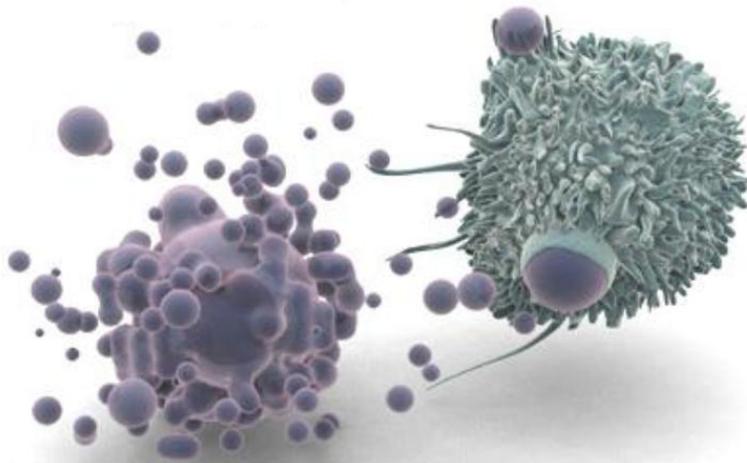


LABORATORIO DE PRODUCCIÓN  
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA  
CENTRO COLABORADOR DE LA OPS/OMS PARA EL ESTUDIO DEL DENGUE Y SU VECTOR  
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ" (IPK)

***MARCADORES DE APOPTOSIS EN PLASMA Y TEJIDOS:  
PROBABLES IMPLICACIONES EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL DENGUE***

---



Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas  
**Autor: Dr. DANIEL DE JESÚS LIMONTA VELÁZQUEZ, MSc.**



La Habana 2013

LABORATORIO DE PRODUCCIÓN  
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA  
CENTRO COLABORADOR DE LA OPS/OMS PARA EL ESTUDIO DEL DENGUE Y SU VECTOR  
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ" (IPK)

***MARCADORES DE APOPTOSIS EN PLASMA Y TEJIDOS:  
PROBABLES IMPLICACIONES EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL DENGUE***

---

Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas

**Autor: Dr. DANIEL DE JESÚS LIMONTA VELÁZQUEZ, MSc.**

**Tutores: Prof. María Guadalupe Guzmán Tirado, DrCs.**

**Prof. Virginia Capó de Paz, DrC.**

**Asesora: Prof. Ana Beatriz Pérez Díaz, DrC.**

*Existen dos tipos de investigación: la investigación aplicada y la investigación todavía  
no aplicada*

Premio Nobel Lord George Porter (1920-2002)  
Ex-presidente de la *Royal Society*

## **AGRADECIMIENTOS**

Se hace imposible mencionar a todas las personas, profesionales, amigos o familiares, que pienso contribuyeron a que llegara este gran momento. Considero que debo agradecer desde a mis primeros profesores de la carrera de Medicina hasta las últimas personas que estuvieron involucradas directa o indirectamente en la realización y revisión de este trabajo de tesis de Doctor en Ciencias Médicas en tan prestigiosa institución como el IPK. A todos ellos muchísimas gracias.

*A la meua filla Ona*

## *Listado de Abreviaturas*

**AcM:** anticuerpos **m**onoclonales

**AcP:** anticuerpos **p**oliclonales

**ADE:** inmuno-amplificación dependiente de anticuerpos del inglés *antibody-dependent enhancement*

**ADN:** ácido **d**esoxirribonucleico

**Arbovirus:** enfermedades transmitidas por artrópodos del inglés *arthropode-borne viruses*

**ARN:** ácido **r**ibonucleico

**ALAT:** alanina **a**minotransferasa

**ASAT:** aspartato **a**minotransferasa

**BSA:** albumina de suero bovino del inglés *bovine serum albumin*

**Caspasas:** del inglés *cysteiny-aspate-cleaving proteases*

**CE:** células **e**ndoteliales

**CIGB:** Centro de **I**ngeniería **G**enética y **B**iotecnología

**CMSP:** células **m**ononucleares de **s**angre **p**eriférica

**DCSA:** dengue con signos de **a**larma

**DG:** dengue **g**rave

**DM:** diabetes **m**ellitus

**DSSA:** dengue sin signos de **a**larma

**ELISA:** ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida del inglés *enzyme linked immunosorbent assay*

**FasL:** ligando de Fas del inglés *Fas ligand*

**FFIP:** fijados en formalina e incluidos en **p**arafina

**FD/FHD/SCD:** fiebre **d**engue/fiebre **h**emorrágica del **d**engue/síndrome de **c**hoque por dengue

**HLA:** antígenos leucocitarios humanos del inglés *human leukocyte antigen*

**IHQ:** inmunohistoquímica

**IFN:** interferon/es

**IPK:** Instituto de Medicina Tropical “**P**edro **K**ourí”

**MAC-ELISA:** del inglés *IgM antibody capture ELISA*

**MCP-1:** proteína quimo-atrayente de monocitos 1 del inglés *monocyte chemoattractant protein-1*

**MEI:** método de **ELISA** de inhibición

**MET:** microscopía electrónica de transmisión

**NS:** proteínas no estructurales del inglés *non structural*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PBS:** solución tampón salina fosfatada del inglés *phosphate buffer saline*

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa del inglés *reverse transcription-polymerase chain reaction*

**TNF:** factor de necrosis tumoral del inglés *tumor necrosis factor*

**TRAIL:** ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF del inglés *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

**TUNEL:** marcaje por dUTP de extremos finales cortados mediado por Transferasa deoxinucleotídica Terminal del inglés *Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick-end labeling*

**VDEN:** virus dengue

**VEGF:** factor de crecimiento de células endoteliales vasculares del inglés *vascular endothelial cell growth factor*

## **SÍNTESIS**

En la compleja fisiopatología del dengue se ha sugerido la participación de la apoptosis. En este trabajo se correlacionó la concentración plasmática de cuatro proteínas apoptóticas con el recuento de las células sanguíneas de pacientes brasileños con dengue y además se detectó apoptosis en tejidos de fallecidos cubanos por dengue. Se cuantificaron tres proteínas proapoptóticas (TNF- $\alpha$ , FasL, TRAIL) y una antiapoptótica (Survivin) en pacientes brasileños con dengue. La concentración en el plasma de las proteínas apoptóticas estudiadas no se asoció en todos los pacientes con la nueva clasificación clínica de dengue de la Organización Mundial de la Salud. Sin embargo, se encontró una disminución del TRAIL en los pacientes con dengue grave. La correlación de la concentración de proteínas apoptóticas con el recuento de células sanguíneas de los pacientes sugiere que el TRAIL induce apoptosis de linfocitos y que en cambio el Survivin brinda protección contra la apoptosis de leucocitos. El aumento del TRAIL se correlacionó con el aumento del número de plaquetas. Hasta donde conocemos, no se habían correlacionado anteriormente el TRAIL y el Survivin con el recuento de células sanguíneas de pacientes con dengue. Por otro lado, se detectaron células apoptóticas mediante el marcado de ADN nuclear fragmentado o microscopía electrónica en cortes de tejidos de siete casos cubanos fatales por dengue. Este es el estudio que por primera vez demuestra apoptosis en células endoteliales de la micro-vasculatura y en células cerebrales de fallecidos por dengue. Los resultados obtenidos sugieren que la apoptosis está implicada en la fisiopatología del dengue.

## ÍNDICE

<b>I- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
<b>I.2 Hipótesis .....</b>	<b>3</b>
<b>I.3 Objetivos .....</b>	<b>4</b>
<b>I.4. Novedad científica.....</b>	<b>4</b>
<b>I.5 Valor teórico y práctico.....</b>	<b>5</b>
<b>I.6 Publicaciones científicas con resultados de la tesis como primer autor.....</b>	<b>5</b>
<b>I.7 Presentaciones en eventos científicos internacionales de resultados de la tesis como primer autor .....</b>	<b>6</b>
<b>I.8 Tesis anteriores del autor que contienen parte de los resultados de la tesis .....</b>	<b>7</b>
<b>I.9 Premios científicos con resultados de la tesis como primer autor .....</b>	<b>7</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>8</b>
<b>II.1 Virus dengue: clasificación, estructura y replicación .....</b>	<b>8</b>
<b>II. 2 El dengue como un problema de salud mundial.....</b>	<b>9</b>
<b>II.2.1 Epidemias de dengue en Brasil.....</b>	<b>9</b>
<b>II.2.2 Epidemias de dengue en Cuba.....</b>	<b>10</b>
<b>II.3 Fisiopatología del dengue .....</b>	<b>11</b>
<b>II.3.1 Factores del virus.....</b>	<b>12</b>
<b>II.3.2 Factores del hospedero .....</b>	<b>12</b>
<b>II.3.3 Hallazgos patológicos .....</b>	<b>15</b>
<b>II.4 Curso clínico del dengue.....</b>	<b>16</b>
<b>II.4.1 Clasificaciones clínicas de dengue de la OMS.....</b>	<b>18</b>
<b>II.4.2 Clasificación tradicional de dengue del año 1997 .....</b>	<b>18</b>
<b>II.4.3 Clasificación reciente de dengue del año 2009.....</b>	<b>19</b>
<b>II.5 Diagnóstico de dengue en el laboratorio .....</b>	<b>19</b>
<b>II.6 Prevención y tratamiento del dengue.....</b>	<b>22</b>
<b>II.7 Muerte celular programada por apoptosis .....</b>	<b>24</b>
<b>II.7.1 Definición de apoptosis .....</b>	<b>24</b>
<b>II.7.2 Mecanismos de regulación de la apoptosis.....</b>	<b>25</b>
<b>II.7.3 Vías de activación de la apoptosis.....</b>	<b>27</b>
<b>II.8 Apoptosis en la infección por virus dengue.....</b>	<b>28</b>

II.8.1 Apoptosis en la infección in vitro por virus dengue.....	28
II.8.2 Apoptosis en modelos animales con infección por virus dengue.....	30
II.8.3 Apoptosis en pacientes con dengue.....	30
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
III.1 Diseño de estudio .....	32
III.2 Consideraciones éticas .....	32
III.3 Recolección de datos clínico-patológicos y de laboratorio de casos con dengue .....	33
III.4 Clasificaciones de la OMS de pacientes con dengue .....	34
III.5 Obtención de las muestras de plasma de pacientes brasileños con dengue.....	34
III.6 Obtención de las muestras control negativo de plasma .....	35
III.7 Cuantificación de las proteínas plasmáticas apoptóticas en pacientes brasileños con dengue.....	35
III.8 Obtención de los tejidos de casos cubanos fatales por dengue .....	37
III.9 Obtención de los tejidos controles .....	40
III.10 Procesamiento de tejidos controles y de casos cubanos fatales por dengue...41	
III.11 Detección de antígenos virales en los tejidos de casos cubanos fatales por dengue entre los años 1997-2006 .....	42
III.12 Detección de células apoptóticas en los tejidos de casos cubanos fatales por dengue entre los años 1997-2001 .....	43
III.13 Microscopía electrónica de transmisión en los tejidos de un caso cubano fatal por dengue del año 2006.....	44
III.14 Inmuno-microscopía electrónica de transmisión en los tejidos de un caso cubano fatal por dengue del año 2006.....	45
III.15 Fotografías y documentación de imágenes.....	45
III.16 Análisis estadístico .....	46
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
IV.1 Pacientes brasileños con dengue: clasificación clínica y parámetros de laboratorio.....	47
IV.2 Concentraciones plasmáticas de las proteínas apoptóticas en pacientes brasileños con dengue.....	51
IV.3 Correlaciones entre las concentraciones de las proteínas apoptóticas plasmáticas con los recuentos de las células sanguíneas de los pacientes brasileños con dengue	56

<b>IV.4</b> <i>Casos cubanos fatales por dengue: clasificación clínica, parámetros de laboratorio y hallazgos de necropsia</i> .....	59
<b>IV.5</b> <i>Detección de antígenos virales en los tejidos de casos cubanos fatales por dengue entre los años 1997-2006</i> .....	64
<b>IV.6</b> <i>Detección de células apoptóticas en los tejidos de casos cubanos fatales por dengue entre los años 1997-2001</i> .....	67
<b>IV.7</b> <i>Microscopía e inmuno-microscopía electrónica de transmisión en los tejidos de un caso cubano fatal por dengue del año 2006</i> .....	76
<b>IV.8</b> <i>Discusión integrada</i> .....	80
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	85
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	86
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	87
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	116
<b>VIII.1</b> <i>Tablas</i> .....	116

# **I- INTRODUCCIÓN**

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1 Antecedentes**

Actualmente el dengue es considerado la enfermedad viral transmitida a humanos por artrópodos (mosquitos del género *Aedes aegypti*) de mayor importancia mundial en términos de morbilidad y mortalidad. Esta enfermedad se informa en 128 países del Sudeste Asiático, Pacífico Occidental, África, Mediterráneo Oriental y las Américas (1-3). Solo en la región de las Américas, entre los años 2001 al 2007, se informó el dengue en más de 30 países y el país que más informó continuó siendo Brasil con más del 70% de los casos (1, 4, 5).

En este contexto regional tan complejo Cuba ha trabajado durante años para mantener al país libre de transmisión. Para ello cuenta con programas de vigilancia clínico-epidemiológica y de control del vector. No obstante, en Cuba han ocurrido grandes epidemias como en los años 1977 y 1981. En el año 1997 la epidemia se localizó en el municipio de Santiago de Cuba y en el año 2001 en La Habana (6, 7). Después del año 2001 ha ocurrido transmisión de dengue como la epidemia del año 2006 en La Habana (6, 8, 9).

El dengue es causado por cualquiera de los cuatro serotipos del virus dengue (VDEN-1,-2,-3,-4) y puede causar desde una infección benigna, llamada fiebre dengue (FD) hasta la forma más severa conocida como fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) según la clasificación clínica tradicional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (10). Esta clasificación se usa hace más de 30 años, sin embargo, debido a la complejidad de su aplicación la OMS propuso una nueva clasificación en el 2009: dengue sin o con signos de alarma (DSSA y DCSA) y dengue grave (DG) (1).

La fisiopatología multifactorial del dengue no está completamente esclarecida a pesar del incremento de las investigaciones sobre esta enfermedad. Sin embargo, existen estudios que indican la interacción de diferentes factores del virus y del hospedero durante la infección. Entre estos factores se encuentran la inmuno-amplificación dependiente de anticuerpos (11), la activación de células T de memoria (12), el serotipo viral infectante (13), la hiper-producción de citocinas y mediadores solubles proinflamatorios (14, 15), la co-morbilidad (16) y la genética del individuo (17). Dentro de este complejo contexto, existen también evidencias de la participación de la apoptosis en la fisiopatología del dengue (18-20).

La apoptosis es la forma fundamental de muerte celular programada. Este evento celular participa en la homeostasis y está implicado en un gran número de enfermedades (21). Existen dos vías fundamentales de inducción de apoptosis que están estrechamente vinculadas: la vía de los receptores de muerte celular o apoptosis extrínseca y la vía mitocondrial o apoptosis intrínseca. La vía de los receptores de muerte celular se activa cuando alguno de los tres ligandos, miembros de la super-familia del factor de necrosis tumoral o TNF (del inglés *tumor necrosis factor*), se une a alguno de sus receptores sobre las células. Estos tres ligandos son el ligando de Fas (FasL, del inglés *Fas ligand*), TNF- $\alpha$  y el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF o TRAIL (del inglés *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (22).

Las caspasas (del inglés *cysteinyl-aspartate-cleaving proteases*) son proteasas celulares esenciales en el inicio y ejecución de las dos vías de la apoptosis. En la compleja regulación de la apoptosis tiene un papel relevante una familia de inhibidores de apoptosis que precisamente inhiben las caspasas. Uno de los principales miembros de esta familia es el Survivin (23).

Se han realizado estudios *in vitro* que muestran la inducción de apoptosis en diferentes cultivos de células por la replicación del VDEN (24-27). Este fenómeno de apoptosis se ha relacionado a las proteínas estructurales de membrana (28) y de cápside (29) y a las proteínas no estructurales NS2B y NS3 del VDEN (30), a anticuerpos antidengue con reacción autoinmune en pacientes (31-33) y al TNF- $\alpha$  del suero de pacientes con dengue (34). También existen modelos en ratones con infección por VDEN que muestran la inducción de apoptosis por la replicación viral en el sistema nervioso central (35) y en células endoteliales (CE) vasculares de tejidos subcutáneos (36).

Por otra parte, en pacientes con dengue se ha demostrado un incremento de la apoptosis en los linfocitos circulantes (19) y un aumento de la expresión de los genes proapoptóticos en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (37-39). Además, se ha asociado la FHD/SCD con una mayor cantidad de CMSP apoptóticas (20, 40) probablemente debido a niveles elevados en el plasma de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  (40) y del receptor soluble de la proteína proapoptótica Fas (20). El TRAIL se encontró aumentado en el suero de pacientes con dengue cuando se comparó con pacientes febriles sin dengue (41).

Además de los estudios de apoptosis en células infectadas *in vitro* por VDENV y en casos con dengue, se han realizado investigaciones en tejidos de fallecidos por esta enfermedad. Inicialmente esta apoptosis en tejidos de casos con dengue se describió en cortes de hígado en dos estudios por medio de la técnica de marcaje por dUTP de extremos finales cortados mediado por Transferasa deoxinucleotídica Terminal o TUNEL (del inglés *Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick-end labeling*) (42, 43).

A pesar de los múltiples estudios realizados *in vitro*, en animales de experimentación y en casos con dengue, no se comprende totalmente la relación de la apoptosis con la fisiopatología del dengue. En la actualidad no está completamente aclarada cómo la interacción entre las proteínas pro y antiapoptóticas está relacionada con la gravedad del dengue. Además, no se ha estudiado la apoptosis en casos con dengue utilizando la nueva clasificación de dengue de la OMS (1). Por otra parte, no existen evidencias de apoptosis en tejidos no hepáticos de casos con dengue ni tampoco la apoptosis se ha estudiado en tejidos de casos fatales por dengue mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

## **I.2 Hipótesis**

“Las proteínas apoptóticas circulantes y la apoptosis en diferentes tejidos contribuyen a la fisiopatología del dengue”.

### **I.3 Objetivos**

#### **Objetivo General:**

- Determinar la posible implicación de la apoptosis en la fisiopatología de la enfermedad causada por el virus dengue.

#### **Objetivos Específicos:**

- Determinar la concentración plasmática de las proteínas apoptóticas TNF- $\alpha$ , FasL, TRAIL y Survivin en pacientes con dengue no grave y con dengue grave.
- Definir las relaciones entre las concentraciones de las proteínas apoptóticas plasmáticas con los datos clínicos y las células sanguíneas de los pacientes con dengue.
- Determinar la presencia de apoptosis en diferentes tejidos de los casos fatales por dengue.
- Identificar la relación entre la apoptosis en diferentes tejidos con los datos virológicos y clínico-patológicos de los casos fatales por dengue.

### **I.4. Novedad científica**

- Este trabajo constituye el primero en el mundo que evalúa proteínas apoptóticas circulantes en pacientes usando la clasificación clínica reciente de dengue de la OMS.
- Es la primera investigación a nivel internacional que estudia la asociación de las concentraciones en la circulación sanguínea de dos proteínas apoptóticas, FasL y Survivin, con el dengue.
- El presente estudio de apoptosis en tejidos de casos con dengue, el más amplio publicado hasta el momento en la literatura mundial, describe por primera vez las implicaciones de la apoptosis en células cerebrales y en CE de la microvasculatura con el dengue.

### **I.5 Valor teórico y práctico**

- Se presentan las probables implicaciones de cuatro proteínas circulantes relacionadas a la apoptosis y de diferentes células apoptóticas con la fisiopatología del dengue.
- Esta investigación contribuye a evaluar posibles bio-marcadores de la gravedad del dengue cuando aún no se dispone de bio-marcadores circulantes robustos del pronóstico de esta enfermedad.
- El presente trabajo explora las posibles funciones inmuno-reguladoras y antivirales de proteínas circulantes durante el dengue que podrían constituir la base de una futura terapéutica específica para las formas más graves de dicha enfermedad.
- El hallazgo en tejidos humanos específicos de los virus causantes del dengue contribuye al diseño y empleo de drogas antivirales contra el dengue.

### **I.6 Publicaciones científicas con resultados de la tesis como primer autor**

- **Limonta D**, Capó V, Torres G, Pérez AB, Guzmán MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. **J Clin Virol**, 40, 50-4, 2007.
- **Limonta D**, Torres G, Capó V, Guzmán MG. Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient. **Diabetes Vasc Dis Res**, 5, 3, 213-4, 2008.
- **Limonta D**, González D, Capó V, Torres G, Pérez AB, Rosario D, Roche-Rodríguez R, Álvarez M, Guzmán MG. Fatal severe dengue and cell death in sickle cell disease during Havana dengue epidemic. **Int J Inf Dis**, Mar;13(2):e77-8, 2009.
- **Limonta D**, Capó V, Torres G, Guzmán MG, López LX, Pérez AB, González D, Álvarez M, Rosario D, Rodríguez R, Díaz J, Pelegrino JL. New evidence of the contribution of apoptosis to dengue hemorrhagic fever pathophysiology. **Biología Aplicada**, Vol.27, No.1, 2010.

- **Limonta D**, Falcón V, Torres G, Capó V, Menéndez I, Rosario D, Castellanos Y, Álvarez M, Rodríguez-Roche R, de la Rosa MC, Pavón A, López L, González K, Guillén G, Guzmán MG. Dengue virus identification by transmission electron microscopy and molecular methods in fatal dengue hemorrhagic fever. **Infection**, Dec;40(6):689-94, 2012.
- **Limonta D**, Capó V, Guzmán MG. Reply: Apropos "Dengue virus identification by transmission electron microscopy and molecular methods in fatal dengue hemorrhagic fever". **Infection**, Jun;41(3):743-4, 2013.
- **Limonta D**, Torrentes-Carvalho A, Ferreira C, Azeredo EL, de Souza LJ, Motta-Castro ARC, Venâncio da Cunha R, Kubelka CF, Nogueira RMR, de-Oliveira-Pinto LM. Apoptotic mediators in patients with severe and non-severe dengue from Brazil. **J Med Virol** 2013 Oct 29. doi: 10.1002/jmv.23832. [Epub ahead of print].

#### ***I.7 Presentaciones en eventos científicos internacionales de resultados de la tesis como primer autor***

- 6<sup>th</sup> International Cell Death Symposium. Rio de Janeiro, Brazil, 2006.
- III Simposio Internacional de Bioquímica y Biología Molecular. La Habana, Cuba, 2006.
- 13<sup>th</sup> International Congress of Immunology. Rio de Janeiro, Brazil. August, 2007.
- Simposio Internacional de Dengue. La Habana, Cuba, 2007.
- XIII Congreso de la Asociación Latino-Americana de Diabetes. La Habana, Cuba, 2007.
- VIII Congreso Centro-Americano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical. La Habana, Cuba, 2007.
- Simposio Internacional de Hepatología (Hepatología 2008). La Habana, Cuba, 2008.
- First Pan-American Dengue Research Network Meeting. Recife, Brazil, 2008.
- Cytotoxicity, Cell Death & The Immune System Workshop. Zaragoza, Spain, 2008.

- Primer Congreso Internacional de Patología Quirúrgica de la División Cubana de la Academia Internacional de Patología. La Habana, Cuba, 2009.
- VIII Jornada Latinoamericana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional. La Habana, Cuba, 2009.
- Congreso 70 Aniversario del IPK. VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. La Habana, Cuba, 2009.
- Tercera Reunión de la Red Panamericana de Investigación de Dengue. Cartagena de Indias, Colombia, 2012.

### ***I.8 Tesis anteriores del autor que contienen parte de los resultados de la tesis***

- Tesis en opción del Título de Especialista en Primer Grado de Microbiología Médica. IPK, 2007.
- Tesis en opción del Título de Máster en Virología. IPK, 2007.

### ***I.9 Premios científicos con resultados de la tesis como primer autor***

- Resultado Relevante del IPK, 2009.
- Logro de la Academia de Ciencias de Cuba, 2009.
- Mención del Concurso Central del Premio Anual de la Salud de Cuba, 2009.
- Sello Forjadores del Futuro del IPK, 2009.
- Premio al mejor poster en la sesión de Biomedicina del V Simposio Internacional de Bioquímica y Biología Molecular. Hotel Melia Habana, Cuba, 2012.
- Premio de asistencia (travel award) en la 13ra Conferencia de Jóvenes Científicos de la Oficina Regional de Latinoamérica y del Caribe de la Academia de Ciencias del Tercer Mundo o TWAS-ROLAC (de sus siglas en inglés). Academia Brasileña de Ciencias, Rio de Janeiro, Brazil, 2013.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### II.1 *Virus dengue: clasificación, estructura y replicación*

El género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*, agrupa muchos virus que producen enfermedades transmitidas por artrópodos o arbovirosis (del inglés *arthropode borne viruses*). Entre los flavivirus se encuentra el VDEN que está representado por cuatro serotipos (VDEN-1 al 4). Los viriones maduros son partículas esféricas de 40-60 nm de diámetro cubiertas por una bicapa lipídica. La nucleocápside contiene una molécula de ARN de simple cadena, lineal, con orientación positiva y de aproximadamente una longitud de 11 kilobases (44, 45).

La molécula de ARN codifica para una larga poliproteína de más de 3 000 aminoácidos conformada por 10 proteínas virales. Entre estas se encuentran tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside y las dos proteínas de superficie, membrana y envoltura. Además de siete proteínas no estructurales (NS) (del inglés *non structural*) denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 respectivamente (44-46).

Se han descrito diferentes receptores celulares de VDEN a los que se une la proteína de la envoltura viral para realizar la penetración mediante endocitosis. Al inicio ocurre traducción de las cadenas positivas de ARN del virus que actúan también como un ARN mensajero. Luego se cambia a la síntesis de cadenas negativas intermediarias que son empleadas como molde de síntesis *de novo* de moléculas de cadenas positivas de ARN que pueden ser usadas para la traducción de proteínas virales, síntesis de cadenas negativas o ser encapsidadas para la formación de nuevos viriones. La replicación viral parece ocurrir asociada a membranas, probablemente a través de la interacción de regiones hidrofóbicas de las NS, en la región peri-nuclear de la célula (45, 47).

## **II.2 El dengue como un problema de salud mundial**

En la actualidad el dengue es endémico o epidémico en casi todos los países tropicales del sudeste asiático, África, Pacífico occidental, América y mediterráneo occidental. Se estima que cada año ocurren de 50 a 100 millones de infecciones, 500 000 casos de FHD/SCD que se hospitalizan y más de 20 000 muertes. Es así que se considera al dengue como la arbovirosis que más enfermedad y muerte causa y por tanto la más importante en el humano (48-50).

Sin embargo, debido a dificultad en el diagnóstico y falta de datos confiables es difícil conocer con exactitud la distribución real del dengue a nivel global. Por estas razones se realiza en la actualidad un mapa basado en evidencias de la distribución de dengue. Recientemente autores de ese trabajo informaron evidencias de dengue en 128 países, 36 países más de lo reportado anteriormente, lo que produjo un estimado preliminar de 3,97 mil millones de personas en riesgo de contraer el dengue a nivel mundial (3). Es decir, un poco más de la mitad de la población mundial (51).

En las Américas la interrupción de la transmisión de dengue durante los años sesenta e inicio de los setenta constituyó un resultado de la campaña de erradicación del *Aedes aegypti* en la región. Sin embargo, la vigilancia del vector y las medidas de control no se continuaron y ocurrió la reinfestación. Como consecuencia ocurrieron epidemias de dengue en el Caribe, América Central y América del Sur (52). Actualmente, los cuatro serotipos del VDEN circulan en la región y los casos de dengue aumentaron en las últimas tres décadas (1).

### **II.2.1 Epidemias de dengue en Brasil**

En Río de Janeiro se describieron epidemias de dengue en los años 1846, 1847, 1848 y 1886. Más tarde en el año 1904, el profesor brasileño Oswaldo Cruz inició una campaña que permitió la erradicación del mosquito *Aedes aegypti* en todo Brasil en el año 1955. Sin embargo, ocurre la reintroducción de este mosquito en la década del 70 que permite en el año 1981 la primera epidemia de cerca de 11 000 personas por VDEN-1 y VDEN-4 en Boa Vista en la región Amazónica. No hubo dispersión hacia el resto del país (53).

El dengue se convirtió en un problema de salud pública en Brasil a partir del año 1986 con la introducción del VDEN-1 en el estado de Río de Janeiro y su diseminación para las regiones nordeste y centro-oeste del país (54). La transmisión era tan intensa en dicho estado que se estimó más de un millón de personas infectadas entre los años 1986 y 1987 (55, 56). La situación se agravó en el año 1990 por la introducción del VDEN-2 en el mismo estado (57).

En el año 1998 Brasil era responsable del 85% de casos notificados de dengue en las Américas y la incidencia alcanzó 345.7 casos por 100 000 habitantes. Se informó la introducción del VDEN-3 en el año 2002 en el estado de Río de Janeiro que al dispersarse rápidamente por el territorio brasileño transformó al país en hiper-endémico de esta enfermedad (58, 59).

Entre los años 2003 y 2005 disminuyeron los casos notificados de dengue en el estado de Río de Janeiro. Sin embargo a partir del año 2007 se observó una reemergencia del VDEN-2 que causó una grave epidemia en el 2008 con un total de 259 392 casos de los 734 384 casos notificados en Brasil (5).

Después en el año 2010 se confirmó la reemergencia del VDEN-4 en el estado de Roraima de la región norte de Brasil (60) y luego en el estado de Río de Janeiro (61). En Brasil durante el año 2011 se demostró el aislamiento de los cuatro serotipos del VDEN con un predominio del serotipo 1 (62).

### ***II.2.2 Epidemias de dengue en Cuba***

En el año 1977 se informó en Cuba la primera gran epidemia de dengue con más de 500 000 casos causada por VDEN-1 pero sin casos graves (63). Luego en año 1981 se produjo una segunda epidemia causada por VDEN-2 con una inusual severidad. Se notificaron 344 203 casos, de los cuales 10 312 se clasificaron como FHD/SCD y 158 casos fatales que incluían 101 niños y 57 adultos (64). Se confirmó que la infección secundaria constituye un factor de riesgo fundamental pues la mayor parte de los casos severos se observaron en individuos que previamente se infectaron con VDEN-1 (65).

Luego se estableció una campaña de lucha contra el *Aedes aegypti*, además de un sistema de vigilancia nacional, que impidió la transmisión endógena de VDEN en Cuba. Sin embargo, en el año 1997 en el municipio de Santiago de Cuba ocurrió una epidemia por VDEN-2 más severa que la epidemia del año 1981 (66). Se confirmaron 3012 casos, 205 de ellos clasificados como FHD/SCD y 12 casos fatales en adultos.

En dicha epidemia se presentó nuevamente la infección secundaria como factor de riesgo principal en el desarrollo de la forma más severa de la enfermedad. De hecho, se demostró la infección secundaria en 11 (92%) de los 12 fallecidos y en el 98% de los casos de FHD/SCD (67-69). Cuba representó un escenario epidemiológico único para demostrar este factor de riesgo tras un largo período de 20 años teniendo en cuenta que el VDEN-1 circuló en Cuba entre los años 1977 y 1979 (68, 70, 71).

Luego de la epidemia de Santiago de Cuba no se informaron más casos de dengue hasta el año 2000. En dicho año se comprobó un pequeño brote en La Habana por VDEN-3 y VDEN-4, con 138 casos y sin fallecidos. Sin embargo, meses más tarde se describió en la misma ciudad otro brote de mayor envergadura debido a VDEN-3. Se informaron 12 889 casos, 78 casos de FHD/SCD y 3 fallecidos adultos. Además, se produjeron algunas transmisiones locales en cinco provincias del país. Nuevamente la infección secundaria se demostró en el 95% de los casos de FHD/SCD. Parte de estos pacientes podrían haber desarrollado su infección primaria durante las epidemias de VDEN-1 en el año 1977 o de VDEN-2 en el año 1981 (7, 72).

Después del año 2001 ocurrió transmisión de dengue en Cuba como la causante de la epidemia del 2006 en La Habana (6, 8, 9).

### **II.3 Fisiopatología del dengue**

A pesar de que la fisiopatología del dengue no está completamente esclarecida, se acepta que es multifactorial. En esta compleja interacción multifactorial participan factores del virus y del hospedero que pueden conducir al dengue grave y hasta la muerte.

### **II.3.1 Factores del virus**

Los cuatro serotipos del VDENV son antigénicamente distintos y presentan características genéticas diferentes. Por ejemplo, la viremia y antigenemia por la proteína NS1 son mayores en las infecciones por VDENV-2 que por VDENV-1 en niños (73, 74). Otro estudio prospectivo sugiere que niños hospitalizados con infecciones por VDENV debido a los serotipos 2 y 3 presentan dos veces más probabilidad de desarrollar FHD que niños infectados con VDENV-4 (75).

### **II.3.2 Factores del hospedero**

El hecho de que solo una pequeña proporción de individuos con infección secundaria por VDENV presentan una enfermedad grave demuestra que otros factores no virales están relacionados al curso clínico de la infección. Estos factores son edad, género, susceptibilidad genética, co-morbilidad y la respuesta inmune (76, 77).

Es importante el factor de la edad, en una epidemia cubana por el VDENV-2 la morbi-mortalidad era mucho mayor en niños que en adultos (78). Este fenómeno también se demostró en el Sudeste Asiático (79, 80). Por otro lado, el género femenino se describió como un factor de riesgo para dengue en Asia (80, 81).

Estudios epidemiológicos en Cuba (82) y en Haití (83) sugieren que las personas de ascendencia africana son menos susceptibles a las manifestaciones graves de dengue. Algunos genes de los antígenos leucocitarios humanos o HLA (del inglés *human leukocyte antigen*) podrían estar asociados con protección o susceptibilidad a la infección por VDENV según estudios en Cuba (84), México (85) y Vietnam (86) debido a que los antígenos virales son presentados a las células T en el contexto de las proteínas HLA clases I y II.

Son también significativos los diferentes polimorfismos genéticos relacionados con menor resistencia o vulnerabilidad a la infección por VDENV (17). Entre los polimorfismos involucrados se destaca el asociado al receptor Fc que participa en la entrada de los VDENV unidos a anticuerpos antivirales en las células diana (87) y el asociado al receptor viral sobre las células dendríticas llamado CD209 (88). También el

polimorfismo del gen de TNF- $\alpha$ , alelo TNF-308A, se relacionó con la mayor susceptibilidad al dengue grave en Cuba (89) y Venezuela (90), pero no en Vietnam (87).

Las enfermedades crónicas no infecciosas igualmente pueden tener influencia en la enfermedad por VDEN. Los estudios en Cuba demuestran que los casos graves y fatales por dengue son más frecuentes en personas con anemia de células falciformes (91). Se describe también un número mayor de casos fatales por dengue en pacientes con antecedentes de diabetes mellitus (DM) y asma bronquial en Cuba (91), Brasil (16), Puerto Rico (92) y Singapur (93). En una serie de casos fatales por dengue de Singapur se encontró DM en seis de los nueve fallecidos estudiados (93).

La activación de la respuesta inmune durante la infección por VDEN está relacionada al intento de eliminar el virus. Sin embargo, una respuesta inadecuada conduce al compromiso de diferentes componentes y células de la inmunidad innata y adaptativa (94).

La infección secundaria por un serotipo diferente de VDEN es considerada un importante factor de riesgo de dengue grave (7, 94). La explicación fundamental para este riesgo aumentado es que los anticuerpos no neutralizantes de reactividad cruzada, causados por una infección primaria, se unen al virus y tienen mayor potencial para infectar las células diana, principalmente las de la línea monocito-macrófago que presentan receptores Fc. Este fenómeno llamado inmuno-amplificación dependiente de anticuerpos o ADE (del inglés *antibody-dependent enhancement*) se propuso inicialmente en el año 1977 por Halstead y O'Rourke (95, 96) y luego se apoyó en estudios epidemiológicos realizados principalmente en Cuba (68, 97).

Las citocinas pueden contribuir al control de la infección viral por diversos mecanismos de activación, diferenciación y proliferación de células inmunes o por su acción antiviral (98). Sin embargo, en algunos individuos con infección secundaria por dengue se detecta en la circulación una hiper-producción de citocinas y otras moléculas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, interferones o IFN, proteínas del sistema de complemento) principalmente procedentes de células T, monocitos, macrófagos y CE (células endoteliales). Este fenómeno es conocido como tormenta de citocinas y se piensa está relacionado a la hiper-permeabilidad del endotelio vascular

que permite el paso de plasma al espacio extravascular. A consecuencia de esta extravasación plasmática son observadas manifestaciones clínicas de ascitis (cavidad abdominal) y derrame pleural (pulmones) en el dengue grave (94, 99).

El TNF- $\alpha$  es una de las citocinas más estudiadas en el dengue. Sin embargo, la relación de esta citocina proinflamatoria con la gravedad del dengue no está esclarecida. Mientras unos trabajos asocian la elevación en la circulación del TNF- $\alpha$  con la FHD (14, 100, 101), otros estudios no encuentran la misma asociación (15, 39, 102-104). Es muy probable que las citocinas participen de forma sinérgica en la hiper-permeabilidad vascular y otras manifestaciones clínicas importantes del dengue, sin embargo, la interacción dinámica de ellas tiene que ser aclarada todavía.

Las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> reconocen péptidos específicos de los VDEN en el contexto de las moléculas de HLA de las células presentadoras de antígenos. Estas células responden con proliferación celular, lisis de las células infectadas y producción de una variedad de citocinas como los IFN que tienen acción antiviral. Estos mecanismos teóricamente deberían restringir la replicación viral y frenar el desarrollo del dengue (94). De hecho, las células T CD8<sup>+</sup> (105) y CD4<sup>+</sup> (106) protegen a ratones de la infección por VDEN. Otro estudio en humanos indica que la presencia de células T CD4<sup>+</sup> es mayor en pacientes que experimentan una infección secundaria sub-clínica que en pacientes que tienen una infección secundaria sintomática (107).

La reducción de los niveles circulantes de componentes asociados a la activación del sistema de complemento en pacientes con la forma grave del dengue sugieren que este sistema está relacionado con la fisiopatología de la enfermedad (108). Particularmente, se postuló que la proteína viral NS1 viral provoca una activación excesiva del sistema de complemento que induce la hiper-permeabilidad vascular (109). También se ha descrito que la NS1 puede interferir en las vías de activación del sistema de complemento y así disminuir la eliminación del virus (110).

### **II.3.3 Hallazgos patológicos**

Existen trabajos que brindan información importante sobre la histopatología de la FHD/SCD. En el examen histopatológico se observa extravasación de plasma, edema peri-vascular y eritrocitos. El bazo y los ganglios linfáticos muestran proliferación de células linfoides maduras y elementos plasmocitoides. Las lesiones hepáticas consisten en necrosis medio-zonal y a veces centro-lobulillar, cuerpos acidófilos sinusoidales (cuerpos de Councilman), hipertrofia de las células de Kupffer, cambios grasos (esteatosis micro-vesicular) e infiltración portal mononuclear (42, 43, 111-113).

Los estudios de casos con FHD/SCD utilizando la inmunohistoquímica (IHQ) en cortes de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (FFIP) han detectado antígenos de VDEN en muchos tejidos de diferentes órganos, incluyendo hígado, bazo, ganglios linfáticos, timo, riñón, pulmón, cerebro, piel y corazón (43, 112-116). Otros tejidos procedentes del tiroides, páncreas, glándula suprarrenal, músculo esquelético e intestino han resultado negativos de antígenos virales (42, 113, 116).

En los estudios previos de cortes de tejido hepático FFIP se demostraron antígenos de VDEN intra-citoplasmáticos localizados en células de Kupffer (112-114, 116, 117), dentro de hepatocitos (42, 43, 114, 117), alrededor de focos necróticos (42, 43), en hepatocitos intactos distantes de las áreas de necrosis (42), en los cuerpos de Councilman (43) y en CE de los vasos sanguíneos (112, 113). También se observaron células mononucleares fagocíticas marcadas en el lumen de vasos sanguíneos hepáticos (112, 113).

En el bazo se han detectado antígenos virales en macrófagos (113, 114), en células linfoides (113, 115) y en CE de la micro-vasculatura (115). En el riñón los antígenos se localizaron dentro de las células que revisten los túbulos renales (113). En el tejido pulmonar se detectaron antígenos en los macrófagos de los espacios alveolares, en el lumen y en CE de los vasos sanguíneos (113, 114).

En la materia blanca del cerebro se observaron fagocitos mononucleares marcados por IHQ con VDEN sobre todo dentro y fuera de pequeñas venas (114). También en ese estudio se localizaron macrófagos en la proximidad de neuronas que presentaban claros rasgos citopáticos en la materia gris.

La presencia de antígenos de VDEN no indica estrictamente que en esas células ocurra replicación viral porque podría deberse a la fagocitosis de virus o al secuestro de inmuno-complejos. Sin embargo, la técnica de hibridación *in situ*, que permite la localización celular de ácidos nucleicos específicos sí puede sugerir que ocurrió replicación viral en las células como se demostró anteriormente en el timo y linfocitos periféricos de casos fatales por dengue (118). En otro estudio de hibridación *in situ* en una serie de casos fatales por dengue (113), el ARN de VDEN se localizó en el citoplasma de macrófagos, células reactivas linfoides y bi-nucleadas y células gigantes multi-nucleadas de la pulpa roja esplénica. En la pulpa blanca el ARN viral se detectó en células inmunoblastoides de los centros germinales. Se observaron también células mononucleares positivas en el lumen de los vasos sanguíneos esplénicos. En las muestras de coágulos de sangre el ARN del virus se localizó principalmente en el citoplasma de monocitos y algunos linfocitos. La búsqueda de ARN del VDEN resultó negativa en células de Kupffer, macrófagos alveolares pulmonares, células de túbulos del riñón y endotelio vascular de estos órganos.

Cuando se combina la hibridación *in situ* con la transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa o RT-PCR (del inglés *reverse transcription-polymerase chain reaction*), técnica llamada RT-PCR *in situ*, en cortes de tejidos FFIP se pueden detectar cantidades mínimas de ácidos nucleicos específicos. Utilizando esta técnica se logró demostrar ARN de VDEN en hepatocitos de áreas medio-zonales hepáticas, macrófagos de la piel y ganglios linfáticos de un caso fatal infantil (119). Otro trabajo utilizó esta técnica para detectar ARN de VDEN en células hepáticas de nueve fallecidos con fallo hepático por FHD/SCD (120).

#### **II.4 Curso clínico del dengue**

Cualquiera de los cuatro serotipos del VDEN puede causar un amplio espectro de manifestaciones clínicas que oscilan desde formas leves de fiebre indiferenciada hasta formas graves con hemorragia, choque y muerte. La mortalidad puede ser tan alta como de 10-20% sin un tratamiento apropiado temprano, pero puede ser menor hasta alcanzar 0.2-1% en hospitales con personal experimentado (1, 2).

El curso clínico de esta enfermedad viral incluye tres fases: fase febril, fase crítica y fase de recuperación. La fase febril se caracteriza por fiebre con duración de dos a siete días, asociada a eritema facial, mialgias, artralgias, cefalea, postración, vómitos y anorexia. No es posible prever la evolución ni tampoco es fácil diferenciar entre el dengue y otras enfermedades febriles en esta fase. Una prueba del torniquete positiva indica una probabilidad elevada de dengue. Sin embargo, en esta etapa no puede predecirse la severidad de la enfermedad. Debido al difícil pronóstico es muy importante observar los signos de alarma que pueden indicar la progresión hacia la fase crítica. Además, pueden ser vistas manifestaciones hemorrágicas de menor relevancia como petequias, epistaxis y gingivorragias. La formación fácil de hematomas y la hemorragia en los sitios de inyección pueden estar presentes en algunos casos. Las hemorragias importantes del tracto gastrointestinal y metrorragia pueden ocurrir pero menos frecuentemente. El hígado se encuentra aumentado de tamaño y el recuento global de leucocitos sanguíneos está disminuido comúnmente (1, 121).

La fase crítica no ocurre en todos los pacientes. Durante la transición del estado febril al afebril los pacientes sin hiper-permeabilidad vascular mejoran sin pasar a la fase crítica. Sin embargo, los casos con hiper-permeabilidad vascular en vez de mejorar cuando desaparece la fiebre comienzan a presentar los signos de alarma como resultado de la fuga capilar. Estos signos de alarma marcan el inicio de la fase crítica. La fase crítica dura de 24 a 48 horas y generalmente aparece entre el tercero y el séptimo día de la defervescencia. Este período se caracteriza por la normalización de la temperatura ( $37.5 - 38^{\circ}\text{C}$  o menos) y aparición de hiper-permeabilidad vascular acompañada de aumento del hematocrito. Una leucopenia (existencia en sangre periférica de un recuento global de leucocitos por debajo de los límites considerados como normales) progresiva seguida por una disminución rápida del recuento global de plaquetas en la sangre precede usualmente al aumento de la hiper-permeabilidad vascular en los tejidos (ascitis en la cavidad abdominal, derrame pleural en el pulmón e hidropericardio en el corazón).

El choque ocurre cuando un volumen crítico del plasma se extravasa y frecuentemente este estado es precedido por signos de alarma. La prolongación del choque causa daño a los órganos, acidosis metabólica, coagulación intra-vascular diseminada y hemorragia grave. Sin embargo, esta hemorragia grave y daño grave a los órganos pueden ocurrir sin extravasación plasmática evidente (1, 77, 121).

Si el paciente sobrevive la fase crítica pasa a la última fase, la fase de recuperación. En esta fase ocurre la mejora del estado general. Además, puede aparecer exantema, prurito y bradicardia. El hematocrito se estabiliza o disminuye debido a la dilución por el líquido reabsorbido. La elevación de los leucocitos típicamente precede a la normalización del número de plaquetas y a la reabsorción del líquido plasmático extravasado (1, 121).

#### **II.4.1 Clasificaciones clínicas de dengue de la OMS**

Por más de 30 años se utilizó una clasificación de dengue (FD/FHD/SCD) de la OMS (10) que aunque contribuyó a la disminución de muertes presenta inconsistencias y no es completamente efectiva (122). De manera que la OMS propuso otra clasificación (DSSA, DCSA, DG) que es de más fácil aplicación en el diagnóstico y manejo de los pacientes (1). Ambas clasificaciones se describen a continuación.

#### **II.4.2 Clasificación tradicional de dengue del año 1997**

*Definición de caso de FD:* fiebre con dos o más síntomas como dolor de cabeza, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias/dolores óseos, manifestaciones hemorrágicas, exantema y leucopenia.

*Definición de caso de FHD:* presenta cuatro criterios. (i) Fiebre, o antecedente reciente de fiebre de 2-7 días de duración. (ii) Manifestaciones hemorrágicas, evidenciada por al menos una de las siguientes: prueba del torniquete positiva, petequias, equimosis o púrpura, sangramientos en las mucosas, tracto gastrointestinal, sitio de inyección u otras. (iii) Trombocitopenia:  $100\ 000 \times \text{mm}^3$  o menos. (iv) Extravasación de plasma evidenciada al menos por una de las siguientes manifestaciones: hemoconcentración con un hematocrito igual o superior a 20% por encima del promedio para la edad, sexo y población que se considere, disminución de 20% o más del hematocrito después del tratamiento rehidratante y la extravasación de plasma como derrame pleural, ascitis o hipo-proteinemia.

*Clasificación de la gravedad en la FHD:* Grado I-fiebre acompañada de síntomas generales no específicos, la única manifestación hemorrágica es una prueba del torniquete positiva. Grado II-hemorragia espontánea, además de las manifestaciones referidas para el grado I, generalmente en la piel, a través de la nariz u otra localización. Grado III-hipotensión según la edad, pulso rápido y débil, el estrechamiento de la tensión diferencial (20 mm de Hg o menos). Grado IV-choque profundo con presión arterial y pulso imperceptibles.

#### **II.4.3 Clasificación reciente de dengue del año 2009**

*DSSA:* el caso vive en áreas endémicas o viajó a ellas y presenta fiebre y dos o más manifestaciones como náuseas o vómitos, exantema, mialgias y artralgias, petequias o prueba del torniquete positivo y leucopenia.

*DCSA:* al cuadro anterior se le suman los signos de alarma como son el dolor abdominal, vómito persistente, acumulación de líquido, hemorragia de mucosas, letargia/irritabilidad, hepatomegalia > 2 cm, aumento de hematocrito con caída rápida del número de plaquetas.

*DG:* presenta extravasación plasmática grave (lleva al choque, acumulación de líquido en pulmón y disnea), hemorragia grave evaluada por el clínico y daño grave de órganos. El daño grave de órganos incluye el hígado con enzimas hepáticas alanina aminotransferasa (ALAT) o aspartato aminotransferasa (ASAT) > 1000, encefalitis/encefalopatía, cardiomiopatía y daño renal agudo.

El paciente con dengue tiene que ser confirmado por laboratorio mediante RT-PCR, cultivo celular o serología cuando no existan evidencias de extravasación de plasma.

#### **II.5 Diagnóstico de dengue en el laboratorio**

La confirmación de laboratorio es muy importante porque el dengue tiene diferentes presentaciones clínicas que tornan difícil el diagnóstico basado solo en la clínica. La prueba más específica para confirmar la infección por VDEN es el aislamiento viral, pero es complejo, caro, dura de una a dos semanas y necesita de personal especialmente

entrenado. También la detección en sangre del genoma del VDEN y antígeno viral NS1 son métodos confirmatorios. La seroconversión de IgM e IgG anti-VDEN y el aumento de cuatro veces o más de la IgG en el suero son muy usadas para confirmar la infección viral. Sin embargo, los altos niveles de IgM e IgG en una única muestra pueden sugerir la infección aguda por VDEN (1, 2, 123).

Durante la fase aguda o fase de viremia (hasta 4-5 días) de la enfermedad puede ser diagnosticado el dengue mediante aislamiento viral, detección del ácido nucleico del virus o del antígeno NS1 en el suero. Al final de la fase aguda de infección, la serología es el método de elección (2).

La línea de células de mosquitos *Aedes albopictus* C6/36 es la más sensible para aislar el VDEN. Si el VDEN no causa efecto citopático en dicho cultivo celular, el virus puede ser identificado al usar un anticuerpo monoclonal (AcM) anti-VDEN o por la detección del genoma viral. Aunque el suero es la muestra más usada, también puede utilizarse el plasma (123).

Las pruebas de amplificación del genoma viral son las más sensibles. Existen varios protocolos de RT-PCR de dengue, sin embargo el más usado detecta los cuatro serotipos (124). También se han desarrollado protocolos de RT-PCR en tiempo real que permiten cuantificar el genoma (carga viral) del VDEN (125-128).

El antígeno viral NS1 de VDEN puede ser detectado en la circulación hasta nueve días después del inicio de la enfermedad (1). Se han desarrollado muchas pruebas comerciales tipo ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) o ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida y también pruebas rápidas que aun están en fase de evaluación para detectar este antígeno (129-133).

Se puede confirmar el diagnóstico de dengue utilizando los tejidos de los casos con sospecha de muerte por dicha enfermedad. El aislamiento viral y el PCR convencional puede realizarse del macerado de tejidos de necropsia (67, 123). Solamente un trabajo ha descrito la detección del genoma de VDEN por RT-PCR en tiempo real en tejidos de fallecidos por dengue (134). Por otro lado, un trabajo reciente en Brasil describió por primera vez la presencia del antígeno viral NS1 en diferentes tejidos de casos fatales usando tres ELISA de captura de NS1 (135).

Las pruebas que generalmente son usadas para el diagnóstico de la infección por VDEN son las serológicas por ser relativamente económicas y fáciles. La respuesta de anticuerpos contra el VDEN puede variar de acuerdo con el estado inmune del hospedero. Cuando la infección ocurre en personas no infectadas previamente por un flavivirus o no inmunizadas con una vacuna anti-flavivirus, los pacientes desarrollan una respuesta primaria de anticuerpos caracterizada por un aumento de anticuerpos específicos. Los primeros anticuerpos que aparecen son de la clase IgM (136, 137). Estos anticuerpos son detectables en el 50% de los pacientes antes de los días 3-5 de inicio de la enfermedad, aumentando hasta 80% en el día 5, hasta 99% en el día 10 y desaparecen después de dos a tres meses (1, 2).

El MAC-ELISA (del inglés *IgM antibody capture ELISA*) se utiliza generalmente para la detección de la IgM anti-VDEN (1, 136). Por otro lado, el método de ELISA de inhibición (MEI), que detecta y titula las inmunoglobulinas totales contra el VDEN, permite clasificar el caso de dengue como primario o secundario (138).

La detección en el líquido cefalorraquídeo del VDEN (RT-PCR y/o aislamiento viral) o la detección de la respuesta inmune humoral antidengue (IgM anti-VDEN) se consideran como requisitos para el diagnóstico confirmatorio de meningitis/meningoencefalitis por dengue (139-141). Sin embargo, es importante destacar que la obtención de líquido cefalorraquídeo presenta como contraindicación la ocurrencia de diátesis hemorrágica, como ocurre en el dengue, por el riesgo de provocar hemorragia espinal o epidural (142). Recientemente, estudios realizados en Brasil demostraron por primera vez la utilidad de la detección del antígeno viral NS1 por ELISA en líquido cefalorraquídeo de pacientes y fallecidos con dengue (143, 144).

Algunas pruebas hematológicas son realizadas usualmente en la fase aguda de dengue. La plaquetopenia (disminución del número de plaquetas circulantes por debajo de los límites considerados como normales) y la leucopenia son encontradas frecuentemente (1). También la leucocitosis se ha demostrado usualmente (145-147). La hemoconcentración unida a la caída abrupta de plaquetas es una de los signos de alarma del DCSA (1).

## **II.6 Prevención y tratamiento del dengue**

Los tres aspectos fundamentales del control y prevención del dengue son la vigilancia epidemiológica, la reducción de la enfermedad y el control del vector. Sin embargo, la mayoría de los países endémicos tienen programas de control y prevención de dengue ineficaces e insuficientes (1, 2).

La obtención de una vacuna contra el VDEN es un gran desafío debido a la necesidad de obtener una vacuna contra cuatro serotipos virales simultáneamente (tetravalente) para evitar el posible riesgo de ADE, la ausencia de un modelo animal adecuado y una comprensión incompleta de los mecanismos inmunes protectores (148). A pesar de estas dificultades técnicas existen diferentes candidatos de vacunas en fase preclínica o clínica en Cuba, Brasil, Estados Unidos, Francia, Tailandia, Taiwán, India y otros países. Los candidatos incluyen virus vivos atenuados, virus inactivados, vacunas de subunidades recombinantes, vacunas con vectores virales, vacunas de partículas similares a virus, vacunas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y virus quiméricos que poseen el genoma del virus de la vacuna de fiebre amarilla 17D al que se le sustituyeron las proteínas de membrana y envoltura por las del VDEN (149-154).

Entre los candidatos de vacuna contra el VDEN el más avanzado es el tetravalente, recombinante, vivo, atenuado de la empresa Sanofi Pasteur que está ahora en fase clínica 3 en más de 30 000 individuos de países endémicos. Sin embargo, en un reciente estudio de fase 2b por Sabchareon y cols esta vacuna solo demostró una preocupante eficacia de 30% (155). Por otro lado, recientemente se realizó el primer reto viral en humanos de un candidato de vacuna tetravalente, viva, atenuada de dengue. La vacunación previa con dicho candidato protegió de forma variable a unos pocos individuos en un reto con VDEN-1 y VDEN-3 inoculado por vía subcutánea (156).

El interrogatorio, el examen físico y las pruebas de laboratorio definen qué clasificación clínica (DSSA, DCSA, DG) el paciente presenta. Según las normas recientes de la OMS los grupos de tratamiento se dividen en tres: grupo A, B y C. El grupo A (DSSA sin enfermedades asociadas ni factores de riesgo) es tratado en su vivienda con evaluación diaria del médico, hemograma cada 48 horas y adecuada ingestión de líquidos. Los pacientes del grupo B (DCSA o DSSA con enfermedades asociadas o factores de riesgo) son hospitalizados para tratarse inmediatamente con soluciones endovenosas de

crystaloides y necesitan seguimiento por hemograma. El grupo C es el grupo más grave y requiere urgentemente de soluciones endovenosas (1, 121).

A pesar de la actividad de diferentes moléculas contra el VDEN tanto *in vitro* como en animales de laboratorio, en la actualidad no existe un fármaco específico contra el VDEN (77). Sin embargo, se ha descrito una acción antiviral de diferentes compuestos dirigidos contra las enzimas del VDEN (157). Además de moléculas que contrarrestan la infección como el ARN de interferencia (158-160), inhibidores de proteínas estructurales (161), anticuerpos monoclonales (162, 163) y el IFN (Clyde, Kyle et al. 2006).

Los esteroides se ensayaron en diversas ocasiones en casos con dengue (164-167) pero sin evidencia de beneficio clínico. También se ensayaron el anti-malárico cloroquina (168) y el antiviral Balapiravir (169) en pacientes con dengue pero sin resultados positivos.

Recientemente se publicó el diseño del ensayo clínico que investigará el efecto del medicamento lovastatina en el dengue (170). La lovastatina pertenece a una clase de medicamentos orales denominados estatinas que se desarrollaron inicialmente para disminuir los lípidos sanguíneos (171). A pesar de divergencias que existen alrededor de estos fármacos (172-175), existe también gran interés en sus acciones antiapoptóticas, antiinflamatorias e inmuno-moduladoras. Estas propiedades farmacológicas se han relacionado con el aumento de la supervivencia de pacientes con diferentes enfermedades infecciosas entre las que se incluyen las virales (176, 177).

Los trabajos de dengue y estatinas, siempre con lovastatina, son escasos y no han estudiado su posible efecto antiapoptótico sino su acción antiviral (178-180). Sin embargo, otros estudios *in vitro* sí han abordado el papel antiapoptótico de las estatinas en el endotelio vascular (181-183) y en pacientes (184). El ensayo de lovastatina en dengue (170) sería el primer ensayo terapéutico en esta enfermedad viral a nivel mundial con un medicamento que tenga alguna acción sobre el endotelio y particularmente en la apoptosis endotelial.

## **II.7 Muerte celular programada por apoptosis**

### **II.7.1 Definición de apoptosis**

La apoptosis es uno de los tipos de muerte celular programada y tiene características bioquímicas y morfológicas muy específicas (185). La morfología de la apoptosis se caracteriza por la retracción de la célula debido a la pérdida de la adherencia con la matriz extracelular y con las células vecinas. Los organelos celulares mantienen su morfología, con excepción de las mitocondrias que pueden presentar ruptura de la membrana externa. La cromatina se condensa y se concentra junto a la membrana nuclear que se mantiene intacta pero luego el núcleo se desintegra en fragmentos envueltos por dicha membrana nuclear. La membrana celular forma prolongamientos que se rompen originando estructuras que contienen fragmentos celulares denominados cuerpos apoptóticos (186, 187).

Las células apoptóticas son fagocitadas por células fagocíticas profesionales y no profesionales (188). Esta fagocitosis se realiza en tres periodos que tienen diferentes señales: (i) señales de “encuéntrame” en la superficie de la célula apoptótica que atraen a los fagocitos, (ii) señales de “cómeme” que permiten el reconocimiento de las células en apoptosis y (iii) un proceso de internalización y digestión de la célula apoptótica con la subsecuente liberación de citocinas antiinflamatorias como el TGF- $\beta$  y la IL-10. En este tercer periodo ocurre la maduración del fagosoma que contiene el material fagocitado que se une a lisosomas que contienen las enzimas necesarias para su degradación (189).

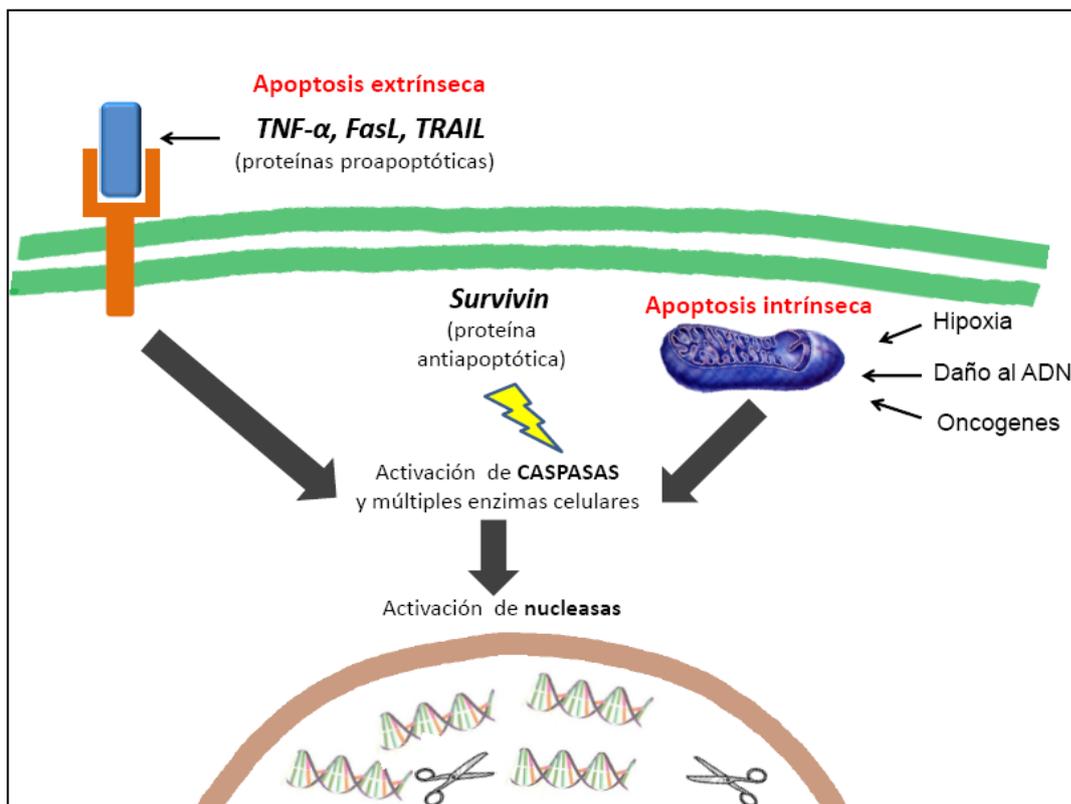
Se debe tener en cuenta que las células apoptóticas pueden localizarse dentro de vacuolas de células fagocíticas. De hecho, las proporciones de células apoptóticas libres e ingeridas pueden ayudar a responder la pregunta sobre la posible eliminación defectuosa de las células apoptóticas (190). Otra consecuencia de la apoptosis es el comienzo de la reparación tisular pues la homeostasis del tejido involucra probablemente el reemplazo eficaz, después de la muerte, de células individuales. Una muestra de este fenómeno es que células apoptóticas pueden estimular la producción de factor de crecimiento de células endoteliales vasculares o VEGF (del inglés *vascular endothelial cell growth factor*) (191) y el factor de crecimiento de hepatocitos (192) que favorecen el crecimiento de CE y células epiteliales respectivamente.

Un rasgo bioquímico importante de la muerte por apoptosis es que la fragmentación inter-nucleosómica del ADN nuclear presenta un patrón característico. La endonucleasa que es activada produce fragmentos de ADN nuclear de 200 pares de bases. Este fenómeno es detectado por la técnica de TUNEL (193). La técnica de TUNEL también puede detectar células necróticas que tienen abundantes fragmentos de ADN de doble cadena y células vivas con activa transcripción o reparación del ADN. Esta falta de especificidad puede ser controlada con la optimización de los controles negativos y positivos. Además, puede ser solucionada utilizando métodos alternativos de detectar apoptosis (194).

La apoptosis ocurre en diversos procesos fisiológicos como la organogénesis y hematopoyesis y en la reposición fisiológica de ciertos tejidos. De hecho, se estima que en el humano un millón de células muere cada segundo por apoptosis debido al recambio celular normal sin ocurrir auto-reactividad. Sin embargo, la apoptosis también ocurre en la respuesta inmune y en la eliminación de células después de un daño tisular (195). Debido a estas formas diferentes de inducción de apoptosis, este fenómeno celular puede clasificarse como apoptosis inmunogénica y apoptosis tolerogénica o silente. La apoptosis silente ocurre en el recambio celular fisiológico. La apoptosis inmunogénica es inducida por patógenos, quimioterapia del cáncer y tejidos ajenos (196, 197).

### ***II.7.2 Mecanismos de regulación de la apoptosis***

La apoptosis es un programa de muerte celular extremadamente regulado que requiere la interacción de numerosos factores. Las alteraciones morfológicas observadas son consecuencia de una cascada de eventos bioquímicos regulados genéticamente (Figura 1) (185).



**Figura 1.** Vías de activación y regulación de la apoptosis. Se representan las dos vías de activación de la apoptosis: vía extrínseca mediada por los ligandos de muerte y la vía intrínseca mediada por la mitocondria e inducida por factores que dañan las células. La proteína antiapoptótica Survivin es una de las moléculas que regula la apoptosis al inhibir las caspasas. Las caspasas y otras enzimas celulares participan en la activación de las endonucleasas que escinden el ADN nuclear en múltiples fragmentos que pueden ser detectados por la técnica de TUNEL. Fuente: del autor.

En la regulación de la apoptosis participa activamente la familia Bcl-2 (del inglés *B-cell lymphoma 2*) que está constituida por proteínas proapoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, NOXA, PUMA) y antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1, BOO/DIVA) (185, 198).

Las caspasas pertenecen a una familia de cisteína-proteasas (poseen una cisteína en el sitio activo) que poseen la capacidad de reconocer y escindir substratos que posean residuos de aspartato (199). Las caspasas son sintetizadas como precursores inactivos y solamente después de la señal de muerte celular son activadas por escisión proteolítica. Las caspasas se clasifican de acuerdo con su papel en la apoptosis como iniciadoras

(caspasas 2, 8, 9 y 10 que están involucradas en la iniciación de la cascada proteolítica) y efectoras (caspasas 3, 6 y 7 que son responsables del clivaje de sustratos) (185).

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis o IAP (del inglés *inhibitor of apoptosis proteins*) son moléculas que ejercen su papel antiapoptótico al inhibir las caspasas efectoras 3 y 7, la caspasa iniciadora 9 y al modular el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Dentro de los miembros de las IAP se encuentra el Survivin o BIRC5 (del inglés *baculoviral IAP repeat-containing protein 5*) (200). Existen evidencias que señalan al Survivin como una proteína esencial en la regulación de la progresión de la mitosis, inhibición de la apoptosis y resistencia a la radioterapia y la quimioterapia en diversos tipos de cáncer (23).

Cualquier desregulación de la apoptosis, tanto el exceso como la insuficiencia, puede tener implicaciones clínicas. La apoptosis excesiva puede causar enfermedades neurodegenerativas y lesiones secundarias a la isquemia. Las enfermedades autoinmunes pueden ser generadas por fallas en el programa de muerte de linfocitos T auto-reactivos. El virus de Epstein-Barr, que se asocia a cánceres linfáticos, codifica para proteínas antiapoptóticas semejantes a Bcl-2. El virus del papiloma, principal causa de cáncer de cuello uterino, inactiva la proteína proapoptótica p53 (21). Por otro lado, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana o VIH induce la apoptosis de linfocitos T CD4+ por diferentes mecanismos (201).

### **II.7.3 Vías de activación de la apoptosis**

La activación de la apoptosis puede ser iniciada por dos vías estrechamente relacionadas: la vía extrínseca (receptores de muerte) o la vía intrínseca (mitocondrial) (Figura 1) (21). Más recientemente, el Comité de Nomenclatura de la Muerte Celular en el año 2012 propuso cambiar las definiciones tradicionales de tipos de muerte celular basadas en la morfología, por las siguientes definiciones basadas en pruebas moleculares: (i) apoptosis extrínseca, (ii) apoptosis intrínseca caspasa-dependiente, (iii) apoptosis intrínseca caspasa-independiente, (iv) necrosis regulada, (v) muerte celular autofágica y (vi) catástrofe mitótica (22).

La vía extrínseca es desencadenada por la interacción de ligandos a receptores de membrana de la super-familia del TNF. Los tres principales ligandos son: (i) TNF- $\alpha$ , (ii) FasL (también conocido como CD95 o TNFSF6 del inglés *TNF superfamily member 6*) y (iii) el TRAIL también denominado TNFSF10 (del inglés *TNF superfamily member 10*) o Apo2L del inglés *apoptosis 2 ligand* (22). Esta unión de ligando y receptor es capaz de activar la cascada de las caspasas (202).

La vía intrínseca es activada por un número mayor de factores que la vía extrínseca. Esos factores incluyen el estrés intracelular o extracelular, la eliminación de factores de crecimiento, el estrés del retículo endoplasmático, los daños al ADN y la hipoxia. Las señales convergen principalmente en la mitocondria que puede liberar moléculas proapoptóticas al citoplasma y activar a las caspasas (203).

## **II.8 Apoptosis en la infección por virus dengue**

Existen evidencias *in vitro*, en modelos animales y en humanos sobre la participación de la apoptosis en la infección por VDEN. De este modo, se ha postulado que la muerte celular apoptótica podría estar involucrada en la fisiopatología del dengue (18-20).

### **II.8.1 Apoptosis en la infección in vitro por virus dengue**

Se ha demostrado que anticuerpos anti-NS1 de VDEN, con actividad de auto-anticuerpos contra CE humanas, inducen apoptosis *in vitro* de las CE mediada por óxido nítrico, hiper-producción de proteínas proapoptóticas y disminución de las antiapoptóticas (31, 32). Otros estudios de proteómica apoyan el papel de los anticuerpos anti-NS1 con actividad auto-inmune dirigida contra un fragmento aminoacídico sobre las CE humanas que presenta mimetismo molecular con la NS1 viral (204, 205).

En otro estudio, el suero de pacientes con dengue mostró reactividad cruzada con CE humanas en cultivo y causó apoptosis mediada por caspasas. La reactividad mayor se observó con los sueros que contenían IgM anti-VDEN (33). Esta inducción de apoptosis

de CE estaba probablemente mediada por factores proinflamatorios del suero como el TNF- $\alpha$  (34).

Sin embargo, la hipótesis de mimetismo molecular entre proteínas del VDEN (que incluyen fundamentalmente al antígeno viral NS1) y proteínas humanas de CE, plaquetas y proteínas de la coagulación (206) tiene varias limitaciones desde el punto de vista de la evolución clínica del dengue que ha traído como consecuencia recientes controversias (207). Por ejemplo, es improbable que los anticuerpos contra la NS1 u otra proteína viral aparezcan antes del quinto día de la enfermedad. Sin embargo, la plaquetopenia se describe usualmente entre el segundo o tercer día de enfermedad y la hiper-permeabilidad vascular ocurre alrededor del quinto día (208). Pero más importante aún, no se podría entonces explicar cómo los anticuerpos anti-NS1 pueden producir una hiper-permeabilidad vascular transitoria por daño endotelial (incluyendo apoptosis) como resultado de una respuesta humoral (auto-anticuerpos) que puede durar muchos años (207).

La proteína de membrana del VDEN posee un pequeño dominio conocido como ecto-M que contiene solamente nueve aminoácidos y es llamado apoptoM por inducir la muerte celular apoptótica de células tumorales (28). Además se demostró que el ecto-M induce la apoptosis al causar el colapso del potencial de membrana de la mitocondria (209).

En un estudio previo, la expresión de los genes de NS3 y de NS2B-NS3 de VDEN indujeron apoptosis en cultivo de CE de la micro-vasculatura. Un aislamiento clínico de VDEN-2 también causó apoptosis de estas CE en cultivo (210). Por otra parte, la proteína viral de la cápside induce apoptosis en células hepáticas (HepG2) por la interacción con la proteína proapoptótica Daxx asociada al Fas (29, 211).

La inducción de muerte celular apoptótica se provocó por aislamientos humanos de VDEN inoculados en una línea de neuroblastoma de ratón (24) y en una línea de neuroblastoma humano (212). El VDEN también ha inducido apoptosis en CE de venas del cordón umbilical (213, 214), células dendríticas (215), monocitos primarios (27, 100), línea monocítica U937 (216), cultivo primario de hepatocitos (26) y células de hepatoma humano (217-219). En uno de los estudios con células de hepatoma humano se demostró que la expresión de TRAIL y su receptor participaban de la inducción de apoptosis en hepatocitos no infectados por VDEN (219).

### **II.8.2 Apoptosis en modelos animales con infección por virus dengue**

Un estudio previo describió la inducción de muerte celular apoptótica en células del sistema nervioso central de ratones recién-nacidos después de la inoculación intracerebral de VDEN (35). Otro estudio precedente documentó que anticuerpos anti-NS1 de VDEN provenientes de ratones, reaccionan de forma cruzada con el endotelio vascular de pequeñas venas de ratón (31). En este último modelo, se observaron CE apoptóticas de la micro-vasculatura de los tejidos subcutáneos que podrían estar asociadas a sangramientos locales. Adicionalmente, se comprobó en ese trabajo que la producción *in situ* de altos niveles de TNF- $\alpha$  por los macrófagos estaba asociado a la muerte celular apoptótica en el endotelio y la hemorragia (36). En otro estudio utilizando este modelo experimental, también se demostró que especies reactivas de nitrógeno y oxígeno podrían estar relacionadas a la inducción de apoptosis de las CE (220).

Recientemente en un modelo murino de dengue se demostró por la técnica de TUNEL y la detección de caspasa 3 que las células NK y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que infiltraban el tejido hepático inducen apoptosis de células del hígado. Las células NK ejercen este papel al inicio de la infección, mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> lo hacen al final (221).

### **II.8.3 Apoptosis en pacientes con dengue**

La apoptosis en tejidos de casos con dengue se confirmó solamente en el hígado y por medio de la técnica de TUNEL en dos estudios (42, 43). En un estudio se demostró apoptosis de hepatocitos en un caso adulto fatal en Francia con infección secundaria causada por VDEN-2 (42) y en otro trabajo se mostró apoptosis en células hepáticas de cinco casos pediátricos fatales por FHD/SCD en Viet-Nam. Cuatro de estos niños presentaban infección secundaria por VDEN-3 (43).

En niños tailandeses con infección secundaria por VDEN se documentó que linfocitos T CD8<sup>+</sup> de alta afinidad de una infección previa son más resistentes a la apoptosis e inclusive proliferarían más, comparados con los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de baja afinidad y específicos al serotipo infectante actual que además serían más susceptibles a la

apoptosis. Como consecuencia, ocurre un menor control del virus por el sistema inmune que contribuye al desarrollo de las formas más severas de la enfermedad (19).

En CMSP de pacientes con dengue se ha detectado una mayor expresión de genes proapoptóticos aunque no siempre asociado a la severidad de la enfermedad (37-39, 222). Otro trabajo demostró un número significativamente mayor de CMSP apoptóticas en pacientes con FHD/SCD comparados con casos de FD y que posiblemente la apoptosis era mediada por niveles elevados de citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  (40).

Los niveles plasmáticos de Fas o CD95 soluble se encontraron elevados en niños con FHD al compararse con niños con FD (20). Por otro lado, otro trabajo demostró que la concentración en el suero de TRAIL era más elevada en pacientes con dengue que en pacientes con otras infecciones febriles y sujetos controles (41). Más recientemente, se encontraron mayores niveles de ADN circulante, probablemente de células apoptóticas, en plasma de niños con FHD que en niños con FD (223).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **III.1 *Diseño de estudio***

En esta investigación se realizaron dos estudios diferentes de corte transversal descriptivo. En uno se cuantificaron las proteínas apoptóticas en plasma y las células sanguíneas de pacientes brasileños con dengue durante una epidemia del año 2010. En el otro estudio se incluyeron tejidos de casos fatales por dengue procedentes de tres epidemias cubanas de dengue durante un periodo de 9 años (1997-2006) para observar células apoptóticas y detectar antígenos de VDEN.

#### **III.2 *Consideraciones éticas***

Todos los pacientes adultos con dengue (o familiares de los menores de edad) y los individuos adultos controles del trabajo de cuantificación plasmática de proteínas apoptóticas firmaron un consentimiento informado. Este procedimiento se aprobó por el Comité de Ética del Instituto Oswaldo Cruz de la Fundación Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), del Ministerio de Salud de Brasil, bajo el número 061/2008.

Para el estudio de tejidos de casos cubanos fatales por dengue se obtuvo el consentimiento informado de los familiares. También se aprobó el trabajo en los Comités de Ética de cada institución cubana involucrada: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Hospital Clínico-Quirúrgico “Salvador Allende” de La Habana y Hospital Clínico-Quirúrgico “Juan Bruno Zayas” de Santiago de Cuba.

### **III.3 Recolección de datos clínico-patológicos y de laboratorio de casos con dengue**

Los pacientes brasileños con diagnóstico confirmado de dengue procedían de centros hospitalarios de ese país. De las historias clínicas se obtuvo información sobre sexo, edad, días de enfermedad, manifestaciones clínicas, resultados de hemogramas y enzimas hepáticas ALAT y ASAT, además de los informes de imagenología (ultrasonidos y radiografías).

Se colectaron los resultados del serotipo viral amplificado por RT-PCR y/o aislado en células C6/36 en el Laboratorio de Flavivirus del Instituto Oswaldo Cruz. Adicionalmente se tomaron los resultados de la citometría de flujo realizada en el Laboratorio de Inmunología Viral del Instituto Oswaldo Cruz a las CMSP purificadas de estos pacientes. Los monocitos se marcaron con AcM anti-CD14 (IOTest, Beckman Coulter, Inc., California, USA), los linfocitos T CD8+ citotóxicos con AcM anti-CD8 (e-Bioscience, California, USA) y los linfocitos T CD4+ cooperadores con AcM anti-CD4 (Biolegend inc., California, USA). La purificación de las CMSP para la citometría se realizó como se ha descrito anteriormente (224). La obtención de los datos de citometría de flujo se realizó en un equipo Accuri 6C (Becton-Dickinson, New Jersey, USA) y los datos se analizaron con el software FlowJo (TreeStar Inc., Oregon, USA).

De los casos cubanos fatales se revisaron las historias clínicas para recolectar información como edad, sexo, antecedentes personales de enfermedades crónicas, días de enfermedad, manifestaciones clínicas, hemogramas, enzimas hepáticas ALAT y ASAT e informes de imagenología (ultrasonidos y radiografías).

Del informe de necropsia se extrajeron los hallazgos macro y microscópicos de anatomía patológica relacionados con la extravasación de plasma y las hemorragias. También se colectaron los resultados de los estudios serológicos (MAC-ELISA y MEI) y de biología molecular (RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real) de dengue realizados a estos casos en el Laboratorio de Arbovirus del IPK.

De los hemogramas se describieron diferentes alteraciones hematológicas como la leucopenia, la plaquetopenia (recuento de plaquetas menor de  $100\ 000 \times \text{mm}^3$ ), la linfocitosis y la linfopenia (existencia en sangre periférica de un recuento relativo de linfocitos por encima, linfocitosis, o por debajo, linfopenia, de los límites considerados

como normales respectivamente). En la evaluación de los datos de laboratorio se tomaron en cuenta los valores de referencia (Anexos, Tabla 1 y 2) (225).

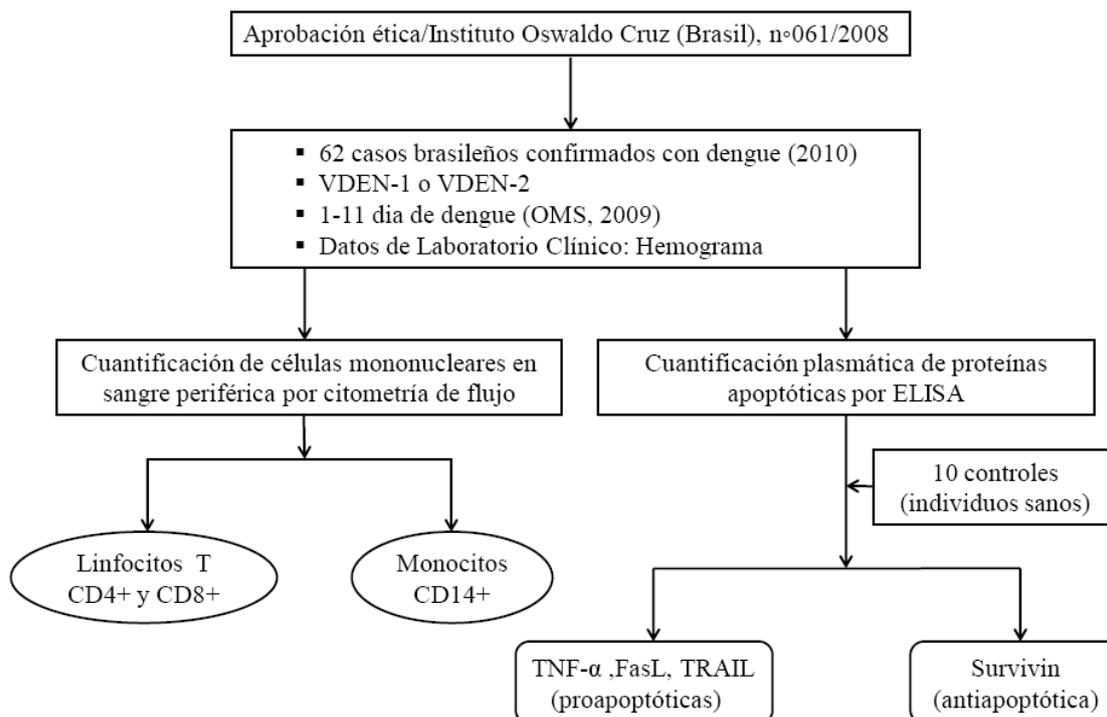
### **III.4 Clasificaciones de la OMS de pacientes con dengue**

Se usaron las dos clasificaciones de dengue de la OMS: la clasificación tradicional de FD/FHD/SCD del año 1997 (Acápito II.4.2) (10) y la clasificación revisada del 2009 que divide la enfermedad en dengue con y sin signos de alarma (DSSA, DCSA) y la forma grave del dengue (DG) (Acápito II.4.3) (1).

### **III.5 Obtención de las muestras de plasma de pacientes brasileños con dengue**

Los 62 casos con dengue de este estudio se confirmaron entre 107 casos febriles con sospecha clínica de dengue que acudieron entre marzo y abril del 2010 a dos instituciones hospitalarias brasileñas: el “*Hospital-Dia Professora Esterina Corsini*” de la Universidad Federal del estado brasileño de *Mato Grosso do Sul* y el Centro de Referencia de Dengue del “*Hospital dos Plantadores de Cana*” en el municipio de *Campos dos Goytacazes* del estado de Río de Janeiro. A estos pacientes se les tomó una muestra de plasma entre el primero y el oncenno día de la enfermedad cuando los pacientes acudieron a los centros hospitalarios mencionados (Figura 2).

La confirmación de infección aguda por VDENV se realizó mediante uno o más métodos diagnósticos (MAC-ELISA, RT-PCR, aislamiento viral en células C6/36 y detección del antígeno viral NS1) realizados en el Laboratorio de Flavivirus del Instituto Oswaldo Cruz.



**Figura 2.** Diagrama de flujo del estudio de proteínas apoptóticas plasmáticas en casos brasileños con dengue.

Los casos con dengue de Brasil estaban divididos en tres grupos según la clasificación más reciente de la OMS (1): 27 casos no presentaban signos de alarma (DSSA), 20 casos con signos de alarma (DCSA) y 15 casos con la forma grave de la enfermedad (DG).

### **III.6 Obtención de las muestras control negativo de plasma**

Las muestras de plasma incluidas en este grupo se obtuvieron de diez individuos adultos sanos del estado de Río de Janeiro sin antecedentes de enfermedades crónicas y que no habían presentado episodios febriles en los últimos tres meses.

### **III.7 Cuantificación de las proteínas plasmáticas apoptóticas en pacientes brasileños con dengue**

La determinación de las concentraciones plasmáticas de FasL, TRAIL, Survivin (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) y TNF-α (Pepro Tech, Inc., New Jersey, USA) se

realizó mediante ELISA tipo sandwich en el Laboratorio de Inmunología Viral del Instituto Oswaldo Cruz de acuerdo a los protocolos de los fabricantes.

Los materiales y soluciones de trabajo se suministraron por el fabricante en los kits de ELISA de FasL, TRAIL y Survivin (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA). Como indicaban los tres protocolos, las muestras de plasma se usaron sin diluir y la curva patrón (1000-31,25 pg/mL) se confeccionó con el patrón y su diluyente correspondiente suministrados en el kit. En resumen, primeramente se adicionaron en los pocillos de la placa, ya recubierta con el anticuerpo de captura correspondiente (anti-FasL, anti-TRAIL o anti-Survivin), 100µL de diluyente de ensayo seguido de 50µL de la muestra de plasma o del patrón y se incubó la placa por 2 horas. Luego se lavó cada pocillo cuatro veces con solución tampón suministrada en el kit. Después se adicionaron 200µL por pocillo de conjugado del kit (anticuerpo policlonal o AcP conjugado con peroxidasa de rábano picante) según la proteína apoptótica a determinar (AcP anti-FasL, AcP anti-TRAIL o AcP anti-Survivin) y se incubó la placa por 2 horas. Se repitió el lavado cuatro veces y se adicionaron 200µL por pocillo de la solución de sustrato del fabricante (peróxido de hidrógeno con 3,3', 5,5'-TMB) durante una incubación de 30 minutos. Finalmente, se adicionaron 50µL por pocillo de la solución de parada suministrada en el kit (ácido sulfúrico) para determinar la densidad óptica dentro de los 30 minutos siguientes. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

En relación a la cuantificación de TNF- $\alpha$ , el kit de ELISA del fabricante (Pepro Tech, Inc., New Jersey, USA) no incluía todos los materiales y soluciones de trabajo, pero si recomendaba cuáles usar. En resumen, 100 µL del anticuerpo de captura anti-TNF- $\alpha$  suministrado en el kit a una concentración de 0,5 µg/mL (Pepro Tech, Inc., New Jersey, USA) diluido en solución tampón salina fosfatada o PBS, (del inglés *phosphate buffer saline*) pH 7,2 se adicionaron por pocillo en una placa de 96 pocillos (Falcon BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) y se incubaron por 18 horas. Al final de este período se realizaron cuatro lavados con solución tampón de lavado (0,05% de tween-20 en PBS pH 7,2). Posteriormente, 200 µL de una solución de bloqueo de 5% de albúmina de suero bovino o BSA (del inglés *bovine serum albumin*) en PBS pH 7,2 se adicionó por pocillo para incubarse por 2 horas. La curva patrón de TNF- $\alpha$  se preparó a través de diluciones seriadas de la alícuota del patrón suministrada por el fabricante (1000-15,62 pg/mL) con solución tampón diluyente (0,05% de tween-20 en PBS pH

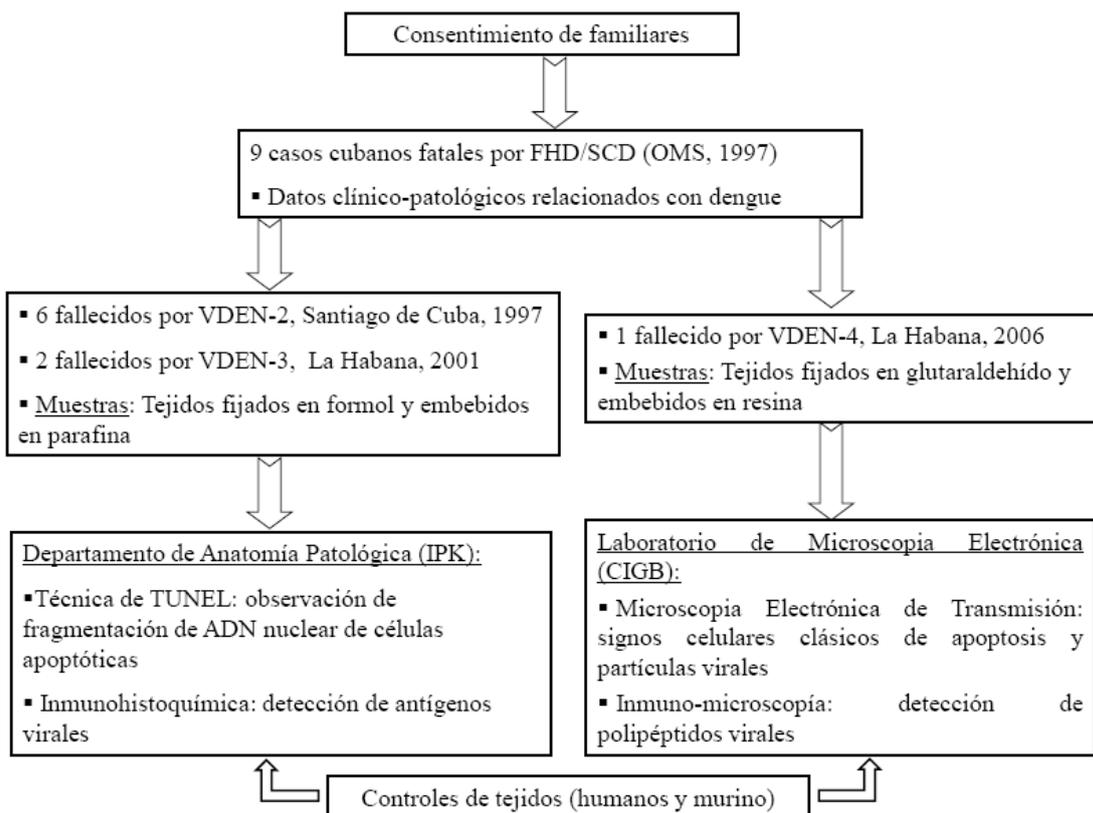
7,2). Se adicionaron 100µL por pocillo de los patrones diluidos o de las muestras de plasma concentradas seguido de una incubación por 2 horas.

Después de este tiempo, se realizaron cuatro lavados con solución tampón de lavado y se adicionaron 100 µL del anticuerpo de detección anti-TNF-α del fabricante en tampón diluyente a la concentración de 0,25 µg/mL. Al final de esta etapa, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado. Después, se adicionaron por pocillo 100 µL del conjugado suministrado por el fabricante (estreptavidina-peroxidasa de rábano picante), diluido 1: 2000 en solución diluyente, para incubar por 30 minutos. Finalmente, 100 µL del sustrato 3,3', 5,5'-TMB (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) se adicionaron por pocillo. Se realizó una incubación durante 30 minutos antes de realizar la lectura. No se indicaba por el fabricante utilizar una solución de parada. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

En los cuatro ELISA realizados la lectura de la densidad óptica de las muestras y patrones se realizó en un espectrofotómetro Expert Plus® (Biocrom Ltd, Cambridge, England) utilizando una longitud de onda de 620 nm.

### ***III.8 Obtención de los tejidos de casos cubanos fatales por dengue***

El universo de estudio de fallecidos cubanos por dengue estuvo constituido por 16 fallecidos por FHD/SCD durante tres epidemias cubanas de dengue (67, 226). Durante la epidemia por VDEN-2 en Santiago de Cuba del año 1997 ocurrieron 12 casos fatales (67), en la epidemia por VDEN-3 en La Habana del año 2001 se informaron 3 fallecidos (226) y más recientemente en una epidemia por VDEN-4 en La Habana en el 2006 se confirmó un caso fatal (227). En el presente estudio se incluyeron nueve de estos fallecidos (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama de flujo del estudio de tejidos de casos cubanos fatales por dengue.

En los fallecidos de dengue de los años 1997 y 2001 se había confirmado con anterioridad el diagnóstico de infección aguda secundaria por VDEN mediante serología (MAC-ELISA y MEI de dengue). En el único caso fatal del año 2006 no se confirmó si la infección aguda (MAC-ELISA de dengue positivo) era secundaria.

Se realizó el aislamiento viral (células C6/36HT) y/o la detección molecular (RT-PCR convencional) del serotipo viral involucrado (VDEN-2 o VDEN-3) en muestras de suero y/o de tejidos frescos de los casos fatales por dengue de los años 1997 y 2001 (67, 72, 228). En los tejidos del fallecido del 2006 se amplificó el ARN de VDEN-4 por RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real (Libro de Entrada de Vigilancia Viroológica del Laboratorio de Arbovirus, Departamento de Virología, IPK).

Para esta investigación se emplearon los tejidos FFIP de órganos obtenidos en las necropsias de nueve casos cubanos de FHD/SCD, en dependencia de su disponibilidad: hígado, cerebro, intestino, pulmón, corazón, riñón y bazo (Tabla 1). De la epidemia del año 1997 se examinaron seis casos y de la epidemia del año 2001 se estudiaron dos

casos, para un 50% y 66.6%, respectivamente, del total de fallecidos en esas epidemias de dengue en Cuba. De la epidemia del año 2006 se estudió un caso confirmado.

**Tabla 1.** Distribución de los casos cubanos fatales por FHD/SCD según epidemia, año, serotipo viral y tejidos examinados.

<b>Casos fatales por FHD/SCD</b>	<b>Epidemia de dengue/Año</b>	<b>Serotipo de VDEN</b>	<b>Tejidos FFIP*</b>
1	Santiago de Cuba/1997	VDEN-2	Cerebro, hígado, intestino
2	Santiago de Cuba/1997	VDEN-2	Pulmón
3	Santiago de Cuba/1997	VDEN-2	Cerebro, hígado
4	Santiago de Cuba/1997	VDEN-2	Cerebro
5	Santiago de Cuba/1997	VDEN-2	Hígado, intestino, pulmón
6	Santiago de Cuba/1997	VDEN-2	Cerebro, hígado, intestino, pulmón
7	La Habana/2001	VDEN-3	Cerebro, corazón, intestino
8	La Habana/2001	VDEN-3	Corazón, intestino
9	La Habana/2001	VDEN-4	Cerebro, riñón, corazón, hígado y bazo

Nota: \* FFIP, fijados en formalina e incluidos en parafina.

Las necropsias de los fallecidos durante la epidemia por VDEN-2 del año 1997 en Santiago de Cuba se realizaron en el Hospital Clínico-Quirúrgico “Juan Bruno Zayas”. Las necropsias durante la epidemia de dengue en La Habana del año 2001 se llevaron a cabo en el IPK. La necropsia del caso del 2006 se realizó en el Hospital Clínico-Quirúrgico “Salvador Allende” de La Habana. Todas las muestras de tejidos se procesaron como tejidos FFIP de la manera habitual en que se realiza en los departamentos de Anatomía Patológica de nuestro país.

Del fallecido por DENV-4 de la epidemia en La Habana en el año 2006 se incluyeron en este estudio los tejidos frescos de los siguientes órganos: bazo, hígado, cerebro y pulmón. Estos tejidos se procesaron y fijaron para realizar MET en el Laboratorio de MET del CIGB.

### **III.9 Obtención de los tejidos controles**

Los tejidos controles positivos de VDEN se obtuvieron de ratones albinos suizos (OF1) lactantes (uno a tres días de nacidos) de manera similar a como se ha descrito previamente (229). Brevemente, ratones lactantes OF1 se inocularon por vía intracerebral con una suspensión de 0.02 mL de PBS pH 7,2 con una dilución de 1/50 de cerebro de ratones OF1 con encefalitis por VDEN. Esta suspensión a un título viral de  $2 \times 10^6$  unidades formadoras de placas contenía uno de los siguientes virus: VDEN-2 (cepa Nueva Guinea C), VDEN-3 (cepa H87) o VDEN-4 (cepa H241). Los ratones se colectaron y se les practicó eutanasia a los cinco días (VDEN-2), siete días (VDEN-3) y cuatro días (VDEN-4) después de la inoculación.

Los cerebros se extrajeron y se fijaron en solución de formol tamponado neutro al 10% (PBS pH 7,2 al 10% de formol 40%) por 48 horas antes del procesamiento histológico de rutina para inclusión en parafina (Sasol Wax, GmbH, Hamburg, Germany). Para ello se empleó equipo procesador automático de tejidos (VRX-23, Sakura, California, USA) programado para procesar en 12 horas.

Los tejidos FFIP de cerebro de ratones empleados como controles negativos se fijaron e incluyeron en parafina de igual manera que los controles positivos. Estos controles se obtuvieron de ratones lactantes OF1 que se inocularon por vía intra-cerebral (0.02 mL) con solución de PBS pH 7,2 sin la presencia de virus y que se colectaron siete días después. Además, se añadieron como controles negativos de los tejidos humanos FFIP los cortes de hígado, cerebro, intestino, pulmón y corazón de tres adultos fallecidos en el IPK entre el año 2001 y 2005 por enfermedades no relacionadas a flavivirus.

Estos mismos tejidos FFIP humanos se usaron como tejidos controles negativos de apoptosis. El control positivo de apoptosis de tejido incluyó solamente el tejido FFIP de amígdala, como indicaba el fabricante (*In Situ Cell Death Detection Kit*, AP; Roche

Applied Sciences, Mannheim, Germany), de uno de los fallecidos mencionados anteriormente.

Los controles positivos para MET se obtuvieron de los ratones lactantes OF1 inoculados por vía intra-cerebral con VDEN-4. Los controles negativos provinieron de cerebros de ratones OF-1 inoculados por vía intra-cerebral con solución de PBS pH 7,2 sin virus.

Estos tejidos se procesaron como se describió anteriormente (230, 231) en el Laboratorio de MET del CIGB. Brevemente, fragmentos de tejidos de aproximadamente 1 mm se fijaron en glutaraldehído al 3.2% durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se lavaron en tampón cacodilato de sodio con 0,1 M a pH 7.2 durante 1 hora a 4°C y se posfijaron por 1 hora a 4°C en 2% en tetróxido de osmio. Seguidamente se lavaron por 5 minutos dos veces en tampón cacodilato de sodio a 4°C y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (30, 50, 70 y 100%) a 4°C durante 10 minutos cada vez. La inclusión de estas muestras de tejidos en resina de microscopía electrónica se realizó según Spurr (232).

### **III.10 *Procesamiento de tejidos controles y de casos cubanos fatales por dengue***

Los cortes histológicos de 4 µm de los tejidos FFIP se realizaron con micrótomo horizontal Leica RM2035 (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) y se montaron en láminas histológicas portaobjetos (Min Sheng, China) tratadas previamente con silane (3-Triethoxisilylpropylamine, Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Los cortes de tejidos se desparafinaron en una estufa a 60°C por 1 hora, seguido de un procedimiento manual de tres pases en xilol de 5 minutos cada uno. Luego, los cortes se rehidrataron en pases sucesivos de 5 minutos cada uno en etanol absoluto, etanol 95%, etanol 80% y etanol 70% según los protocolos utilizados en el Departamento de Anatomía Patológica del IPK.

Los cortes ultra-finos de los tejidos fijados para MET, de un grosor de 40-50 nm, se realizaron con un ultra-micrótomo (NOVA, LKB, Bromma, Sweden) y se colocaron sobre rejillas de níquel de 400 orificios en el Laboratorio de MET del CIGB.

### **III.11 Detección de antígenos virales en los tejidos de casos cubanos fatales por dengue entre los años 1997-2006**

Para la detección de antígenos de VDEN en tejidos de los fallecidos cubanos por FHD/SCD de la epidemias de los años 1997, 2001 y 2006 se empleó la técnica de IHQ por el método indirecto de inmuno-peroxidasa descrito previamente (42, 112, 113, 229, 233) con algunas modificaciones. Los cortes de tejidos desparafinados y rehidratados se digirieron con una solución al 0.1% de tripsina (Difco Laboratories, Michigan, USA),  $\text{CaCl}_2$  al 0.1% y pH 7.8, durante 20 minutos en estufa a 37<sup>0</sup>C. Seguidamente, se bloqueó la actividad endógena de la enzima peroxidasa del tejido con una solución de metanol al 90%,  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 5% en agua destilada. Los sitios antigénicos de unión inespecífica se bloquearon con una solución de BSA fracción V (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) al 5%, en TBS (solución tamponada salina de Tris) al 0.05% más Tween 20 (TBST). Los pasos de bloqueo se realizaron a temperatura ambiente y por 20 minutos cada uno.

Los anticuerpos primarios anti-VDEN, AcP y AcM, se produjeron en el IPK (234). El AcP anti-VDEN-2, anti-VDEN-3 y anti-VDEN-4 se obtuvieron de líquido ascítico hiper-inmune de ratón y se utilizaron en una dilución de 1:1000. El AcM H3-6, que reconoce un antígeno de la proteína viral de envoltura común en los cuatro serotipos de VDEN, se usó en la dilución 1:100. Los anticuerpos primarios se diluyeron en Tris 0.05 M pH 7.4 con BSA al 1% mas Tween 20 al 0.1%. Estos anticuerpos se incubaron durante 18 horas a 4<sup>0</sup>C. Se utilizaron inmunoglobulinas de conejo antiratón conjugadas con peroxidasa de rábano picante (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) y diluidas 1:200 en Tris 0.05 M pH 7.4 como anticuerpos secundarios.

La reacción positiva se evidenció con una solución de revelado constituida por una tableta de 3, 3`-Diaminobenzidina (Sigma Fast DAB, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) como cromógeno en 10 mL de Tris 0.05 M pH 7.4. Esta solución de revelado se filtró con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Minisart, Sartorius Ag, Goettingen, Germany) y el tiempo de revelado se controló bajo observación microscópica (5 a 10 minutos). La reacción se detuvo con agua destilada. Luego los cortes se deshidrataron en tres pases sucesivos de etanol absoluto y se aclararon en tres pases sucesivos de xilol de 5 minutos cada uno. Finalmente, los cortes histológicos se montaron bajo cubre-objeto de cristal con medio de montaje permanente (Sharlau Chemie, Barcelona, España) para realizarse la observación con microscopio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

En todos los cortes de tejidos se utilizó el AcP anti-VDEN según el serotipo involucrado en la epidemia. Los tejidos positivos en un primer ensayo con el AcP anti-VDEN se reanalizaron posteriormente al utilizar el AcM H3-6 anti-VDEN con el objetivo de buscar mayor especificidad en el ensayo. Todos los pasos del protocolo de IHQ se realizaron en cámara húmeda. Para realizar los lavados de los cortes de tejidos entre paso y paso del protocolo de IHQ se utilizó una solución tampón de lavado (TBST pH 7.4).

Los controles positivos y negativos de tejidos de ratón y negativos de tejidos humanos se incubaron con el AcP o el AcM anti-VDEN en correspondencia con el anticuerpo primario anti-VDEN utilizado en las muestras de tejidos de los fallecidos por dengue. Se realizó de cada bloque de tejido humano un corte para ser usado como control interno. Estos controles internos se cubrieron con el AcP murino anticitoqueratina humana listos para su uso (Serotec, Kidlington, UK) durante 18 horas y a 4<sup>0</sup>C como se realizó con el resto de los cortes de tejidos humanos examinados.

### **III.12 *Detección de células apoptóticas en los tejidos de casos cubanos fatales por dengue entre los años 1997-2001***

En los casos fatales de las epidemias de dengue ocurridas en Cuba en los años 1997 y 2001 se estudiaron tejidos FFIP provenientes de hígado, pulmón, intestino, corazón y cerebro. Se determinó apoptosis mediante el marcaje de extremos finales cortados de fragmentos de ADN generados por degradación inter-nucleosomal de ADN genómico al emplear la técnica de TUNEL y siguiendo el protocolo del fabricante (*In Situ Cell Death Detection Kit*, AP, Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany). Brevemente, los cortes de tejidos desparafinados y rehidratados se digirieron durante 15 minutos a 37<sup>0</sup>C con proteinasa K recombinante de *Tritirachium album* (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) en una solución de 20 µg/mL en 10mM Tris, pH 7.4-8. Posteriormente, los cortes se incubaron durante 1 hora en estufa a 37<sup>0</sup>C con la mezcla de reacción de TUNEL. Esta mezcla estaba conformada por la enzima recombinante transferasa terminal de deoxinucleótidos o TdT, del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase*, de timo de ternero más nucleótidos marcados con fluoresceína en buffer de reacción. Seguidamente, se examinó el ADN fragmentado en el núcleo de las células

mediante microscopio de fluorescencia Leica DLMB (Leica Microsystems, Illinois, USA).

Se continuó el protocolo, como indica opcionalmente el fabricante, al adicionar a los cortes el anticuerpo antiluoresceína de carnero conjugado con fosfatasa alcalina (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany). Este anticuerpo conjugado estaba compuesto solamente por el fragmento de unión al antígeno de la molécula de inmunoglobulina y se incubó por 30 minutos en estufa a 37<sup>0</sup>C. Luego se reveló con una solución de una tableta de NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany), sustrato de la fosfatasa alcalina, en 10 mL de agua bi-distilada por 10 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó una solución de lavado de PBS pH 7.2 entre los pasos del protocolo para realizar lavados de 5 minutos de todos los cortes de tejidos. Todos los pasos del protocolo se realizaron en cámara húmeda. Finalmente se montaron los cortes de tejido bajo cubre-objeto de cristal con PBS/glicerol y se analizaron con microscopio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Esta microscopía de luz se usó también para examinar las características morfológicas de las células en apoptosis (186, 235).

En cada ocasión que se realizó el protocolo de TUNEL se incluyeron controles de tejidos desparafinados, rehidratados y digeridos con proteinasa K siguiendo las instrucciones del fabricante. Los controles negativos de tejidos quedaron constituidos por cortes de tejidos humanos provenientes de hígado, pulmón, intestino, cerebro y corazón que se incubaron solamente con nucleótidos marcados con fluoresceína (sin TdT) en el paso de marcaje. El control positivo de tejido incluyó cortes de amígdala humana tratadas con una nucleasa, DNase I grado I (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany), en una solución de 1000 U/mL en 50 mM Tris, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 1mg/mL BSA por 10 minutos a temperatura ambiente y cámara húmeda para provocar la fragmentación de ADN genómico antes de los procedimientos de marcaje.

### ***III.13 Microscopía electrónica de transmisión en los tejidos de un caso cubano fatal por dengue del año 2006***

Con el objetivo de observar las alteraciones ultra-estructurales características de las células apoptóticas y las partículas virales en las células, las muestras de tejido del

fallecido del año 2006 se procesaron para la MET siguiendo el mismo protocolo de los tejidos controles de MET. Los cortes ultra-finos obtenidos se colocaron sobre rejillas de níquel, se contrastaron con acetato de uranilo saturado y citrato de plomo y se examinaron con MET (JEOL JEM 2000 EX, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) a diferentes magnificaciones en el Laboratorio de MET del CIGB.

### ***III.14 Inmuno-microscopía electrónica de transmisión en los tejidos de un caso cubano fatal por dengue del año 2006***

En los tejidos procesados para MET del caso fatal de dengue del año 2006 se utilizó la inmuno-microscopía electrónica para inmuno-localizar poli-péptidos virales (Laboratorio de MET del CIGB). En resumen, se usaron tres anticuerpos primarios diferentes: el AcP contra VDEN-4 (líquido ascítico hiper-inmune de ratón), el AcM H3/6 (234) o el AcP de suero de ratón dirigido contra la proteína NS1 de VDEN producido por el Centro de Investigaciones Biológicas de La Habana (cedido gentilmente por G. Lemus, datos no publicados).

Los cortes ultra-finos se incubaron con el anticuerpo primario, a una dilución de 1:10, durante 60 minutos a 4°C. Después estos cortes se incubaron con anticuerpo anti-IgG de ratón, marcados con oro coloidal de 15 nm de diámetro, a una dilución de 1:200 durante 60 minutos a 4°C (Amersham PLC, England). Los cortes se lavaron en seis pases de 2 minutos cada uno, primero con PBS pH 7,3-BSA y finalmente con agua. Se empleó PBS pH 7,3 en sustitución de los anticuerpos primarios, como control negativo de la técnica. Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo saturado y citrato de plomo para ser examinados mediante MET (JEOL JEM 2000 EX, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) a diferentes magnificaciones. En este ensayo se incluyeron los cortes ultra-finos de los tejidos controles positivos y negativos.

### ***III.15 Fotografías y documentación de imágenes***

En la IHQ se tomaron micro-fotografías con una cámara digital (PowerShot G6, Canon, Tokyo, Japan) montada en el adaptador del microscopio de luz Axiostar Plus (Carl

Zeiss, Göttingen, Germany). En la MET se tomaron micro-fotografías y las imágenes obtenidas se revelaron y digitalizaron. Todas las imágenes se analizaron con *Microsoft Picture Office Manager* (Windows 2000 o Windows 7, Microsoft Inc, Washington, USA).

### **III.16 Análisis estadístico**

Los datos sobre la cuantificación de proteínas apoptóticas circulantes en pacientes brasileños con dengue se almacenaron usando el software de EpiData versión 3.1 (<http://www.epidata.dk>). El análisis de los datos de laboratorio clínico, del recuento de las células sanguíneas y las concentraciones de proteínas apoptóticas entre dos grupos de pacientes se llevó a cabo con el test no paramétrico de Mann-Whitney.

La correlación de Spearman usando el GraphPad Prism v5.0 con el *Windows GraphPad Software* (<http://www.graphpad.com>) se empleó para conocer el grado de asociación de las concentraciones de las proteínas apoptóticas circulantes con el recuento de las células sanguíneas de los pacientes con dengue. La prueba de Kolmogorow-Smirnov se aplicó con un valor de  $p < 0,05$  para ser considerada significativa.

Los datos de los tejidos de los casos cubanos fatales por dengue se analizaron estadísticamente usando distribuciones de frecuencia. Los resultados que se obtuvieron en todo el trabajo se exponen en tablas y figuras.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Diferentes estudios *in vitro*, en modelos animales y en pacientes han sugerido que la apoptosis está involucrada en la fisiopatología del dengue (18-20). En este trabajo, se cuantificaron marcadores apoptóticos plasmáticos en pacientes brasileños con VDEN. Por otro lado, se evaluó la presencia de células apoptóticas en tejidos de fallecidos cubanos por dengue.

### ***IV.1 Pacientes brasileños con dengue: clasificación clínica y parámetros de laboratorio***

En 62 pacientes brasileños con dengue se cuantificaron cuatro moléculas solubles relacionadas con la apoptosis. La muestra de plasma se recolectó cuando los pacientes estaban entre el primero y el oncenavo días de la enfermedad. Estos pacientes presentaban una edad media de 40 años, solo 5 eran de edad pediátrica (< 15 años) y 30 eran del sexo femenino.

Basándose en la clasificación más reciente de la OMS (1) los casos con dengue estaban divididos en tres grupos: 27 pacientes con DSSA, 20 pacientes con DCSA y 15 pacientes con la forma grave (DG). Uno de los pacientes adultos graves presentó choque por dengue y falleció. De los 15 casos graves, 5 casos se clasificaron como FHD/SCD de acuerdo con la clasificación tradicional de la OMS. Estos cinco pacientes se clasificaron de la siguiente manera: FHD-I (2 casos), FHD-II (2 casos), SCD-IV (único caso fatal). Los restantes 57 casos con dengue, según la clasificación tradicional (10), se agruparon como casos de FD. De manera que la reciente clasificación (1) triplicó el número de casos de dengue con manifestaciones graves.

Discrepancias similares entre las dos clasificaciones de dengue se han encontrado en un trabajo reciente realizado en países del sudeste asiático y de Latino-América (con la participación de Brasil). Sin embargo, en ese estudio previo se detectaron casos de

FHD/SCD que no se incluyeron en el grupo de DG (236). La interpretación de la diferencia de nuestros hallazgos con ese hallazgo anteriormente descrito es limitada debido al menor número de pacientes con dengue que estudiamos.

La mayoría de los casos estudiados en los que se logró identificar el serotipo viral resultó ser el VDEN-2 (21/26) (Tabla 2). En Brasil se introdujeron desde 1986 los serotipos 1, 2 y 3 del VDEN (5).

**Tabla 2.** Datos demográficos y clínicos de los casos brasileños con dengue.

Datos	Clasificación		
	Dengue sin signos de alarma <sup>n=27</sup>	Dengue con signos de alarma <sup>n=20</sup>	Dengue grave <sup>n=15</sup>
<b>Demográficos</b>			
Edad (media ± desviación estándar)	38.4 ± 16.5	40.7 ± 16.1	40.4 ± 19.6
Género (Femenino: Masculino)	10:17	13:7	7:8
VDEN-1:VDEN-2 <sup>*</sup>	1:10	4:7	0:4
<b>Clínica</b>			
Hemorragia <sup>†</sup> (%)	0	35	66.7
Fuga capilar <sup>‡</sup> (%)	0	0	46.2
Hipotensión <sup>§</sup> (%)	0	0	25

DENV-1:VDEN-2<sup>\*</sup> corresponde a la proporción de aislamientos virales y/o amplificación de genoma de los serotipos 1 y 2 de VDEN. Hemorragias<sup>†</sup> incluyen petequias, epistaxis, melena, hematemesis, hematuria y metrorragia. Fuga capilar<sup>‡</sup> manifestada por derrame pleural, derrame pericárdico y ascitis. Hipotensión<sup>§</sup> definida por presión del pulso por debajo de 20 mm Hg (diferencia entre las presiones diastólica y sistólica) o por hipotensión para la edad.

En este estudio las manifestaciones hemorrágicas se encontraron en mayor proporción en los casos graves comparados con los casos de DSSA. La fuga capilar y la hipotensión se presentaron solamente en los casos graves (Tabla 2). Estos hallazgos clínicos se encuentran asociados a la severidad del dengue (10) y en epidemias anteriores en Brasil se ha descrito una mayor frecuencia de estas manifestaciones clínicas en los casos severos (54, 237).

En los casos estudiados el recuento de plaquetas disminuyó de forma significativa en los pacientes con DG comparado con los casos no graves e individuos controles (Tabla 3). La plaquetopenia es un hallazgo frecuente en dengue y se ha usado como marcador de gravedad (238-240). Por otro lado, los niveles de las enzimas hepáticas (ASAT, ALAT) eran significativamente mayores en los pacientes con DG lo cual corrobora la asociación del daño al hígado con la severidad del dengue (Tabla 3) (239, 241, 242).

**Tabla 3.** Datos de laboratorio clínico y de células sanguíneas de los casos brasileños con dengue.

Datos de Laboratorio <sup>e</sup> (media ± desviación estándar)	Clasificación			
	Controles <sup>n=10</sup>	Dengue sin signos de alarma <sup>n=27</sup>	Dengue con signos de alarma <sup>n=20</sup>	Dengue grave <sup>n=15</sup>
Recuento de plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	296.8 ± 34.9 <sup>£</sup>	128 ± 73.7	88.2 ± 64.8 <sup>*</sup>	61.4 ± 48.1 <sup>#&amp;</sup>
Hematocrito (%)	39.9 ± 3.0	40.5 ± 3.8	39 ± 4.7	37.3 ± 4.4 <sup>#</sup>
AST (IU/L) <sup>b</sup>	-	64.3 ± 63.9	80.2 ± 78.3	1592.3 ± 545.6 <sup>#</sup>
ALT (IU/L) <sup>c</sup>	-	56.6 ± 48.8	71.5 ± 69.2	2055.0 ± 6791.0 <sup>#</sup>
Recuento global de leucocitos/mm <sup>3</sup>	6073.0 ± 635.2	4130.0 ± 2148.0	4318.0 ± 2470.0	5813.0 ± 3545.0
Recuento global de linfocitos /mm <sup>3</sup>	1845.3 ± 349.3	1469.0 ± 993.0	1694.0 ± 1515.0	2253.0 ± 1591.0
Recuento global de monocitos /mm <sup>3</sup>	432.7 ± 99.8	518.9 ± 377.8	409.7 ± 240.9	606.8 ± 387.0

Recuento diferencial de monocitos (%)	7.8 ± 1.7 <sup>‡</sup>	12.3 ± 4.5	9.8 ± 4.0	12.7 ± 6.0
Recuento diferencial de linfocitos (%)	30.8 ± 7.6	36.0 ± 16.8	35.3 ± 17.0	43.8 ± 16.8
Recuento de monocitos CD14+ /mm <sup>3</sup>	263.9.8 ± 35.7	254.5 ± 226.6	236.6 ± 136.7	317.4 ± 265.6
Recuento de linfocitos CD4+ /mm <sup>3</sup>	616.2 ± 113.4 <sup>‡</sup>	296.8 ± 192.5	500.7 ± 438.7	690.0 ± 486.0
Recuento de linfocitos CD8+ /mm <sup>3</sup>	428.9 ± 205.5 <sup>‡</sup>	199.1 ± 181.2	512.6 ± 331.7	345.2 ± 308.6
Recuento de monocitos CD14+ (%)	60.8 ± 11.5	60.0 ± 21.1	57.0 ± 17.9	53.3 ± 18.9
Recuento de linfocitos CD4+ (%)	30.2 ± 10.0	33.0 ± 14.3	31.7 ± 11.8	32.8 ± 12.1
Recuento de linfocitos CD8+ (%)	19.9 ± 4.4	20.8 ± 9.3	20.7 ± 8.9	17.4 ± 8.0

Datos de laboratorio del día de toma de la muestra de sangre para cuantificar las proteínas apoptóticas. Las diferencias estadísticas se analizaron con el test de Mann Whitney ( $p < 0.05$ ). <sup>‡</sup> representa diferencias entre los controles y alguno(s) de los grupos de dengue, \* entre dengue sin signos de alarma y dengue con signos de alarma, <sup>#</sup> entre dengue sin signos de alarma y dengue grave, y <sup>&</sup> entre dengue con signos de alarma y dengue grave.

No se observaron diferencias significativas al compararse las proporciones o números absolutos de leucocitos, monocitos y sub-poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, entre los tres grupos estudiados de pacientes con dengue (Tabla 3). Particularmente, a pesar de una tendencia al incremento del número de células inmunes relacionado con la gravedad del dengue, no se observaron diferencias significativas entre los leucocitos totales y las dos sub-poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+.

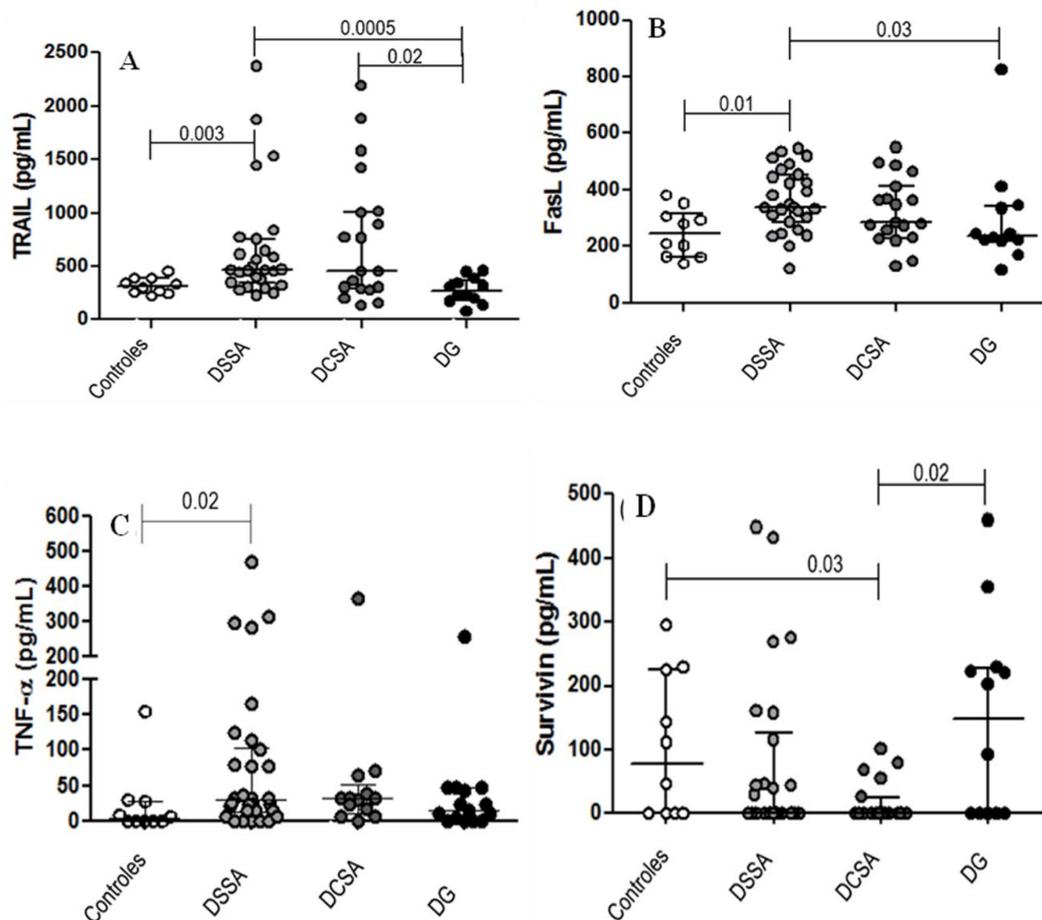
Sin embargo, el recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+ era significativamente más elevado en los grupos con dengue que en el grupo control. En estudios anteriores (243, 244) se ha documentado también el aumento de estas sub-poblaciones linfocitarias en pacientes graves con dengue al compararse con pacientes no graves.

La proliferación e hiper-activación de células inmunes, específicamente linfocitos, se describe como uno de los factores principales en la fisiopatología del dengue. Estos linfocitos participan en la respuesta antiviral produciendo anticuerpos, liberando un amplio rango de citocinas y lisando células infectadas por el virus (94).

Se observó un recuento diferencial de monocitos significativamente mayor en los casos controles que en los grupos con dengue. Recientemente un trabajo experimental describió un resultado interesante al mostrar que la infección por VDEN de monocitos puede protegerlos de la apoptosis espontánea que ocurre en estas células cuando no están estimuladas (245).

#### ***IV.2 Concentraciones plasmáticas de las proteínas apoptóticas en pacientes brasileños con dengue***

Las concentraciones detectadas en el plasma de las proteínas TRAIL y FasL eran muy variables en cada uno de los grupos estudiados. Los pacientes del grupo DSSA presentaron concentraciones significativamente más elevadas de TRAIL y FasL al ser comparadas con los pacientes del grupo con DG y los sujetos controles. El TNF- $\alpha$  constituyó la única proteína evaluada que no mostró una diferencia significativa que incluía al grupo con DG. Una marcada variabilidad en las concentraciones plasmáticas del Survivin se constató en los casos estudiados (Figura 4).



**Figura 4.** Cuantificación en plasma por ELISA de las proteínas asociadas a la apoptosis de pacientes brasileños con dengue. Son mostrados las concentraciones de las proteínas plasmáticas TRAIL (A), FasL (B), TNF- $\alpha$  (C) y Survivin (D) en los controles y pacientes según la reciente clasificación de dengue de la OMS. Se utilizó el test de Mann-Whitney para el análisis estadístico mediante el empleo del programa GraphPad Prism 5. Las líneas horizontales representan la mediana del grupo y las verticales se extienden desde el 25 al 75 percentil. Se incluyeron los valores con significación estadística.

Aunque son significativos, existen actualmente pocos estudios en relación a la participación de TRAIL en la infección por VDENV. Un estudio *in vitro* demostró que la liberación de TRAIL por hepatocitos infectados con VDENV podría inducir la apoptosis de hepatocitos no infectados (219). Warke y cols demostraron la participación de TRAIL en la respuesta antiviral durante la infección por VDENV, independiente de la inducción de mecanismos proapoptóticos, en cultivos primarios de células dendríticas y monocitos (246).

En un trabajo previo se detectaron niveles elevados en suero de TRAIL en pacientes venezolanos con dengue. En ese estudio no se realizó una comparación del nivel de TRAIL en la circulación con la gravedad de los pacientes probablemente porque habían solo dos casos de FHD (41). En cambio, en el presente estudio sí se contrastaron los niveles en la circulación de TRAIL en los diferentes grupos de casos con dengue clasificados según las guías recientes de la OMS (1).

De forma interesante, nuestros pacientes clasificados como DSSA presentaron concentraciones plasmáticas aumentadas de TRAIL, aunque con variabilidad alta en la producción de esta proteína, en comparación con los individuos controles y los pacientes graves (DG) (Figura 4. A). Este hallazgo apoya el posible papel antiviral de TRAIL que se describió en un estudio *in vitro* anterior (246). En ese estudio anterior el tratamiento del cultivo de células dendríticas con TRAIL recombinante disminuyó el título de VDEN y además un AcM anti-TRAIL recombinante aumentó el número de copias de VDEN en los cultivos de células endoteliales, de monocitos y de linfocitos B tratados previamente con TRAIL recombinante. También se concluyó en ese trabajo que la acción antiviral del TRAIL era independiente de la apoptosis y que la inducción de TRAIL por el VDEN era regulado por las vías de activación de los IFN  $\alpha/\beta$  o IFN tipo I (247). Otro estudio experimental más reciente (247) con un flavivirus relacionado al VDEN (virus del Nilo Occidental) también demostró el papel antiviral de TRAIL.

Nuestros resultados sugieren que una mayor concentración de TRAIL ejerció una acción antiviral en los casos de DSSA y que por otro lado una menor concentración de TRAIL no brindó probablemente protección antiviral a los casos con DG. El análisis de los resultados de nuestro estudio no explica la menor concentración plasmática de TRAIL en los casos con DG. Sin embargo, no se excluye un mecanismo de inhibición de la inducción del TRAIL por el VDEN en los casos de mayor gravedad que son los que presentan una mayor carga viral. Estudios anteriores han descrito la inhibición de las vías de activación de los IFN  $\alpha/\beta$  (IFN tipo I) por una combinación de proteínas no estructurales del VDEN (NS2A, NS4A, NS4B, NS5) (248). Estas vías también regulan la inducción de TRAIL (246). De manera que especulamos que una inhibición de las vías de activación de los IFN  $\alpha/\beta$  pudiera estar asociada a una expresión menor de TRAIL en los casos con DG.

Un trabajo anterior en niños tailandeses detectó que los niveles plasmáticos de Fas (receptor soluble de FasL) y la proporción media de CMSP que presentaban apoptosis era mayor en niños que presentaban FHD que en los que presentaban FD (20). Ese estudio postuló que la apoptosis podría tener un papel potencial en la inmunomodulación de la respuesta inmune adaptativa al VDEN. En el presente estudio se cuantificó el ligando de Fas (FasL) que se une a su receptor específico Fas en la membrana celular. También se encontró la concentración plasmática mayor de FasL (792,23 pg/mL) en un caso grave el día antes de fallecer. Sin embargo, el grupo DG presentó significativamente menor concentración de esta molécula en comparación con los casos de DSSA (Figura 4. B).

De este modo, el presente trabajo aborda por primera vez en el mundo la participación de FasL en la enfermedad causada por VDEN, su posible asociación con la fisiopatología del dengue y particularmente con la del dengue fatal. Estos hallazgos en conjunto apoyan el potencial papel inmuno-regulador de FasL en la enfermedad causada por VDEN.

En los pacientes del grupo DSSA se cuantificaron concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$  que resultaron elevadas significativamente al compararse con los individuos controles (Figura 4. C). No encontramos diferencias de las concentraciones en plasma de TNF- $\alpha$  entre los tres grupos de pacientes. El TNF- $\alpha$  es una de las citocinas más estudiadas en la infección por VDEN, sin embargo, la asociación del TNF- $\alpha$  con la gravedad del dengue no se comprende completamente. Mientras unos estudios la relacionan con la FHD (14, 100, 101), otros no encuentran la misma asociación (15, 39, 102-104).

Las discrepancias entre los datos publicados en la literatura, incluyendo los nuestros, pueden estar relacionados a varias causas. Diferentes autores han demostrado cómo los polimorfismos genéticos de TNF- $\alpha$  pueden influir en la producción de esta citocina durante el dengue (89, 90, 249) y no se puede excluir que estos polimorfismos hayan influido en los resultados aquí expuestos.

Otro aspecto discutido es la influencia del serotipo viral infectante en la producción de TNF- $\alpha$  durante la infección por VDEN. Un trabajo anterior detectó diferentes niveles de TNF- $\alpha$  liberado en cultivo de CE pulmonares en dependencia de si estas células eran infectadas con VDEN-2 o con otro serotipo, el VDEN-3 (250). En parte de los casos

brasileños estudiados en esta investigación se demostró la infección por VDEN-1, pero en su mayoría la infección fue causada por otro serotipo, el VDEN-2. El diferente serotipo de VDEN que infectó a los pacientes estudiados pudo influir en la liberación del TNF- $\alpha$  durante la enfermedad por dengue.

Adicionalmente, la cinética de TNF- $\alpha$  durante la infección parece influir en la concentración que se detecta en la circulación. Un estudio en niños con dengue demostró que el TNF- $\alpha$  se detecta al inicio de la infección y luego disminuye entre el sexto y el décimo día (101). La toma de las muestras del presente estudio entre el primero y el oncenavo días de inicio de los síntomas, sin analizarse los días exactos de cada determinación, pudiera explicar la ausencia de diferencias significativas en las concentraciones de TNF- $\alpha$  entre los grupos de pacientes.

En el plasma del caso brasileño fatal no se encontró una concentración elevada de TNF- $\alpha$  el día antes de fallecer. Este resultado concuerda con un estudio anterior en el que no se detectó aumento de esta citocina en casos adultos fatales de FHD al compararse con casos sobrevivientes de FHD y pacientes con FD (104).

Se evaluaron, por primera vez en la infección por VDEN, la concentración plasmática de Survivin que es una proteína conocida por su papel antiapoptótico (23, 200). Al cuantificarse esta proteína se observó una variabilidad marcada de las concentraciones circulantes entre los individuos (Figura 4. D). Sin embargo, a diferencia de las restantes proteínas evaluadas en este estudio, el Survivin disminuyó de forma significativa en los pacientes con DCSA comparado con los individuos controles y pacientes graves.

Se ha descrito en estudios previos *in vitro* la participación del Survivin en la proliferación de CE de la micro-vasculatura (re-endotelización) después de la muerte de estas CE por apoptosis (251, 252). Si se tienen en cuenta esos hallazgos anteriores, se puede especular que el Survivin interviene en la regeneración del endotelio micro-vascular en los casos con dengue que presentaron hiper-permeabilidad vascular relacionada a apoptosis de CE.

Finalmente, se debe señalar la influencia que los polimorfismos genéticos de las proteínas apoptóticas ejercen en la producción de estas proteínas. La influencia de los polimorfismos se describe en la producción de TRAIL (253), FasL (254) y Survivin (255) durante enfermedades infecciosas y no infecciosas. Estos polimorfismos genéticos

en los sujetos estudiados pudieran estar relacionados con las diferentes concentraciones que se encontraron en plasma de las proteínas apoptóticas.

#### ***IV.3 Correlaciones entre las concentraciones de las proteínas apoptóticas plasmáticas con los recuentos de las células sanguíneas de los pacientes brasileños con dengue***

Estudiamos en la muestra de sangre periférica obtenida el mismo día, la relación entre las concentraciones de las proteínas apoptóticas plasmáticas con el recuento de plaquetas, el recuento de leucocitos y el porcentaje de linfocitos en las células sanguíneas determinadas en el hemograma, además de la relación con el recuento de monocitos y de sub-poblaciones de linfocitos por citometría de flujo. Las concentraciones de TRAIL se correlacionaron positivamente con el recuento de plaquetas. De forma interesante observamos una correlación inversa entre las concentraciones de TRAIL con el recuento de linfocitos. Es notable que el Survivin estaba correlacionado positivamente con el recuento de leucocitos y linfocitos totales y además con el recuento de monocitos CD14+ (Tabla 4). No se encontró ninguna correlación entre las concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$  y FasL con el recuento de células sanguíneas (datos no mostrados).

La correlación inversa entre la cuantificación de TRAIL y el recuento de linfocitos circulantes sugiere que esta molécula posiblemente participa en un mecanismo inductor de apoptosis de linfocitos. Un mecanismo similar de inducción de apoptosis se encontró anteriormente en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana o VIH (201), niños con bronquiolitis por infección con virus sincitial respiratorio (256), individuos infectados con el coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (257) y pacientes infectados con el virus del sarampión (258).

La inducción aparente de apoptosis linfocitaria por el TRAIL en los casos estudiados y el aumento significativo de esta molécula en los casos no graves sugieren que el TRAIL podría estar vinculado con la muerte de clones de linfocitos causantes de la respuesta inmune no protectora. Esta respuesta es responsable en parte de las manifestaciones más graves del dengue. Sin embargo, nuestros resultados solo permiten hacer limitadas inferencias en este sentido debido a que la respuesta específica de los linfocitos sanguíneos contra el VDEN a nivel experimental no se abordó en el presente trabajo.

**Tabla 4.** Correlaciones entre las concentraciones de las proteínas apoptóticas plasmáticas con los recuentos de las células sanguíneas de los pacientes brasileños con dengue.

<b>Células sanguíneas</b>	<b>TRAIL</b>	<b>Survivin</b>
Plaquetas/mm <sup>3</sup>	$R = 0.443^{n=54} \dagger$ $p = 0.0008$	ns
Leucocitos/mm <sup>3</sup>	ns‡	$R = 0.333^{n=48}$ $p = 0.02$
Linfocitos/mm <sup>3</sup>	$R = (-) 0.525^{n=44}$ $p = 0.0003$	$R = 0.376^{n=44}$ $p = 0.01$
Linfocitos (%)	$R = (-) 0.572^{n=44}$ $p < 0.0001$	ns
Monocitos CD14+ /mm <sup>3</sup>	ns	$R = 0.428^{n=27}$ $p = 0.03$
Linfocitos T CD4+ /mm <sup>3</sup>	$R = (-) 0.647^{n=27}$ $p = 0.0003$	ns
Linfocitos T CD8+ /mm <sup>3</sup>	$R = (-) 0.727^{n=27}$ $p < 0.0001$	ns

Se realizó una correlación de Spearman utilizando el programa GraphPad Prism versión 5. La correlación directa se considera cuando el valor de R es positivo y correlación inversa cuando R es negativo. Los valores de p se consideraron significativos cuando:  $p < 0,05$ . †n, representa el número de pares disponibles analizados; ‡ns, se refiere a la correlación no significativa.

En este estudio se observó una correlación positiva entre las concentraciones plasmáticas de TRAIL y los recuentos de plaquetas. Estudios experimentales anteriores demostraron la regulación de la megacariopoyesis por el TRAIL (259) y la inducción del desarrollo de megacarioblastos de médula ósea humana normal en plaquetas por el TRAIL (260). El TRAIL también específicamente incrementa los antígenos de diferenciación (CD61 y CD42b) de megacariocitos en cultivo (261). Adicionalmente se ha demostrado *in vitro* que las plaquetas activadas liberan TRAIL (262). Se necesitarían más estudios para determinar si el TRAIL está asociado al incremento de las plaquetas o

si las plaquetas activadas están liberando esta proteína durante la infección por VDEN. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que los recuentos disminuidos de plaquetas en los casos graves de dengue del presente estudio (Tabla 3) estén relacionados con una disminución de TRAIL en la circulación.

Es significativo señalar que este trabajo sugiere una relación de TRAIL con un buen pronóstico de la enfermedad mediante dos posibles mecanismos protectores. Primeramente por el aumento de TRAIL en los casos de DSSA que apoya su posible efecto antiviral demostrado anteriormente *in vitro* (246) y en segundo lugar que esta proteína se correlacionó positivamente con el aumento del recuento de plaquetas.

Un hallazgo interesante de este estudio constituyó la correlación positiva entre las concentraciones de Survivin y el recuento de leucocitos y linfocitos, además de los monocitos CD14+. El Survivin es una proteína clásicamente conocida como inhibidora de la apoptosis al bloquear las caspasas que son proteasas intracelulares esenciales en el proceso apoptótico (200). Por otra parte, en un estudio *in vitro* se describió que el Survivin mediaba la activación de las cadenas alfa de las  $\beta$ -integrinas en las membranas de los leucocitos y de esa manera participaba activamente de la migración de estas células inflamatorias (263). Adicionalmente, el Survivin se encuentra relacionado a la división linfocitaria y a la expansión clonal (264).

Aunque este trabajo no verificó experimentalmente la liberación al medio extracelular y la acción extracelular del Survivin en los leucocitos sanguíneos, la correlación positiva de esta molécula con el número de leucocitos en la sangre sugiere que uno de los mecanismos por el que el Survivin se asoció al aumento de leucocitos y particularmente de monocitos puede ser la inhibición de la apoptosis de estas células en los pacientes estudiados. Para conocer si el Survivin aumenta la migración y proliferación de células inflamatorias durante el dengue se necesitarían otros estudios inmunológicos.

En resumen, en nuestro trabajo se observó variabilidad de las diferentes proteínas apoptóticas estudiadas en el plasma. No podemos descartar que la mayor plaquetopenia de los casos graves esté relacionada a las concentraciones disminuidas de TRAIL. También, nuestros resultados sugieren que el TRAIL puede estar asociado a la inducción de apoptosis linfocitaria y que podría participar en la respuesta antiviral de los pacientes con dengue. En cambio, el Survivin pudiera ejercer un papel

antiapoptótico en leucocitos, linfocitos y monocitos sanguíneos durante la enfermedad causada por VDEN. Una función inmuno-reguladora pudiera ser desarrollada por el FasL en las diversas formas clínicas de dengue incluyendo el dengue fatal. No encontramos relaciones entre las concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$  con la gravedad del dengue probablemente a causa de la ausencia de estratificación cinética de las muestras tomadas, sin excluir la influencia de diferentes factores virales y del hospedero.

#### ***IV.4 Casos cubanos fatales por dengue: clasificación clínica, parámetros de laboratorio y hallazgos de necropsia***

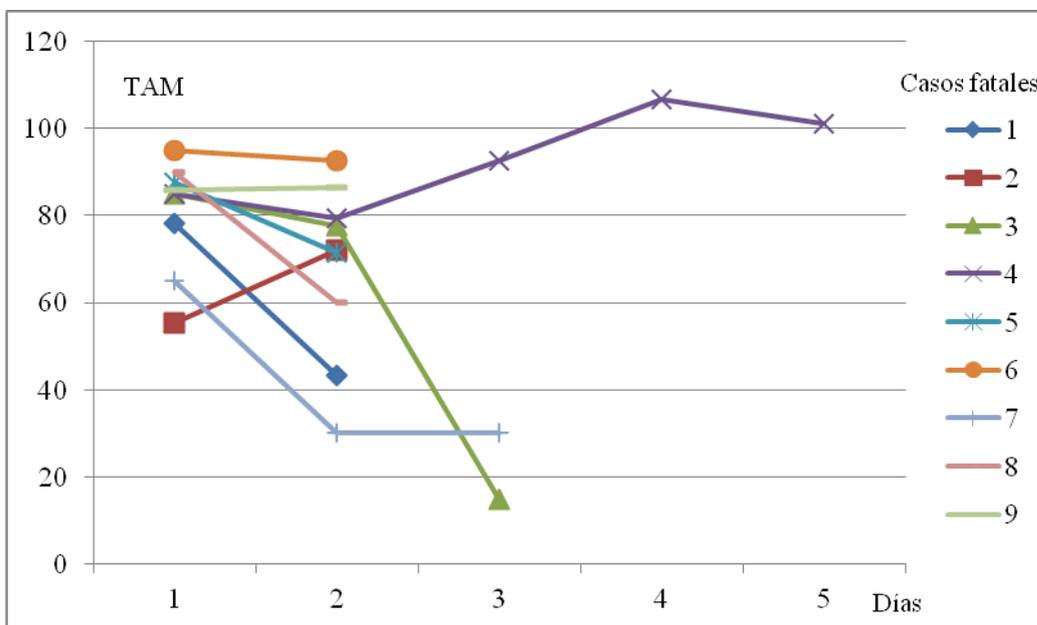
En la realización de esta investigación se tomaron tejidos FFIP provenientes de hígado, cerebro, intestino, pulmón, riñón, bazo y corazón de necropsias de nueve casos fallecidos por FHD/SCD (grado III-IV) en Cuba. De la epidemia del año 1997 se examinaron seis casos y de la epidemia del año 2001 se estudiaron dos casos, para un 50% y 66.6% respectivamente, del total de fallecidos en estas epidemias. De la epidemia del 2006 se estudió un único caso. Los nueve casos fatales estudiados eran todos adultos, de 25 a 50 años de edad y con una media de edad de 36 años. Este grupo de individuos estuvo constituido por seis hombres y tres mujeres.

Los ocho casos con FHD/SCD de las epidemias de los años 1997 y 2001 presentaban infección secundaria por VDEN confirmada mediante serología (MAC-ELISA y MEI de dengue). En el caso fallecido del 2006 solo se obtuvo el resultado positivo del MAC-ELISA y no se confirmó serológicamente si se trataba de una infección secundaria.

Se ha demostrado anteriormente que la infección secundaria es uno de los factores de riesgo más significativos para desarrollar la FHD/SCD (76, 91, 208). Sin embargo, este factor de riesgo no se ha encontrado en todos los casos fatales de dengue al informarse también fallecimientos por la infección primaria con VDEN (93, 145, 265, 266).

En los nueve individuos de nuestro estudio el choque comenzó en el cuarto día de la enfermedad y se prolongó como media durante dos días hasta el desenlace fatal. Llamó la atención cómo luego de iniciado el choque no se estabilizaron las cifras de tensión arterial en la gran mayoría de estos sujetos (Figura 5). La defunción de los casos

estudiados ocurrió en una media de 6 días (Tabla 5) de forma similar a como se ha descrito previamente (111, 265, 267). Sólo el caso 4 presentó una enfermedad con una duración prolongada de 13 días. Sin embargo, se han informado en la literatura casos fatales de estancia hospitalaria de 18 días (93, 267).



**Figura 5.** Promedio diario de la tensión arterial media (TAM) de los nueve casos fatales de dengue durante los días con choque (TAM normal = 100).

Se identificaron manifestaciones clínicas de extravasación de plasma (Tabla 5), sobre todo hidrotórax y ascitis (77%), en los casos fatales estudiados. Este resultado demuestra que la fuga capilar es un signo patognomónico de la FHD/SCD (7). Entre las manifestaciones hemorrágicas que se presentaron en los casos se encontró principalmente hematemesis (62.5%) y petequias (50%). Hallazgos similares se describen en otros estudios de casos fatales por dengue (93, 111, 265).

Se encontró plaquetopenia en todos los casos estudiados, entre  $90$  y  $2 \times 10^9$  cél/L, con una media estadística de plaquetas circulantes de  $38 \times 10^9$  cél/L (Tabla 6). Se presentaron cifras de plaquetopenia severa ( $\leq 50 \times 10^9$  cél/L) en el 66% de los fallecidos. De manera que la plaquetopenia se asoció a la presencia de choque como se documentó antes en casos severos de dengue (241, 242, 268, 269).

**Tabla 5.** Hallazgos clínicos-patológicos de casos fatales de FHD/SCD de epidemias cubanas de dengue de los años 1997, 2001 y 2006.

Casos fatales *	Edad/ Sexo†	Enfermedad Crónica	Días de enfermedad	Día de inicio de SCD	Hidro pericardio	Ascitis	Hidrotórax	Hemorragias
1	30/M	HTA‡, diabetes mellitus	4	3	-	250 mL¶	-	Petequias, hematemesis, melena, hemorragia pulmonar¶
2	45/F	Úlcera duodenal	4	4	-	1500 mL¶	Bilateral (300 mL)¶	Metrorragia, hemorragia gastrointestinal¶ y subaracnoidea focal¶
3	27/F	-	6	2	-	-	-	Petequias, hematemesis
4	36/F	-	13	4	Ecocardiograma	250 mL¶	Bilateral (500 mL)¶	Petequias, gingivorragia, metrorragia, hemorragia conjuntival, subaracnoidea y pulmonar¶
5	50/M	Enfermedad de Cronh	5	5	-	Ultrasonido abdominal	Edema pulm¶#	Hematemesis
6	43/M	Úlcera péptica	6	5	-	2000 mL¶	Bilateral (2000 mL)¶	Petequias, equimosis y hematemesis
7	25/M	Rasgo de ACF§	4	3	-	1500 mL¶	Bilateral (200-300 mL)¶	Hematuria y equimosis
8	34/M	Rasgo de ACF	6	4	250 mL¶	-	Derecho (150 mL)¶ Edema pulm#	Hematemesis y gingivorragia
9	41/F	-	5	5	-	Severa	Severo	Hemorragia gastroduodenal y subaracnoidea

\*Casos fatales de FHD/SCD, casos 1 al 6 de epidemia por VDEN-2 en año 1997, casos 7 y 8 de epidemia por VDEN-3 en año 2001, caso 9 de epidemia por VDEN-4 en año 2006; †M, masculino; F, femenino; ‡HTA, hipertensión arterial; §ACF, anemia de células falciformes; ¶Informe de necropsia; #Edema pulm, edema pulmonar como signo de extravasación de plasma.

**Tabla 6.** Distribución según sexo y alteraciones hematológicas de casos fatales por FHD/SCD de las epidemias cubanas de dengue de los años 1997, 2001 y 2006.

Alteraciones hematológicas*	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Caso 8	Caso 9
Sexo†	M	F	F	F	M	M	M	M	F
Anemia (g/dL)	-	-	-	6.3	8.4	-	-	9	-
Hemoconcentración	0.52	0.46	0.45	0.30‡	0.27‡	nd§	0.48	0.48	0.56
Leucopenia (x1000/mm <sup>3</sup> )	-	3.8	-	3.5	-	-	-	-	-
Leucocitosis (x1000/mm <sup>3</sup> )	11.2	-	16	-	-	-	-	17	18
Linfocitosis (%)	-	0.60	-	-	0.70	0.60	-	-	-
Linfopenia (%)	-	-	0.02	-	-	-	-	-	8.3
Plaquetopenia (x1000/mm <sup>3</sup> )	90	37	2	24	6	10	35	80	63

\*Se tomaron los valores extremos de las alteraciones hematológicas (según sistema tradicional de unidades) encontradas en las historias clínicas; †Sexo; M, masculino; F, femenino; ‡valor de hematocrito luego de tratamiento con líquidos endovenosos; §nd; no disponible el dato en la historia clínica.

Se presentó leucopenia solamente en los casos 2 y 4 (22%). La leucopenia es un criterio diagnóstico de la forma menos severa del dengue, FD y DSSA, tanto en la clasificación tradicional de la OMS (10) como en la reciente clasificación (1). La leucopenia se demostró anteriormente hasta en el 28,6% (265) y 50% (147) de fallecidos por dengue. Por otro lado, un estudio reciente demostró esta alteración hematológica 48 horas antes de morir en el 22,2% de los casos de dengue (267). Estos resultados coinciden con nuestros hallazgos sobre la frecuencia de leucopenia antes de la muerte por dengue.

Ocurrió leucocitosis en los casos 1, 3, 8 y 9. Aunque en uno de los trabajos recientes anteriormente mencionados se asoció la leucocitosis a la bacteriemia (267), un estudio anterior no documentó diferencias significativas entre la presencia de leucocitosis y bacteriemia en pacientes con FHD/SCD (147). En nuestros casos con leucocitosis no se realizó ninguna confirmación de infección bacteriana sobreañadida.

La linfocitosis se presentó en tres pacientes del estudio y la linfopenia se observó en los casos 3 y 9 que mostraron también leucocitosis durante la enfermedad. La activación y proliferación de los linfocitos en el dengue se relaciona al intento de eliminar el virus. Los linfocitos B sintetizan las inmunoglobulinas que pueden neutralizar al virus pero que también pueden ocasionar el ADE. Por otro lado, los linfocitos T lisan células infectadas y además liberan los factores proinflamatorios que provocan la tormenta de citocinas (94).

La anemia (casos 4, 5 y 8) en nuestro estudio no se presentó asociada a la úlcera péptica como se ha planteado anteriormente (270). Sin embargo, parte de estos casos con anemia sí sufrieron importantes hemorragias.

Seis de los nueve casos fatales estudiados presentaban antecedentes de alguna enfermedad crónica como la DM tipo 2 (caso 1) y rasgo de anemia de células falciformes (casos 7 y 8) (Tabla 5). Estas co-morbilidades se asociaron por primera vez a las formas más severas de dengue en la epidemia del año 1981 en Cuba (91).

En resumen, en los nueve casos cubanos fallecidos de FHD/SCD se observó una serie de manifestaciones clínicas, hallazgos anatomo-patológicos y alteraciones hematológicas documentadas anteriormente en la forma más severa del dengue.

#### **IV.5 Detección de antígenos virales en los tejidos de casos cubanos fatales por dengue entre los años 1997-2006**

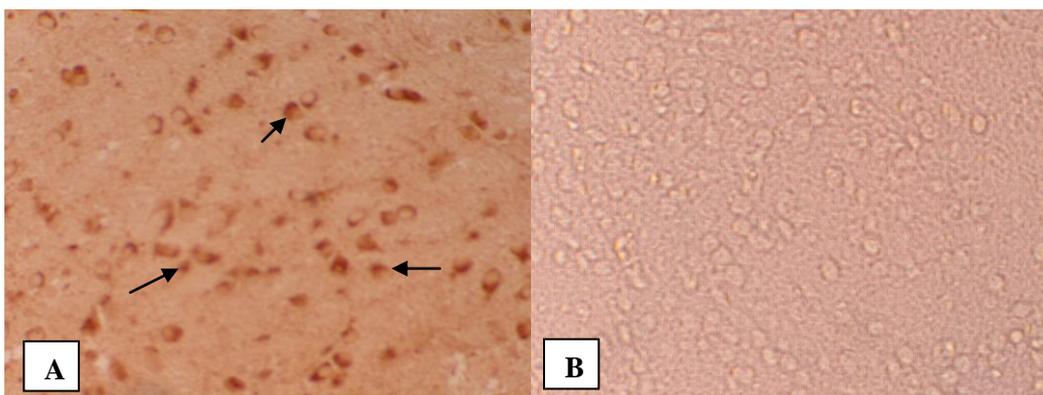
En este estudio se demostró la presencia de antígenos de VDEN mediante IHQ en focos de necrosis hepática y algunas células de Kupffer en dos individuos fallecidos (casos 1 y 3) de la epidemia de VDEN-2 en el año 1997 (Tabla 7). Este hallazgo incluye el 50% de los hígados examinados de casos fatales de la epidemia de Santiago de Cuba. La IHQ se validó y resultó positiva cuando se utilizaron dos anticuerpos diferentes anti-VDEN como anticuerpos primarios: el AcP anti-VDEN-2 y el AcM H3-6 (Figura 6. A y B).

**Tabla 7.** Resultados de la detección de antígenos de VDEN por IHQ y detección de apoptosis por la técnica de TUNEL en tejidos FFIP de casos cubanos fatales por FHD/SCD entre los años 1997-2001.

<b>Casos fatales por FHD/SCD *</b>	<b>Serotipo de VDEN</b>	<b>Tejidos FFIP†</b>	<b>Antígenos de VDEN</b>	<b>Apoptosis</b>
1	VDEN-2	Cerebro, Intestino, Hígado	Hígado	Cerebro, Intestino, Hígado
2	VDEN-2	Pulmón	-	-
3	VDEN-2	Cerebro, Hígado	Hígado	Cerebro
4	VDEN-2	Cerebro	-	Cerebro
5	VDEN-2	Intestino, Pulmón, Hígado	-	Pulmón, Hígado
6	VDEN-2	Cerebro, Intestino, Pulmón, Hígado	-	Cerebro
7	VDEN-3	Intestino, Cerebro, Corazón	-	Cerebro
8	VDEN-3	Intestino, Corazón	-	-

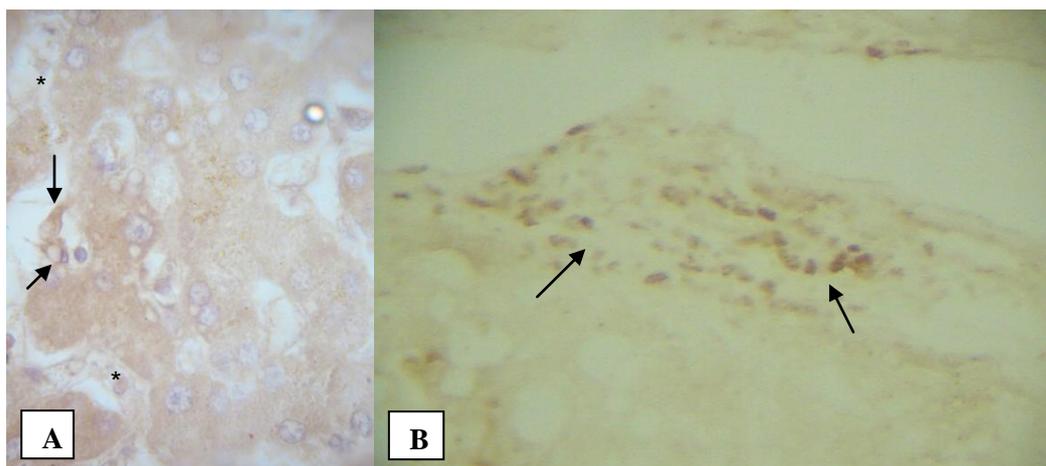
\*Casos fatales por fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) de las epidemias de Santiago de Cuba (casos 1-6) y La Habana (casos 7-8); † FFIP, fijados en formalina e incluidos en parafina.

En la literatura se ha descrito anteriormente la inmuno-detección de antígenos de diferentes serotipos de VDEN en cortes hepáticos de casos fatales (43, 113, 115). Estos trabajos previos y los resultados de nuestro trabajo apoyan la participación del hígado como órgano diana en la enfermedad causada por VDEN (271).



**Figura 6.** Validación de controles de tejidos de la técnica de IHQ en cortes de cerebro de ratón. **(A)** Se presentan células cerebrales positivas (flechas) del control positivo de VDEN al utilizar el AcM H3-6 anti-VDEN en corte de cerebro de ratón inoculado con VDEN-2 (x400). **(B)** Control negativo en corte de cerebro de ratón (x400).

En el caso 3 se demostró la presencia de antígenos de VDEN en escasas células de Kupffer y en algunos hepatocitos adyacentes (Figura 7. A). Los antígenos virales se inmuno-localizaron principalmente en varios focos de necrosis medio-zonales hepáticos de ambos casos (casos 1 y 3) que presentaban además infiltrado inflamatorio agudo (Figura 7. B). No se detectaron antígenos virales en células del epitelio sinusoidal hepático.



**Figura 7.** Detección de antígenos de VDEN por IHQ en tejidos hepáticos de casos cubanos fatales. **(A)** En el caso 3 se inmuno-localizaron antígenos de VDEN en escasas células de Kupffer (flechas) y algunos hepatocitos al utilizar un AcM H3-6 anti-VDEN. Las células endoteliales sinusoidales eran negativas (asteriscos) (x400). **(B)** Se observa un foco de necrosis peri-portal en un corte de hígado del caso 1 con presencia de tinción positiva por IHQ (flechas) al utilizar el AcP anti-VDEN-2 (x200).

Anteriormente se había demostrado en el hígado de fallecidos por dengue la presencia de antígenos de VDEN (42, 43, 112, 115, 120) asociados específicamente a focos de necrosis (42, 43, 120). En uno de estos estudios coincidió la detección de los antígenos virales (IHQ automatizada de alta sensibilidad) con el RNA viral (RT-RCP *in situ*) en hepatocitos de pacientes fallecidos por fallo hepático debido a FHD/SCD (120). Más recientemente, un trabajo demostró los cuatro serotipos de VDEN en diferentes tejidos FFIP de fallecidos por dengue mediante RT-PCR e IHQ (116). Estos hallazgos anteriores y nuestros resultados en tejidos humanos corroboran las observaciones anteriores en líneas celulares de hepatoma (272-274) y en cultivo primario de hepatocitos humanos (26) en las que se demostró replicación del VDEN.

En cortes de hígado del caso 3 se detectaron antígenos virales en células de Kupffer como se documentó anteriormente (112-114, 116, 117). En estas células fagocíticas no se ha demostrado anteriormente la multiplicación viral efectiva *in vitro* (275) ni ácido nucleico viral en cortes de tejidos de fallecidos por dengue mediante hibridación *in situ* (113). Sin embargo, en un estudio previo sí se demostró la presencia de ARN viral en células de Kupffer por RT-PCR *in situ* en cortes de hígado de nueve casos fatales de dengue con fallo hepático (120).

En este estudio no se demostró la presencia de antígenos de VDEN en tejido intestinal, pulmonar, cerebral, renal, esplénico y cardíaco. Estos resultados coinciden con otros autores que no han encontrado antígenos de VDEN en tejido intestinal y cardíaco (42, 113, 116). Sin embargo, en casos fatales por dengue sí se han documentado anteriormente antígenos de VDEN mediante IHQ en cortes de tejido cardíaco, cerebral (114, 115, 134, 276) y pulmonar (113, 115).

No se detectaron antígenos virales por IHQ en los cortes de tejidos examinados del caso fatal del año 2006 de La Habana. En los tejidos de este caso no se estudió la apoptosis por la técnica de TUNEL.

En este estudio postulamos que no se detectaron más células con antígenos virales en los tejidos examinados por la posible destrucción parcial de los antígenos en el procesamiento posnecropsia de los tejidos mediado por formol. También pudo intervenir en el resultado que no se utilizó en este análisis histopatológico una técnica de IHQ de muy alta sensibilidad (233).

En conclusión, este trabajo de detección de antígenos de VDEN en tejidos de fallecidos cubanos confirmó la presencia de VDEN en cortes de hígado. Sin embargo, no se encontraron antígenos virales en otros órganos como el cerebro, pulmón y corazón en los que se han documentado también su presencia.

#### ***IV.6 Detección de células apoptóticas en los tejidos de casos cubanos fatales por dengue entre los años 1997-2001***

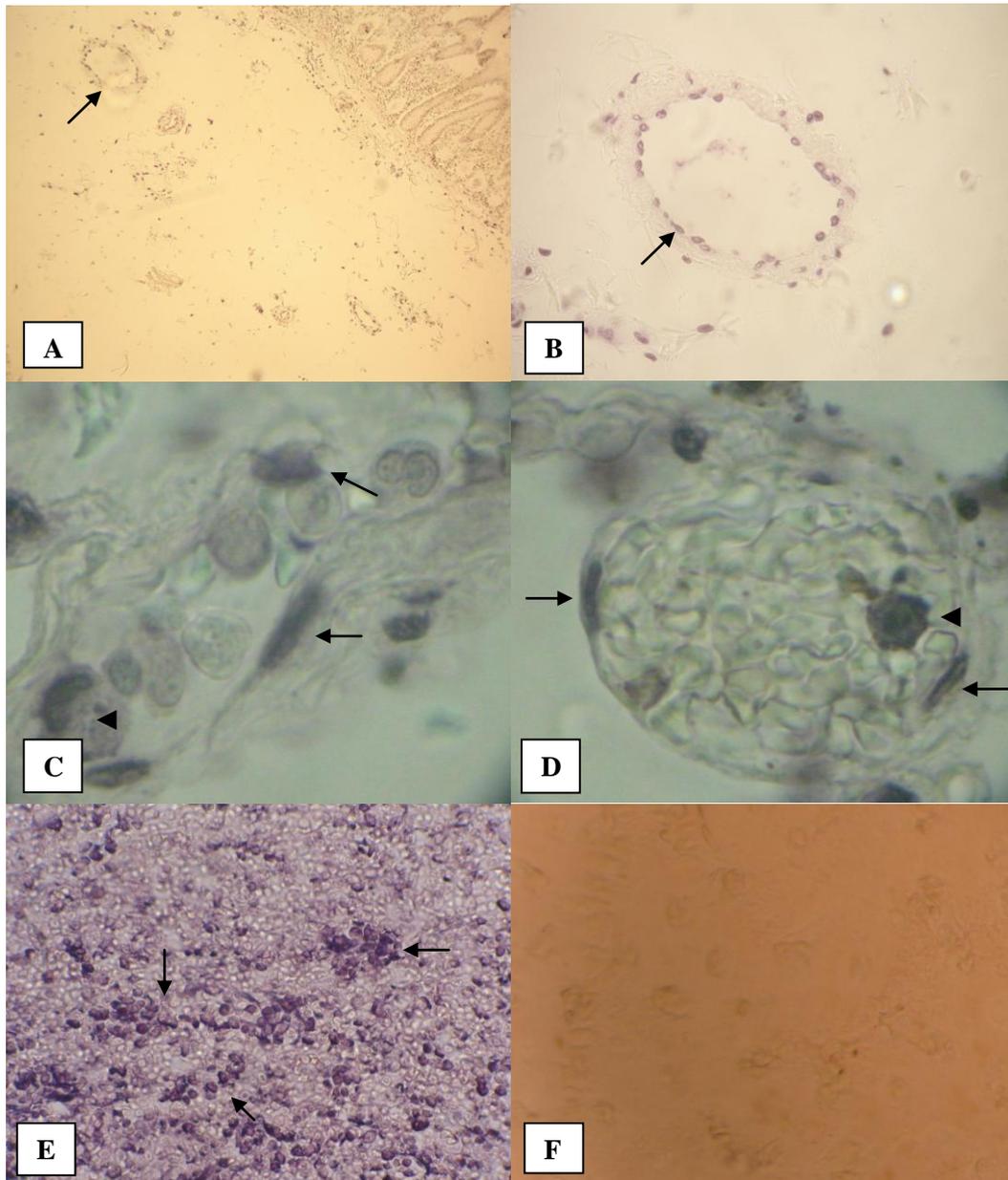
En el presente estudio se examinaron tejidos de ocho fallecidos de FHD/SCD con la técnica de TUNEL y se demostró apoptosis en seis casos. Cinco fallecidos de la epidemia de Santiago de Cuba en el año 1997 se encontraban infectados con VDEN-2 y un fallecido de la epidemia del año 2001 en La Habana con VDEN-3. Se detectó apoptosis en el 47.37% del total de tejidos FFIP estudiados. Se observaron células con reacción positiva de TUNEL y cambios morfológicos característicos de apoptosis en cortes de cuatro órganos: hígado, cerebro, intestino y pulmón. Solamente en las células cardíacas no se encontró ADN nuclear fragmentado (TUNEL positivo) (Tabla 7).

Se debe resaltar que la apoptosis en tejidos de casos fatales por dengue únicamente se había demostrado con anterioridad en el hígado de un fallecido en Francia (42) y de cinco niños vietnamitas (42, 43). De manera que nuestro resultado incrementa el número de órganos en los que se ha descrito la apoptosis en tejidos de casos con dengue.

Se ha encontrado que la replicación del VDEN en una línea humana de CE de la micro-vasculatura (213, 277) induce la muerte celular apoptótica. También se ha propuesto, basándose en estudios *in vitro* y en estudios en modelos animales, que mecanismos inmunes a través de mediadores proinflamatorios como el TNF- $\alpha$  en el suero (34, 278) y anticuerpos anti-NS1 (contra la proteína viral NS1) de reactividad cruzada con proteínas de las CE humanas (205, 206) inducen la apoptosis de estas células del endotelio. Los resultados de estos trabajos especulan que la apoptosis de las CE de la micro-vasculatura podría participar en la extravasación de plasma y la hemorragia encontrada en el dengue.

De forma interesante, CE apoptóticas de la micro-vasculatura (Figura 8) y extravasación de plasma se observaron en dos de los casos cubanos fatales por FHD/SCD (Tabla 5) sugiriendo una posible relación entre ambos fenómenos. El caso 1 presentó apoptosis de las CE de la micro-vasculatura de la submucosa intestinal acompañado de edema local de esta submucosa y de ascitis. Por otro lado, el caso 5 presentó apoptosis de las CE de la micro-vasculatura de los alvéolos pulmonares además de edema pulmonar. Esta es la primera vez que se describe apoptosis de las CE en casos fatales de dengue, un fenómeno descrito previamente en investigaciones con VDEN en líneas celulares (31, 33, 34, 213, 277) y en modelos animales (36, 220, 279).

Por otro lado, no podemos excluir que las CE apoptóticas de la micro-vasculatura intestinal del caso 1 estén relacionadas a las manifestaciones de hemorragia gastrointestinal (hematemesis y melena) que presentó este paciente. Este postulado tiene en cuenta un modelo murino de hemorragia por VDEN que asoció las CE en apoptosis de la micro-vasculatura de los tejidos subcutáneos con las hemorragias locales (36, 220).



**Figura 8.** Apoptosis en tejidos de casos fatales por dengue y tejidos controles. (A) Se observan pequeños vasos sanguíneos (flecha) de la submucosa intestinal del caso 1 que presentan células endoteliales positivas en la reacción de TUNEL. También se aprecia edema importante de esta submucosa (x100). (B) Se muestran células endoteliales de la micro-vasculatura de la submucosa intestinal, de la misma área de (A), con los núcleos TUNEL positivos (x400). (C) y (D) Se observan células endoteliales con núcleo TUNEL positivo (flechas) en la micro-vasculatura de los alvéolos pulmonares del caso 5. Se presentan adicionalmente leucocitos apoptóticos, probablemente monocitos (punta de flecha), en el interior de estos pequeños vasos sanguíneos alveolares (x1000). (E)

Control positivo de TUNEL (flechas) en amígdala humana tratada con DNAasa I (x400). (F) Control negativo de TUNEL en amígdala humana (x400).

Llama la atención que el caso 1 padecía de DM tipo 2 y que estudios previos han asociado la DM tipo 2 con la producción incrementada de citocinas (280-282). Específicamente, se documentó que el TNF- $\alpha$  presente en el suero de pacientes con DM tipo 2 induce la apoptosis de CE vasculares *in vitro* (280). Además, se documentan altos niveles de la proteína quimo-atrayente de monocitos 1 o el MCP-1 (del inglés *monocyte chemoattractant protein-1*) (281) y el VEGF (282, 283) en pacientes con DM tipo 2.

De igual forma, se describe la inducción *in vitro* de apoptosis en las CE de la micro-vasculatura por altos niveles de TNF- $\alpha$  en el suero de pacientes con dengue (34). También se documentó una alta expresión de MCP-1 en diferentes células linfoides sanguíneas infectadas *in vitro* con VDEN (284, 285), un elevado nivel de MCP-1 en la circulación de pacientes con FD (286) y FHD/SCD (284, 285) y más recientemente en casos de DCSA (287). En uno de estos estudios anteriores el MCP-1 se vinculó al incremento de la permeabilidad de las CE vasculares humanas en cultivo (284). Por otra parte, el incremento del VEGF circulante se relacionó con la severidad del dengue (288, 289) y particularmente con la regulación de la permeabilidad vascular en la FHD/SCD (288).

Este conjunto de estudios previos en dengue y DM tipo 2 sugieren que la hiperproducción de citocinas en pacientes diabéticos podrían predisponerlos durante la enfermedad causada por VDEN a la fuga capilar y por tanto también al dengue severo a través del daño o apoptosis del endotelio micro-vascular. Nuestro estudio es el primero en describir apoptosis en un paciente con DM que fallece por dengue.

Particularmente durante el dengue la muerte de las CE no solo se relacionaría a la pérdida de la función endotelial de barrera continua semi-permeable, sino que quedaría abolida la participación de estas células activadas en la respuesta inmune innata/adaptativa al no liberar mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios importantes para controlar la enfermedad. Estos mediadores son las citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-7, IL-10, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IFN- $\beta$ , VEGF, las quimocinas RANTES, CXCL9, CXCL10, CXCL11 y el factor B de la properdina del complemento (99, 250, 290). También durante el proceso de muerte por apoptosis de las CE se comprometerían las

funciones homeostáticas del endotelio como la de mantener el tono vasomotor que contribuye al control de la tensión arterial y perfusión tisular, la adhesión y trans migración de leucocitos circulantes, el tráfico de nutrientes en la circulación y la regulación de mecanismos pro y anticoagulantes (291, 292).

A pesar de no detectarse antígenos virales por IHQ en el intestino y pulmón de los casos 1 y 5 respectivamente, no se puede descartar que la replicación del VDEN haya desencadenado la apoptosis en las CE de la micro-vasculatura de estos tejidos. Sin embargo, los antígenos de VDEN en tejidos intestinales de casos fatales por dengue no se han detectado previamente mediante IHQ (42, 113, 115).

Un estudio previo describió la detección de antígenos de VDEN en el endotelio vascular pulmonar humano pero la hibridación *in situ* no demostró el ARN viral en estas células (113). En un trabajo más reciente se confirmó por IHQ la proteína viral NS3 en las CE de la micro-vasculatura del bazo pero la RT-PCR de VDEN resultó negativa en el tejido de dicho órgano (115). Además, otra investigación histopatológica reciente documentó la presencia de antígenos virales en las CE de pequeños vasos sanguíneos en los cortes de tejido de corazón de un niño con miocarditis fatal por dengue (293). Sin embargo, existe también un grupo de estudios de IHQ en fallecidos por dengue que no describen antígenos virales en el endotelio vascular (116, 120, 134, 145, 294).

Se ha sugerido que estas proteínas virales en el endotelio vascular pulmonar podrían corresponder a la macro-pinocitosis de los antígenos virales (113) o menos probablemente al depósito de inmuno-complejos y no a la replicación viral (207, 295). Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de una infección temporal y productiva de las CE en la fase temprana o pre-mortem de la enfermedad contribuyendo así a la viremia, liberación de mediadores proinflamatorios y modulación de la coagulación (296).

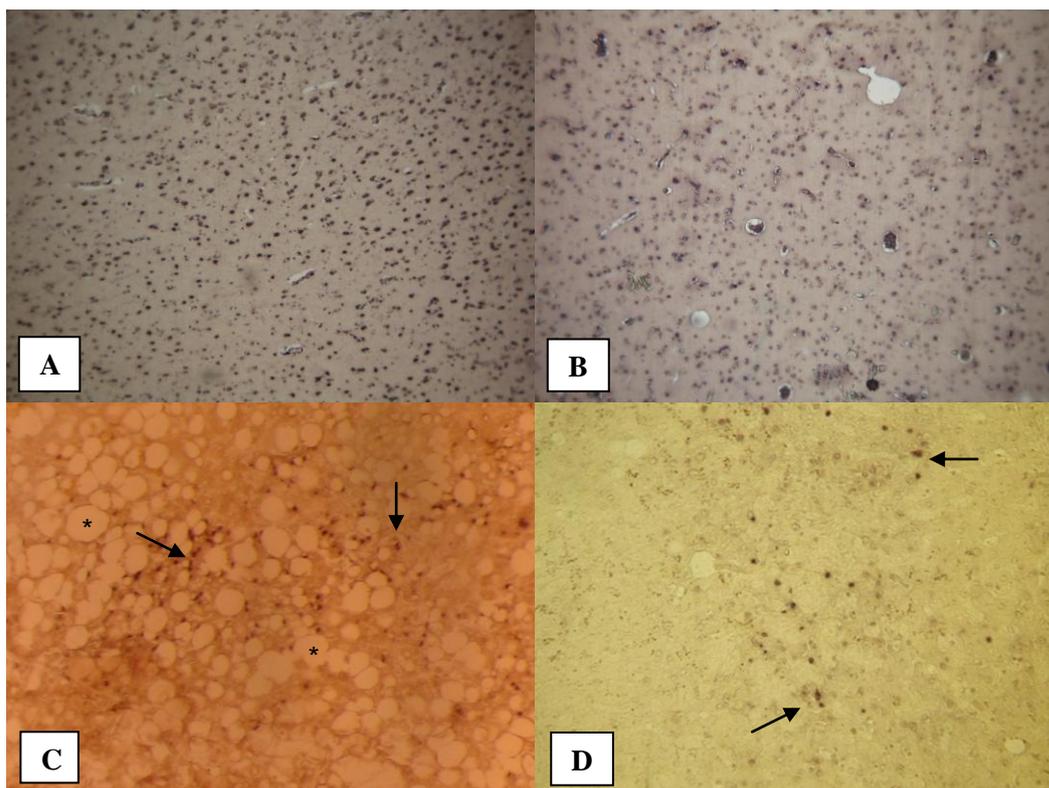
Existen elementos que pueden explicar el por qué no se observaron las CE de la micro-vasculatura positivas con la técnica de TUNEL en los cinco tejidos estudiados con extravasación de plasma de cuatro casos fatales. Una posible explicación es que estas CE al morir por apoptosis como están expuestas siempre al flujo sanguíneo se desprenden rápidamente de los vasos sanguíneos para entrar en la circulación y luego ser eliminadas (297). Otra causa adicional puede ser el carácter focal de la apoptosis

endotelial y por tanto este fenómeno no estaba presente en los cortes examinados del tejido (292). Sin embargo, es importante resaltar que no se observaron CE apoptóticas en la micro-vasculatura de nueve muestras de tejidos provenientes de órganos que no presentan extravasación de plasma como son el cerebro y el hígado.

Las células apoptóticas son eliminadas eficiente y rápidamente de los tejidos y estas se observan de forma infrecuente en tejidos normales (190). Se calcula que el humano adulto sano posee alrededor de un millón de millones o  $10^{13}$  de CE, que pesarían como 1 kg y cubrirían entre 4000 a 7000 m<sup>2</sup> (298) (para tener una idea más gráfica, una cancha de futbol convencional tiene solo 1000 m<sup>2</sup>, <http://www.wikipedia.org>). Sin embargo, en ausencia de un estado patológico, se estima que solo un pequeño porcentaje (< 0,1%) de este billón de células está muriendo por apoptosis (292). Específicamente relacionado con la observación de la apoptosis durante el curso de una enfermedad, Hotchkiss y cols estudiaron este fenómeno en pacientes fallecidos por sepsis y no detectaron la apoptosis de forma significativa en las CE de los mismos (297, 299).

El papel del daño del endotelio en el dengue es tan relevante en la fisiopatología de esta enfermedad que una estrategia terapéutica que contrarreste este daño celular sería de enorme beneficio clínico. Por tanto, los resultados del ensayo de levostatina en dengue (170) son de importancia para el campo de la terapia específica del dengue.

En este estudio se detectó fragmentación de ADN nuclear (reacción de TUNEL positiva) de numerosas células cerebrales en los cortes de los cinco cerebros estudiados (casos 1, 3, 4, 6 y 7) (Figura 9. A y B). En estos tejidos no se detectaron antígenos de VDEN por IHQ ni se observó reacción inflamatoria.



**Figura 9.** Apoptosis en tejidos de fallecidos por dengue. Se muestran abundantes células apoptóticas cerebrales en la reacción de TUNEL del tejido cerebral del caso 4 (A) y caso 7 (B) (x100). (C) Se observa corte hepático del caso 1 con células hepáticas TUNEL positivas agrupadas (flechas), también se observan abundantes vacuolas de grasa (asteriscos) (x100). (D) Se presentan células con núcleos TUNEL positivos (flechas) distribuidos a lo largo del corte de hígado del caso 5 (x100).

Anteriormente se había sugerido que la apoptosis podría ser un mecanismo patogénico de la infección por VDEN en el cerebro humano durante la FHD/SCD. Este postulado se basó en estudios de inoculación del VDEN en líneas celulares de neuroblastoma de ratón (24), de neuroblastoma humano (212) y en el sistema nervioso central de ratones lactantes (35). En la actualidad se considera que el VDEN es neuro-virulento y puede ocasionar enfermedad neurológica grave que lleva a la muerte (144, 300). De hecho, en la más reciente clasificación de dengue de la OMS se incluye a la encefalitis/encefalopatía entre los daños graves de órganos del DG (1).

Tomando en consideración que la única prueba confirmatoria de infección con el VDEN que se realizó a los tejidos cerebrales examinados era la IHQ, la cual resultó negativa, no se puede excluir del todo que el virus estuviera presente en este tejido y pudiera

inducir apoptosis cerebral como se ha demostrado anteriormente en líneas celulares de neuroblastoma (24, 212) y en el sistema nervioso central de ratón (35).

Sin embargo, es importante señalar también que la inducción de apoptosis neuronal por la hipoxia se confirmó previamente en la literatura (301-303). Inclusive, se describen los mecanismos moleculares por los que la hipoxia puede conducir a la apoptosis neuronal *in vitro* (304) y en modelos animales (305, 306). Adicionalmente, la apoptosis de células cerebrales se ha demostrado en fallecidos por choque séptico debido, entre otros factores, a la isquemia (307). Más recientemente, se describió que la intensidad de la isquemia y la apoptosis neuronal en los pacientes sépticos tienden a correlacionarse con la duración de la hipotensión (308).

Si se tienen en cuenta estos antecedentes, es muy probable que la hipoxia y la isquemia del sistema nervioso central estén relacionadas al desencadenamiento de mecanismos apoptóticos en las células cerebrales de los casos con FHD/SCD estudiados. Lo anterior se encuentra apoyado por los trastornos hemo-dinámicos posiblemente causados por el tiempo prolongado de hipotensión durante el choque que presentaron estos casos (Figura 5).

Por otro lado, se demostró apoptosis en el tejido cerebral del caso 7 que era portador del rasgo de anemia de células falciformes y cabe la posibilidad que la hemoglobina S haya jugado algún papel. Este postulado se fundamenta en la probable inducción de apoptosis neuronal por la hemoglobina S mediante un mecanismo neuro-toxico como se describió en un estudio *in vitro* (309).

En esta investigación se demostró la presencia de leucocitos sanguíneos apoptóticos, probablemente monocitos, en el interior de la micro-vasculatura del tejido pulmonar del caso 5 (Figura 8. C y D). Este resultado apoya publicaciones previas de inducción de apoptosis de monocitos infectados en cultivo con VDEN-2 (310, 311) y la posible relación de CMSP apoptóticas *ex vivo* con el incremento de la severidad del dengue (19). El presente hallazgo de leucocitos apoptóticos en sangre también apoya otros estudios que demostraron un número mayor de CMSP apoptóticas en casos con FHD que en casos con FD (20, 40) y trabajos de transcriptomas de CMSP que indican un aumento de la expresión de genes proapoptóticos durante la infección por VDEN (37-39).

En este trabajo se detectó apoptosis por la técnica de TUNEL en cortes hepáticos de dos de los cuatro casos estudiados con muestras hepáticas (Figura 5. C y D). La apoptosis en casos fatales de dengue solo se había demostrado anteriormente en tejidos de hígado de fallecidos por FHD/SCD y se había propuesto que la replicación viral estaba involucrada en la inducción de dicha apoptosis (42, 43). Este planteamiento anterior está en concordancia con trabajos posteriores en líneas de hepatocitos que sugieren que la replicación del VDEN podría inducir apoptosis de células hepáticas (218, 312). La infección viral como causa de apoptosis de células del hígado es apoyada por la detección mediante IHQ de antígenos virales en el tejido hepático de uno de los dos casos nuestros con apoptosis hepática.

Sin embargo, la liberación de TRAIL por hepatocitos infectados con VDEN-2 podría también inducir la apoptosis de hepatocitos no infectados como se documentó *in vitro* (219). Por otra parte, un estudio previo en ratones describió que, tanto la administración pasiva de anticuerpos murinos anti-NS1 o de IgG humana anti-VDEN como la inmunización con la proteína viral NS1, provocan daño hepático. Este daño estaba representado por la presencia de células hepáticas apoptóticas y el aumento de las transaminasas en la sangre de los ratones (279). De manera que consideramos la posibilidad de que varios mecanismos (replicación viral, producción local de TRAIL y tal vez la síntesis de anticuerpos anti-NS1) estén asociados a la inducción de apoptosis en las células hepáticas de los casos fatales estudiados.

La distribución de los hepatocitos con reacción de TUNEL positiva fuera de los focos necróticos hepáticos en nuestro estudio (casos 1 y 5) se describió previamente (42, 43). También en un trabajo reciente con un modelo murino de infección con VDEN e inmunización con la proteína viral NS1 se observaron múltiples células hepáticas apoptóticas (núcleos picnóticos) que no se encontraban en los focos de infiltración inflamatoria y de necrosis (313).

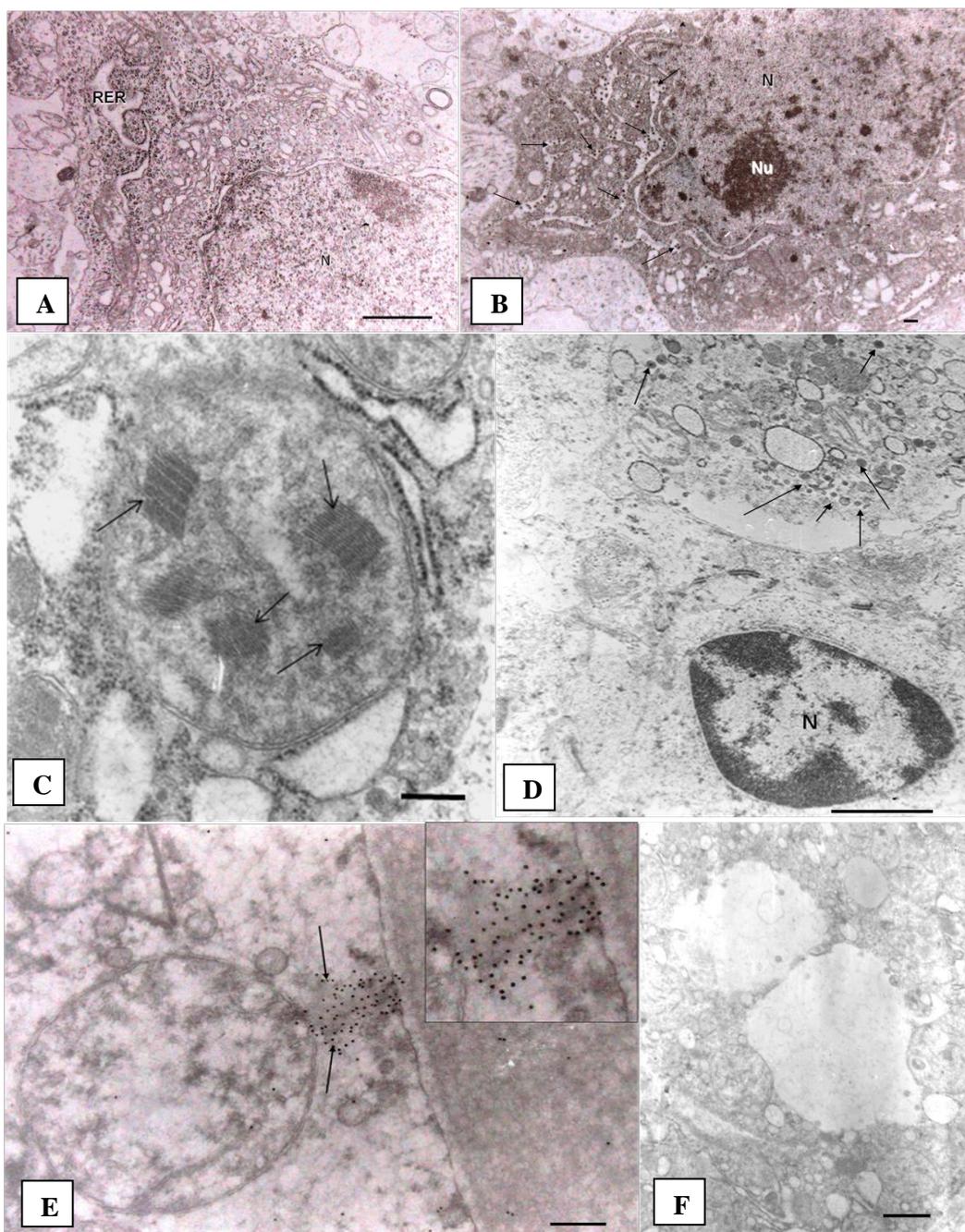
Hasta donde conocemos, este es el trabajo más grande realizado hasta la actualidad de apoptosis en tejidos de casos con dengue. Se describe por primera vez el hallazgo de células apoptóticas en tejido pulmonar, cerebral e intestinal de fallecidos por dos serotipos diferentes de VDEN, el serotipo 2 y el serotipo 3.

#### ***IV.7 Microscopía e inmuno-microscopía electrónica de transmisión en los tejidos de un caso cubano fatal por dengue del año 2006***

El caso fatal estudiado infectado con VDEN-4, de la epidemia cubana del año 2006, era del sexo femenino y tenía 41 años. En los cortes ultra-finos de tejidos de los órganos de este caso (cerebro, riñón, hígado, bazo, pulmón) no se observaron células apoptóticas mediante MET. Sin embargo, sí se visualizaron partículas de 50-60 nm sugestivas de pertenecer a flavivirus en bazo, hígado, cerebro y pulmón. Además, se confirmaron por inmuno-microscopía electrónica que se encontraban poli-péptidos de VDEN en hepatocitos, neuroglías y células pulmonares (Figura 10. E). Por otro lado, se visualizaron también inclusiones para-cristalinas, estructuras túbulo-reticulares y vesículas lipídicas en el citoplasma de hepatocitos (Figura 10. C) relacionadas con la infección viral.

Se debe resaltar que es la primera vez que se visualizan partículas virales de VDEN en bazo, hígado, cerebro y pulmón de un caso con dengue por microscopía electrónica. Además es la primera ocasión en que se utiliza la inmuno-microscopía electrónica para confirmar poli-péptidos de VDEN en tejidos humanos. Anteriormente, se observaron partículas virales por MET en casos no fatales de dengue solo en muestras de tejido renal y de sangre. El tejido renal se obtuvo por biopsia en niños con dengue (314) y en un caso adulto no fatal de FHD/SCD asociado a síndrome hemolítico-urémico (315). Las muestras de sangre se tomaron durante el periodo agudo de la enfermedad de un paciente adulto con FD (316) y de niños con dengue (317).

Resultó interesante que en nuestro trabajo también se visualizaron partículas virales en una gran vacuola fagocítica citoplasmática de un macrófago esplénico (Figura 10. D). Esta estructura es sugestiva de corresponder con la fagocitosis de un cuerpo apoptótico o tal vez de una célula apoptótica completa debido a su gran tamaño, a la presencia en su interior de organelos intra-citoplasmáticos sugestivos de mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso no digeridos completamente, así como al hallazgo en su interior de partículas virales con tamaño similar a los flavivirus (aproximadamente entre 50-60 nm de diámetro).



**Figura 10.** Estudio ultra-estructural por microscopía electrónica de transmisión de cortes ultra-finos de tejidos del caso fatal por VDEN-4 de la epidemia cubana del año 2006. (A) Control negativo en corte de cerebro de ratón. (B) Las flechas señalan partículas virales de 50-60 nm de diámetro dentro del retículo endoplasmico rugoso (RER) en una célula cerebral, parecida a un oligodendrocito, de cerebro de ratón inoculado cinco días antes con VDEN-4. (C) Las flechas señalan estructuras túbulo-reticulares cerca del RER de un hepatocito del caso fatal. (D) Partículas virales (flechas) en el interior de una vacuola citoplasmática grande, muy sugestiva de ser un cuerpo

apoptótico fagocitado, de un macrófago esplénico humano. **(E)** Inmuno-microscopía electrónica con anticuerpos anti-NS1 de VDEN que detectan poli-péptidos virales en una célula pulmonar del fallecido. **(F)** Control negativo en un corte de hígado humano. Barras de escala: 200 nm **(A, B, C)** y 500 nm **(D, E, F)**.

La observación de este fagosoma concuerda con el trabajo previo de Mosquera y cols en cultivo de monocitos humanos infectados con VDEN (311). Estos autores observaron por MET que los monocitos fagocitaban monocitos apoptóticos adyacentes para formarse grandes vacuolas citoplasmáticas que contenían fragmentos celulares en diferentes estadios de degradación y partículas virales típicas (311).

En el estudio de necropsias de casos con dengue, más amplio realizado hasta la fecha, se examinaron los bazos de 95 casos fatales pediátricos de Tailandia. Se describió en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina que en 22 de estos casos la proporción de pulpa blanca era relativamente pequeña. Según los autores la disminución del tamaño esplénico podría deberse en parte a la destrucción linfocitaria. Hasta un 72% de los bazos presentaban fagocitosis de linfocitos muy activa y muy frecuentemente se encontraron macrófagos que aparentaban haber ingerido uno o más linfocitos intactos. Al aplicarse anticuerpos fluorescentes anti-VDEN se marcaron células de origen linfocítico o del sistema retículo-endotelial en los sinusoides esplénicos de un caso (111). Es interesante que la fagocitosis linfocitaria por macrófagos y el marcaje con anticuerpos antidengue descrito por Bhamarapravati y cols (111) coinciden con nuestros hallazgos en tejido esplénico de una gran vacuola fagocítica en un macrófago y de linfocitos con partículas virales.

En este fallecido cubano por dengue se observó una evidente disminución de los linfocitos en los cortes histológicos de bazo teñidos con hematoxilina-eosina (comunicación personal de Prof. Virginia Capó del Departamento de Anatomía Patológica del IPK en La Habana, 22 del septiembre del 2006) aunque no se observara una fagocitosis esplénica tan activa. Este caso también presentó, en un hemograma antes de fallecer, una linfocitopenia marcada de 8.3% (Tabla 6). Este hallazgo en sangre periférica podría estar en asociación con la descripción de depleción linfocítica en el bazo debido a que una relación similar, linfocitopenia con depleción de linfocitos esplénicos, se observó en 22 de 26 pacientes con sepsis severa en un estudio anterior

(299, 318). También Hotchkiss y cols describieron en los bazos de pacientes con diferentes sepsis una profunda depleción esplénica debido a la apoptosis de linfocitos B y linfocitos T CD8+. Este trabajo previo además mostró en una imagen de microscopía de luz la fagocitosis de fragmentos apoptóticos de un linfocito por un macrófago esplénico (318).

Nuestra investigación presenta la primera evidencia por microscopía electrónica de apoptosis en un caso con dengue. Solamente una vez a través de MET se habían descrito cambios en la ultra-estructura celular, CE de la micro-vasculatura de la dermis de niños con FHD, sugestivos de apoptosis pero los autores no llegaron a confirmar o especular sobre este evento celular (319).

La presencia de VDEN en el tejido esplénico estudiado se confirmó con la amplificación de ARN de VDEN-4 por la RT-PCR convencional y en tiempo real (Libro de Entrada de Vigilancia Viroológica, Laboratorio de Arbovirus, Departamento de Virología, IPK). Los hallazgos de VDEN por técnicas moleculares y por MET en el bazo de este caso cubano apoyan trabajos previos de detección de antígenos de VDEN en cortes de tejido esplénico por IHQ en diferentes células como las CE (115), los macrófagos y las células linfoides (113, 117, 134). En uno de estos estudios se corroboró la presencia de ARN del VDEN en los macrófagos y células linfoides mediante la técnica de hibridación *in situ* (113) y en otro trabajo se amplificó el ARN viral por RT-PCR convencional y en tiempo real (134). Más recientemente se describió la coincidencia de la técnica de IHQ y RT-PCR para detectar VDEN en los tejidos FFIP de los bazos de fallecidos por dengue (116). Por otro lado, un estudio reciente documentó la detección de la proteína NS1 del VDEN por tres diferentes ELISA de captura en fragmentos esplénicos de casos fatales (135).

La observación de un macrófago con una vacuola fagocítica con cuerpos apoptóticos que contenían virus, partículas virales en linfocitos y amplificación de genoma de VDEN en el tejido esplénico con depleción linfocitaria permite especular la existencia de dos eventos interconectados. En primer lugar, que el cuerpo apoptótico fagocitado corresponda a uno de los linfocitos que muriera por apoptosis y en segundo lugar, que la apoptosis linfocitaria pudiera ser inducida en parte por la replicación viral.

En los tejidos FFIP de cerebro, riñón, corazón, hígado y bazo de este fallecido por VDENV-4 no se detectaron antígenos virales mediante IHQ que es considerada una técnica de inmuno-detección en tejidos menos sensible que la MET (320, 321). Adicionalmente, los antígenos virales podrían no detectarse porque se destruyeron en parte durante el procesamiento de los tejidos FFIP o porque la cantidad de antígeno no era suficiente para ser detectada por este método (112, 113).

Una limitación de este trabajo en tejidos de casos fatales por dengue es que se estudió la apoptosis mediante la técnica de MET o de TUNEL y no por ambas técnicas en el mismo tejido. El análisis por estas dos técnicas podría incrementar el número de tejidos donde se encuentra la apoptosis, así como describir el tipo específico de célula involucrada.

En resumen, es la primera vez que se utiliza la microscopia electrónica para estudiar tejidos de un caso fatal por dengue y no se observaron células apoptóticas sino una célula fagocítica en el bazo con una vacuola fagocítica conteniendo posiblemente un cuerpo apoptótico con partículas virales. También la microscopia electrónica permitió visualizar los virus causantes del dengue en diferentes células del bazo, el hígado, el cerebro y el pulmón.

#### ***IV.8 Discusión integrada***

Hasta la actualidad no se había investigado la regulación de la apoptosis durante el dengue por proteínas pro y antiapoptóticas circulantes y cómo estos mecanismos se asocian con la fisiopatología de la enfermedad. Por otra parte, no se habían estudiado estas proteínas en casos con dengue utilizando la nueva clasificación clínica de dengue de la OMS (1). Hasta el momento, en casos con dengue no existían evidencias de apoptosis en tejidos no hepáticos ni tampoco se había evaluado la apoptosis en tejidos mediante microscopía electrónica.

En el presente estudio, se estudiaron cuatro proteínas circulantes (TRAIL, FasL, TNF- $\alpha$ , Survivin) asociadas a la apoptosis en pacientes con dengue clasificados según las nuevas guías clínicas de dengue de la OMS (1). Además, se demostró apoptosis en diferentes tejidos de fallecidos por dengue que no estaban documentados en la literatura.

Se encontraron posibles nuevas implicaciones de TRAIL en casos no graves de dengue, que presentaban mayores concentraciones de esta proteína, como la de favorecer el aumento de plaquetas. La plaquetopenia es un hallazgo relacionado muy frecuentemente a la gravedad del dengue. De manera que especulamos que la disminución de la concentración en la circulación de TRAIL podría también estar involucrada en la disminución de plaquetas (plaquetopenia) documentada en el periodo grave pre-mortem de los casos fatales por FHD/SCD y en los pacientes con DG. En cambio, los resultados de este trabajo sugieren que el Survivin presentó un probable papel antiapoptótico en los leucocitos sanguíneos. El aumento o disminución de la concentración de esta proteína en la circulación podría relacionarse a la leucocitosis o a la leucopenia respectivamente que se encontró en los pacientes con dengue estudiados.

En el presente trabajo se encontró una elevación plasmática de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en casos con dengue. Por otro lado, en las CE de los tejidos examinados de casos fatales por dengue no se observaron virus por MET ni se detectaron antígenos de VDEN por IHQ. Estos resultados, más los descritos en la literatura que excluyen la probable infección viral productiva (113, 115) y la auto-inmunidad (207) en el endotelio durante el dengue, nos permiten plantear mecanismos plausibles de daño endotelial que condujeron a la hiper-permeabilidad vascular en los fallecidos estudiados. Estos mecanismos serían fundamentalmente dos y estarían estrechamente interconectados: (i) acción de mediadores proinflamatorios que alteran la función de barrera del endotelio y (ii) muerte por apoptosis de las CE de la micro-vasculatura.

A pesar de ser un trabajo sin un número grande de casos, nuestra investigación sobre proteínas reguladoras de la apoptosis en pacientes con dengue contribuye a la evaluación de bio-marcadores potenciales de la gravedad del dengue cuando aun no se dispone de bio-marcadores circulantes robustos que pronostiquen con certeza la progresión a gravedad de esta enfermedad (238). También el hallazgo de las CE apoptóticas en casos fatales por dengue asociadas a hiper-permeabilidad vascular apoya la detección de mediadores circulantes de daño vascular en pacientes con dengue como marcador de severidad.

Además, la inhibición de mecanismos apoptóticos específicos podría convertirse más adelante en una estrategia terapéutica del dengue cuando se definan mejor las

implicaciones de este suicidio celular en la fisiopatología del cuadro clínico grave de esta enfermedad. Para alcanzar ese objetivo se necesitarían cuidadosos estudios en modelos animales y pacientes con dengue.

A pesar de que en este trabajo se sugieren asociaciones entre las concentraciones plasmáticas de proteínas apoptóticas con la fisiopatología y la reciente clasificación clínica del dengue, existen varias limitaciones en su análisis. Entre estas limitaciones se encuentran la ausencia de un análisis entre el serotipo viral infectante, la viremia y las manifestaciones clínicas características de dengue con las concentraciones en plasma de las proteínas apoptóticas. La falta de este análisis limita la capacidad de discernir como estos factores intervienen en los resultados obtenidos. Tampoco se abordó en los casos si existía alguna asociación de las proteínas apoptóticas estudiadas con la co-morbilidad y la respuesta inmune primaria o secundaria al dengue. Sin embargo, posiblemente la limitación más importante en este estudio de cuantificación plasmática de proteínas apoptóticas es que no se obtuvo una cinética diaria en los pacientes estudiados. Esta cinética permitiría determinar mejor las tendencias en las concentraciones de estas proteínas circulantes en relación con el número de las células sanguíneas cada día de la enfermedad en los grupos estudiados y brindar más solidez al análisis estadístico.

Por otro lado, podrían presentarse varias hipótesis alternativas para la interpretación del efecto contraproducente de la apoptosis durante la infección por VDEN. Aunque especulamos que la apoptosis de diversas células favorece la severidad del dengue al incrementar la hiper-permeabilidad vascular, el daño hepático, el daño cerebral y la eliminación de células linfoides circulantes, es también posible que la apoptosis tenga algún efecto beneficioso o incluso un efecto no relevante.

De hecho, la apoptosis puede ser un mecanismo eficaz para eliminar células infectadas por virus que luego sirven para activar la inmunidad adquirida. Esta activación inmune sería a través de las células presentadoras de antígenos que presentarían los cuerpos apoptóticos con virus en su interior a los linfocitos T CD8+ y T CD4+ en el contexto de las moléculas HLA clase I y clase II respectivamente (322-324). Además, la apoptosis de linfocitos, hepatocitos y CE disminuiría la elevada producción por estas células de mediadores proinflamatorios que forman parte de la tormenta de citocinas que contribuye a las manifestaciones más graves del dengue. Por último, la apoptosis induciría la liberación de mediadores antiinflamatorios de los fagocitos encargados de

eliminar las células apoptóticas (190, 325), lo cual ayudaría a contrarrestar la hiperactivación y la proliferación no protectora de células del sistema inmune que ocurre en el cuadro clínico grave del dengue.

Por otro lado, podría existir una interpretación alternativa a la más obvia y común de que observar células apoptóticas en los tejidos que estudiamos representa un incremento de la muerte celular. Las células apoptóticas son rápida y eficazmente eliminadas en la mayoría de los tejidos. De manera que los defectos en la eliminación de células apoptóticas podrían provocar la apariencia de un número aumentado de células apoptóticas en un tejido, incluso en la ausencia de un proceso incrementado de muerte celular. Por tanto, la observación de apoptosis en un corte de tejido podría ser resultado de (i) la inducción aumentada de apoptosis, (ii) de un defecto en la eliminación de estas células o (iii) una combinación de ambos fenómenos (190).

Nuestros resultados en conjunto sugieren que la apoptosis de diferentes células en el dengue es uno de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. Los hallazgos que presentamos no demuestran que la muerte celular apoptótica en los tejidos es un fenómeno central en la fisiopatología del dengue, sino que este evento celular podría actuar en concierto con otros mecanismos claves descritos anteriormente. Este estudio también sugiere que existe una interrelación entre proteínas apoptóticas circulantes con la fisiopatología del dengue. Estas proteínas a través de diferentes acciones, independientes y dependientes de la apoptosis, pueden aparentemente favorecer o contrarrestar la severidad del dengue. No obstante, se necesitan más estudios que definan con mayor claridad cuales implicaciones tienen las células apoptóticas y las diferentes acciones de las proteínas apoptóticas circulantes en la compleja fisiopatología del dengue.

En resumen, en este trabajo se describe por primera vez la posible inducción de apoptosis por el TRAIL en linfocitos sanguíneos de pacientes con dengue. En cambio, una protección contra la apoptosis en leucocitos sanguíneos podría ser ejercida por el Survivin. Por otro lado, es la primera ocasión que se utiliza la microscopía electrónica para estudiar tejidos de un caso fatal por dengue y no se observaron células apoptóticas sino una célula fagocítica del bazo con una vacuola conteniendo posiblemente un cuerpo apoptótico con partículas virales. Sin embargo, este es el primer estudio que

demuestra apoptosis en células cerebrales y en CE de la micro-vasculatura del intestino y del pulmón de casos fatales por dengue. Estas CE apoptóticas pudieran estar asociadas a la extravasación de plasma y a la hemorragia de los tejidos. El análisis integrado de estos resultados sugiere que la apoptosis juega un papel en la compleja fisiopatología del dengue.

## **V. CONCLUSIONES**

## **V. CONCLUSIONES**

- La mayor concentración de TRAIL en el plasma de los casos con dengue no grave en comparación con los casos graves sugiere una posible función antiviral de esta proteína.
- El incremento de la concentración plasmática de TRAIL se correlacionó a la disminución de linfocitos T sanguíneos de los pacientes con dengue lo cual sugiere que esta proteína induce apoptosis de linfocitos T.
- La correlación positiva entre la concentración en plasma de TRAIL con el recuento de plaquetas sugiere que la concentración disminuida de esta proteína podría estar asociada a la plaquetopenia de los casos graves con dengue.
- La correlación positiva de la concentración en plasma del Survivin con el recuento de leucocitos, específicamente linfocitos y monocitos, sugiere que el Survivin brinda protección contra la apoptosis a estas células sanguíneas.
- La presencia de apoptosis en tejido cerebral, pulmonar, intestinal y esplénico incrementa el número de órganos en los que se ha documentado este fenómeno en fallecidos por dengue lo que sugiere que la apoptosis está implicada en la fisiopatología del dengue fatal.
- La ausencia de antígenos del VDEN en las células cerebrales de fallecidos por dengue sugiere que la apoptosis de estas células podría deberse a los trastornos isquémicos/hipóxicos que ocurren en el choque por dengue.
- La apoptosis de las CE de la micro-vasculatura de tejidos con extravasación de plasma sugiere que las CE apoptóticas pudieran estar asociadas a la extravasación plasmática observada en el cuadro clínico más grave de dengue.

## **VI. RECOMENDACIONES**

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Cuantificar las proteínas apoptóticas circulantes y las células sanguíneas en casos con dengue estratificados por días de toma de la muestra (cinética).
- Analizar los resultados de las concentraciones en la circulación de las proteínas apoptóticas usando ambas clasificaciones clínicas de dengue de la OMS.
- Realizar un análisis de las asociaciones entre las concentraciones en la circulación de las proteínas apoptóticas con la co-morbilidad, el serotipo viral infectante, la viremia, la inmunidad a dengue y las manifestaciones clínicas características de dengue.
- Caracterizar en un número mayor de casos fatales por dengue la presencia de las células apoptóticas en los tejidos estudiados, especialmente en las células del endotelio micro-vascular de los tejidos con extravasación plasmática, y en tejidos de otros órganos (médula ósea y ganglios linfáticos) al utilizar más de una técnica de detección de la apoptosis.

## **VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control Geneva WHO Press; 2009.
2. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Dec;8(12 Suppl):S7-S16.
3. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 Aug;6(8):e1760.
4. San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Jan;82(1):128-35.
5. Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2009;25 Suppl 1:S7-18.
6. Guzman MG. Treinta años después de la epidemia cubana de dengue hemorrágico en 1981. *Rev Cubana Med Trop.* 2012 ene-abr;64 (1).
7. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2002 Jan;2(1):33-42.
8. OPS-Cuba. Brote de dengue en Cuba, 2006. *EER Noticias: Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de Las Américas.* 2006;3(1).
9. Garcia G, Gonzalez N, Perez AB, Sierra B, Aguirre E, Rizo D, et al. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. *Int J Infect Dis.* 2011 Jan;15(1):e38-43.
10. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. WHO, Geneva 1997.
11. Kliks S. Antibody-enhanced infection of monocytes as the pathogenetic mechanism for severe dengue illness. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1990 Aug;6(8):993-8.

12. Rothman AL. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;338:83-98.
13. Balmaseda A, Hammond SN, Perez L, Tellez Y, Saborio SI, Mercado JC, et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Mar;74(3):449-56.
14. Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignacio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, et al. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001 Feb;96(2):229-32.
15. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008;8:86.
16. Figueiredo MA, Rodrigues LC, Barreto ML, Lima JW, Costa MC, Morato V, et al. Allergies and diabetes as risk factors for dengue hemorrhagic fever: results of a case control study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(6):e699.
17. Fang X, Hu Z, Shang W, Zhu J, Xu C, Rao X. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Nov;66(2):134-46.
18. Courageot MP, Catteau A, Despres P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Adv Virus Res.* 2003;60:157-86.
19. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003 Jul;9(7):921-7.
20. Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *J Infect Dis.* 2006 Sep 1;194(5):600-7.
21. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009 Oct 15;361(16):1570-83.
22. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012 Jan;19(1):107-20.

23. Cheung CH, Cheng L, Chang KY, Chen HH, Chang JY. Investigations of survivin: the past, present and future. *Front Biosci.* 2011;16:952-61.
24. Despres P, Flamand M, Ceccaldi PE, Deubel V. Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *J Virol.* 1996;70(6):4090-6.
25. Nasirudeen AM, Wang L, Liu DX. Induction of p53-dependent and mitochondria-mediated cell death pathway by dengue virus infection of human and animal cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2008 Aug-Sep;10(10-11):1124-32.
26. Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR. Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. *J Med Virol.* 2007 Mar;79(3):300-7.
27. Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, et al. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Dec;104(8):1091-9.
28. Catteau A, Kalinina O, Wagner MC, Deubel V, Courageot MP, Despres P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J Gen Virol.* 2003 Oct;84(Pt 10):2781-93.
29. Limjindaporn T, Netsawang J, Noisakran S, Thiemmecca S, Wongwiwat W, Sudsaward S, et al. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by dengue virus capsid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Oct 19;362(2):334-9.
30. Shafee N, AbuBakar S. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. *J Gen Virol.* 2003 Aug;84(Pt 8):2191-5.
31. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol.* 2002 Jul 15;169(2):657-64.
32. Lin YS, Lin CF, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, et al. Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. *Curr Pharm Des.* 2004;10(2):213-21.
33. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol.* 2003 Jan;69(1):82-90.
34. Cardier JE, Marino E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role

- of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine*. 2005 Jun 21;30(6):359-65.
35. Despres P, Frenkiel MP, Ceccaldi PE, Duarte Dos Santos C, Deubel V. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. *J Virol*. 1998;72(1):823-9.
36. Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, Wu-Hsieh BA. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol*. 2007;81(11):5518-26.
37. Simmons CP, Popper S, Doloczek C, Chau TN, Griffiths M, Dung NT, et al. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2007 Apr 15;195(8):1097-107.
38. Ubol S, Masrinoul P, Chaijaruwanich J, Kalayanaroj S, Charoensirisuthikul T, Kasisith J. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2008 May 15;197(10):1459-67.
39. Hoang LT, Lynn DJ, Henn M, Birren BW, Lennon NJ, Le PT, et al. The early whole-blood transcriptional signature of dengue virus and features associated with progression to dengue shock syndrome in Vietnamese children and young adults. *J Virol*. 2010 Dec;84(24):12982-94.
40. Jaiyen Y, Masrinoul P, Kalayanaroj S, Pulmanusahakul R, Ubol S. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol*. 2009 Aug;53(8):442-50.
41. Becerra A, Warke RV, Martin K, Xhaja K, de Bosch N, Rothman AL, et al. Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo. *J Med Virol*. 2009 Aug;81(8):1403-11.
42. Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, Henin D, et al. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Hum Pathol*. 1999;30(9):1106-10.
43. Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch*. 2001;438(2):107-15.

44. Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Knippe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 1. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 991-1042.
45. Harris E, Holden KL, Edgil D, Polacek C, Clyde K. Molecular biology of flaviviruses. *Novartis Found Symp*. 2006;277:23-39; discussion 40, 71-3, 251-3.
46. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*. 2006 Aug 23;80(23):11418-31.
47. Paranjape SM, Harris E. Control of dengue virus translation and replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;338:15-34.
48. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*. 2004 Dec;10(12 Suppl):S98-109.
49. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480-96.
50. Calisher CH. Persistent emergence of dengue. *Emerg Infect Dis*. 2005 May;11(5):738-9.
51. A world of 7 billion people. *Lancet*. 2011 Oct 29;378(9802):1527.
52. Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica*. 2006 Dec;20(6):407-15.
53. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983 Jan-Feb;25(1):53-4.
54. Nogueira RM, de Araujo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007 Nov;22(5):358-63.
55. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986 Apr-Jun;81(2):245-6.
56. Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MF, Farias Filho JD. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988 Apr-Jun;83(2):219-25.
57. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect*. 1993 Aug;111(1):163-70.

58. Nogueira RM. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis.* 2005 Sep;11(9):1376-81.
59. de Araujo JM, Bello G, Schatzmayr HG, dos Santos FB, Nogueira RM. Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 May;104(3):526-9.
60. Temporao JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011 May;17(5):938-40.
61. Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 May;106(3):255-6.
62. Secretaria de Vigilância em Saúde MdS, Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue. Balanço Dengue Semana Epidemiológica 1 a 391 de 2011  
Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Edifício Sede, sala 148, Brasília - DF2011. p. 1-12.
63. Mas P. Dengue fever in Cuba in 1977:some laboratory aspects. PAHO Scientific Publication. 1979;375:40-3.
64. Guzman MG, Kouri G, Martinez E, Bravo J, Riveron R, Soler M, et al. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bull Pan Am Health Organ.* 1987;21(3):270-9.
65. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):821-3.
66. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica.* 2002 Apr;11(4):223-7.
67. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Valdes L, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis.* 1999 Spring;3(3):130-5.
68. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol.* 2000 Nov 1;152(9):793-9.

69. Valdes L, Guzman MG, Kouri G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, et al. La epidemiología del dengue y del dengue hemorrágico en Santiago de Cuba, 1997. *Rev Panam Salud Publica*. 1999;6(1):16-25.
70. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(1):89-92.
71. Guzman MG. Global voices of science. Deciphering dengue: the Cuban experience. *Science*. 2005 Sep 2;309(5740):1495-7.
72. Pelaez O, Guzman MG, Kouri G, Perez R, San Martin JL, Vazquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis*. 2004 Apr;10(4):719-22.
73. Chau TN, Quyen NT, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Dung NT, et al. Dengue in Vietnamese infants--results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2008 Aug 15;198(4):516-24.
74. Duyen HT, Ngoc TV, Ha do T, Hang VT, Kieu NT, Young PR, et al. Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status. *J Infect Dis*. 2011 May 1;203(9):1292-300.
75. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, et al. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic Fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3):e617.
76. Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*. 2011 Sep 23;29(42):7221-8.
77. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012 Apr 12;366(15):1423-32.
78. Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis*. 2002 Jun;6(2):118-24.
79. Cummings DA, Iamsirithaworn S, Lessler JT, McDermott A, Prasanthong R, Nisalak A, et al. The impact of the demographic transition on dengue in Thailand: insights from a statistical analysis and mathematical modeling. *PLoS Med*. 2009 Sep;6(9):e1000139.

80. Anders KL, Nguyet NM, Chau NV, Hung NT, Thuy TT, Lien le B, et al. Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Jan;84(1):127-34.
81. Kabra SK, Jain Y, Pandey RM, Madhulika, Singhal T, Tripathi P, et al. Dengue haemorrhagic fever in children in the 1996 Delhi epidemic. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999 May-Jun;93(3):294-8.
82. Sierra Bde L, Kouri G, Guzman MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol.* 2007 Mar;152(3):533-42.
83. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(3):180-3.
84. Sierra B, Alegre R, Perez AB, Garcia G, Sturn-Ramirez K, Obasanjo O, et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: Advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol.* 2007 Jun;68(6):531-40.
85. LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales J, Villarreal-Garza C, Higuera L, et al. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* 2002 Nov;63(11):1039-44.
86. Nguyen TP, Kikuchi M, Vu TQ, Do QH, Tran TT, Vo DT, et al. Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1\*0901 and HLA-A\*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(10):e304.
87. Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jul;67(1):102-6.
88. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet.* 2005 May;37(5):507-13.
89. Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene

- polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* 2010 Nov;71(11):1135-40.
90. Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens.* 2004 Oct;64(4):469-72.
91. Bravo JR, Guzman MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):816-20.
92. Rigau-Perez JG, Laufer MK. Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: diagnosis and clinical alarm signals. *Clin Infect Dis.* 2006 May 1;42(9):1241-6.
93. Lahiri M, Fisher D, Tambyah PA. Dengue mortality: reassessing the risks in transition countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Oct;102(10):1011-6.
94. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):532-43.
95. Halstead SB, O'Rourke EJ. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature.* 1977;265(5596):739-41.
96. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med.* 1977 Jul 1;146(1):201-17.
97. Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 1990 Feb;42(2):179-84.
98. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology.* 7th edition ed: Elsevier Saunders.; 2011.
99. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Aug;53(3):287-99.
100. Levy A, Valero N, Espina LM, Anez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010 Jan;104(1):16-23.
101. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Mar;48(3):324-31.

102. Laur F, Murgue B, Deparis X, Roche C, Cassar O, Chungue E. Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998 Nov-Dec;92(6):654-6.
103. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, et al. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS One.* 2010;5(1):e8709.
104. Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Jan;74(1):142-7.
105. Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, et al. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol.* 2009 Apr 15;182(8):4865-73.
106. Lazo L, Gil L, Lopez C, Valdes I, Marcos E, Alvarez M, et al. Nucleocapsid-like particles of dengue-2 virus enhance the immune response against a recombinant protein of dengue-4 virus. *Arch Virol.* 2010 Oct;155(10):1587-95.
107. Hatch S, Endy TP, Thomas S, Mathew A, Potts J, Pazoles P, et al. Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection. *J Infect Dis.* 2011 May 1;203(9):1282-91.
108. Malasit P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1987 Sep;18(3):316-20.
109. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: a Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. *J Infect Dis.* 2006 Apr 15;193(8):1078-88.
110. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med.* 2010 Apr 12;207(4):793-806.
111. Bhamarapravati N, Tuchinda P, Boonyapaknavik V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. *Ann Trop Med Parasitol.* 1967 Dec;61(4):500-10.
112. Hall WC, Crowell TP, Watts DM, Barros VL, Kruger H, Pinheiro F, et al. Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-

embedded human liver by immunohistochemical analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Oct;45(4):408-17.

113. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis.* 2004 Apr 15;189(8):1411-8.

114. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol.* 1997 Jul-Aug;16(4):204-8.

115. Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Mar;80(3):416-24.

116. Bhatnagar J, Blau DM, Shieh WJ, Paddock CD, Drew C, Liu L, et al. Molecular detection and typing of dengue viruses from archived tissues of fatal cases by rt-PCR and sequencing: diagnostic and epidemiologic implications. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Feb;86(2):335-40.

117. Basilio-de-Oliveira CA, Aguiar GR, Baldanza MS, Barth OM, Eyer-Silva WA, Paes MV. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2005 Aug;9(4):341-7.

118. Killen H, O'Sullivan MA. Detection of dengue virus by in situ hybridization. *J Virol Methods.* 1993 Feb;41(2):135-46.

119. Kangwanpong D, Bhamarapravati N, Lucia HL. Diagnosing dengue virus infection in archived autopsy tissues by means of the in situ PCR method: a case report. *Clin Diagn Virol.* 1995 Feb;3(2):165-72.

120. Carvalho de Macedo F, Nicol AF, Cooper LD, Yearsley M, Cordovil Pires AR, Nuovo GJ. Histologic, Viral, and Molecular Correlates of Dengue Fever Infection of the Liver Using Highly Sensitive Immunohistochemistry. *Diagn Mol Pathol.* 2006 Dec;15(4):223-8.

121. World Health Organization. Handbook for clinical management of dengue. Geneva WHO Press; 2012.

122. Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet.* 2006;368:170-73.

123. Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012 Aug;10(8):895-907.
124. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Mar;30(3):545-51.
125. Conceicao TM, Da Poian AT, Sorgine MH. A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples. *J Virol Methods.* 2010 Jan;163(1):1-9.
126. Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvao LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virol J.* 2010 Jan 27;7(1):22.
127. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol.* 2006 Apr;44(4):1295-304.
128. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):4977-83.
129. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002 Feb;40(2):376-81.
130. Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, Dung NM, et al. Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(1):e360.
131. Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang YD, Hao W, et al. Serotype 1-Specific Monoclonal Antibody-Based Antigen Capture Immunoassay for Detection of Circulating Nonstructural Protein NS1: Implications for Early Diagnosis and Serotyping of Dengue Virus Infections. *J Clin Microbiol.* 2006 Aug;44(8):2872-8.
132. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(8).

133. Lima Mda R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7):e738.
134. de Araujo JM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, et al. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods*. 2009 Jan;155(1):34-8.
135. Lima Mda R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Limonta D, Dos Santos FB. A New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):e1147.
136. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg*. 1989 Apr;40(4):418-27.
137. Nogueira RM, Miagostovich MP, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG. Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Res Virol*. 1992 Nov-Dec;143(6):423-7.
138. Vazquez S, Bravo JR, Perez AB, Guzman MG. ELISA de inhibición: su utilidad para clasificar un caso de dengue. *Rev Cubana Med Trop*. 1997;49(2):108-12.
139. Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B, et al. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet*. 2000 Mar 25;355(9209):1053-9.
140. Garcia-Rivera EJ, Rigau-Perez JG. Encephalitis and dengue. *Lancet*. 2002 Jul 20;360(9328):261.
141. Puccioni-Sohler M, Orsini M, Soares CN. Dengue: a new challenge for neurology. *Neurol Int*. 2012 Oct 5;4(3):e15.
142. Roos KL. Lumbar puncture. *Semin Neurol*. 2003 Mar;23(1):105-14.
143. Araujo FM, Brilhante RS, Cavalcanti LP, Rocha MF, Cordeiro RA, Perdigao AC, et al. Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods*. 2011 Oct;177(1):128-31.
144. Araujo F, Nogueira R, Araujo Mde S, Perdigao A, Cavalcanti L, Brilhante R, et al. Dengue in patients with central nervous system manifestations, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2012 Apr;18(4):677-9.

145. Huhtamo E, Vuorinen S, Uzcategui NY, Vapalahti O, Haapasalo H, Lumio J. Fatal dengue virus infection in a Finnish traveler. *J Clin Virol.* 2006 Dec;37(4):323-6.
146. Lee IK, Liu JW, Yang KD. Clinical characteristics and risk factors for concurrent bacteremia in adults with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Feb;72(2):221-6.
147. Lee IK, Liu JW, Yang KD. Clinical and laboratory characteristics and risk factors for fatality in elderly patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Aug;79(2):149-53.
148. Wilder-Smith A, Ooi EE, Vasudevan SG, Gubler DJ. Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Curr Infect Dis Rep.* 2010 May;12(3):157-64.
149. Schmitz J, Roehrig J, Barrett A, Hombach J. Next generation dengue vaccines: a review of candidates in preclinical development. *Vaccine.* 2011 Sep 23;29(42):7276-84.
150. Azevedo AS, Goncalves AJ, Archer M, Freire MS, Galler R, Alves AM. The Synergistic Effect of Combined Immunization with a DNA Vaccine and Chimeric Yellow Fever/Dengue Virus Leads to Strong Protection against Dengue. *PLoS One.* 2013;8(3):e58357.
151. Arora U, Tyagi P, Swaminathan S, Khanna N. Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice. *Vaccine.* 2013 Jan 30;31(6):873-8.
152. Thomas SJ, Eckels KH, Carletti I, De La Barrera R, Dessy F, Fernandez S, et al. A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Jan;88(1):73-88.
153. Smith KM, Nanda K, Spears CJ, Piper A, Ribeiro M, Quiles M, et al. Testing of novel dengue virus 2 vaccines in African green monkeys: safety, immunogenicity, and efficacy. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Oct;87(4):743-53.
154. Lanata CF, Andrade T, Gil AI, Terrones C, Valladolid O, Zambrano B, et al. Immunogenicity and safety of tetravalent dengue vaccine in 2-11 year-olds previously vaccinated against yellow fever: randomized, controlled, phase II study in Piura, Peru. *Vaccine.* 2012 Sep 7;30(41):5935-41.
155. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD

tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2012 Nov 3;380(9853):1559-67.

156. Sun W, Eckels KH, Putnak JR, Lyons AG, Thomas SJ, Vaughn DW, et al. Experimental dengue virus challenge of human subjects previously vaccinated with live attenuated tetravalent dengue vaccines. *J Infect Dis*. 2013 Mar;207(5):700-8.

157. Noble CG, Shi PY. Structural biology of dengue virus enzymes: towards rational design of therapeutics. *Antiviral Res*. 2012 Nov;96(2):115-26.

158. Zhang W, Singam R, Hellermann G, Kong X, Juan HS, Lockey RF, et al. Attenuation of dengue virus infection by adeno-associated virus-mediated siRNA delivery. *Genet Vaccines Ther*. 2004 Aug 9;2(1):8.

159. Subramanya S, Kim SS, Abraham S, Yao J, Kumar M, Kumar P, et al. Targeted delivery of small interfering RNA to human dendritic cells to suppress dengue virus infection and associated proinflammatory cytokine production. *J Virol*. 2010 Mar;84(5):2490-501.

160. Stein DA, Perry ST, Buck MD, Oehmen CS, Fischer MA, Poore E, et al. Inhibition of dengue virus infections in cell cultures and in AG129 mice by a small interfering RNA targeting a highly conserved sequence. *J Virol*. 2011 Oct;85(19):10154-66.

161. Byrd CM, Dai D, Grosenbach DW, Berhanu A, Jones KF, Cardwell KB, et al. A novel inhibitor of dengue virus replication that targets the capsid protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):15-25.

162. Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, Flores D, Kyle JL, Mehlhop E, et al. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by fc modification. *PLoS Pathog*. 2010;6(2):e1000790.

163. Li PC, Liao MY, Cheng PC, Liang JJ, Liu IJ, Chiu CY, et al. Development of a humanized antibody with high therapeutic potential against dengue virus type 2. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1636.

164. Tam DT, Ngoc TV, Tien NT, Kieu NT, Thuy TT, Thanh LT, et al. Effects of short-course oral corticosteroid therapy in early dengue infection in vietnamese patients: a randomized, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2012 Nov;55(9):1216-24.

165. Tassniyom S, Vasanawathana S, Chirawatkul A, Rojanasuphot S. Failure of high-dose methylprednisolone in established dengue shock syndrome: a placebo-controlled, double-blind study. *Pediatrics*. 1993 Jul;92(1):111-5.

166. Sumarmo, Talogo W, Asrin A, Isnuhandoyo B, Sahudi A. Failure of hydrocortisone to affect outcome in dengue shock syndrome. *Pediatrics*. 1982 Jan;69(1):45-9.
167. Pongpanich B, Bhanchet P, Phanichyakarn P, Valyasevi A. Studies on dengue hemorrhagic fever. Clinical study: an evaluation of steroids as a treatment. *J Med Assoc Thai*. 1973 Jan;56(1):6-14.
168. Tricou V, Minh NN, Van TP, Lee SJ, Farrar J, Wills B, et al. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8):e785.
169. Nguyen NM, Tran CN, Phung LK, Duong KT, Huynh HL, Farrar J, et al. A Randomized, Double-Blind Placebo Controlled Trial of Balapiravir, a Polymerase Inhibitor, in Adult Dengue Patients. *J Infect Dis*. 2012 Aug 30.
170. Whitehorn J, Chau NV, Truong NT, Tai LT, Van Hao N, Hien TT, et al. Lovastatin for adult patients with dengue: protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2012 Oct 31;13(1):203.
171. Superko HR, Momary KM, Li Y. Statins personalized. *Med Clin North Am*. 2012 Jan;96(1):123-39.
172. Majumdar SR, McAlister FA, Eurich DT, Padwal RS, Marrie TJ. Statins and outcomes in patients admitted to hospital with community acquired pneumonia: population based prospective cohort study. *BMJ*. 2006 Nov 11;333(7576):999.
173. Forde KA, Law C, O'Flynn R, Kaplan DE. Do statins reduce hepatitis C RNA titers during routine clinical use? *World J Gastroenterol*. 2009 Oct 28;15(40):5020-7.
174. Brett SJ, Myles P, Lim WS, Enstone JE, Bannister B, Semple MG, et al. Pre-admission statin use and in-hospital severity of 2009 pandemic influenza A(H1N1) disease. *PLoS One*. 2011;6(4):e18120.
175. Patel K, Lim SG, Cheng CW, Lawitz E, Tillmann HL, Chopra N, et al. Open-label phase 1b pilot study to assess the antiviral efficacy of simvastatin combined with sertraline in chronic hepatitis C patients. *Antivir Ther*. 2011;16(8):1341-6.
176. Vandermeer ML, Thomas AR, Kamimoto L, Reingold A, Gershman K, Meek J, et al. Association between use of statins and mortality among patients hospitalized with laboratory-confirmed influenza virus infections: a multistate study. *J Infect Dis*. 2012 Jan 1;205(1):13-9.

177. Atsukawa M, Tsubota A, Kondo C, Itokawa N, Narahara Y, Nakatsuka K, et al. Combination of fluvastatin with pegylated interferon/ribavirin therapy reduces viral relapse in chronic hepatitis C infected with HCV genotype 1b. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jan;28(1):51-6.
178. Martinez-Gutierrez M, Castellanos JE, Gallego-Gomez JC. Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology*. 2011;54(4):202-16.
179. Pena J, Harris E. Early dengue virus protein synthesis induces extensive rearrangement of the endoplasmic reticulum independent of the UPR and SREBP-2 pathway. *PLoS One*. 2012;7(6):e38202.
180. Rothwell C, Lebreton A, Young Ng C, Lim JY, Liu W, Vasudevan S, et al. Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology*. 2009 Jun 20;389(1-2):8-19.
181. Taoufiq Z, Pino P, N'Dilimabaka N, Arrouss I, Assi S, Soubrier F, et al. Atorvastatin prevents Plasmodium falciparum cytoadherence and endothelial damage. *Malar J*. 2011;10:52.
182. Lin R, Liu J, Peng N, Gan W, Wang W, Han C, et al. Lovastatin reduces apoptosis and downregulates the CD40 expression induced by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells. *Curr Neurovasc Res*. 2006 Feb;3(1):41-7.
183. Sato K, Nuki T, Gomita K, Weyand CM, Hagiwara N. Statins reduce endothelial cell apoptosis via inhibition of TRAIL expression on activated CD4 T cells in acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*. 2010 Nov;213(1):33-9.
184. Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Rossig L, Kamper U, Dimmeler S. Improvement of endothelial damage and regeneration indexes in patients with coronary artery disease after 4 weeks of statin therapy. *Atherosclerosis*. 2010 Jul;211(1):249-54.
185. Pereira WO, Amarante-Mendes GP. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? *Scand J Immunol*. 2011 May;73(5):401-7.
186. Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Jul;2(7):545-50.
187. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*. 2004 Jun;19:124-8.
188. deCathelineau AM, Henson PM. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem*. 2003;39:105-17.

189. Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(1).
190. Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol.* 2010 Jun 28;189(7):1059-70.
191. Golpon HA, Fadok VA, Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Sauer C, Welte T, et al. Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth. *FASEB J.* 2004 Nov;18(14):1716-8.
192. Morimoto K, Amano H, Sonoda F, Baba M, Senba M, Yoshimine H, et al. Alveolar macrophages that phagocytose apoptotic neutrophils produce hepatocyte growth factor during bacterial pneumonia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 May;24(5):608-15.
193. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000 Feb;45(3):528-37.
194. Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol.* 2011;682:3-13.
195. Ranganath RM, Nagashree NR. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol.* 2001;202:159-242.
196. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.* 2008 Jan;15(1):3-12.
197. Ladoire S, Hannani D, Vetizou M, Locher C, Aymeric L, Apetoh L, et al. Cell-Death-Associated Molecular Patterns As Determinants of Cancer Immunogenicity. *Antioxidants & redox signaling.* 2013 Mar 20.
198. Marsden VS, Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:71-105.
199. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem.* 2009 Aug 14;284(33):21777-81.
200. Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J.* 2010 Sep 1;430(2):199-205.
201. Cummins NW, Badley AD. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010. *Cell Death Dis.* 2010;1:e99.

202. Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol.* 2009 Apr;10(4):348-55.
203. Parsons MJ, Green DR. Mitochondria in cell death. *Essays Biochem.* 2010;47:99-114.
204. Cheng HJ, Lin CF, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Luo YH, et al. Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. *Exp Biol Med (Maywood).* 2009 Jan;234(1):63-73.
205. Liu IJ, Chiu CY, Chen YC, Wu HC. Molecular mimicry of human endothelial cell antigen by autoantibodies to nonstructural protein 1 of dengue virus. *J Biol Chem.* 2011 Mar 18;286(11):9726-36.
206. Lin YS, Yeh TM, Lin CF, Wan SW, Chuang YC, Hsu TK, et al. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011 May 1;236(5):515-23.
207. Halstead SB. Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatr Int Child Health.* 2012 May;32 Suppl 1:5-9.
208. Halstead SB. Dengue. *Lancet.* 2007 Nov 10;370(9599):1644-52.
209. Catteau A, Roue G, Yuste VJ, Susin SA, Despres P. Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation. *Biochimie.* 2003 Aug;85(8):789-93.
210. Vasquez Ochoa M, García Cordero J, Gutierrez Castaneda B, Santos Argumedo L, Villegas Sepulveda N, Cedillo Barron L. A clinical isolate of dengue virus and its proteins induce apoptosis in HMEC-1 cells: a possible implication in pathogenesis. *Arch Virol.* 2009;154(6):919-28.
211. Morchang A, Yasamut U, Netsawang J, Noisakran S, Wongwiwat W, Songprakhon P, et al. Cell death gene expression profile: role of RIPK2 in dengue virus-mediated apoptosis. *Virus Res.* 2011 Mar;156(1-2):25-34.
212. Jan JT, Chen BH, Ma SH, Liu CI, Tsai HP, Wu HC, et al. Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF-kappaB are sequentially involved. *J Virol.* 2000;74(18):8680-91.
213. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol.* 1998;161(11):6338-46.

214. Liew KJ, Chow VT. Differential display RT-PCR analysis of ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2 reveals messenger RNA expression profiles of multiple human genes involved in known and novel roles. *J Med Virol.* 2004 Apr;72(4):597-609.
215. Palmer DR, Sun P, Celluzzi C, Bisbing J, Pang S, Sun W, et al. Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *J Virol.* 2005 Feb;79(4):2432-9.
216. Klomporn P, Panyasrivanit M, Wikan N, Smith DR. Dengue infection of monocytic cells activates ER stress pathways, but apoptosis is induced through both extrinsic and intrinsic pathways. *Virology.* 2011 Jan 20;409(2):189-97.
217. Marianneau P, Cardona A, Edelman L, Deubel V, Despres P. Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *J Virol.* 1997;71(4):3244-9.
218. Thongtan T, Panyim S, Smith DR. Apoptosis in dengue virus infected liver cell lines HepG2 and Hep3B. *J Med Virol.* 2004 Mar;72(3):436-44.
219. Matsuda T, Almasan A, Tomita M, Tamaki K, Saito M, Tadano M, et al. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Gen Virol.* 2005 Apr;86(Pt 4):1055-65. Retraction in: *J Gen Virol.* 2010 Oct;91:658.
220. Yen YT, Chen HC, Lin YD, Shieh CC, Wu-Hsieh BA. 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.* 2008 Dec;82(24):12312-24.
221. Sung JM, Lee CK, Wu-Hsieh BA. Intrahepatic infiltrating NK and CD8 T cells cause liver cell death in different phases of dengue virus infection. *PLoS One.* 2012;7(9):e46292.
222. Long HT, Hibberd ML, Hien TT, Dung NM, Van Ngoc T, Farrar J, et al. Patterns of gene transcript abundance in the blood of children with severe or uncomplicated dengue highlight differences in disease evolution and host response to dengue virus infection. *J Infect Dis.* 2009 Feb 15;199(4):537-46.
223. Ha TT, Huy NT, Murao LA, Lan NT, Thuy TT, Tuan HM, et al. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. *PLoS One.* 2011;6(10):e25969.

224. Azeredo EL, Zagne SM, Alvarenga AR, Nogueira RM, Kubelka CF, de Oliveira-Pinto LM. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Jun;101(4):437-49.
225. Suardiáz Pareras JH, Cruz Rodríguez CL, Colina Rodríguez AJ. *Laboratorio Clínico*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2004.
226. Guzman MG, Pelaez O, Kouri G, Quintana I, Vazquez S, Penton M, et al. Caracterización final y lecciones de la epidemia de dengue 3 en Cuba, 2001–2002. *Rev Panam Salud Publica*. 2006;19(4):282-9.
227. Brote de dengue en Cuba, 2006 [Internet]. Organización Panamericana de la Salud. 2006 [cited 10 March 2012]. Available from: <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/eid-eer-2006-oct-24.htm>.
228. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Holmes EC, Bernardo L, Kouri G, Gould EA, et al. Dengue virus type 3, Cuba, 2000-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005 May;11(5):773-4.
229. Pelegrino JL, Arteaga E, Rodriguez AJ, Gonzalez E, Frontela MD, Guzman MG. Normalización de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de antígenos del virus dengue en tejidos embebidos en parafina. *Rev Cubana Med Trop*. 1997;49(2):100-7.
230. Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*. 1971 Nov;8(11):1081-3.
231. Kellenberger E, Durrenberger M, Villiger W, Carlemalm E, Wurtz M. The efficiency of immunolabel on Lowicryl sections compared to theoretical predictions. *J Histochem Cytochem*. 1987 Sep;35(9):959-69.
232. Spurr AR. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res*. 1969 Jan;26(1):31-43.
233. Boenisch T. *Immunochemical Staining Methods*. 3rd ed. California: DakoCytomation; 2001.
234. Hermida Diaz C, Pupo M, Guzmán Tirado MG, Gonzalez Garriga M, Marcet Sanchez R. Empleo de un anticuerpo monoclonal anticomplejo dengue en la purificación viral. *Rev Cubana Med Trop*. 1992;44(3):171-6.
235. Lockshin RA, Zakeri Z. Introduction. In: Lockshin RA, Zakeri Z, editors. *When Cells Die II: A Comprehensive Evaluation of Apoptosis and Programmed Cell Death*. New York: Wiley-Liss; 2004. p. 3-23.

236. Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Trop Med Int Health*. 2011 Aug;16(8):936-48.
237. Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, dos Santos FB, de Araujo ES, de Filippis AM, et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999 May-Jun;94(3):297-304.
238. Srikiatkachorn A, Green S. Markers of dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;338:67-82.
239. Wichmann O, Gascon J, Schunk M, Puente S, Siikamaki H, Gjorup I, et al. Severe dengue virus infection in travelers: risk factors and laboratory indicators. *J Infect Dis*. 2007 Apr 15;195(8):1089-96.
240. Ramos MM, Arguello DF, Luxemburger C, Quinones L, Munoz JL, Beatty M, et al. Epidemiological and clinical observations on patients with dengue in Puerto Rico: results from the first year of enhanced surveillance--June 2005-May 2006. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Jul;79(1):123-7.
241. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis*. 1997 Aug;176(2):313-21.
242. Khan E, Siddiqui J, Shakoor S, Mehraj V, Jamil B, Hasan R. Dengue outbreak in Karachi, Pakistan, 2006: experience at a tertiary care center. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007 Nov;101(11):1114-9.
243. Kadhiravan T, Saxena A, Singh A, Broor S, Sharma SK, Mitra DK. Association of Intracellular T(H)1-T(H)2 Balance in CD4+ T-cells and MIP-1alpha in CD8+ T-cells with Disease Severity in Adults with Dengue. *Immune Netw*. 2010 Oct;10(5):164-72.
244. de-Oliveira-Pinto LM, Marinho CF, Pova TF, de Azeredo EL, de Souza LA, Barbosa LD, et al. Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. *PLoS One*. 2012;7(7):e38527.
245. Wong KL, Chen W, Balakrishnan T, Toh YX, Fink K, Wong SC. Susceptibility and response of human blood monocyte subsets to primary dengue virus infection. *PLoS One*. 2012;7(5):e36435.
246. Warke RV, Martin KJ, Giaya K, Shaw SK, Rothman AL, Bosch I. TRAIL is a novel antiviral protein against dengue virus. *J Virol*. 2008 Jan;82(1):555-64.

247. Shrestha B, Pinto AK, Green S, Bosch I, Diamond MS. CD8<sup>+</sup> T cells use TRAIL to restrict West Nile virus pathogenesis by controlling infection in neurons. *J Virol*. 2012 Sep;86(17):8937-48.
248. Munoz-Jordan JL. Subversion of interferon by dengue virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;338:35-44.
249. Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, Kalayanaroj S, Vaughn DW, Endy TP, et al. TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *J Infect Dis*. 2009 May 15;199(10):1442-8.
250. Azizan A, Sweat J, Espino C, Gemmer J, Stark L, Kazanis D. Differential proinflammatory and angiogenesis-specific cytokine production in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with dengue-2 and dengue-3 virus. *J Virol Methods*. 2006 Dec;138(1-2):211-7.
251. Quillard T, Devalliere J, Chatelais M, Coulon F, Seveno C, Romagnoli M, et al. Notch2 signaling sensitizes endothelial cells to apoptosis by negatively regulating the key protective molecule survivin. *PLoS One*. 2009;4(12):e8244.
252. O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol*. 2000 Feb;156(2):393-8.
253. Korner C, Riesner K, Kramer B, Eisenhardt M, Glassner A, Wolter F, et al. TRAIL receptor I (DR4) polymorphisms C626G und A638C are associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma (HCC) in HCV-infected patients. *BMC Cancer*. 2012 Mar 8;12(1):85.
254. Nasi M, Pinti M, Bugarini R, Troiano L, Lugli E, Bellodi C, et al. Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and Fas ligand (CD178) influence the rise in CD4<sup>+</sup> T cell count after antiretroviral therapy in drug-naive HIV-positive patients. *Immunogenetics*. 2005 Oct;57(9):628-35.
255. Borges Bdo N, Burbano RR, Harada ML. Survivin -31C/G polymorphism and gastric cancer risk in a Brazilian population. *Clin Exp Med*. 2011 Sep;11(3):189-93.
256. Roe MF, Bloxham DM, White DK, Ross-Russell RI, Tasker RT, O'Donnell DR. Lymphocyte apoptosis in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Immunol*. 2004 Jul;137(1):139-45.

257. Law HK, Cheung CY, Sia SF, Chan YO, Peiris JS, Lau YL. Toll-like receptors, chemokine receptors and death receptor ligands responses in SARS coronavirus infected human monocyte derived dendritic cells. *BMC Immunol.* 2009;10:35.
258. Okada H, Kobune F, Sato TA, Kohama T, Takeuchi Y, Abe T, et al. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol.* 2000;145(5):905-20.
259. Zauli G, Secchiero P. The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006 Aug;17(4):245-57.
260. Melloni E, Secchiero P, Celeghini C, Campioni D, Grill V, Guidotti L, et al. Functional expression of TRAIL and TRAIL-R2 during human megakaryocytic development. *J Cell Physiol.* 2005 Sep;204(3):975-82.
261. Gobbi G, Mirandola P, Sponzilli I, Micheloni C, Malinverno C, Cocco L, et al. Timing and expression level of protein kinase C epsilon regulate the megakaryocytic differentiation of human CD34 cells. *Stem Cells.* 2007 Sep;25(9):2322-9.
262. Crist SA, Elzey BD, Ludwig AT, Griffith TS, Staack JB, Lentz SR, et al. Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol.* 2004 Nov;32(11):1073-81.
263. Mera S, Magnusson M, Tarkowski A, Bokarewa M. Extracellular survivin up-regulates adhesion molecules on the surface of leukocytes changing their reactivity pattern. *J Leukoc Biol.* 2008 Jan;83(1):149-55.
264. Song J, So T, Cheng M, Tang X, Croft M. Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. *Immunity.* 2005 May;22(5):621-31.
265. Ong A, Sandar M, Chen MI, Sin LY. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. *Int J Infect Dis.* 2007 May;11(3):263-7.
266. Barnes WJ, Rosen L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg.* 1974 May;23(3):495-506.
267. Lee IK, Liu JW, Yang KD. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults: emphasizing the evolutionary pre-fatal clinical and laboratory manifestations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1532.

268. Binh PT, Matheus S, Huong VT, Deparis X, Marechal V. Early clinical and biological features of severe clinical manifestations of dengue in Vietnamese adults. *J Clin Virol.* 2009 Aug;45(4):276-80.
269. Carlos CC, Oishi K, Cinco MT, Mapua CA, Inoue S, Cruz DJ, et al. Comparison of clinical features and hematologic abnormalities between dengue fever and dengue hemorrhagic fever among children in the Philippines. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Aug;73(2):435-40.
270. Chiu YC, Wu KL, Kuo CH, Hu TH, Chou YP, Chuah SK, et al. Endoscopic findings and management of dengue patients with upper gastrointestinal bleeding. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Aug;73(2):441-4.
271. Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Feb 14.
272. Marianneau P, Megret F, Olivier R, Morens DM, Deubel V. Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *J Gen Virol.* 1996;77(Pt 10):2547-54.
273. Lin YL, Liu CC, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, Chen RM, et al. Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. *J Med Virol.* 2000 Apr;60(4):425-31.
274. Thepparit C, Phoolcharoen W, Suksanpaisan L, Smith DR. Internalization and propagation of the dengue virus in human hepatoma (HepG2) cells. *Intervirology.* 2004;47(2):78-86.
275. Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Jaeck D, Kirn A, et al. Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. *J Virol.* 1999;73(6):5201-6.
276. Ramos C, Sanchez G, Pando RH, Baquera J, Hernandez D, Mota J, et al. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol.* 1998 Aug;4(4):465-8.
277. Liao H, Xu J, Huang J. FasL/Fas pathway is involved in dengue virus induced apoptosis of the vascular endothelial cells. *J Med Virol.* 2010 Jun 22;82(8):1392-9.
278. Wu-Hsieh BA, Yen YT, Chen HC. Dengue hemorrhage in a mouse model. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Sep;1171 Suppl 1:E42-7.
279. Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC, Chiu SC, et al. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab Invest.* 2008 Oct;88(10):1079-89.

280. Makino N, Maeda T, Sugano M, Satoh S, Watanabe R, Abe N. High serum TNF-alpha level in Type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS down-regulation and apoptosis in endothelial cells. *J Diabetes Complications*. 2005;19(6):347-55.
281. Cipolletta C, Ryan KE, Hanna EV, Trimble ER. Activation of peripheral blood CD14+ monocytes occurs in diabetes. *Diabetes*. 2005 Sep;54(9):2779-86.
282. Brausewetter F, Jehle PM, Jung MF, Boehm BO, Brueckel J, Hombach V, et al. Microvascular permeability is increased in both types of diabetes and correlates differentially with serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Horm Metab Res*. 2001;33(12):713-20.
283. Hubold C, Oltmanns KM, Schultes B, Jelkmann W, Born J, Fehm HL, et al. High plasma VEGF relates to low carbohydrate intake in patients with type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)*. 2006 Sep;30(9):1356-61.
284. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol*. 2006;87(12):3623-30.
285. Sierra B, Perez AB, Vogt K, Garcia G, Schmolke K, Aguirre E, et al. MCP-1 and MIP-1alpha expression in a model resembling early immune response to dengue. *Cytokine*. 2010 Dec;52(3):175-83.
286. Becquart P, Wauquier N, Nkoghe D, Ndjoyi-Mbiguino A, Padilla C, Souris M, et al. Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. *BMC Infect Dis*. 2010 Dec 17;10(1):356.
287. Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LC, et al. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS One*. 2012;7(12):e52215.
288. Srikiatkachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanoroj S, Libraty DH, Green S, et al. Virus Induced Decline in Soluble Vascular Endothelial Growth Receptor-2 Is Associated with Plasma Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever. *J Virol*. 2006 Dec 6.

289. Furuta T, Murao LA, Lan NT, Huy NT, Huong VT, Thuy TT, et al. Association of mast cell-derived VEGF and proteases in Dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1505.
290. Bosch I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke RV, et al. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J Virol.* 2002 Jun;76(11):5588-97.
291. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2008 Mar;83(3):536-45.
292. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003 May 15;101(10):3765-77.
293. Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, et al. Heart and Skeletal Muscle Are Targets of Dengue Virus Infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Dec 21;29(3):238-42.
294. Schmidt-Chanasit J, Tenner-Racz K, Poppert D, Emmerich P, Frank C, Dinges C, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever imported into Germany. *Infection.* 2012 Oct 15;40(4):441-3.
295. Halstead SB. More dengue, more questions. *Emerg Infect Dis.* 2005 May;11(5):740-1.
296. Dalrymple NA, Mackow ER. Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Adv Virol.* 2012;2012:840654.
297. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Karl IE. Endothelial cell apoptosis in sepsis. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5 Suppl):S225-8.
298. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays.* 1994 Dec;16(12):901-6.
299. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1999 Jul;27(7):1230-51.
300. Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, Pannuti CS. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci.* 2008 Apr 15;267(1-2):36-40.
301. Guo MF, Yu JZ, Ma CG. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia. *Folia Neuropathol.* 2011;49(2):78-87.

302. Liu N, Du HW, Chen RH, Zheng A, Huang HP, Wu ZH. [The effect of interleukin-10 on neurocyte apoptosis in cerebral ischemia in rats]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2007 Jun;23(6):498-500.
303. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol*. 2011 May;69(5):743-58.
304. Goldenberg-Cohen N, Raiter A, Gaydar V, Dratviman-Storobinsky O, Goldstein T, Weizman A, et al. Peptide-binding GRP78 protects neurons from hypoxia-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2012 Mar;17(3):278-88.
305. Russell JC, Whiting H, Szufliata N, Hossain MA. Nuclear translocation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) determines cell fate after hypoxia ischemia in neonatal brain. *J Neurochem*. 2008 Aug;106(3):1357-70.
306. Chiang MC, Ashraf QM, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Mechanism of DNA fragmentation during hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets. *Neurochem Res*. 2008 Jul;33(7):1232-7.
307. Siami S, Annane D, Sharshar T. The encephalopathy in sepsis. *Crit Care Clin*. 2008 Jan;24(1):67-82, viii.
308. Polito A, Brouland JP, Porcher R, Sonnevile R, Siami S, Stevens RD, et al. Hyperglycaemia and apoptosis of microglial cells in human septic shock. *Crit Care*. 2011;15(3):R131.
309. Vanderveldt GM, Regan RF. The neurotoxic effect of sickle cell hemoglobin. *Free Radic Res*. 2004 May;38(5):431-7.
310. Espina LM, Valero NJ, Hernandez JM, Mosquera JA. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Jan;68(1):48-53.
311. Mosquera JA, Hernandez JP, Valero N, Espina LM, Anez GJ. Ultrastructural studies on dengue virus type 2 infection of cultured human monocytes. *Virology*. 2005 Mar 31;2(1):26.
312. Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Kirn A, Deubel V. Differing infection patterns of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line. *J Infect Dis*. 1998;178(5):1270-8.
313. Falconar AK, Martinez F. The NS1 glycoprotein can generate dramatic antibody-enhanced dengue viral replication in normal out-bred mice resulting in lethal multi-organ disease. *PLoS One*. 2011;6(6):e21024.

314. Boonpucknavig V, Bhamarapravati N, Boonpucknavig S, Futrakul P, Tanpaichitr P. Glomerular changes in dengue hemorrhagic fever. *Arch Pathol Lab Med.* 1976 Apr;100(4):206-12.
315. Wiersinga WJ, Scheepstra CG, Kasanardjo JS, de Vries PJ, Zaaijer H, Geerlings SE. Dengue Fever-induced hemolytic uremic syndrome. *Clin Infect Dis.* 2006 Sep 15;43(6):800-1.
316. Allwinn R, Schieferstein C, Glauke S, Doerr HW. Rapid diagnosis of primary dengue fever by the immunochromatographic test and by electron microscopy--a case report. *Infection.* 1999 Nov-Dec;27(6):365-7.
317. Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, et al. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009 Mar;40(2):253-62.
318. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol.* 2001 Jun 1;166(11):6952-63.
319. Sahaphong S, Riengrojpitak S, Bhamarapravati N, Chirachariyavej T. Electron microscopic study of the vascular endothelial cell in dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1980 Jun;11(2):194-204.
320. Hazelton PR, Gelderblom HR. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg Infect Dis.* 2003 Mar;9(3):294-303.
321. Goldsmith CS, Miller SE. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Oct;22(4):552-63.
322. Fonteneau JF, Kavanagh DG, Lirvall M, Sanders C, Cover TL, Bhardwaj N, et al. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood.* 2003 Dec 15;102(13):4448-55.
323. Raftery MJ, Schwab M, Diesner S, Egerer G, Schonrich G. Dendritic cells cross-presenting viral antigens derived from autologous cells as a sensitive tool for visualization of human cytomegalovirus-reactive CD8+ T cells. *Transplantation.* 2002 Mar 27;73(6):998-1002.
324. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 1998 Mar 5;392(6671):86-9.
325. Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis.* 2006 Oct;11(10):1709-26.

## **VIII. ANEXOS**

### VIII.1 Tablas

**Tabla 1.** Valores de referencia del hemograma normal en el adulto.

<b>Hemograma</b>	<b>Valor de referencia</b>
Hematocrito	0,41 - 0,50 (hombre) 0,37 - 0,47 (mujer)
Recuento global de leucocitos	3,4 - 10 000/mm <sup>3</sup> *
Recuento global de linfocitos	0,8 - 3,5000/mm <sup>3</sup>
Recuento diferencial de linfocitos	20 - 40%
Recuento global de monocitos	0,2 - 0,800/mm <sup>3</sup>
Recuento diferencial de monocitos	1 - 3%
Recuento global de plaquetas	150 – 450 000/mm <sup>3</sup> *

\* Sistema tradicional de unidades en células por milímetros cúbicos.

Fuente: Suardíaz Pareras, Cruz Rodríguez y cols. 2004

**Tabla 2.** Intervalos de referencia de las enzimas hepáticas.

<b>Enzimas hepáticas</b>	<b>Intervalos de referencia‡</b>
ALAT*	0-35 U/L
ASAT†	0-35 U/L

\*ALAT, alanina aminotransferasa; †ASAT, aspartato aminotransferasa; ‡U/L, Sistema Internacional de Unidades por Litro.

Fuente: Suardíaz Pareras, Cruz Rodríguez y cols. 2004.