera, M., Valdes Palacios, D., Vazquez Ramudo, S., Delgado Hernandez, I., Garcia Infante, S., Morier Diaz, L., & Guzman Tirado, M. G. (1998). [The standardization of the plaque reduction technic for differentiating a dengue infection from a yellow fever infection]. *Rev Cubana Med Trop*, 50(3), 177-181.
- Amorim, J. H., Porchia, B. F., Balan, A., Cavalcante, R. C., da Costa, S. M., de Barcelos Alves, A. M., & de Souza Ferreira, L. C. (2010). Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods*, 167(2), 186-192. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.04.003
- Avirutnan, P., Fuchs, A., Hauhart, R. E., Somnuk, P., Youn, S., Diamond, M. S., & Atkinson, J. P. (2010). Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med*, 207(4), 793-806. doi: 10.1084/jem.20092545
- Avirutnan, P., Hauhart, R. E., Marovich, M. A., Garred, P., Atkinson, J. P., & Diamond, M. S. (2011). Complement-mediated neutralization of dengue virus requires mannose-binding lectin. *MBio*, 2(6). doi: 10.1128/mBio.00276-11
- Avirutnan, P., & Matangkasombut, P. (2013). Unmasking the role of mast cells in dengue. *Elife*, 2, e00767. doi: 10.7554/eLife.00767
- Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S., Komoltri, C., Thiemmecca, S., Auethavornanan, K., . . . Malasit, P. (2006). Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis*, 193(8), 1078-1088. doi: 10.1086/500949
- Azeredo, E. L., De Oliveira-Pinto, L. M., Zagne, S. M., Cerqueira, D. I., Nogueira, R. M., & Kubelka, C. F. (2006). NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol*, 143(2), 345-356. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.02996.x
- Barba-Spaeth, G., Dejnirattisai, W., Rouvinski, A., Vaney, M. C., Medits, I., Sharma, A., . . . Rey, F. A. (2016a). Erratum: Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*, 539(7628), 314. doi: 10.1038/nature19780
- Barba-Spaeth, G., Dejnirattisai, W., Rouvinski, A., Vaney, M. C., Medits, I., Sharma, A., . . . Rey, F. A. (2016b). Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*, 536(7614), 48-53. doi: 10.1038/nature18938
- Bardina, S. V., Bunduc, P., Tripathi, S., Duehr, J., Frere, J. J., Brown, J. A., . . . Lim, J. K. (2017). Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. *Science*, 356(6334), 175-180. doi: 10.1126/science.aal4365
- Bartenschlager, R., & Miller, S. (2008). Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol*, 3(2), 155-165. doi: 10.2217/17460913.3.2.155
- Barth, O. M., Barreto, D. F., Paes, M. V., Takiya, C. M., Pinhao, A. T., & Schatzmayr, H. G. (2006). Morphological studies in a model for dengue-2 virus infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101(8), 905-915.

- Bastin, R., Rodhain, F., Frottier, J., Vilde, J. L., Dournon, E., Bricaire, F., & Charmot, G. (1981). [Asiatic dengue in France: 9 cases, of which one of the thrombopenic type (author's transl)]. *Ann Med Interne (Paris)*, *132*(2), 106-108.
- Basu, A., & Chaturvedi, U. C. (2008). Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *53*(3), 287-299. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00420.x
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., . . . Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, *496*(7446), 504-507. doi: 10.1038/nature12060
- Bhattacharya, M. K., Maitra, S., Ganguly, A., Bhattacharya, A., & Sinha, A. (2013). Dengue: a growing menace -- a snapshot of recent facts, figures & remedies. *Int J Biomed Sci*, *9*(2), 61-67.
- Brown, C. (2016). Zika virus outbreaks in Asia and South America. *CMAJ*, *188*(2), E34. doi: 10.1503/cmaj.109-5212
- Capeding, R. Z., Luna, I. A., Bomasang, E., Lupisan, S., Lang, J., Forrat, R., . . . Crevat, D. (2011). Live-attenuated, tetravalent dengue vaccine in children, adolescents and adults in a dengue endemic country: randomized controlled phase I trial in the Philippines. *Vaccine*, *29*(22), 3863-3872. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.03.057
- Cimini, E., Castilletti, C., Sacchi, A., Casetti, R., Bordoni, V., Romanelli, A., . . . Agrati, C. (2017). Human Zika infection induces a reduction of IFN-gamma producing CD4 T-cells and a parallel expansion of effector Vdelta2 T-cells. *Sci Rep*, *7*(1), 6313. doi: 10.1038/s41598-017-06536-x
- Clark, D.H., & Casals, J. . (1958). Techniques for hemagglutination inhibition with arthropodborne viruses. *Am. J. Trop. Hyg.*, *7*, 561-573.
- Clyde, K., Barrera, J., & Harris, E. (2008). The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis. *Virology*, *379*(2), 314-323. doi: 10.1016/j.virol.2008.06.034
- Cunha-Neto, E., Rosa, D. S., Harris, P. E., Olson, T., Morrow, A., Ciotlos, S., . . . Rubsamen, R. M. (2017). An Approach for a Synthetic CTL Vaccine Design against Zika Flavivirus Using Class I and Class II Epitopes Identified by Computer Modeling. *Front Immunol*, *8*, 640. doi: 10.3389/fimmu.2017.00640
- Chambers, T. J., McCourt, D. W., & Rice, C. M. (1989). Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. *Virology*, *169*(1), 100-109.
- Chang, C. X., Tan, A. T., Or, M. Y., Toh, K. Y., Lim, P. Y., Chia, A. S., . . . Grotenbreg, G. M. (2013). Conditional ligands for Asian HLA variants facilitate the definition of CD8+ T-cell responses in acute and chronic viral diseases. *Eur J Immunol*, *43*(4), 1109-1120. doi: 10.1002/eji.201243088
- Chareonsirisuthigul, T., Kalayanarooj, S., & Ubol, S. (2007). Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol*, *88*(Pt 2), 365-375. doi: 10.1099/vir.0.82537-0
- Chaturvedi, U. C., Elbishbishi, E. A., Agarwal, R., Raghupathy, R., Nagar, R., Tandon, R., . . . Azizieh, F. (1999). Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol*, *59*(3), 335-340.
- Chen, M. C., Lin, C. F., Lei, H. Y., Lin, S. C., Liu, H. S., Yeh, T. M., . . . Lin, Y. S. (2009). Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J Immunol*, *183*(3), 1797-1803. doi: 10.4049/jimmunol.0800672

- Chen, Y., Maguire, T., & Marks, R. M. (1996). Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol*, *70*(12), 8765-8772.
- Chokephaibulkit, K., & Perng, G. C. (2013). Challenges for the formulation of a universal vaccine against dengue. *Exp Biol Med (Maywood)*, *238*(5), 566-578. doi: 10.1177/1535370212473703
- Davis, AC, & Shulman, MJ. (1989). IgM -molecular requirement for its assembly and function. *Imunology Today*, *10*, 118-128.
- Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., . . . Screaton, G. (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*, *328*(5979), 745-748. doi: 10.1126/science.1185181
- Diamond, M. S., Roberts, T. G., Edgil, D., Lu, B., Ernst, J., & Harris, E. (2000). Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol*, *74*(11), 4957-4966.
- Dong, T., Moran, E., Vinh Chau, N., Simmons, C., Luhn, K., Peng, Y., . . . Rowland-Jones, S. (2007). High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. *PLoS One*, *2*(12), e1192. doi: 10.1371/journal.pone.0001192
- Egloff, M. P., Decroly, E., Malet, H., Selisko, B., Benarroch, D., Ferron, F., & Canard, B. (2007). Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5. *J Mol Biol*, *372*(3), 723-736. doi: 10.1016/j.jmb.2007.07.005
- Fagbami, A. H. (1979). Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J Hyg (Lond)*, *83*(2), 213-219.
- Fang, S., Wu, Y., Wu, N., Zhang, J., & An, J. (2013). Recent Advances in DENV Receptors. *ScientificWorldJournal*, *2013*, 684690. doi: 10.1155/2013/684690
- FitzSimmons, J., & Shah, S. (2016). Zika Virus. *N Engl J Med*, *375*(3), 293-294.
- Garcia, G., Sierra, B., Perez, A. B., Aguirre, E., Rosado, I., Gonzalez, N., . . . Guzman, M. G. (2010). Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FcgammaRIIIa polymorphism. *Am J Trop Med Hyg*, *82*(6), 1153-1156. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0353
- George, J., Valiant, W. G., Mattapallil, M. J., Walker, M., Huang, Y. S., Vanlandingham, D. L., . . . Mattapallil, J. J. (2017). Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques. *Sci Rep*, *7*(1), 10498. doi: 10.1038/s41598-017-10901-1
- Gil, L., Lopez, C., Blanco, A., Lazo, L., Martin, J., Valdes, I., . . . Hermida, L. (2009). The cellular immune response plays an important role in protecting against dengue virus in the mouse encephalitis model. *Viral Immunol*, *22*(1), 23-30. doi: 10.1089/vim.2008.0063
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., . . . Garcia-Sastre, A. (2016). Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe*, *19*(6), 882-890. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.009
- Green, S., Kurane, I., Edelman, R., Tacket, C. O., Eckels, K. H., Vaughn, D. W., . . . Ennis, F. A. (1993). Dengue virus-specific human CD4+ T-lymphocyte responses in a recipient of an experimental live-attenuated dengue virus type 1 vaccine: bulk culture proliferation, clonal analysis, and precursor frequency determination. *J Virol*, *67*(10), 5962-5967.
- Grifoni, A., Pham, J., Sidney, J., O'Rourke, P. H., Paul, S., Peters, B., . . . Sette, A. (2017). Prior Dengue virus exposure shapes T cell immunity to Zika virus in humans. *J Virol*. doi: 10.1128/jvi.01469-17

- Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*, 11(3), 480-496.
- Guirakhoo, F., Arroyo, J., Pugachev, K. V., Miller, C., Zhang, Z. X., Weltzin, R., . . . Monath, T. P. (2001). Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol*, 75(16), 7290-7304. doi: 10.1128/JVI.75.16.7290-7304.2001
- Guirakhoo, F., Pugachev, K., Arroyo, J., Miller, C., Zhang, Z. X., Weltzin, R., . . . Monath, T. P. (2002). Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. *Virology*, 298(1), 146-159. doi: 10.1006/viro.2002.1462
- Gupta, A. K., Kaur, K., Rajput, A., Dhanda, S. K., Sehgal, M., Khan, M. S., . . . Kumar, M. (2016). ZikaVR: An Integrated Zika Virus Resource for Genomics, Proteomics, Phylogenetic and Therapeutic Analysis. *Sci Rep*, 6, 32713. doi: 10.1038/srep32713
- Guy, B., Nougarede, N., Begue, S., Sanchez, V., Souag, N., Carre, M., . . . Forrat, R. (2008). Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. *Vaccine*, 26(45), 5712-5721. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.08.019
- Guzman, M. G., Alvarez, M., & Halstead, S. B. (2013). Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*, 158(7), 1445-1459. doi: 10.1007/s00705-013-1645-3
- Guzman, M. G., Garcia, G., & Kouri, G. (2006). [Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities]. *Rev Panam Salud Publica*, 19(3), 204-215.
- Guzman, M. G., & Kouri, G. (2009). Dengue in Cuba: research strategy to support dengue control. *Lancet*, 374(9702), 1660-1661. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61975-9
- Guzman, M. G., Kouri, G., Valdes, L., Bravo, J., Alvarez, M., Vazques, S., . . . Halstead, S. B. (2000). Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol*, 152(9), 793-799; discussion 804.
- Guzman, M. G., Mune, M., & Kouri, G. (2004). Dengue vaccine: priorities and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2(6), 895-911.
- Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., . . . Weaver, S. C. (2012). Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(2), e1477. doi: 10.1371/journal.pntd.0001477
- Halstead, S. B. (1974). Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg*, 23(5), 974-982.
- Halstead, S. B. (2003). Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res*, 60, 421-467.
- Halstead, S. B. (2007). Interview with Scott B. Halstead, M.D. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 7(1), 99-105. doi: 10.1089/vbz.2007.9998
- Halstead, S. B., Udomsakdi, S., Scanlon, J. E., & Rohitayodhin, S. (1969). Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. V. Epidemiologic observations outside Bangkok. *Am J Trop Med Hyg*, 18(6), 1022-1033.
- Halstead, S. B., Udomsakdi, S., Simasthien, P., Singharaj, P., Sukhavachana, P., & Nisalak, A. (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses. *Yale J Biol Med*, 42(5), 261-275.

- Halstead, S. B., Udomsakdi, S., Singharaj, P., & Nisalak, A. (1969). Dengue chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. 3. Clinical, epidemiologic, and virologic observations on disease in non-indigenous white persons. *Am J Trop Med Hyg*, *18*(6), 984-996.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., . . . Misse, D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*, *89*(17), 8880-8896. doi: 10.1128/jvi.00354-15
- Hamel, R., Liegeois, F., Wichit, S., Pompon, J., Diop, F., Talignani, L., . . . Misse, D. (2016). Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microbes Infect*, *18*(7-8), 441-449. doi: 10.1016/j.micinf.2016.03.009
- Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2012). Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*, *30*(29), 4301-4306. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.114
- Holmes, E. C., & Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*, *3*(1), 19-28.
- Hombach, J., Barrett, A. D., Cardosa, M. J., Deubel, V., Guzman, M., Kurane, I., . . . Kieny, M. P. (2005). Review on flavivirus vaccine development. Proceedings of a meeting jointly organised by the World Health Organization and the Thai Ministry of Public Health, 26-27 April 2004, Bangkok, Thailand. *Vaccine*, *23*(21), 2689-2695.
- Huang, C. Y., Butrapet, S., Pierro, D. J., Chang, G. J., Hunt, A. R., Bhamarapavati, N., . . . Kinney, R. M. (2000). Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine. *J Virol*, *74*(7), 3020-3028.
- Huang, K. J., Li, S. Y., Chen, S. C., Liu, H. S., Lin, Y. S., Yeh, T. M., . . . Lei, H. Y. (2000). Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol*, *81*(Pt 9), 2177-2182.
- Iglesias, N. G., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2011). The F1 motif of dengue virus polymerase NS5 is involved in promoter-dependent RNA synthesis. *J Virol*, *85*(12), 5745-5756. doi: 10.1128/JVI.02343-10
- Imrie, A., Meeks, J., Gurary, A., Sukhbaatar, M., Truong, T. T., Cropp, C. B., & Effler, P. (2007). Antibody to dengue 1 detected more than 60 years after infection. *Viral Immunol*, *20*(4), 672-675. doi: 10.1089/vim.2007.0050
- Imrie, A., Meeks, J., Gurary, A., Sukhbataar, M., Kitsutani, P., Effler, P., & Zhao, Z. (2007). Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. *J Virol*, *81*(18), 10081-10091. doi: 10.1128/JVI.00330-07
- Jain, A., & Chaturvedi, U. C. (2010). Dengue in infants: an overview. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *59*(2), 119-130. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00670.x
- Jefferis, R., & Kumararatne, D.S. (1990). Selective IgG subclass deficiency. *Clinical and Experimental Immunology*, *81*, 357-367.
- Jegerlehner, A., Maurer, P., Bessa, J., Hinton, H. J., Kopf, M., & Bachmann, M. F. (2007). TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. *J Immunol*, *178*(4), 2415-2420.
- Jennings, L. C., & Mackenzie, J. S. (2016). Zika virus threat. *N Z Med J*, *129*(1432), 10-15.
- Jurado, K. A., Yockey, L. J., Wong, P. W., Lee, S., Huttner, A. J., & Iwasaki, A. (2017). Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice. *Nat Microbiol*. doi: 10.1038/s41564-017-0060-z
- Kliks, S. C., Nisalak, A., Brandt, W. E., Wahl, L., & Burke, D. S. (1989). Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, *40*(4), 444-451.

- Kouri, G. P., Guzman, M. G., & Bravo, J. R. (1987). Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81(5), 821-823.
- Kouri, G. P., Guzman, M. G., Bravo, J. R., & Triana, C. (1989). Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ*, 67(4), 375-380.
- Krishna Murthy, H. M., Judge, K., DeLucas, L., Clum, S., & Padmanabhan, R. (1999). Crystallization, characterization and measurement of MAD data on crystals of dengue virus NS3 serine protease complexed with mung-bean Bowman-Birk inhibitor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55(Pt 7), 1370-1372.
- Kuberski, T. T., & Rosen, L. (1977). Identification of dengue viruses using complement fixing antigen produced in mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, 26(3), 538-543.
- Lai, L., Roupheal, N., Xu, Y., Natrajan, M. S., Beck, A., Hart, M., . . . Mulligan, M. J. (2017). Innate, T and B Cell Responses in Acute Human Zika Patients. *Clin Infect Dis*. doi: 10.1093/cid/cix732
- Lanciotti, R. S., Gubler, D. J., & Trent, D. W. (1997). Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*, 78 (Pt 9), 2279-2284.
- Laoprasopwattana, K., Libraty, D. H., Endy, T. P., Nisalak, A., Chunsuttiwat, S., Ennis, F. A., . . . Green, S. (2007). Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. *J Infect Dis*, 195(8), 1108-1116. doi: 10.1086/512860
- Lee, M., Etebari, K., Hall-Mendelin, S., van den Hurk, A. F., Hobson-Peters, J., Vatipally, S., . . . Asgari, S. (2017). Understanding the role of microRNAs in the interaction of *Aedes aegypti* mosquitoes with an insect-specific flavivirus. *J Gen Virol*, 98(7), 1892-1903. doi: 10.1099/jgv.0.000832
- Leguia, M., Cruz, C. D., Felices, V., Torre, A., Troncos, G., Espejo, V., . . . Mores, C. (2017). Full-genome amplification and sequencing of Zika viruses using a targeted amplification approach. *J Virol Methods*, 248, 77-82. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.06.005
- Leitmeyer, K. C., Vaughn, D. W., Watts, D. M., Salas, R., Villalobos, I., de Chacon, . . . Rico-Hesse, R. (1999). Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*, 73(6), 4738-4747.
- Lima, N. S., Rolland, M., Modjarrad, K., & Trautmann, L. (2017). T Cell Immunity and Zika Virus Vaccine Development. *Trends Immunol*, 38(8), 594-605. doi: 10.1016/j.it.2017.05.004
- Lin, B., Cotton, R. G., Trent, D. W., & Wright, P. J. (1992). Geographical clusters of dengue virus type 2 isolates based on analysis of infected cell RNA by the chemical cleavage at mismatch method. *J Virol Methods*, 40(2), 205-218.
- Lin, Y. L., Liao, C. L., Chen, L. K., Yeh, C. T., Liu, C. I., Ma, S. H., . . . King, C. C. (1998). Study of Dengue virus infection in SCID mice engrafted with human K562 cells. *J Virol*, 72(12), 9729-9737.
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (1999). Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol*, 73(6), 4611-4621.
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2001). *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In D. M. Knippe & P.M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (Vol. 1, pp. 991-1042). London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lozach, P. Y., Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sanchez, E., Harriague, J., Virelizier, J. L., . . . Amara, A. (2005). Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem*, 280(25), 23698-23708. doi: 10.1074/jbc.M504337200
- Mangada, M. M., & Rothman, A. L. (2005). Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J Immunol*, 175(4), 2676-2683.

- Martinez, E. (2008). Dengue. *Estudios Avancados*, 22(64), 33-52.
- Mas, P. (1978). Dengue fever in Cuba in 1977. *PAHO*, 375, 40-43.
- Mazumder, R., Hu, Z. Z., Vinayaka, C. R., Sagripanti, J. L., Frost, S. D., Kosakovsky Pond, S. L., & Wu, C. H. (2007). Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. *Virus Genes*, 35(2), 175-186. doi: 10.1007/s11262-007-0103-2
- McBride, W. J., & Bielefeldt-Ohmann, H. (2000). Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect*, 2(9), 1041-1050.
- Medin, C. L., Fitzgerald, K. A., & Rothman, A. L. (2005). Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol*, 79(17), 11053-11061. doi: 10.1128/JVI.79.17.11053-11061.2005
- Miller, N. (2010). Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr Opin Mol Ther*, 12(1), 31-38.
- Monath, T. P. (1997). Early indicators in acute dengue infection. *Lancet*, 350(9093), 1719-1720. doi: 10.1016/S0140-6736(05)63567-2
- Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X. N., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., . . . Screaton, G. (2003). Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*, 9(7), 921-927. doi: 10.1038/nm887
- Morens, D. M., & Halstead, S. B. (1990). Measurement of antibody-dependent infection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. *J Gen Virol*, 71 (Pt 12), 2909-2914.
- Muller, D. A., & Young, P. R. (2013). The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res*, 98(2), 192-208. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.008
- Murphy, B. R., & Whitehead, S. S. (2011). Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol*, 29, 587-619. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101315
- Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., . . . Brout, J. (2014). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill*, 19(14).
- Okuno, Y., Fukunaga, T., Tadano, M., Fukai, K., Ikeda, T., Sekii, K., & Ariyoshi, H. (1983). Serological studies on volunteers inoculated experimentally with a dengue virus strain in 1943. *Biken J*, 26(4), 161-163.
- Osatomi, K., & Sumiyoshi, H. (1990). Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology*, 176(2), 643-647.
- Pacsa, A. S., Agarwal, R., Elbishbishi, E. A., Chaturvedi, U. C., Nagar, R., & Mustafa, A. S. (2000). Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 28(2), 151-155.
- Paes, M. V., Pinhao, A. T., Barreto, D. F., Costa, S. M., Oliveira, M. P., Nogueira, A. C., . . . Barth, O. M. (2005). Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology*, 338(2), 236-246. doi: 10.1016/j.virol.2005.04.042
- PAHO/WHO. (2016). Zika - Epidemiological Report Cuba. Washington, D.C.
- Pantoja, P., Perez-Guzman, E. X., Rodriguez, I. V., White, L. J., Gonzalez, O., Serrano, C., . . . Sariol, C. A. (2017). Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. *Nat Commun*, 8, 15674. doi: 10.1038/ncomms15674

- Pardi, N., Hogan, M. J., Pelc, R. S., Muramatsu, H., Andersen, H., DeMaso, C. R., . . . Weissman, D. (2017). Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, *543*(7644), 248-251. doi: 10.1038/nature21428
- Pardy, R. D., Rajah, M. M., Condotta, S. A., Taylor, N. G., Sagan, S. M., & Richer, M. J. (2017). Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. *PLoS Pathog*, *13*(2), e1006184. doi: 10.1371/journal.ppat.1006184
- Pelaez, O., Guzmán, M. G., Kourí, G., Pérez, R., Martín, J. L. S., Vázquez, S., . . . Prado, I. (2004). Dengue 3 epidemic in Havana, 2001. *Emerg Infect Dis*, *10*(4), 219-222.
- Perez, A. B., Sierra, B., Garcia, G., Aguirre, E., Babel, N., Alvarez, M., . . . Guzman, M. G. (2010). Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol*, *71*(11), 1135-1140. doi: 10.1016/j.humimm.2010.08.004
- Plevka, P., Battisti, A. J., Junjhon, J., Winkler, D. C., Holdaway, H. A., Keelapang, P., . . . Rossmann, M. G. (2011). Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. *EMBO Rep*, *12*(6), 602-606. doi: 10.1038/embor.2011.75
- Priyamvada, L., Quicke, K. M., Hudson, W. H., Onlamoon, N., Sewatanon, J., Edupuganti, S., . . . Wrammert, J. (2016). Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(28), 7852-7857. doi: 10.1073/pnas.1607931113
- Puschnik, A., Lau, L., Cromwell, E. A., Balmaseda, A., Zompi, S., & Harris, E. (2013). Correlation between Dengue-Specific Neutralizing Antibodies and Serum Avidity in Primary and Secondary Dengue Virus 3 Natural Infections in Humans. *PLoS Negl Trop Dis*, *7*(6), e2274. doi: 10.1371/journal.pntd.0002274
- Ramanathan, B., Poh, C. L., Kirk, K., McBride, W. J., Aaskov, J., & Grollo, L. (2016). Synthetic B-Cell Epitopes Eliciting Cross-Neutralizing Antibodies: Strategies for Future Dengue Vaccine. *PLoS One*, *11*(5), e0155900. doi: 10.1371/journal.pone.0155900
- Rojas, W.M. . (2015.). *Inmunología de Rojas 17 edición*
- Rosen, L. (1977). The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, *26*(3), 337-343.
- Rothman, A. L. (2009). T lymphocyte responses to heterologous secondary dengue virus infections. *Ann N Y Acad Sci*, *1171 Suppl 1*, E36-41. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05055.x
- Rothman, A. L. (2010). Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, *338*, 83-98. doi: 10.1007/978-3-642-02215-9_7
- Rothman, A. L., & Ennis, F. A. (1999). Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology*, *257*(1), 1-6. doi: 10.1006/viro.1999.9656
- Rubin, E. J., Greene, M. F., & Baden, L. R. (2016). Zika Virus and Microcephaly. *N Engl J Med*, *374*(10), 984-985. doi: 10.1056/NEJMe1601862
- Sampath, A., & Padmanabhan, R. (2009). Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res*, *81*(1), 6-15. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.08.004
- Screaton, G., & Mongkolsapaya, J. (2006). T cell responses and dengue haemorrhagic fever. *Novartis Found Symp*, *277*, 164-171; discussion 171-166, 251-163.
- Schlesinger, R. W. (1977). Dengue viruses. *Virol Monogr*(16), 1-132.
- Sierra, B., Perez, A. B., Vogt, K., Garcia, G., Schmolke, K., Aguirre, E., . . . Guzman, M. G. (2010). Secondary heterologous dengue infection risk: Disequilibrium between immune regulation and inflammation? *Cell Immunol*, *262*(2), 134-140. doi: 10.1016/j.cellimm.2010.02.005

- Smith, D. W., & Mackenzie, J. (2016). Zika virus and Guillain-Barre syndrome: another viral cause to add to the list. *Lancet*, *387*(10027), 1486-1488. doi: 10.1016/s0140-6736(16)00564-x
- Soundravally, R., Hoti, S. L., Patil, S. A., Cleetus, C. C., Zachariah, B., Kadiravan, T., . . . Kumar, B. A. (2014). Association between proinflammatory cytokines and lipid peroxidation in patients with severe dengue disease around defervescence. *Int J Infect Dis*, *18*, 68-72. doi: 10.1016/j.ijid.2013.09.022
- Souza, D. G., Fagundes, C. T., Sousa, L. P., Amaral, F. A., Souza, R. S., Souza, A. L., . . . Teixeira, M. M. (2009). Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(33), 14138-14143. doi: 10.1073/pnas.0906467106
- Swanstrom, J. A., Plante, J. A., Plante, K. S., Young, E. F., McGowan, E., Gallichotte, E. N., . . . Baric, R. S. (2016). Dengue Virus Envelope Dimer Epitope Monoclonal Antibodies Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus. *MBio*, *7*(4). doi: 10.1128/mBio.01123-16
- Tang, W. W., Young, M. P., Mamidi, A., Regla-Nava, J. A., Kim, K., & Shresta, S. (2016). A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication. *Cell Rep*, *17*(12), 3091-3098. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.070
- Tappe, D., Perez-Giron, J. V., Zammarchi, L., Rissland, J., Ferreira, D. F., Jaenisch, T., . . . Schmidt-Chanasit, J. (2016). Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol*, *205*(3), 269-273. doi: 10.1007/s00430-015-0445-7
- Terzian, A. C. B., Schanoski, A. S., Mota, M. T. O., da Silva, R. A., Estofolete, C. F., Colombo, T. E., . . . Nogueira, M. L. (2017). Viral Load and Cytokine Response Profile Does Not Support Antibody-Dependent Enhancement in Dengue-Primed Zika Virus-Infected Patients. *Clin Infect Dis*, *65*(8), 1260-1265. doi: 10.1093/cid/cix558
- Tsunoda, I., Omura, S., Sato, F., Kusunoki, S., Fujita, M., Park, A.M., Hasanovic, F., Yanagihara, R., Nagata, S. (2016). Neuropathogenesis of Zika Virus Infection : Potential Roles of Antibody-Mediated Pathology. *Acta Med Kinki Univ*, *41*(2), 37-52.
- Ubol, S., & Halstead, S. B. (2010). How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. *Clin Vaccine Immunol*, *17*(12), 1829-1835. doi: 10.1128/CI.00316-10
- Valdes, L., Guzman, M. G., Kouri, G., Delgado, J., Carbonell, I., Cabrera, M. V., . . . Vazquez, S. (1999a). [Epidemiology of dengue and hemorrhagic dengue in Santiago, Cuba 1997]. *Rev Panam Salud Publica*, *6*(1), 16-25.
- Valdes, L., Guzman, M. G., Kouri, G., Delgado, J., Carbonell, I., Cabrera, M. V., . . . Vazquez, S. (1999b). La epidemiología del dengue y del dengue hemorrágico en Santiago de Cuba, 1997. [Epidemiology of dengue and hemorrhagic dengue in Santiago, Cuba 1997]. *Rev Panam Salud Publica*, *6*(1), 16-25.
- van der Most, R. G., Murali-Krishna, K., & Ahmed, R. (2003). Prolonged presence of effector-memory CD8 T cells in the central nervous system after dengue virus encephalitis. *Int Immunol*, *15*(1), 119-125.
- van Der Most, R. G., Murali-Krishna, K., Ahmed, R., & Strauss, J. H. (2000). Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J Virol*, *74*(17), 8094-8101.
- Vaughn, D. W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., . . . Nisalak, A. (2000). Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*, *181*(1), 2-9. doi: 10.1086/315215

- Vazquez, S., Bravo, J. R., Perez, A. B., & Guzman, M. G. (1997). [Inhibition ELISA. Its utility for classifying a case of dengue]. *Rev Cubana Med Trop*, 49(2), 108-112.
- Vazquez, S., Guzman, M. G., Guillen, G., Chinae, G., Perez, A. B., Pupo, M., . . . Alvarez, M. (2002). Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine*, 20(13-14), 1823-1830.
- Wang, S., He, R., & Anderson, R. (1999). PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J Virol*, 73(3), 2547-2551.
- Wen, J., Elong Ngono, A., Angel Regla-Nava, J., Kim, K., Gorman, M. J., Diamond, M. S., & Shresta, S. (2017). Dengue virus-reactive CD8(+) T cells mediate cross-protection against subsequent Zika virus challenge. *Nat Commun*, 8(1), 1459. doi: 10.1038/s41467-017-01669-z
- Wen, J., & Shresta, S. (2017a). ADE-ing and Abetting Zika. *Cell Host Microbe*, 21(5), 557-558. doi: 10.1016/j.chom.2017.04.006
- Wen, J., & Shresta, S. (2017b). T Cell Immunity to Zika and Dengue Viral Infections. *J Interferon Cytokine Res*, 37(11), 475-479. doi: 10.1089/jir.2017.0106
- Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., & Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*, 5(7), 518-528. doi: 10.1038/nrmicro1690
- WHO. (1997). Dengue Hemorrhagic Fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. *Geneva*, 1-84.
- WHO. (2010). Clinical Dengue Clasification. *WHO Dengue Guideline*.
- Williams, K. L., Zompi, S., Beatty, P. R., & Harris, E. (2009). A mouse model for studying dengue virus pathogenesis and immune response. *Ann N Y Acad Sci*, 1171 Suppl 1, E12-23. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05057.x
- Wu, C. F., Wang, S. H., Sun, C. M., Hu, S. T., & Syu, W. J. (2003). Activation of dengue protease autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *J Virol Methods*, 114(1), 45-54.
- Wu, S. F., Liao, C. L., Lin, Y. L., Yeh, C. T., Chen, L. K., Huang, Y. F., . . . Sytwu, H. K. (2003). Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine*, 21(25-26), 3919-3929.
- Xiang, J., McLinden, J. H., Rydze, R. A., Chang, Q., Kaufman, T. M., Klinzman, D., & Stapleton, J. T. (2009). Viruses within the Flaviviridae decrease CD4 expression and inhibit HIV replication in human CD4+ cells. *J Immunol*, 183(12), 7860-7869. doi: 10.4049/jimmunol.0902276
- Xu, M., Hadinoto, V., Appanna, R., Joensson, K., Toh, Y. X., Balakrishnan, T., . . . Fink, K. (2012). Plasmablasts generated during repeated dengue infection are virus glycoprotein-specific and bind to multiple virus serotypes. *J Immunol*, 189(12), 5877-5885. doi: 10.4049/jimmunol.1201688
- Yamshchikov, V. F., & Compans, R. W. (1994). Generation of long flavivirus expression cassettes by in vivo recombination and transient dominant selection. *Gene*, 149(2), 193-201.
- Yang, M., Dent, M., Lai, H., Sun, H., & Chen, Q. (2017). Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus. *Vaccine*, 35(33), 4287-4294. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.04.052
- Yang, PY, Kautner, I, Koh, C.L, & Lam, SK. (1994). Nucleotide and deduced amino acid sequences of genes encoding the structural and nonstructural NS1 proteins of a dengue-2 virus isolated in China. *Virus Genes*, 8(1), 71-74.
- Yauch, L. E., Zellweger, R. M., Kotturi, M. F., Qutubuddin, A., Sidney, J., Peters, B., . . . Shresta, S. (2009). A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol*, 182(8), 4865-4873. doi: 10.4049/jimmunol.0801974

- Yen, Y. T., Chen, H. C., Lin, Y. D., Shieh, C. C., & Wu-Hsieh, B. A. (2008). Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol*, *82*(24), 12312-12324. doi: 10.1128/JVI.00968-08
- Zhang, Q., Sun, K., Chinazzi, M., Pastore, Y. Piontti A., Dean, N. E., Rojas, D. P., . . . Vespignani, A. (2017). Spread of Zika virus in the Americas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(22), E4334-E4343. doi: 10.1073/pnas.1620161114
- Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal models of dengue virus infection. *Viruses*, *4*(1), 62-82. doi: 10.3390/v4010062
- Zompi, S., Montoya, M., Pohl, M. O., Balmaseda, A., & Harris, E. (2012). Dominant cross-reactive B cell response during secondary acute dengue virus infection in humans. *PLoS Negl Trop Dis*, *6*(3), e1568. doi: 10.1371/journal.pntd.0001568
- Zulueta, A., Martin, J., Hermida, L., Alvarez, M., Valdes, I., Prado, I., . . . Guzman, M. G. (2006). Amino acid changes in the recombinant Dengue 3 Envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. *Virus Res*, *121*(1), 65-73. doi: 10.1016/j.virusres.2006.04.003