

ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DEL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 3

SERGIO YEBRAIL GÓMEZ RANGEL

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2010**

ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DEL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 3

SERGIO YEBRAIL GÓMEZ RANGEL

**Tesis de Grado como requisito para optar al título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Directora:
RAQUEL E. OCAZONEZ PhD.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2010**

DEDICO ESTE LOGRO:

A mis padres y mi hermano, por estar conmigo en cada momento, por su paciencia y comprensión. Por brindarme tranquilidad, sus buenos deseos, su aliento y su cariño.

A Gaby, mi adorada sobrina, fuente de muchas de mis sonrisas y alegrías

A Paolita, por acompañarme con todo su apoyo, su cariño y su solidaridad.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Raquel Ocazonez, directora de tesis, por su inagotable y generosa ayuda para lograr este objetivo. Por su enseñanza del método científico, por su interés y compromiso con mi formación personal y científica.

Al doctor Luis Carlos Orozco, por su colaboración en el diseño del trabajo y en el análisis de los resultados.

A mis amigos del grupo de Arbovirus, Angela, Rocio y Luz Angela, por su apoyo moral, y su ayuda en los ensayos de laboratorio.

A Indira, Wilfredo y Sandra, por su ánimo y su amistad en el transcurso del posgrado.

Al CINTROP, por brindarme las herramientas y los laboratorios para el desarrollo del proyecto.

Al programa de maestría por el apoyo económico recibido para la participación en eventos científicos.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. OBJETIVOS	19
1.1 GENERAL	19
1.2 ESPECÍFICOS	19
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1 ESTRUCTURA DEL VIRUS	20
2.2 CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS	22
2.3 VIRULENCIA DEL VDEN	24
2.3.1 Modelos para estudiar la virulencia	24
2.3.2 Marcadores de virulencia	29
2.3.3 Base genética de la virulencia.	33
3. METODOLOGÍA	36
3.1 CÉLULAS	36
3.2 VIRUS	36
3.3 SUEROS	38
3.4 SEVERIDAD DEL DENGUE Y TIPO DE INFECCIÓN	39
3.5 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	39
3.5.1 Métodos de cuantificación de partículas virales	39
3.5.2 Ensayo de replicación viral.	41
3.5.3 ELISA- NS1	42
3.5.4 Ensayo de neutralización por reducción de placa	43

3.6 ANALISIS DE DATOS	44
4. RESULTADOS	45
4.1 NS1 <i>in vitro</i>	45
4.2 NS1 EN PACIENTES CON DENGUE	50
4.3 SUSCEPTIBILIDAD DEL VIRUS A NEUTRALIZACIÓN CRUZADA POR ANTICUERPOS CONTRA EL VDEN-1	53
5. DISCUSIÓN	55
5.1 NS1 COMO MARCADOR DE VIRULENCIA DE LA CEPA DEL VIRUS	55
5.2. SUSCEPTIBILIDAD A LA NEUTRALIZACIÓN CRUZADA COMO MARCADOR DE VIRULENCIA DE LA CEPA DEL VIRUS	59
5.3 LOS HALLAZGOS DEL ESTUDIO EN EL CONTEXTO DE LA TRASMISIÓN LOCAL DEL VDEN	61
6. CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFIA	65

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cepas de virus dengue utilizadas en el estudio	37
Tabla 2. Comparación de la concentración de NS1 soluble en células infectadas con VDEN-3 y VDEN-2 de pacientes con distinta severidad del dengue	48
Tabla 3. Nivel sérico de proteína NS1 en pacientes con dengue infectado con el VDEN-3 o VDEN-2 de acuerdo con el tipo de infección	52
Tabla 4. Nivel sérico de la proteína NS1 en pacientes infectados con VDEN-3 con distinta severidad del dengue comparado con el de infectados con VDEN-2	53
Tabla 5. Susceptibilidad de cepas del VDEN-3 y VDEN-2 aisladas de pacientes con distinta severidad del dengue a la neutralización cruzada por anticuerpos contra el VDEN-1.	54

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Formación de placas de infección en células Vero por virus del dengue en relación con el número de pases.	40
Figura 2. Relación entre dilución del suero y unidades de densidad óptica en el ensayo de ELISA para detectar proteína NS1 del virus del dengue. Sueros (n = 4) fueron diluidos como fue señalado y luego se procesaron usando el estuche E-DEN01P (Panbio, Australia) como se detalla en el texto.	43
Figura 3. Concentración de NS1 secretada en células Vero y BHK-21 infectadas con VDEN-3 (▲) comparada con infectadas con VDEN-2 (■)	45
Figura 4. Concentración de NS1 soluble en células Vero y BHK-21 infectadas con cepas del VDEN-3 aisladas de casos severos (rojo) comparada con las aisladas de casos leves (negro).	46
Figura 5. Concentración de NS1 en células Vero y BHK-21 infectadas con cepas del VDEN-2 aisladas de casos severos (rojo) comparada con las aisladas de casos leves (negro).	47
Figura 6. Correlación entre concentración de la proteína NS1 secretada y título viral en sobrenadante de cultivos de células Vero infectadas con cepas del VDEN-3 y VDEN-2	49
Figura 7. Concentración de NS1 secretada en células Vero infectadas con cepas de VDEN-3 de casos de dengue severo de acuerdo al MOI.	50
Figura 8. Nivel sérico de la proteína NS1 en pacientes con dengue por el VDEN-3 comparado con pacientes por el VDEN-2	51
Figura 9. Nivel sérico de la proteína NS1 en infecciones por el VDEN-3 y VDEN-2 en relación con la severidad del dengue	52

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DEL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 3*

AUTORES: GÓMEZ RANGEL, Sergio Yebraíl; OCAZIOEZ JIMÉNEZ, Raquel Elvira**

PALABRAS CLAVES: Dengue, Virulencia, severidad, neutralización, NS1

DESCRIPCION

En Santander (Colombia) el serotipo 3 del virus del dengue (VDEN-3) ha causado infección primaria y enfermedad leve, mientras que el VDEN-2 secundaria y severa – fatal. Hasta la fecha no ha sido encontrado un marcador biológico que refleje la diferencia del potencial virulento de cepas del VDEN. En este trabajo se investigó si la habilidad para producir NS1 soluble y la susceptibilidad a la neutralización por anticuerpos contra un serotipo distinto, se relaciona con el potencial de la cepa para causar dengue severo. *In vitro*, cepas VDEN-3 de casos severos produjeron menos NS1 que las de leves (0.16 ± 0.1 versus 26.6 ± 8.4 UP, $p < 0.001$) y estas más que las de VDEN-2 ($p = 0.02$; Coef. = 10.9 IC 95% 1.9, 19.9). Diferencias del nivel sérico de NS1 no se relacionaron con la severidad de la enfermedad en infectados con VDEN-3 (20.3 ± 7.3 en severos versus 12.1 ± 9.1 UP en leves; $p = 0.06$) o VDEN-2 (17.1 ± 16.6 versus 12.2 ± 15.1 UP; $p = 0.58$). Las cepas de ambos serotipos fueron igualmente susceptibles a neutralización por anticuerpos contra el VDEN-1 en la prueba de reducción de placa y no hubo diferencias entre serotipos, demostrando que ese marcador no refleja el potencial virulento. Los resultados sugieren que con respecto al VDEN-3, cuanto mayor potencial virulento menor habilidad para replicarse *in vitro* produciendo NS1 y cuanto menor el potencial más habilidad comparado con el VDEN-2. Se requieren estudios para conocer si los hallazgos *in vitro*, podrían estar relacionados con la ocurrencia rara de casos severos por VDEN-3 debido a dificultad de cepas virulentas para mantenerse en la naturaleza y la predominancia del serotipo sobre el VDEN-2, ambos vistos en Santander. La utilidad del nivel sérico de NS1 como marcador de severidad necesita evaluarse en otros estudios.

* Trabajo de grado

** Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director Tesis RAQUEL E. OCAZIOEZ PhD.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE VIRULENCE OF DENGUE VIRUS SEROTYPE 3*

AUTHORS: GÓMEZ RANGEL, Sergio Yebrail; OCAZIO NEZ JIMÉNEZ, Raquel Elvira**

KEY WORDS: Dengue, virulence, severity, neutralization, NS1

DESCRIPTION

In Santander (Colombia), dengue virus type 3 (DENV-3) has caused primary infection and mild illness, while DENV-2 secondary infection and severe – fatal disease. Today, a biological marker that reflects the virulent potential of DENV has not identified. In this study was investigated if the ability to produce soluble NS1 and the susceptibility to neutralization by cross-reactive antibodies, both are related to the virulent potential of DENV strains. In vitro, DENV-3 strains from severe cases produced less NS1 than strains from mild cases (0.16 ± 0.1 versus 26.6 ± 8.4 PU, $p < 0.001$), and strains from mild cases more than DENV-2 strains ($p = 0.02$; Coef. = 10.9 IC 95% 1.9, 19.9). Differences in serum level of NS1 did not correlate with severity of dengue in DENV-3 (20.3 ± 7.3 in severe versus 12.1 ± 9.1 PU in mild cases, $p = 0.06$) or DENV-2 infections (17.1 ± 16.6 versus 12.2 ± 15.1 PU, $p = 0.58$). Both serotypes were equally susceptible to neutralization by antibodies against DENV-1 using plaque reduction test and there were no differences between serotypes, demonstrating the low value of this marker. The results suggest that with respect to DENV-3, the higher the virulent potential the less ability to replicate in vitro producing soluble NS1, and the less virulent potential more ability respective to DENV-2 strains. Studies are needed to know whether the in vitro findings could be related to rare occurrence of severe cases by DENV-3 due to difficulty staying in nature of virulent strains, and with the predominance of this serotype over DENV-2, both seen in Santander. The utility of serum level of NS1 as a severity marker needs to be evaluated in further studies.

* Masters thesis. Medical Basic Sciences Postgraduate Programme

** Faculty of Health, Medical Basic Sciences Postgraduate Programme, Director thesis RAQUEL E. OCAZIO NEZ PhD.

INTRODUCCIÓN

El virus del dengue (VDEN) pertenece al género *Flavivirus* de la familia Flaviviridae y existe como cuatro serotipos denominados VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4. Las cepas de cada serotipo divergen genéticamente y esto ha permitido agruparlas en subtipos o genotipos: cinco (I – V) de los serotipos 1 y 2, cuatro del 3 y tres del 4 (Weaver & Vasilakis 2009). El virus posee cápside icosaédrica rodeada por una envoltura lipoproteína y genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva. El ARN codifica una poliproteína de ~3400 aminoácidos, la cual es fragmentada por proteasas celulares y virales en 10 proteínas: 3 conforman la partícula viral y las 7 restantes o no-estructurales (NS) están presentes en la célula infectada (Lindenbach & Rice 2003).

La infección de humanos con el VDEN puede resultar en una enfermedad leve que clínicamente se presenta como un síndrome febril llamado dengue clásico, o en la forma severa con alteraciones hemodinámicas denominada dengue hemorrágico y que puede llevar a muerte (Gubler 2006). Al menos 65.034 casos de dengue severo ocurrieron en Latinoamérica en 2007-2008 de los cuales cerca de 70 murieron. Colombia fue uno de los países con tasas de incidencia altas, 116.5 x 100.000 habitantes (PAHO 2009). Un sinnúmero de investigaciones se han encaminado hacia la identificación de factores que favorecen la ocurrencia del dengue severo en el individuo y en la comunidad. Hasta la fecha, existen evidencias para concluir que la severidad del dengue depende de la cepa del virus; además de factores individuales como tipo de respuesta inmune, edad y susceptibilidad genética (Chaturvedi et al. 2006, Pang et al. 2007).

Varios estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que los serotipos del VDEN difieren en potencial para causar dengue severo. Sin embargo, las características biológicas y moleculares determinantes de virulencia están aún en estudio y el conocimiento hasta la fecha no es concluyente. Esto debido a que la mayoría de la

investigación se ha realizado con el VDEN-2 desconociéndose si lo mismo ocurre con los otros serotipos. Además, porque no se dispone de un modelo animal apropiado que se pueda usar de rutina en laboratorios de experimentación. Consecuentemente, el potencial virulento de una cepa se ha inferido relacionando la severidad del dengue en el infectado y/o frecuencia del dengue severo en una epidemia con propiedades biológicas del virus que favorecen su mantenimiento, infectividad y diseminación en la población.

El VDEN-2 se considera el de mayor potencial tanto en países de Asia como de América (Vaughn et al. 2000, Guzmán et al. 2000, Nisalak et al. 2003, Ocazonez et al. 2006). Se ha visto que la virulencia de este serotipo es distinta dependiendo del genotipo de la cepa. En América, casos severos fueron muy raros cuando el genotipo IV circuló pero la introducción y posterior permanencia y predominancia del III ha sido uno de los factores relacionados con el incremento notorio del dengue hemorrágico en la región (Kouri et al. 1989, Guzmán et al. 2000, Guzmán & Kouri 2002). En cohortes de pacientes infectados con distinto serotipo, el VDEN-2/III se aísla con mayor frecuencia de quienes desarrollan las formas graves. No obstante, en la población de infectados con este virus es más frecuente el dengue leve que severo (Kouri et al. 1989; Nisalak et al. 2003, Ocazonez et al 2006), sugiriendo que las cepas dentro de un mismo genotipo tienen distinto potencial para causar dengue hemorrágico.

El potencial virulento del VDEN-3 ha sido poco investigado y se infiere de observaciones epidemiológicas y escasos estudios clínicos y básicos. En Latinoamérica casos severos por el genotipo IV cuando fue predominante en los años sesenta no fueron reportados, pero la introducción y diseminación del genotipo III desde 1994 coincidió con incremento del dengue severo en la región (CDC 1995, Messer et al. 2003, Nogueira et al. 2005). Más aún, las cepas del VDEN-3/III parece que difieren en virulencia. En México, Puerto Rico, Venezuela y Perú las epidemias e infecciones han sido de baja severidad a pesar del riesgo de

infección secundaria debido a la presencia de los otros serotipos (Briseño-García et al. 1996, Rigau-Perez et al. 2002, Uzcategui et al. 2003, Montoya et al. 2003). Al contrario, en Brasil, Paraguay y Cuba, el virus ha causado epidemias con mayor proporción de casos severos y muertes (Passos et al. 2004, Peláez et al. 2004 PAHO 2007). Estas diferencias entre cepas del genotipo III se han visto más claramente con aislados de Sri Lanka. Antes de 1989 la ocurrencia de dengue severo era infrecuente, pero en los años siguientes se incrementó notoriamente y esto se ha relacionado con resurgencia de una cepa del mismo genotipo que diverge genéticamente de la que estuvo circulando años atrás (Messer et al. 2002).

En los últimos años ha crecido el interés por estudiar la relación entre concentración de la forma secretada de la proteína NS1 y severidad del dengue. Esta proteína es una de las 7 no-estructurales y participa en el proceso de replicación del ARN viral (Lindenbach & Rice 1997, Alcon-LePoder et al. 2005, Clyde et al. 2006). La NS1 se detecta en el sobrenadante del cultivo de células infectadas con VDEN y se ha demostrado que la cantidad de proteína correlaciona con la eficiencia del ciclo replicativo del virus (Flamand 1999). Adicionalmente, se ha sugerido que el nivel sérico de NS1 en el individuo infectado puede ser usado como marcador del grado de severidad del dengue (Avirutnan et al. 2006). La relación entre potencial virulento de la cepa y habilidad para producir NS1 ha sido muy poco estudiada. Se encontraron solo 4 estudios sobre la relación entre nivel sérico de la proteína en el infectado y severidad de la enfermedad, demostrándose en dos estudios que es mayor en los severos (Libraty et al 2002, Avirutnan et al. 2006, Alcon-LePoder et al. 2006, Lapphra et al. 2008)

Otra propiedad que ha sido postulada como determinante de virulencia del VDEN es la susceptibilidad a la neutralización cruzada por anticuerpos contra otro serotipo (Kochel et al. 2002, Halstead 2009). Se ha sugerido que cepas más

susceptibles se unen al anticuerpo de forma más estable permitiendo ser neutralizadas y consecuentemente disminuyendo el riesgo de infección o enfermedad severa. Al contrario, las cepas menos susceptibles se podrían unir al anticuerpo con menor afinidad sin ser neutralizadas, resultando un complejo con virus viable que es internalizado por células con receptores para la porción Fc del anticuerpo. Como resultado, se facilita la replicación del virus con incremento de la viremia y riesgo de alteraciones severas.

No se encontraron estudios sobre marcadores biológicos del potencial virulento de cepas del VDEN-3. El tema ha sido explorado con cepas del genotipo III y solo dos estudios se encontraron luego de una búsqueda detallada en varias bases de datos. Aislados de VDEN-3/III de Cuba de casos severos no se diferenciaron de los de casos leves en la habilidad para infectar y replicarse en células de mosquito (C6/36) y en ratón lactante (López 2003). Lo mismo se reportó con cepas de Sri Lanka en las mismas células y de riñón de mono (Vero). Sin embargo, los aislados asiáticos se diferenciaron en la habilidad para infectar y diseminarse en el *Ae. aegypti* (Hanley et al. 2008).

Con respecto a VDEN de Colombia, el conocimiento sobre el potencial virulento es muy limitado, datos publicados se encuentran con cepas aisladas en el Departamento de Santander. En esta región circula el VDEN-2/III y VDEN-3/III, además de los otros serotipos (Ocazonez et al 2006, Cortés et al. 2007, Gómez et al 2008, Diaz 2007, Villabona-Arenas et al. 2009). El VDEN-2 el que más casos severos asociados con infección secundaria ocasiona, aunque también casos leves con el mismo tipo de infección o primaria. Adicionalmente, la predominancia de ese serotipo ha coincidido con mayor incidencia de casos severos. El VDEN-3 empezó a circular en 2001 volviéndose el virus predominante hasta 2008. Se esperaba que en ese periodo se incrementara la frecuencia del dengue severo, debido a la supuesta virulencia del genotipo como se vio en Brasil y por el riesgo de infecciones secundarias considerando la endemia por los otros serotipos. Se

observó lo contrario, la proporción de casos severos disminuyó con respecto a años anteriores y la mayoría de las infecciones por el serotipo fueron primarias y leves. Sin embargo, el VDEN-3 se aisló de pacientes con infección primaria que sufrieron dengue hemorrágico grado III (Ocazonez et al. 2006 y 2007, Gómez et al. 2008).

Los hallazgos en el Departamento de Santander sugieren que las cepas del VDEN-3 se diferencian en el potencial para causar dengue severo y éste es menor con respecto al VDEN-2. El propósito general del presente trabajo fue determinar si esas diferencias de potencial se reflejan en diferencias en propiedades biológicas determinantes de virulencia de la cepa. Específicamente, si el potencial para causar dengue severo está relacionado con la habilidad para producir NS1 secretada y con la susceptibilidad a la neutralización cruzada por anticuerpos contra un serotipo distinto. Esto como un intento de aportar al escaso conocimiento sobre la virulencia del VDEN-3 y a la identificación de un marcador para monitorear la presencia de cepas virales con mayor potencial virulento circulando en la comunidad.

1. OBJETIVOS

1.1 GENERAL

Estudiar la relación entre el potencial del VDEN-3 para causar dengue severo y propiedades biológicas determinantes de virulencia de la cepa.

1.2 ESPECÍFICOS

- Determinar si cepas del VDEN-3-genotipo III aisladas de pacientes con distinta severidad del dengue se diferencian entre sí con respecto a la habilidad para producir *in vitro* proteína NS1 soluble
- Establecer si existen diferencias en la concentración sérica de NS1 en infectados con cepas de VDEN-3 genotipo III que desarrollaron distinta severidad del dengue
- Determinar si cepas del VDEN-3 genotipo III aisladas de pacientes con distinta severidad del dengue se diferencian entre sí con respecto a la susceptibilidad a la neutralización por anticuerpos contra un serotipo distinto
- Determinar si existen diferencias de las propiedades del VDEN-3 arriba mencionadas con respecto al VDEN-2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ESTRUCTURA DEL VIRUS

El VDEN tiene un diámetro de 40 – 60 nm, posee envoltura lipoprotéica, cápside icosaédrica, y genoma de ARN de cadena sencilla y de polaridad positiva. La envoltura es derivada de la membrana citoplasmática de la célula y contiene las proteínas E y M del virus. La cápside es una estructura constituida por múltiples copias de la proteína C. El ARN es de 11.000 pares de bases aproximadamente, con una región de lectura abierta y extremos 5' y 3' no-codificantes o regiones UTR. Las regiones UTR contienen secuencias conservadas [CS] y una estructura en forma de horquilla [stem-loop], las cuales son indispensables para la replicación del virus (Clyde & Harris 2006). Holden y colaboradores (2006), encontraron inhibición de la replicación de VDEN-2 en células BHK-21 por oligómeros ligantes de las regiones 5'SL y 3'CS; y lo mismo se demostró con VDEN-1 y -3 con la región 3'SL. La región de lectura abierta del ARN se traduce en una poliproteína que es fragmentada por enzimas virales y celulares en 10 proteínas individuales. El orden de las proteínas dentro de la poliproteína es el siguiente: NH₂-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-COOH. Las tres primeras conforman la estructura del virión como se anotó antes y las 7 restantes participan en la morfogénesis del virus por lo que se conocen como no-estructurales (Lindenbach & Rice 2003).

Cada proteína del virus posee una estructura particular y varias de sus funciones son conocidas:

Proteínas estructurales – La C tiene un tamaño de 11 kDa y posee abundantes residuos de lisina y arginina que le confieren carácter de péptido básico. Esta propiedad le permite interactuar con el genoma para formar la nucleocápside. Por su extremo carboxilo posee un dominio que señala la traslocación de la prM

al retículo endoplásmico rugoso (Rice 1996). La proteína prM de 26 KDa es el precursor de la proteína M madura (8 kDa), su extremo carboxilo contiene un dominio transmembrana que sirve como señal para su localización en el retículo endoplasmático (Mukhopadhyay et al. 2005). Se asume que la prM forma complejos con la proteína E previniendo en ésta un cambio conformacional irreversible que resulte en fusión anticipada durante el ensamblaje de la partícula. Esto permite el transporte de viriones a la superficie celular en compartimentos ácidos. Durante la salida del virus al espacio intercelular ocurre la proteólisis de prM a M por una furina celular (Clyde et al. 2006). La proteína E es una glicoproteína de ~ 54 KDa, considerada la más inmunogénica. Posee un dominio que contiene epítopes que generan anticuerpos de reacción cruzada entre *Flavivirus*, y dos dominios con epítopes para anticuerpos específicos de serotipo y de reacción cruzada entre estos (Modis et al. 2003). La proteína determina el tropismo celular, y participa en la adsorción y penetración del virus al interior de la célula (Clyde et al. 2006).

- *Proteína NS1* - Tiene un tamaño aproximado entre 39 – 41 kDa, es sintetizada como una glicoproteína monomérica y luego transportada al aparato de Golgi donde sufre modificaciones. Posee dos sitios de glicosilación conservados en las posiciones N130 y N207, los cuales son necesarios para la replicación del virus en células de mosquito. La NS1 se encuentra intracelular, sobre la superficie de la célula, y además es secretada dentro del fluido extracelular de células de mamífero pero no de insectos. La proteína intracelular forma homodímeros y estudios con mutantes han mostrado que participa en la replicación del ARN viral (Lindenbach & Rice 1997; Clyde et al. 2006). La proteína aparece anclada a la membrana externa de la célula por glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) y se asume que participa en procesos de señalización (Jacobs et al. 2000). La forma secretada de la proteína interactúa con células vecinas y se considera que tiene papel preponderante en la patogénesis del virus (Alcon LePoder et al. 2005), como se detalla adelante.

- *Otras proteínas no-estructurales* - NS3 tiene función de fosfatasa y helicasa durante la síntesis de ARN viral y también de serin-proteasa cuando la NS2B actúa como cofactor (Arias et al. 1993). En VDEN-2 se ha demostrado que la NS3 puede regular el tráfico intracelular del virus entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi siendo importante en la formación de vesículas membranosas necesarias para la replicación del ARN (Chua et al. 2004). NS5 es una ARN polimerasa dependiente de ARN y posee acción de metil-transferasa (Tan et al. 1996; Egloff et al. 2002). También se ha descrito como proteína que puede inducir la transcripción y la traducción de la Interleuquina 8 que funciona como factor activador de monocitos y neutrófilos (Medin et al. 2005). De NS2A, NS4A y NS4B poco se conoce de sus funciones. Sin embargo, ha sido estimado que podrían participar en la localización adecuada de proteínas para síntesis de ARN y ensamblaje de nuevas partículas (Lindenbach & Rice 2003). Así mismo parecen estar implicadas en regular la respuesta inmune por inhibición del interferón (Muñoz-Jordán et al. 2003).

2.2 CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS

Diferentes tipos de células son susceptibles a la infección por el VDEN. En el individuo infectado son macrófagos, linfocitos, células dendríticas, hepatocitos, microglia y del endotelio (King et al. 1999, Wu et al. 2000, Neves-Souza et al. 2005, Clyde et al. 2006). *In vitro*, células de mosquito *Aedes albopictus* [clon C6/36] (Igarashi 1978) son las más susceptibles, seguido por células de animales como las líneas BHK-21 [riñón de hamster], y Vero [riñón de mono verde africano], y de tejido humano como HepG2 [hepatocarcinoma], Hela [carcinoma epitelial], HEK293 [riñón embrionario]; U-937 [leucemia monocítica] y HL-60 [leucemia promielocítica], K-562 [leucemia eritro-mielo-blastoide], HHF [fibroblastos de piel] y HUVEC [endoteliales de cordón umbilical] (Diamond et al. 2000). La infección celular sigue varias etapas.

La entrada del virus a la célula se realiza mediante eventos consecutivos que comienzan con la adsorción a receptores sobre la membrana celular, siendo el heparan sulfato y el DC-SIGN (molécula específica de adhesión de células dendríticas) los mejores descritos (Germi et al. 2002, Tassaneeritthep et al. 2003). La unión o adsorción del virus al receptor celular es un proceso mediado por la proteína E y la penetración dentro del citoplasma ocurre por endocitosis dentro de vesículas. En el endosoma el pH bajo induce la formación de trímeros de la proteína E y este cambio conformacional resulta en fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal. La fusión forma un poro por el cual la cápside es liberada al citoplasma donde la traducción y replicación del ARN ocurren (Van der Schaar et al. 2007).

La replicación del ARN inicia con la síntesis de una cadena negativa complementaria resultando una molécula de doble cadena (forma replicativa -RF). A partir de la cadena negativa se sintetizan cadenas nacientes (RI) hasta completar nuevas moléculas de ARN cadena sencilla y polaridad positiva. (Uchil & Satchidanandam, 2003). La replicación ocurre en íntima unión con compartimentos membranosos intracelulares donde se detecta la forma RF. Uno de estos compartimentos, los paquetes de vesículas (VP), han sido reportados como sitios membranosos derivados del aparato de Golgi (Mackenzie et al, 1999). Varias proteínas del virus y celulares participan en la replicación. La NS5, NS3 y NS2A se ensamblan con proteínas celulares formando el complejo de replicación (Clyde et al. 2006). Para que se dé inicio a la replicación, las regiones 5'CS y 3'CS deben formar interacciones entre sí con el fin de permitir la ciclización del ARN (Alvarez et al, 2005). La formación del complejo inicia la traducción y síntesis de proteínas, con reclutamiento de la fracción 43S y 48S ribosomales en interacción con la proteína celular eIF4F que inicia la lectura del ARN. La detección del primer codón es facilitada por la presencia de una región en forma de horquilla (cHP) ubicada 12 a 16 nucleótidos aguas abajo [down-stream]. Residuos conservados

antes y después del codón de inicio parecen ser indispensables para la replicación eficiente en células C6/36 y Hep3B (Clyde & Harris, 2006).

El evento más temprano en la formación de nuevos viriones es la formación de la nucleocápside. Esta estructura se conforma de una copia de genoma y abundantes de la proteína C, y el ensamble es llevado a cabo en el citoplasma en asociación con la membrana del retículo endoplásmico. En el lumen del retículo, las proteínas prM y E forman un heterodímero que sigue la vía secretora celular hasta el aparato de Golgi. En las cisternas *trans* la proteína prM es fragmentada a M antes de la salida del virión liberándose el péptido pr, lo cual deja expuesto el dominio de fusión y esto convierte la partícula en un virus maduro capaz de infectar una nueva célula (Zhang et al. 2003). Los nuevos viriones son transportados a la membrana celular por el sistema de vesículas, y el virus es liberado al medio extracelular por fusión de la membrana externa de la célula con la membrana vesicular exocítica o por rupturas específicas en la membrana celular (Mukhopadhyay et al. 2005, Clyde et al. 2006).

2.3 VIRULENCIA DEL VDEN

La virulencia de la cepa del virus ha sido un factor que se tiene en cuenta al explicar por qué algunos individuos que sufren dengue por primera vez y por un mismo serotipo desarrollan enfermedad severa y otros no.

2.3.1 Modelos para estudiar la virulencia. Existen diferentes modelos para investigar características del virus que pueden estar relacionadas con la virulencia. La mayoría de trabajos comparan cepas de distintos genotipos de un mismo serotipo y son infrecuentes los trabajos con cepas de serotipo distinto. Los modelos no son excluyentes debido a que la patogénesis del dengue debe mirarse como un proceso multifactorial.

- Ensayos *in vitro*

La evaluación de la replicación *in vitro* usando líneas celulares continuas de animales, es el método más usado para estudiar la virulencia. Los ensayos se pueden realizar en células C6/36, Vero, HFF y HepG2 que se consideran las más susceptibles a la infección (Diamond et al. 2000); y las condiciones de temperatura, nutrientes y tiempo de incubación dependen de la célula. La habilidad de replicación se evalúa por el efecto citopático sobre la monocapa, el número de células infectadas, o por la productividad del cultivo definida como la concentración de partículas virales en el sobrenadante. En cualquier caso, se asume que cuanto mayor el indicador de replicación mayor la virulencia (Rico-Hesse 2009 y 2010).

Aunque los ensayos *in vitro* con líneas celulares proveen la ventaja de disponer de la célula en el laboratorio sin mayor dificultad, en algunos casos los resultados no correlacionan con la virulencia de la cepa. Esto es, potencial para causar dengue severo en el infectado y/o ser responsable de epidemia de notoria magnitud. La limitante de los ensayos es debida a que no incluyen simultáneamente factores individuales y del vector determinantes de patogénesis y transmisibilidad del virus. Por otro lado, los resultados de los estudios son difíciles de comparar porque la misma cepa se puede comportar de manera distinta debido a la presencia de factores celulares particulares, los cuales pueden favorecer o debilitar la eficiencia del ciclo replicativo (Diamond et al. 2000; Rico-Hesse 2009 y 2010). Como alternativa para superar las limitaciones de los ensayos con líneas celulares, se recomienda usar células de cultivo primario humano teniendo en cuenta que proveen un escenario más cercano al de la infección natural en el infectado. No obstante, estos cultivos tienen la limitante de necesitar un donante que idealmente deberá ser un individuo sano sin infecciones previas con VDEN. Esto debido a que la memoria inmune y genética de la célula puede modular la infección y replicación del virus (Rico-Hesse 2010).

- *Infección de mosquitos*

Evalúa la habilidad de la cepa para infectar y diseminarse en el *Aedes aegypti* y es utilizado para inferir su capacidad de transmisión y diseminación en la población. La infección del mosquito se logra por inoculación del virus por vía intratorácica o por alimentación artificial utilizando sangre contaminada dispuesta en membranas simulando la picadura, siendo el segundo más recomendado porque se acerca más al ciclo natural de infección del mosquito. Diferentes indicadores son usados para inferir la virulencia de la cepa: proporción de células infectadas en diferentes tejidos, tiempo empleado para diseminarse desde el intestino hasta las glándulas salivales, y carga viral en el intestino y glándulas salivales. Se considera que la cepa virulenta es la que infecta mayor proporción de células, se disemina en menor tiempo e invade el mosquito con una carga mayor de viriones. Teniendo en cuenta que las colonias de mosquitos son mantenidas en condiciones artificiales, el ciclo replicativo del virus se puede alterar por variaciones en la susceptibilidad del mosquito a la infección viral. En consecuencia, se recomienda usar mosquitos de bajas generaciones idealmente hasta F4 (Armstrong & Rico-Hesse 2001, Armstrong & Rico-Hesse 2003, Cologna et al. 2005, Anderson & Rico-Hesse 2006; Rico-Hesse 2009).

- *Modelo animal*

Durante años varios investigadores vienen trabajando en la generación de una cepa de ratón susceptible a la infección del virus y que desarrolle síntomas similares a los observados en el individuo que sufre dengue. En 2005 se reportó la cepa NOD/SCID transplantada con células madres hematopoyéticas de cordón umbilical humano. La infección produjo en el ratón un cuadro similar a dengue leve con trombocitopenia aunque sin anticuerpos humanos detectables, por lo cual se consideró un modelo apto para evaluar antivirales (Bente et al. 2005). Desde entonces otras cepas de ratón humanizado han sido reportadas, las cuales

desarrollaron inmunidad adaptativa funcional con producción de anticuerpos aunque a bajo nivel (Kuruvilla et al. 2007, Watanabe et al. 2007, Pearson et al. 2008). En 2009 se reportó la cepa NOD-scid $IL2\gamma^{null}$ con mayor grado de desarrollo del sistema inmune humano y la infección con cepas de diferentes genotipos del VDEN-2 permitió concluir que el modelo es apropiado para evaluar patogénesis en términos de virulencia de la cepa del virus (Mota & Rico-Hesse, 2009). Por otro lado, la infección de monos induce niveles detectables de viremia y esto ha permitido usar el modelo para evaluar toxicidad o efectos adversos de candidatos a vacuna (Yauch & Shresta 2008).

- *Análisis de secuencias genéticas*

La comparación de secuencias de nucleótidos de diferentes regiones del genoma viral y la secuencia de aminoácidos derivada de ésta, puede hacerse con programas sofisticados de bioinformática comercialmente disponibles. Estas herramientas permiten generar árboles filogenéticos y la diversidad genética de una población de virus puede ser inferida de acuerdo a la topología. Las ramas del árbol se pueden correlacionar con variables tales como localización geográfica de la cepa, año de su aislamiento, huésped de dónde se aisló, severidad de la enfermedad en el huésped. Igualmente, se puede inferir sobre la dispersión de la cepa en tiempo y lugar; el reemplazo de linajes de la misma en un periodo de tiempo; identificar cepas más virulentas cuando las aisladas de pacientes severos aparecen agrupadas en una rama distinta a las aisladas de casos leves. El análisis filogenético también permite inferir sobre el origen geográfico del virus y predecir eventos que conducen a resurgencia de una variante genética de la cepa. (Holmes et al. 1995, Holmes 1998).

- Modelos matemáticos

Consiste en generar modelos de transmisión para estimar el efecto sobre la cantidad de virus circulante, de cambios en la inmunidad del hospedero y en la capacidad vectorial del mosquito. Así, se puede inferir sobre el riesgo de dengue para una población humana hipotética y sobre la topología de una epidemia. El análisis con estos modelos sugieren que la reactividad inmune cruzada entre serotipos y la capacidad vectorial del mosquito son los factores más determinantes de la dinámica de circulación de una cepa y el remplazo de linajes o genotipos de la misma (Adams et al. 2006, Wearing & Rohani 2006, Nagao & Koelle 2008). Estas simulaciones matemáticas también permiten medir el peso de la genética del huésped sobre la virulencia de la cepa (Pitzer et al. 2007, Gottfredsson et al. 2008). Aunque es un modelo novedoso y promisorio en el estudio de las características biológicas del virus, aun requiere mayores ajustes y probablemente inclusión de otras variables debido a que las conclusiones obtenidas en algunos estudios llegan a ser contradictorias (Rico-Hesse 2010).

- Predictores de replicación In silico

La implementación de nuevas técnicas moleculares ha permitido el desarrollo y manipulación de clones (genoma completo) o replicones (genoma incompleto) del VDENVEN para el estudio de los eventos involucrados en la replicación (Ward & Davidson 2008). El modelo ha permitido evaluar la relación entre las regiones no codificantes y el ciclo de replicación del virus. Han sido descritas funciones de algunos segmentos que pueden determinar la eficiencia del ciclo replicativo. Las predicciones de estructura secundaria y terciaria de estas regiones del genoma han demostrado ser diferente entre serotipos y genotipos, aunque algunos segmentos se consideran conservados como la región 3'SL (Stem Loop). En el VDENVEN-2, ha sido documentado que las regiones 5' y 3' UTR difieren entre genotipos (Leitmeyer et al. 1999), aunque no es así cuando se comparan cepas

dentro del mismo genotipo de acuerdo a la severidad (Mangada & Igarashi 1998). No obstante, los resultados pueden variar dependiendo del software y del algoritmo matemático que se utilice. (Rico-Hesse 2009).

2.3.2 Marcadores de virulencia. En Latinoamérica la condición más altamente asociada a enfermedad severa es la infección por VDENV-2 genotipo III, (Guzmán et al. 2000). Con el VDENV-3 existe controversia. En algunos países la infección primaria por el genotipo III resulta en dengue leve en la mayoría de los casos (Montoya et al. 2003, Ocazonez et al. 2007) mientras que en otros causa complicaciones severas y muertes (Passos et al. 2004, PAHO 2007). En Puerto Rico, el VDENV-4 genotipo II es el más asociado a epidemias severas mientras que en la mayoría de los otros países es el serotipo que menos papel ha tenido (Rigau-Perez et al. 2002, Gomez et al 2008).

El término virulencia de la cepa del VDENV ha sido considerado como el potencial para causar enfermedad severa, esto es, la proporción de casos en una población de individuos infectados siendo 1 la máxima virulencia; y la habilidad para infectar el mosquito vector causando brotes *versus* epidemias de largo tiempo. Se asume que las cepas con mayor habilidad para infectar y replicarse en la célula huésped del humano y del mosquito tienen mayor potencial para causar dengue severo si se considera que: (i) pueden invadir tejidos del infectado en más extensión y menor tiempo induciendo una respuesta inflamatoria e inmune robusta con mayor nivel sérico de citoquinas pro-inflamatorias que promueven incremento de la permeabilidad vascular (Kurane et al. 1991 y 1993, Green et al. 1999, Lee et al. 2006, Halstead 2007) y (ii) el virus se puede transmitir y diseminar más fácilmente en la comunidad infectando mayor número de individuos susceptibles (Cologna et al. 2005, Rico-Hesse 2010).

Un marcador de virulencia de virus que infectan humanos es la magnitud de la viremia en el enfermo, en términos de concentración de viriones, moléculas de

ARN y/o antígeno viral. Varios estudios han mostrado que cuanto mayor la viremia mayor el riesgo de sufrir dengue severo, y esto se asume que refleja mayor habilidad de la cepa para replicarse en las células blanco (Vaughn et al. 2000, Libraty et al. 2002b, Wang et al. 2003, Guilarde et al. 2008). Usando infecciones *in vitro* se ha encontrado que cepas del VDEN-2 de distinto genotipo difieren en la habilidad para replicarse. Las del III se replicaron a mayor título en células dendríticas y macrófagos de humanos comparado con las del genotipo IV (Cologna et al. 2005, Cologna & Rico-Hesse 2003) y lo mismo se ha encontrado en infecciones experimentales del mosquito *Ae. aegypti* (Armstrong & Rico-Hesse 2003, Cologna et al. 2005). Esas diferencias no fueron tan evidentes cuando se compararon cepas del genotipo III aisladas de casos severos con las aisladas de casos leves en Thailandia (Mangada & Igarashi, 1998), aunque en otros trabajos se ha observado que las aisladas de casos severos muestran mayor capacidad de infectar y replicarse en células humanas, de animales y mosquito comparadas con las de casos leves (Diamond et al. 2000, López 2003).

En los últimos años se le viene dando gran importancia al papel de la NS1 en la virulencia de la cepa y por consiguiente en la severidad de la enfermedad. La forma soluble de la NS1 interactúa con el heparan-sulfato y condroitin-sulfato E en la membrana de células no infectadas y es endocitada acumulándose en endosomas tardíos. Así, puede interrumpir el tráfico intracelular de moléculas resultado en alteración fisiológica de la célula (Alcon-LePoder et al. 2005, Avirutnan et al. 2007). En cultivo *in vitro* de células hepáticas humanas infectadas se ha demostrado que la productividad del ciclo replicativo del virus se incrementa en presencia de NS1 en el sobrenadante, sugiriendo que la acumulación en endosomas puede facilitar la infección celular y favorecer la replicación (Alcon-LePoder et al. 2005). La proteína juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad por la modulación del sistema inmune. Se ha demostrado que factores del complemento pueden ser activados en suero humano normal por la adición de NS1, en ausencia o presencia de anticuerpos anti-NS1 (Avirutnan et al.

2006). La proteína puede interactuar con la proteína celular Clu (encargada de inhibir la acción del complemento), y controlar su función. Dado que la activación del complemento se asocia con extravasación plasmática, se presume que mayor nivel de NS1 en el infectado podría contribuir a la severidad de la enfermedad (Kurosu et al. 2007).

El papel de la NS1 asociada a membrana en la activación del sistema inmune ha sido demostrado en varios estudios (Jacob et al. 2000, Avirutnan et al. 2006, Kurosu et al. 2007). Como sucede con este tipo de proteínas, el reconocimiento por anticuerpos específicos puede resultar en transducción de señales intracelulares vía tirosina-quinasa. Esta señalización puede inducir diferenciación celular la cual se ha demostrado favorece la replicación del virus incrementando la progenie (O'Sullivan & Killen 1994). Por otra parte, ha sido demostrado que la NS1 anclada puede activar señales similares a la del receptor celular CD55, relacionado con inhibición de la actividad del sistema de complemento (Jacob et al. 2000). Al contrario, ha sido reportado que la respuesta inmune dirigida contra la NS1 anclada puede inducir la activación del complemento (Avirutnan et al. 2006).

Se ha reportado que individuos con inmunidad al dengue que luego se infectan con otro *Flavivirus* se recuperan más fácilmente que los no inmunes. (Price & Thind 1971; Tarr & Hammon 1974). Por otro lado, numerosas evidencias han confirmado la contribución de los anticuerpos de reactividad cruzada entre serotipos a la severidad del dengue en infecciones secundarias, un mecanismo conocido como incremento inmune mediado por anticuerpos (Guzman et al. 2002, Halstead 2003). No obstante, la mayoría de individuos que sufren infecciones secuenciales por serotipos distintos desarrollan dengue leve. Para explicar esta controversia, se ha sugerido que los anticuerpos contra un serotipo distinto, presentes en la circulación sanguínea del infectado, podrían neutralizar parcialmente el nuevo serotipo disminuyendo la viremia y en consecuencia el riesgo de enfermedad severa. Dicha neutralización se sustenta en el hecho que la

proteína E contiene epítopes que estimulan la producción de anticuerpos de reactividad cruzada, es decir, reconocen y se unen a los cuatro serotipos del virus (Watts et al. 1999, Endy et al. 2004, Guilarde et al. 2008, Van der Schaar et al. 2009).

El papel de los anticuerpos como determinante de la virulencia del VDENV ha sido explorado en muy pocos estudios. Se ha sugerido que el potencial virulento de la cepa o está relacionado con la capacidad de evadir la acción neutralizante de los anticuerpos específicos o de reactividad cruzada (Kochel et al 2002). Así, cepas de casos severos serían menos susceptibles a la neutralización cruzada que las de casos leves. Esta variación se asume que puede estar relacionada con afinidades distintas del anticuerpo por su epítopo en la proteína E, lo cual a su vez estaría determinado por variación en la secuencia de aminoácidos (Pierson et al. 2007, Kou et al. 2008). Cambio de prolina por treonina en la posición 19 (dominio I), y de valina por alanina en la 329 (dominio III) se asociaron con diferencias de neutralización entre cepas del VDENV-3 genotipo III (Alvarez et al. 2008). Zulueta et al. (2006) observaron que cambios del aminoácido en la posición 329 de la misma proteína, se asociaron con diferencia a la neutralización por anticuerpos entre cepas de VDENV-3 de genotipos distintos.

El escape de cepas del VDENV a la neutralización por anticuerpos, es decir menor susceptibilidad, puede favorecer o al contrario disminuir el riesgo de enfermedad severa dependiendo si es infección por primera vez o secuencial por serotipos distintos. En primarias, el escape podría ser el resultado de presión inmune induciendo cambio en la antigenicidad de la proteína E que disminuye la acción neutralizante de los anticuerpos y en consecuencia el virus más fácilmente infectaría células con agravamiento de la enfermedad. En secundarias, la menor susceptibilidad a la neutralización cruzada resultaría en una interacción anticuerpos-proteína E leve favoreciendo el fenómeno de incremento inmune y en

consecuencia incrementando el riesgo de enfermedad severa (Guzman et al. 2002, Halstead 2009).

Hasta la fecha, la prueba de reducción de placa es el ensayo utilizado para medir la susceptibilidad a neutralización cruzada, la cual se conoce como Plaque Reduction Neutralization Test o PRNT por su sigla en inglés. La magnitud de la neutralización se expresa como la mayor dilución del suero que reduce entre 50 - 80% las placas virales (PRNT₅₀₋₈₀). Se asume que cuanto menor el valor del PRNT menor la susceptibilidad a la neutralización y en consecuencia mayor el potencial virulento de la cepa. La relación entre susceptibilidad a la neutralización cruzada y virulencia de la cepa ha sido demostrada en un solo estudio con VDEN-2. En este, se comparó la susceptibilidad de cepas genotipo III y IV frente a anticuerpos contra el VDEN-1. El valor del PRNT₅₀ fue menor con las del genotipo III (1:32 *versus* 1:262) (Kochel et al. 2002).

2.3.3 Base genética de la virulencia. Análisis filogenéticos han demostrado el incremento de linajes de cada serotipo durante los últimos 200 años, que se pueden intercambiar a través del tiempo o en cierto momento una de ellas ser eliminada (Holmes 2006). Estos cambios de linajes por lo general coinciden con ocurrencia de epidemias e incremento en la proporción de casos severos.

Análisis de secuencias del VDEN-3 genotipo III de la India aislados en un período de 26 años muestran resurgencia de 2 nuevos linajes, uno 1989 y otro en el 2000 coincidiendo con incremento del dengue severo (Messer et al. 2003). VDEN-3 de América se han reconocido 4 linajes distintos cada uno con una ubicación geográfica bien definida, que al parecer difieren en su potencial virulento. Las de Argentina, Paraguay y Brasil forman un linaje distinto a las de Venezuela, Colombia y Perú; el primero más asociado a dengue severo y el segundo a leve (Uzcategui et al. 2003, Aquino et al. 2006, Gomez et al. 2008). Al comparar VDEN-2 de Tailandia aislados en un período de 31 años se identificaron linajes distintos

en relación con el lugar y el período de más o menos dengue severo (Rico-Hesse et al. 1998). El análisis de cepas del VDEN-2 genotipo III de Venezuela aisladas por un período de 10 años mostró la co-circulación de varios linajes y esto se sugirió como un factor que contribuyó a más casos de dengue severo (Uzcategui et al. 2001). La comparación de secuencias de VDEN-4 de Puerto Rico permitió identificar recambio de 5 linajes en un período de 16 años siendo el linaje de años recientes el que causó la epidemia de mayor severidad en ese país en los años 90 (Bennett et al. 2003).

Hasta la fecha no ha sido posible establecer una correlación clara entre severidad del dengue en el infectado y cepas genéticamente distintas. En varios estudios filogenéticos se explorado la variación del gen E entre cepas del mismo serotipo de diferentes países, sin encontrar divergencia genética asociada a severidad. Esto es, las cepas de casos severos se agrupan con las de casos leves en la misma rama del árbol (Duangchanda et al.1994, Thant et al. 1996, Rico-Hesse et al. 1998, Pandey et al. 2000, Uzcategui et al. 2003, Gómez et al. 2008). Lo mismo se ha visto comparando la secuencia de las regiones 3' y 5' UTRs. En un estudio inicial con pocas cepas se encontraron cambios que correlacionaron con virulencia (Mangada & Igarashi 1997), pero esto mismo no se reportó analizando un número mayor de cepas (Zhou et al. 2006).

En general, la base genética de la virulencia del VDEN se ha inferido comparando cepas aisladas durante periodos de tiempo con distinta frecuencia de casos severos. Se ha sugerido que entre VDEN-2 las cepas del genotipo III son más virulentas que las del V o Americano con base en variaciones de la secuencia del genoma. Específicamente, se ha encontrado cambio del codón para el aminoácido 71, 390 y 203 de la proteína E y en varios nucleótidos en las regiones 3' y 5' UTRs, las cuales se consideran determinantes de la capacidad de la cepa para infectar células humanas y en consecuencia causar mayor daño en el infectado (Lewis et al. 1993, Bray et al. 1998, Leitmeyer et al. 1999, Cologna & Rico-Hesse

2003, Rodríguez & Guzman 2005). Al comparar cepas del VDEN-3 genotipo III de la Polinesia Francesa, Roche y colaboradores (2006) encontraron sustituciones en la secuencia del gen NS1 y NS5 e inserciones en la región 3'UTR, las cuales fueron relacionadas con inhibición del ciclo replicativo viral en células K-562. Con respecto al VDEN-3 de Latinoamérica recientemente introducido, se ha encontrado divergencia del gen E y regiones UTRs relacionada a la distribución geográfica y coincidencia con la aparición de casos severos. Cepas de Colombia, Venezuela y México donde el dengue leve fue más frecuente, divergieron de cepas de Brasil, Argentina, Paraguay donde el dengue severo y casos fatales fueron más notorios (Gómez et al. 2008, Aquino et al. 2006).

3. METODOLOGÍA

3.1 CÉLULAS

Se emplearon líneas celulares obtenidas de la colección del Laboratorio de Arbovirus del CINTROP. Los cultivos se hicieron en frascos FALCON® (Becton Dickinson) de 25 y 75 cm² y las monocapas se mantuvieron mediante pases cada 3 - 4 días a concentración de 70.000 células/ml siguiendo procedimientos de rutina.

Las líneas celulares fueron:

- C6/36 HT, de *Aedes albopictus* – cultivadas a 32°C sin atmósfera de CO₂, en medio de Leibovitz (GIBCO-BRL) enriquecido con triptosa (10%) y suero bovino fetal (10%).
- Vero, de riñón de mono verde africano – cultivadas a 37°C en atmósfera de CO₂ (5%), en medio 199 (M-199; SIGMA-ALDRICH) enriquecido con suero bovino fetal (10%).
- BHK-21, de riñón de hamster lactante – cultivadas a 37°C en atmósfera de CO₂ (5%), en medio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH) enriquecido con suero bovino fetal (10%).

3.2 VIRUS

Las cepas del VDEN incluidas en el estudio se seleccionaron de la colección del Laboratorio de Arbovirus del CINTROP, las cuales fueron aisladas del suero de pacientes incluidos en estudios previos. El aislamiento del virus se hizo en células C6/36 y el serotipo se identificó en algunos casos por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales (CDC, Atlanta, USA) y en otros mediante amplificación

de secuencias serotipo-específicas usando la prueba de la PCR con transcripción reversa (Ocazonez et al. 2006, Gómez et al 2008).

Se incluyeron un total de 8 cepas: 4 del VDEN-2 y 4 del VDEN-3 de pacientes con dengue leve y severo todos con infección primaria (Tabla 1), La severidad del dengue se definió como se describe adelante. Los virus fueron tipificados genéticamente en estudios previos: VDEN-3 son del genotipo III de acuerdo a análisis de secuencias del gen E (Villabona-Arenas et al. 2009) y VDEN-2 son del subtipo A (genotipo III; Harris et al. 1999) según el patrón electroforético de secuencias para enzimas de restricción o Restriction-Specific-Site-PCR (Cortés et al. 2007). El genotipo III del VDEN-2 fue confirmado por análisis de secuencias del gen E (Díaz 2007).

El número de cepas de cada serotipo se calculó teniendo en cuenta los siguientes parámetros: i) valor de significancia igual a 0.05; ii) poder del estudio mayor o igual a 0.8; iii) concentración esperada de NS1 de 20 ± 5 y 30 ± 5 unidades PanBio para VDEN-3 y VDEN-2, respectivamente. Estos valores se estimaron en una prueba piloto usando el estuche del ELISA PanBio E-DEN01P y suero de pacientes infectados con VDEN-1, -2, -3, y -4.

Tabla 1. Cepas de virus dengue utilizadas en el estudio.

Serotipo	Código	Año de aislamiento	Severidad del dengue*	Denominación
VDEN-3 [¶]	LV-016	2003	Severo	VDEN-3/S-16
	LV-433	2004	Severo	VDEN-3/S-33
	OC-283	2006	Leve	VDEN-3/L-83
	OC-384	2006	Leve	VDEN-3/L-84
VDEN-2 ^{&}	01-363	2001	Severo	VDEN-2/S-63
	OC-095	2005	Severo	VDEN-2/S-95
	OC-210	2005	Leve	VDEN-2/L-10
	OC-279	2006	Leve	VDEN-2/L-79

*: según criterios descritos en el texto. [¶]: genotipo III (Villabona et al. 2009); [&]: subtipo A/genotipo III (Cortés et al. 2007).

Cada cepa seleccionada se replicó por pases sucesivos en frascos de 25 cm² cada 4 – 6 días, cuatro veces en células C6/36 (pase C6/36 # 4) y 14 veces en células Vero (pase Vero # 14). En todos los casos, el sobrenadante del cultivo conteniendo virus se almacenó a -70°C en alícuotas hasta su uso. Los pases en células Vero fueron requeridos debido a que la progenie colectada de pases menores no formó placas de infección claramente definidas (Figura 1) y esto era indispensable para evaluar la susceptibilidad de las cepas a la neutralización cruzada como se detalla adelante.

3.3 SUEROS

Las muestras fueron seleccionados de la colección del Laboratorio de Arbovirus del CINTROP, las cuales se colectaron de pacientes con dengue que fueron incluidos en estudios previos (Ocazonez et al. 2006, Gomez et al. 2008). El tipo de infección (primaria o secundaria) se definió como se describe adelante.

Se incluyeron sueros de:

- Casos de dengue con infección primaria aguda por VDEN-1: la infección se confirmó por aislamiento viral y el suero se obtuvo 15 - 30 días después de inicio de síntomas. Se incluyeron 10 sueros que se usaron en el ensayo de neutralización cruzada. El número de sueros fue estimado teniendo en cuenta los siguientes parámetros: i) poder de estudio igual a 0.80 con nivel de significancia de 0.05; ii) porcentaje esperado de neutralización cruzada: 70 ±15 y 35 ±15 para VDEN-3 y VDEN-2, respectivamente. Estos valores fueron adoptados con base en las medias geométricas del título de anticuerpos de reacción cruzada obtenidas en estudios por otros utilizando metodología similar a la de este (Kochel et al. 2002, Alvarez et al. 2008).

- Casos de dengue con infección primaria (n = 47) y secundaria (n = 17) por el VDEN-3 confirmada por aislamiento viral. De cada caso se seleccionó el suero colectado 1-5 días después de inicio de síntomas
- Casos de dengue con infección primaria (n = 30) y secundaria (n = 22) por VDEN-2 confirmada por aislamiento viral. De cada caso se seleccionó el suero colectado 1-5 días después de inicio de síntomas

3.4 SEVERIDAD DEL DENGUE Y TIPO DE INFECCIÓN

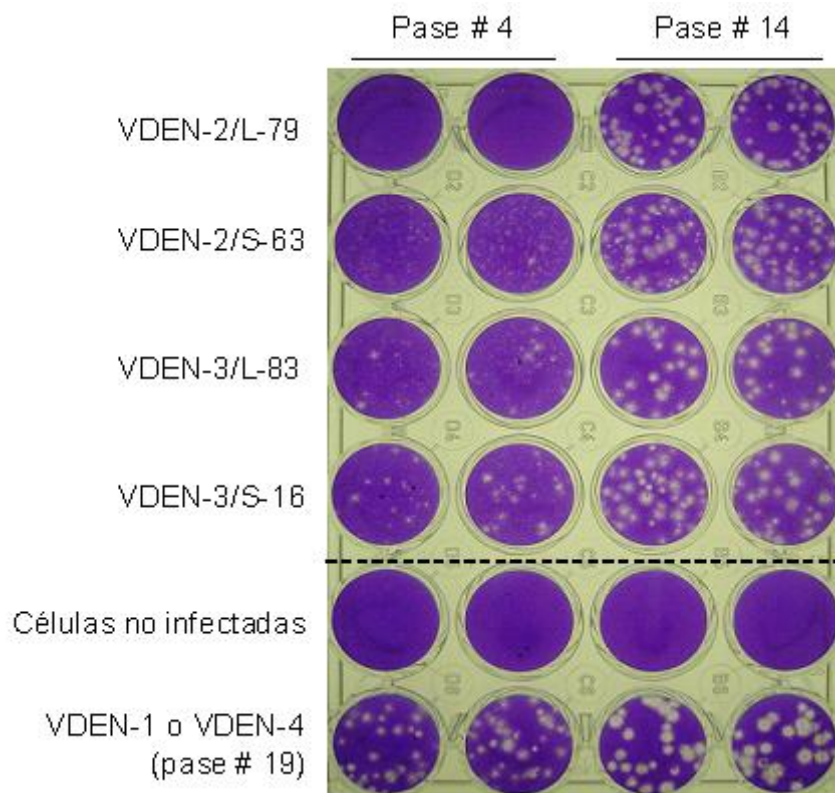
La severidad del dengue y el tipo de infección de los casos de quienes la cepa viral y el suero fueron seleccionados para este estudio se determinó en estudios previos (Gomez et al 2009; Ocazionez et al. 2006). Los parámetros de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2009) fueron adoptados para clasificar el dengue como: leve - presencia simultánea de fiebre, 100.000 o más plaquetas por mm^3 , ausencia de signos de extravasación plasmática (hemoconcentración $\geq 20\%$; sin derrame pleural o hipotensión) y ausencia de hemorragias; o severo - presencia simultánea de fiebre, menos de 100.000 plaquetas por mm^3 , extravasación plasmática (hemoconcentración $\geq 20\%$; y/o derrame pleural y/o hipotensión) y algún tipo de hemorragia. El tipo de infección se definió por la presencia (secundaria) o ausencia (primaria) de anticuerpos IgG anti-dengue en el suero agudo usando el estuche del ELISA E-DEN01G (PanBio, Australia).

3.5 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

3.5.1 Métodos de cuantificación de partículas virales. *Plaqueo* - Se siguió un protocolo modificado al descrito previamente (Meneses et al. 2009). Brevemente, diluciones seriadas en base 10 de la suspensión de virus se adicionaron por duplicado (200 μl /pozo) a monocapas de células Vero crecidas en cajas de 24 pozos y el virus fue adsorbido 1 h a 26°C . Luego se adicionó (0.5 ml/pozo) medio

de plaqueo (M-199; suero bovino fetal 5%; carboximetilcelulosa 3%) y las cajas se incubaron 6 días a 37°C. Al término, las células se fijaron con formol (10%) por 1 h y luego se colorearon con cristal violeta (0.3%). A la dilución apropiada fueron contadas las placas visibles bien definidas y la concentración del virus (título) se calculó así: número de placas x dilución x 1000 (conversión a mililitro) y el valor se expresó en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml).

Figura 1. Formación de placas de infección en células Vero por virus del dengue en relación con el número de pases.



RT-PCR en tiempo real - Se siguió un protocolo descrito (Ocazonez et al. 2010). Para la construcción de la curva se utilizaron diluciones seriadas en base 10 de una suspensión de virus locales de referencia (VDEN-2/ G-025; VDEN-3/ LV-016), de título conocido ($4 - 5.5 \times 10^6$ UFP/ml) por plaqueo. El ensayo de RT-PCR brevemente consistió en: RNA (de virus del estudio y de referencia) fue extraído

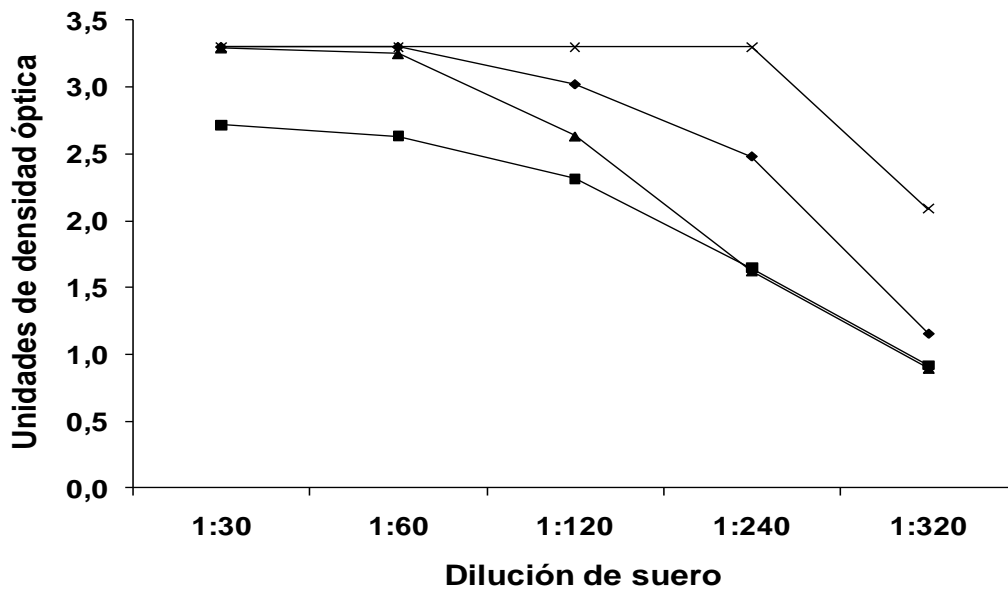
utilizando el estuche QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) y siguiendo las indicaciones del fabricante. El RNA fue resuspendido en 50 μ l de agua tratada con dietil-pirocarbonato y 10 μ l fueron usados para síntesis de DNA copia (cDNA) en una mezcla de reacción de 50 μ l que contenía 200 UI de transcriptasa reversa M-MLV® (Invitrogen, California, USA), 50ng de iniciadores (random hexamers) y 25 mM de cada dNTP. La reacción se llevó a cabo a 25°C por 10 minutos, 55°C por 1 hora y 75°C por 15 minutos. El cDNA se usó para PCR en tiempo real utilizando el estuche comercial Quanti Tect SYBR Green Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y dos parejas de iniciadores (D1-TS2 y D1-TS3. Lanciotti et al. 1992.) para VDEN-2 y VDEN-3. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l que contenían 2 μ l de cDNA, 0.8 μ M de cada iniciador y 25 μ l de la mezcla de PCR SYBR Green. La reacción se realizó en 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 50°C por 30 segundos, y 72°C por 30 segundos con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los valores r^2 para las curvas corregidas con VDEN-2 y VDEN-3 fueron de 0.98 y 0.99, respectivamente, y la concentración menor detectada estuvo entre 4 y 5 UFP/ml para ambos serotipos. Los títulos de los virus del estudio oscilaron entre 3.7×10^5 y 3×10^7 UFP/ml.

3.5.2 Ensayo de replicación viral. Células Vero o BHK-21 (3×10^4 en 200 μ l) en cajas de 48 pozos se infectaron por duplicado con virus (pase C6/36 # 4) a multiplicidad de infección (MOI) de 1. Después de 4 h a 37°C se adicionaron 200 μ l de medio M-199 suplementado con suero bovino fetal al 2% y las cajas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. El sobrenadante se colectó 4, 6 y 8 días después de la infección y se almacenó a -70°C rotulado con un código que no conoció el experimentador. Este sobrenadante se empleó para determinar la concentración de NS1 (adelante), siendo el indicador de habilidad de la cepa viral para replicarse *in vitro*. En cada experimento se analizaron simultáneamente las cepas virales seleccionadas y se hicieron dos ensayos independientes.

3.5.3 ELISA- NS1. Se usó el estuche comercial E-DEN01P (Panbio, Australia) siguiendo las indicaciones del fabricante pero modificando la dilución de la muestra. A la dilución indicada en el estuche (1:10), altas concentraciones de la proteína presentan el mismo valor de absorbancia debido a que se sobrepasa el rango lineal de la lectura (3.3 unidades). Bajo esta circunstancia, se realizó un estudio piloto con diluciones (1:30, 1:60, 1:120, 1:240 y 1:320) de sueros con alta y baja concentración de proteína para determinar la dilución con la cual el ensayo se comportara tipo dosis-respuesta. Se escogió la dilución 1:320 debido a que con los cuatro sueros el valor de absorbancia se ubicó en el rango lineal de lectura (Figura 2). El mismo protocolo se utilizó para el ensayo con sobrenadante de cultivos, usando diluciones (1:50, 1:100 y 1:200) de muestras de cultivos infectados con cepas locales de referencia de los 4 serotipos (VDEN-1 07-150, VDEN-2 G-025, VDEN-3 LV-016 y VDEN-4 04-158) y la dilución 1:50 fue escogida.

El ensayo del ELISA consistió en: 100 µl de suero (1:320) o de sobrenadante (1:50) fueron adicionados a pozos sensibilizados con anticuerpo policlonal anti-NS1 y la placa fue incubada 1 h a 37°C. Después de 6 lavados, se agregaron 100 µl de conjugado anti-NS1 Mab Horseradish-peroxidase, se incubó nuevamente 1 h a 37°C y se realizó lavado de la placa 6 veces. Los complejos inmunes se detectaron por desarrollo de color adicionando 100 µl de Tetra-metil-benzidina (TMB) por 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con ácido fosfórico y la intensidad de color se midió en un espectrofotómetro Anthos 2020 a longitud de onda de 450 nm. La concentración de la proteína se calculó siguiendo las instrucciones del fabricante y expresando el valor en unidades Panbio (UP).

Figura 2. Relación entre dilución del suero y unidades de densidad óptica en el ensayo de ELISA para detectar proteína NS1 del virus del dengue. Sueros (n = 4) fueron diluidos como fue señalado y luego se procesaron usando el estuche E-DEN01P (Panbio, Australia) como se detalla en el texto.



3.5.4 Ensayo de neutralización por reducción de placa. Se utilizaron cepas de casos leves y severos de ambos serotipos (VDEN-3/S-16, VDEN-3/L-83, VDEN-2/S-63 y VDEN-2/L-79) y se siguió el protocolo descrito previamente (Ocazonez et al. 2007). Brevemente, 150 μ l de suero anti-DENV-1 diluido 1:100, 1:500, 1:2500, 1:12500 y 1:62500 se incubaron con 150 μ l de una suspensión de cada virus (60 UFP) 2 h a 37°C. Luego, 200 μ l de la mezcla se adicionaron a monocapas de células Vero crecidas en cajas de 24 pozos y después de adsorción por 1 hora a 37°C las monocapas se incubaron a 37°C, CO₂ 5% en medio de plaqueo (M-199; suero bovino fetal 5%; carboximetilcelulosa 3%). A los 6 días, las placas virales se revelaron por coloración con cristal violeta (0,3%), previa fijación con formol (10%), y se contaron. El conteo de placas lo hizo el experimentador y una persona distinta quien desconocía el propósito del estudio. Los datos se expresaron como la dilución del suero que redujo en 50% o 75% (PRNT₅₀ o ₇₅) las placas virales

calculada por análisis de regresión. Cada suero se procesó simultáneamente con todas las cepas y en dos ensayos independientes.

3.6 ANALISIS DE DATOS

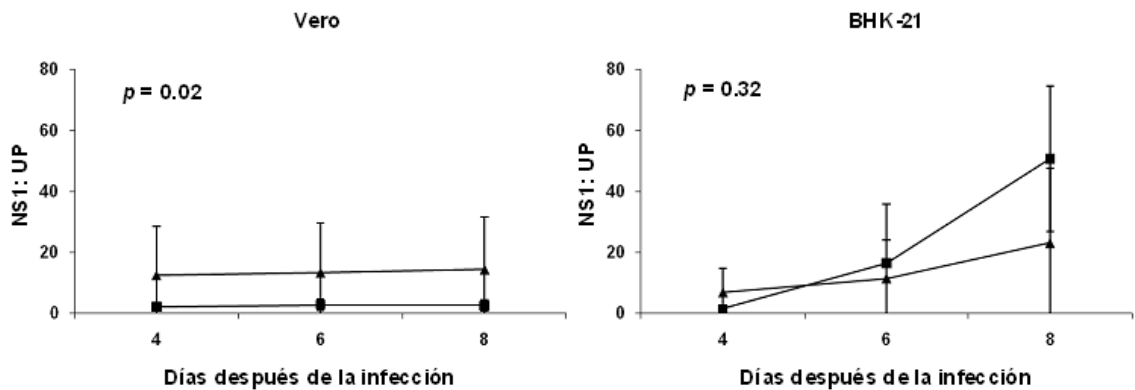
Se comparó: i) la concentración (UP) de NS1 a través del tiempo en cultivos infectados con las cepas de los dos serotipos y la significancia de las diferencias se estableció por análisis de regresión; ii) la concentración (UP) de NS1 en el suero de casos infectados por los dos serotipos del virus y la significancia de las diferencias se determinó usando la prueba de Mann-Whitney U .; y iii) los valores promedios del PRNT con cada suero para cepa de los dos serotipos y la significancia de las diferencias se estableció usando la prueba t de Student. Los análisis se hicieron con el software STATA versión 10.0.

4. RESULTADOS

4.1 NS1 *in vitro*

La concentración de NS1 soluble en cultivos celulares infectados con las cepas del VDEN-3 se comparó con las del VDEN-2. En células Vero, la concentración de la proteína por VDEN-3 resultó mayor ($p = 0.02$; Coef. = 10.9 IC 95% 1.9, 19.9; regresión) en el período del monitoreo. En células BHK-21 se observó al contrario, las del VDEN-2 produjeron más NS1 aunque las diferencias no fueron significativas ($p = 0.32$; Coef. = -9.1 IC 95% -28, 9.7) (Figura 3)

Figura 3. Concentración de NS1 secretada en células Vero y BHK-21 infectadas con VDEN-3 (▲) comparada con infectadas con VDEN-2 (■).

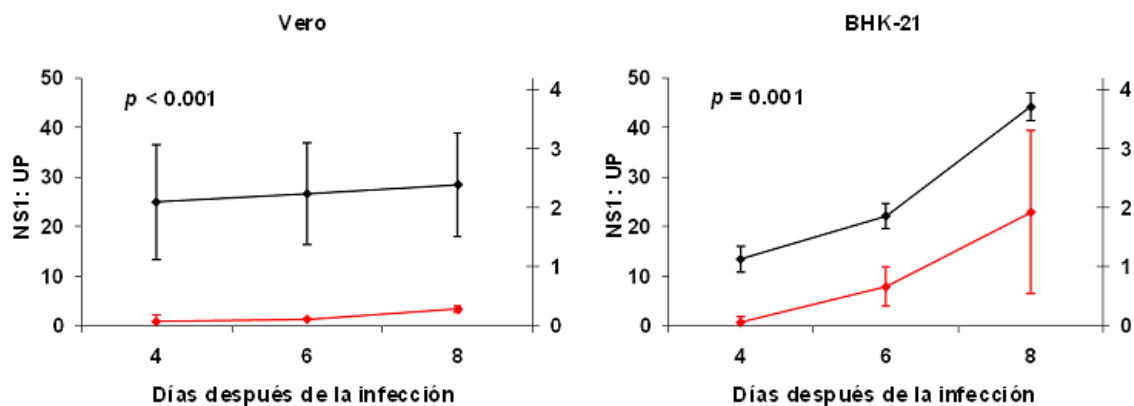


Monocapas celulares se infectaron a MOI de 1 y en los días señalados se recogió el sobrenadante para procesar por el ELISA. Cada dato corresponde al promedio de 4 cepas de cada serotipo analizadas por duplicado y en dos experimentos independientes.

La habilidad de las cepas del VDEN-3 para producir NS1 soluble se comparó entre sí (Figura 4). En células Vero, las de casos severos produjeron menos proteína viral que las de leves en cualquier día después de la infección. La concentración promedio fue 0.16 ± 0.1 versus 26.6 ± 8.4 UP ($p = 0.000$; Coef. = -26.5 IC 95% -34.2, -18.8; regresión). Con ninguna cepa, la concentración de NS1 se incrementó a través del tiempo ($p = 0.8$; Coef = 0.2; IC 95% -2, 2.5, regresión).

En células BHK-21 el resultado fue similar, la concentración promedio de la proteína en el sobrenadante fue 0.88 ± 1.06 versus 26.61 ± 14.3 UP ($p = 0.001$; Coef. = -25.7; IC 95% -38.7, -12.6; regresión). No obstante, en estas células se encontró que la concentración incrementó en el tiempo ($p = 0.002$; Coef = 8.2; IC 95% 3.4, 12.9; regresión).

Figura 4. Concentración de NS1 soluble en células Vero y BHK-21 infectadas con cepas del VDEN-3 aisladas de casos severos (rojo) comparada con las aisladas de casos leves (negro).

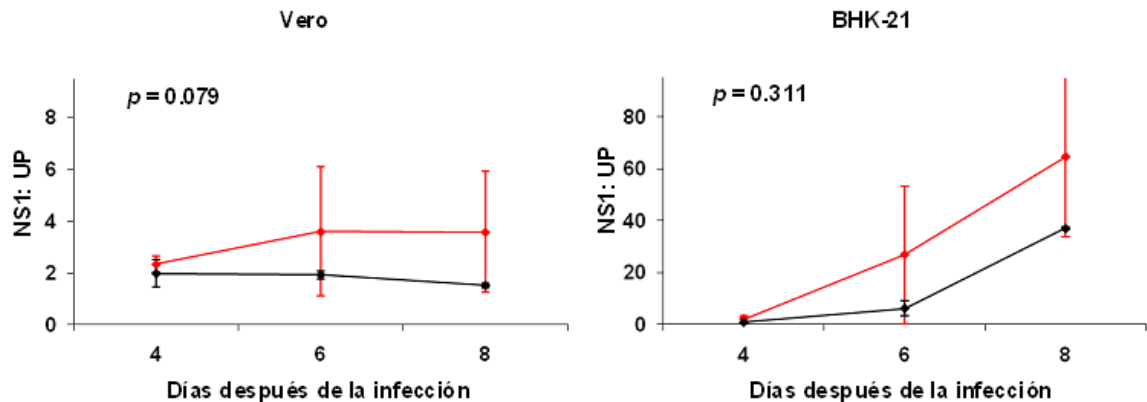


Monocapas celulares se infectaron a MOI de 1 y en los días señalados se recogió el sobrenadante para procesar por el ELISA. Cada valor corresponde al promedio de 2 cepas analizadas por duplicado y en dos experimentos independientes.

La producción de proteína NS1 por cepas del VDEN-2 fue también comparada (Figura 5). Aunque la concentración en cualquier día después de la infección y en ambas células tendió a ser mayor con las cepas de casos severos que de casos leves, la diferencia en ningún caso fue significativa. Esto es: Vero: 3.17 ± 1.66 versus 1.81 ± 0.33 UP en Vero ($p = 0.079$; Coef. = 1.3 IC 95% -0.18, 2.9; regresión); BHK-21: 31.1 ± 33.4 versus 14.6 ± 17.5 UP ($p = 0.3$; Coef. = 16.4 IC 95% -17.9, 50.8). Se encontró que la concentración de la proteína se incrementó a través del tiempo en células BHK-21 ($p = 0.003$; Coef = 12.3; IC 95% 5.4, 19.2; regresión), pero no fue así en células Vero ($p = 0.69$; Coef = 0.09; IC 95% -0.45, 0.65; regresión).

La producción de NS1 soluble a los 8 días post-infección por cepas de los dos serotipos con distinto potencial para causar dengue se comparó (Tabla 2). Entre las aisladas de casos severos, la concentración de la proteína fue mayor con las del VDEN-2 tanto en células Vero ($p = 0.02$; Mann-Whitney U) como BKH-21 ($p = 0.02$). Entre las aisladas de casos con dengue leve el resultado fue al contrario, las del VDEN-3 resultaron con mayor habilidad para producir NS1 tanto en células Vero ($p = 0.01$) como en BHK-21 ($p = 0.02$). Un hallazgo para resaltar es que en células Vero la concentración de NS1 por cepas del VDEN-3 de casos leves resultó mayor comparada con cepas del VDEN-2 de casos severos ($p = 0.02$); sin embargo, en células BHK-21 no se observó la misma diferencia ($p = 0.2$).

Figura 5. Concentración de NS1 en células Vero y BHK-21 infectadas con cepas del VDEN-2 aisladas de casos severos (rojo) comparada con las aisladas de casos leves (negro).



Monocapas celulares se infectaron a MOI de 1 y en los días señalados se recogió el sobrenadante para procesar por el ELISA. Cada valor corresponde al promedio de 2 cepas analizadas por duplicado y en dos experimentos independientes.

Tabla 2. Comparación de la concentración de NS1 soluble en células infectadas con VDEN-3 y VDEN-2 de pacientes con distinta severidad del dengue.

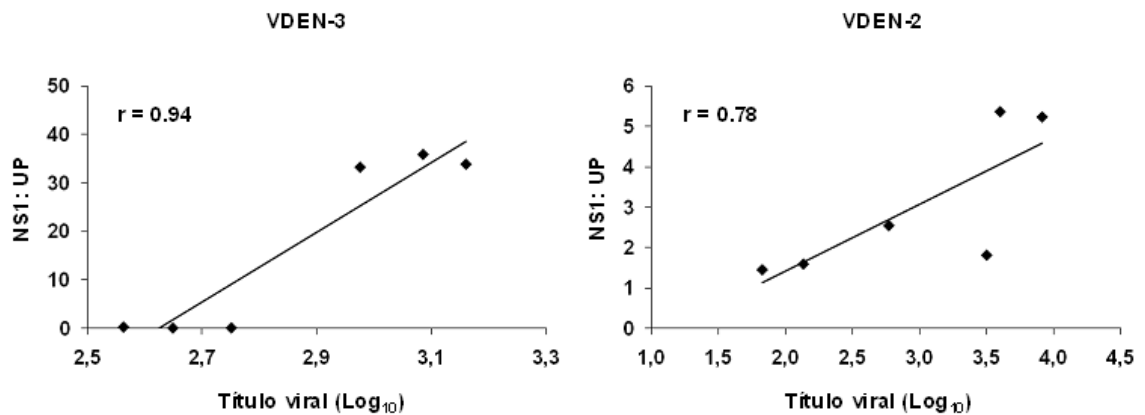
Serotipo	Dengue severo		Dengue leve	
	Vero	BHK-21	Vero	BHK-21
VDEN-3	0.29 ± 0.04	1.92 ± 1.37	28.44 ± 10.4	44.18 ± 2.76
VDEN-2	3.58 ± 2.33	64.49 ± 30.8	1.52 ± 0.08	37 ± 0.61
<i>p</i> *	0.02	0.02	0.01	0.02

Cultivos celulares se infectaron con el virus a MOI de 1 y la concentración de NS1 en el sobrenadante se determinó a los 8 días post-infección por el ELISA. *p** valor de la significancia de la diferencia entre ambos grupos calculado con la prueba de Mann-Whitney U.

De todas las cepas analizadas, las del VDEN-3 de casos severos resultaron las menos hábiles para producir NS1 soluble. Este resultado podría reflejar dos circunstancias: (i), la proteína presente en el sobrenadante podría ser endocitada por células no infectadas con mayor afinidad que la producida por las otras cepas y esto contribuir a menor concentración; y (ii), al MOI usado para infectar las células la productividad del cultivo podría ser muy baja y consecuentemente la producción de NS1. Las dos hipótesis se evaluaron, la primera correlacionando la concentración de NS1 con el título viral en el sobrenadante del cultivo; la segunda, determinando la variación en la concentración de la proteína en relación con el MOI.

La correlación entre título viral y concentración de NS1 se evaluó realizando infecciones de células Vero, con una cepa de cada serotipo con distinto potencial para causar dengue severo. En todos los casos, se observó correlación entre los dos indicadores de replicación viral tanto en VDEN-3 ($r = 0.94$) como en VDEN-2 ($r = 0.78$) (Figura 6), como ha sido reportado por otros (Libraty et al. 2002). Como se esperaba, la cepa de VDEN-3 del caso severo fue la que se multiplicó a más bajo título. Estos resultados descartan la hipótesis de que la baja concentración de NS1 soluble podría deberse a que la proteína es endocitada por células no infectadas o por la misma infectada.

Figura 6. Correlación entre concentración de la proteína NS1 secretada y título viral en sobrenadante de cultivos de células Vero infectadas con cepas del VDEN-3 y VDEN-2.

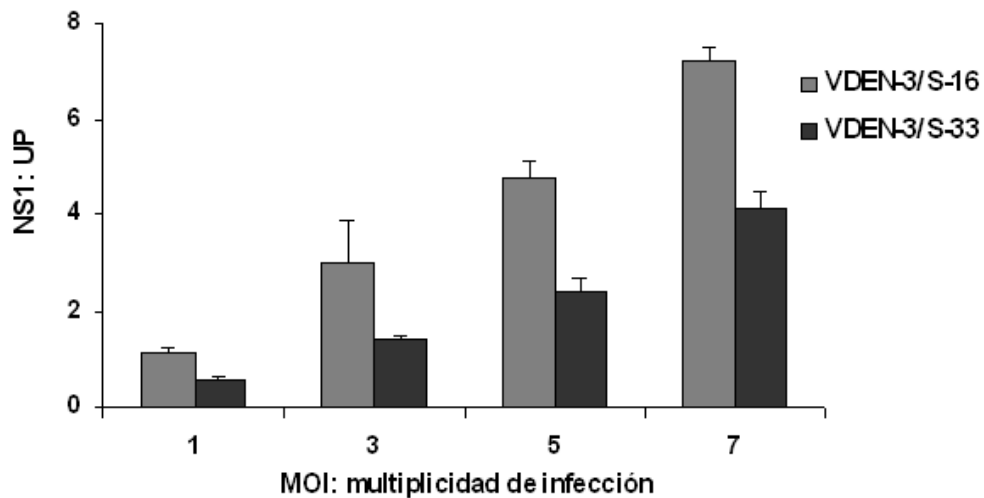


Monocapas celulares se infectaron a MOI de 1 y a los días señalados se recogió el sobrenadante para determinar simultáneamente la concentración de NS1 (estuche E-DEN01P) y título viral (UFP/mL determinado por RT-PCR en tiempo real). Para cada serotipo se incluyeron 2 cepas (-/S y -/L). Cada valor corresponde al promedio de dos experimentos independientes.

Para evaluar la relación entre MOI y concentración de NS1, se infectaron células Vero con las cepas del VDEN-3 de casos severos usando variados MOI (1, 3, 5 y 7). La concentración de la proteína se determinó en el sobrenadante colectado 8 días después de la infección. Como se muestra en la Figura 7, con ambas cepas se obtuvo una curva dosis-respuesta, esto es, mayor concentración de la proteína cuanto mayor el MOI como fue reportado por Ludert et al (2008). Estos resultados confirman la hipótesis que al MOI utilizado, los cultivos infectados con las cepas de VDEN-3 de casos severos tienen baja productividad de virus, y por tanto, esto podría explicar la baja detección de NS1 en el sobrenadante.

Los resultados de los experimentos *in vitro* sugieren que la relación entre potencial de la cepa del virus para causar dengue severo y concentración de la proteína NS1 soluble varía dependiendo del serotipo. Con el VDEN-3 el potencial patógeno se relaciona con menor producción de proteína y al contrario con el VDEN-2.

Figura 7. Concentración de NS1 secretada en células Vero infectadas con cepas de VDEN-3 de casos de dengue severo de acuerdo al MOI.



Monocapas celulares se infectaron a la MOI señalada y 8 días después de la infección se colectó el sobrenadante para determinar la concentración de NS1 por ELISA. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos independientes.

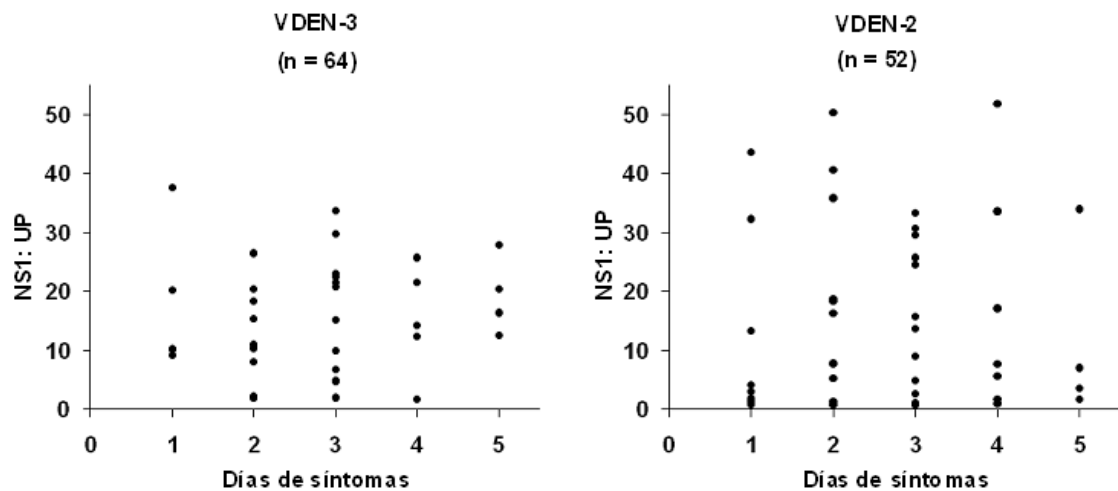
4.2 NS1 EN PACIENTES CON DENGUE

En los primeros cinco días de inicio de síntomas de la enfermedad, el nivel sérico promedio de NS1 no fue diferente entre pacientes infectados con VDEN-3 y con VDEN-2: 13.7 ± 9.3 versus 13.2 ± 14.6 ($p = 0.072$; Mann-Whitney U), aunque mayores niveles se observaron en infectados con VDEN-2 (Figura 8). Debido a que el tipo de infección es determinante del resultado de la infección con el VDEN y que la NS1 interviene en procesos que contribuyen a la severidad del dengue, se comparó el nivel sérico de la proteína en casos por cada serotipo con diferente tipo de infección (Tabla 3). Con VDEN-3 el nivel sérico promedio en primarios no varió significativamente de los secundarios ($p = 0.1$, Mann-Whitney U), pero en VDEN-2 el nivel sérico fue mayor en los primarios ($p = 0.007$).

La relación entre nivel sérico de NS1 y potencial de la cepa para causar dengue severo fue evaluada (Figura 9). En infecciones por el VDEN-3 no se encontraron

diferencias en el nivel sérico de la proteína entre las severas comparadas con las leves (20.3 ± 7.3 versus 12.1 ± 9.1 UP; $p = 0.06$; Mann-Whitney U), y lo mismo se encontró en infecciones por el VDEN-2 (17.1 ± 16.6 versus 12.2 ± 15.1 UP; $p = 0.58$). No obstante, se observa tendencia a mayores promedios en las infecciones severas por los dos serotipos. Lo mismo se encontró cuando se evaluó la relación entre NS1 sérica y severidad de la enfermedad independiente del serotipo, aunque las diferencias no fueron significativas: 18.9 ± 11.5 versus 12.1 ± 12.3 ($p = 0.08$; Mann-Whitney U).

Figura 8. Nivel sérico de la proteína NS1 en pacientes con dengue por el VDEN-3 comparado con pacientes por el VDEN-2.



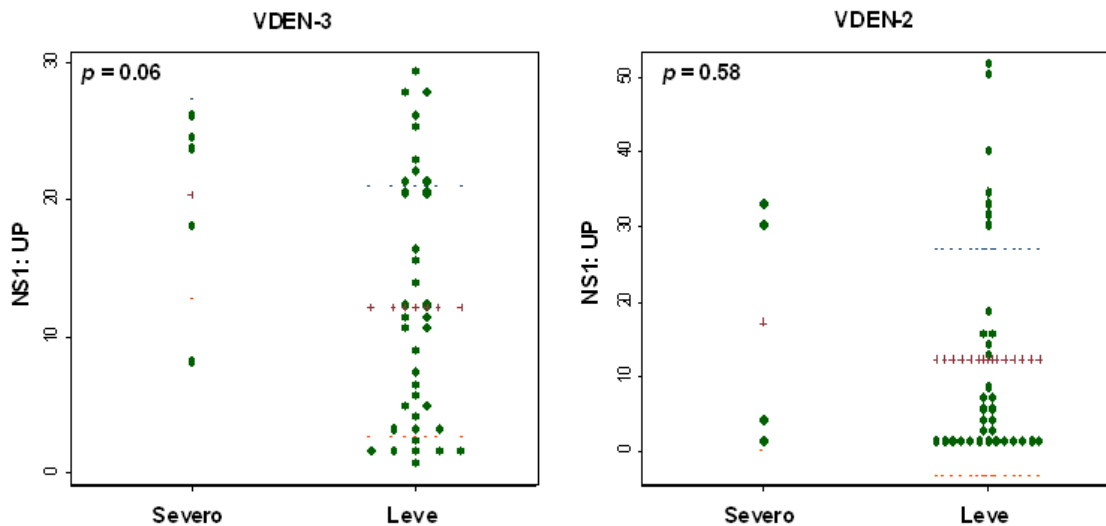
Suero de casos de dengue confirmado por aislamiento del virus y colectado en los días señalados, se procesó con el estuche E-DEN01P. No hubo diferencias en el nivel sérico al comparar los datos de VDEN-3 con VDEN-2 ($p = 0.07$, Mann-Whitney U).

Tabla 3. Nivel sérico de proteína NS1 en pacientes con dengue infectado con el VDEN-3 o VDEN-2 de acuerdo con el tipo de infección.

Infección	VDEN-3		VDEN-2	
	n	UP [†]	n	UP
Primaria	47	14.7 ± 9.0	30	16.6 ± 15.7
Secundaria	17	10.8 ± 9.5	22	8.6 ± 11.8
<i>p</i> *		0.1		0.007

El tipo de infección se determinó como se describe en el texto. †: Unidades PanBio (estuche E-DEN01P). *: significancia de la diferencia en el mismo grupo (Mann-Whitney U).

Figura 9. Nivel sérico de la proteína NS1 en infecciones por el VDEN-3 y VDEN-2 en relación con la severidad del dengue.



Suero de casos de dengue de distinta severidad infectados con el VDEN-3 (severo = 5, leve = 37) o el VDEN-2 (severo = 4, leve = 34), colectado entre 0 – 5 días de inicio de síntomas, se procesó por el ELISA.

El nivel sérico promedio de NS1 se comparó entre infectados con VDEN-3 e infectados con VDEN-2 (Tabla 4). En casos con dengue severo no se observaron diferencias entre los dos serotipos ($p = 0.9$) y lo mismo se encontró en casos con dengue leve ($p = 0.16$). Al comparar infecciones leves por VDEN-3 con las severas por VDEN-2, tampoco se encontraron diferencias ($p = 0.62$).

Los resultados en pacientes con dengue sugieren que el potencial de la cepa del virus para causar dengue severo no se relaciona con el nivel sérico de la proteína NS1. No obstante, contrario a lo observado *in vitro*, el nivel de la proteína en infecciones por VDEN-3 tiende a ser mayor en las severas que en las leves y en las primeras es similar comparado con infecciones de la misma severidad por el VDEN-2.

Tabla 4. Nivel sérico de la proteína NS1 en pacientes infectados con VDEN-3 con distinta severidad del dengue comparado con el de infectados con VDEN-2.

Dengue	VDEN-3		VDEN-2		p^*
	n	UP [†]	n	UP	
Severo	5	20.3 ± 7.3	4	17.1 ± 16.6	0.9
Leve	37	12.1 ± 9.1 ††	34	12.2 ± 15.1	0.16

†: Unidades PanBio (estuche E-DEN01P). *: significancia de la diferencia en el mismo grupo (Mann-Whitney U). ††: $p = 0.62$ comparado con VDEN-2 severo.

4.3 SUSCEPTIBILIDAD DEL VIRUS A NEUTRALIZACIÓN CRUZADA POR ANTICUERPOS CONTRA EL VDEN-1

Con los sueros de casos con infección aguda por VDEN-1, la cepa del VDEN-3 aislada del caso severo resultó igual de susceptible a la neutralización cruzada que la cepa aislada del caso leve (4.29 ± 0.15 versus 4.67 ± 0.14). Cuando se compararon las cepas de VDEN-3 con las de VDEN-2 no se encontraron diferencias tanto entre las de casos severos (4.29 ± 0.15 versus 4.4 ± 0.12) como de leves (4.67 ± 0.14 versus 4.75 ± 0.19). Tampoco hubo diferencias entre la cepa del VDEN-3 del caso leve y la de VDEN-2 del severo: (4.67 ± 0.14 versus 4.4 ± 0.12). La Tabla 5 muestra los valores del PRNT₅₀ para cada virus con cada uno de los sueros.

Tabla 5. Susceptibilidad de cepas del VDEN-3 y VDEN-2 aisladas de pacientes con distinta severidad del dengue a la neutralización cruzada por anticuerpos contra el VDEN-1.

Suero	VDEN-3 / dengue		VDEN-2 / dengue	
	Severo (S-16)	Leve (L-83)	Severo (S-63)	Leve (L-79)
1	3.64 ± 0.03	4.62 ± 0.15	4.19 ± 0.22	5.20 ± 0.11
2	5.82 ± 0.23	5.39 ± 0.13	5.13 ± 0.19	6.58 ± 0.22
3	5.31 ± 0.13	6.27 ± 0.09	5.06 ± 0.12	6.53 ± 0.07
4	3.14 ± 0.09	3.11 ± 0.07	3.41 ± 0.05	2.40 ± 0.01
5	4.38 ± 0.33	5.14 ± 0.32	4.26 ± 0.02	5.70 ± 0.12
6	1.98 ± 0.03	2.73 ± 0.07	2.94 ± 0.27	1.54 ± 0.88
7	3.86 ± 0.20	4.22 ± 0.18	3.98 ± 0.06	4.10 ± 0.11
8	5.18 ± 0.13	4.97 ± 0.06	4.84 ± 0.20	6.02 ± 0.04
9	4.71 ± 0.10	5.05 ± 0.14	4.95 ± 0.02	4.70 ± 0.17
10	4.86 ± 0.18	5.23 ± 0.19	5.20 ± 0.04	4.76 ± 0.16
Promedio	4.29 ± 0.15	4.67 ± 0.14	4.4 ± 0.12	4.75 ± 0.19

Los datos corresponden al Log_5 de la dilución del suero que redujo 50% de las placas de infección (PRNT_{50}). $P > 0.05$ (Student) al comparar promedio de los grupos de cada serotipo o entre los dos serotipos. Los datos representan el promedio de dos ensayos independientes.

Los resultados de los ensayos de la PRNT sugieren que la susceptibilidad del virus a la neutralización por anticuerpos contra un serotipo distinto, no se puede considerar como marcador in vitro de potencial virulento de la cepa.

5. DISCUSIÓN

5.1 NS1 COMO MARCADOR DE VIRULENCIA DE LA CEPA DEL VIRUS

Es conocido que la virulencia de la cepa del virus es factor determinante de la severidad del dengue (Gubler 2006). Una pregunta aún no resuelta se relaciona con las propiedades de la cepa que le confieren el potencial para causar enfermedad severa. Muy poco se ha avanzado en clarificar el tema y la mayoría de los estudios se han realizado comparando cepas del VDEN-2 del genotipo III con el V. Algunas evidencias sugieren que la virulencia podría estar relacionada con la habilidad de la cepa para replicarse en la célula huésped y con la magnitud a la que se deja neutralizar por anticuerpos contra si misma y contra otro serotipo (Kochel et al. 2002, Cologna & Rico-Hesse 2003, Armstrong & Rico-Hesse 2003, Cologna et al. 2005, Clyde et al. 2006, Haslstead 2009, Rico-Hesse 2010).

En este estudio se investigó si la producción de la forma soluble de la proteína NS1, podría ser un factor relacionado con la virulencia del VDEN-3 con respecto al VDEN-2. Esto debido a que la NS1 ha sido descrita como una proteína determinante de la eficiencia del ciclo replicativo del virus (Alcon Le-Poder et al. 2006) y en consecuencia de la magnitud de la viremia en el infectado (Libraty et al. 2002). Varios estudios demuestran que el riesgo de dengue severo incrementa cuanto mayor sea la viremia (Vaughn et al. 2000, Libraty et al. 2002b, Wang et al. 2003, Guilarde et al. 2008).

Los experimentos *in vitro* muestran que, dependiendo de la célula, las cepas del VDEN-3 resultaron más o igual de hábiles para producir NS1 que las del VDEN-2 (Figura 3). Mayor producción de NS1 en células C6/36 por una cepa Venezolana del VDEN-3 también fue encontrada por Ramirez y colaboradores (2009), al compararla con otra del VDEN-2 del mismo país. La mayor habilidad del VDEN-3 no se espera considerando que el VDEN-2 es el serotipo que con mayor

frecuencia causa dengue severo en Santander, Colombia (Ocazonez et al. 2006) y también en otros países (Kouri et al. 1989, Rico-Hesse et al. 1997, Vaughn et al. 2000). Un resultado que llamó la atención, fue que la habilidad para producir NS1 no se relacionó con el potencial de la cepa para causar dengue severo. Esto es, con VDEN-3 las de casos leves produjeron más proteína que las de los severos, y con VDEN-2 no hubo diferencias a pesar que una cepa era de un caso fatal (Figura 4, 5). Se esperaba que las cepas de severos mostraran mayor habilidad teniendo en cuenta que en estos pacientes la viremia tiende a ser más alta y esto se asume ser debido a mayor replicación del virus (Vaughn et al. 2000, Libraty et al. 2002b, Wang et al. 2003, Guilarde et al. 2008).

La menor producción *in vitro* de NS1 por cepas del VDEN-3 de casos severos podría deberse a problemas técnicos o de diseño del estudio. Particularmente: (i) pudo haberse errado en el cálculo de concentración (PFU/mL) del inóculo de las severas que se usó para infectar las células y esto resultó en un MOI menor comparado con las otras cepas. Esto se descartó ya que el título viral del inóculo fue nuevamente determinado por RT-PCR en tiempo real y el resultado fue el mismo; y (ii) imprecisión en la clasificación de la severidad del dengue en el paciente de quien la cepa se aisló. Esto también se podría descartarse teniendo en cuenta que los pacientes fueron atendidos por un médico participante en el estudio, quien con base en seguimiento de hallazgos clínicos y de laboratorio definió la severidad siguiendo los criterios de la OMS (Ocazonez et al, 2006). Por otro lado, la severidad de los casos reflejaron los extremos del espectro, esto es, dengue leve sin manifestaciones hemorrágicos *versus* hemorrágico grado III, y todos habían sufrido la enfermedad por primera vez descartándose que en la presentación del cuadro clínico influyó el fenómeno de incremento mediado por anticuerpos.

Como se muestra en la Figura 6, la concentración de NS1 y título de la progenie en el sobrenadante del cultivo correlacionaron, indicando que la habilidad de la

cepa para sintetizar la proteína refleja su capacidad para infectar y replicarse. Lo mismo fue reportado por Ludert y colaboradores (2008) con VDEN-2. Así, se podría especular que la menor producción de NS1 por VDEN-3 de severos pudo deberse a menor habilidad de la cepa para infectar la célula. Como se muestra en la Figura 7, cuanto mayor el MOI la producción de NS1 por cepas de severos incrementó. Al parecer, estas cepas interactúan con la célula con mayor dificultad comparadas con las leves, teniendo en cuenta que las segundas produjeron más NS1 inclusive comparadas con las del VDEN-2.

Un factor que puede determinar la habilidad de la cepa para infectar y replicarse *in vitro* produciendo NS1, es el número de subcultivos en la misma célula donde originalmente se aisló o en otras. Se ha sugerido que pases sucesivos resultan en mutaciones puntuales en el genoma viral favoreciendo o disminuyendo el ciclo replicativo del virus (Diamond et al 2000, Rico-Hesse et al 1998). En este estudio, cada una de las cepas seleccionadas presentaban solamente cuatro pases en células de mosquito (clon C6/36) antes de ser usadas para infectar células Vero o BKH-21. Así, diferencias en los resultados no podrían ser atribuibles a diferencias en la adaptabilidad previa a la célula.

Ha sido demostrado que la proteína E del virus es fundamental en las etapas de adsorción y penetración del ciclo replicativo. El reemplazo del aminoácido asparagina por ácido aspártico en la posición 390 favorece la infección celular (Sanchez et al. 1996, Leitmeyer et al. 1999, Pryor et al. 2001, Rodríguez & Guzman 2005). En este contexto, se podría especular que la menor habilidad de las cepas del VDEN-3 de casos severos podría deberse a divergencia del gen E con respecto a la misma secuencia de las leves. Esto no fue demostrado en un estudio con cepas de Santander incluidas las seleccionadas para este: las cepas de casos leves y severos formaron un mismo grupo filogenético (Villabona et al 2009). Lo mismo informaron Diaz y colaboradores con cepas de VDEN-2 del mismo Departamento incluyendo las de este estudio. Consecuentemente, las

diferencias entre las cepas para replicarse *in vitro* no podrían atribuirse a divergencia del gen E.

En este estudio y en otros (Diamond et al. 2000, Ludert et al. 2008, Hanley et al. 2008) se ha demostrado que la progenie *in vitro* de una cepa del VDENVZV difiere dependiendo del tipo de célula. Así, los resultados de los experimentos con líneas celulares de animales tienen limitaciones en términos de su confiabilidad para inferir lo que ocurre en la célula humana. Bajo esta circunstancia, se recomienda realizar experimentos con cultivos primarios de células humanas ya que no presentan modificaciones genéticas que puedan modular la infección viral. En este trabajo no se hicieron experimentos con este tipo de cultivos por dificultades técnicas y para obtener la fuente de células. Como alternativa, se evaluó el nivel sérico de NS1 en pacientes infectados con los serotipos estudiados.

En un primer análisis, no se encontraron diferencias en el nivel sérico de NS1 en infectados con VDENVZV-3 con respecto a infectados con VDENVZV-2 (Figura 8). Este resultado difiere del reportado por Alcon-LePoder y colaboradores (2006) quienes encontraron 7.5 veces más proteína en infectados con VDENVZV-2 comparado con el otro serotipo. Dos razones podrían ser consideradas para explicar las diferencias entre los estudios: i) el ensayo - en este se utilizó un estuche comercial (E-DENV01P, Panbio) que calcula la concentración de la proteína de manera indirecta, esto es, en relación con intensidad de color de la reacción (Unidades de DO). En el otro estudio se utilizó una prueba casera que calcula la concentración directamente, es decir, usando una curva de calibración generada con variadas concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) de la proteína. ii) la cohorte de pacientes - en este la mayoría (73.5%) de infectados con VDENVZV-3 fueron primarios y la mayoría (57.7%) con VDENVZV-2 secundarios. Como se muestra en la Tabla 3, con respecto a infección con el VDENVZV-2 el nivel de NS1 fue notoriamente menor en secundaria que primaria. Otros han encontrado que en infecciones secundarias la NS1 se detecta con menor frecuencia y se ha sugerido que se debe a la

formación de complejos proteína-anticuerpos que no se pueden detectar en el ELISA (Lapphra et al. 2008, Sekaran et al. 2007, Kumarasamy et al. 2007, Blacksell et al. 2008, Chuansumrit et al. 2008).

En un segundo análisis, el nivel sérico de NS1 se relacionó con la severidad del dengue con cada serotipo y no se encontraron diferencias (Figura 9). Es probable que el resultado sea debido al escaso número de pacientes que sufrieron dengue severo. No fue posible incluir más pacientes con infección primaria debido a que la secundaria por VDEN-2 es más frecuente y la mayoría sufren dengue leve y los casos severos por VDEN-3 fueron muy raros (Ocazonez et al.2006). Estudios de otros autores sobre asociación entre nivel sérico de NS1 y severidad del dengue en infecciones por VDEN-3 o VDEN-2 no se encontraron. En algunos se ha comparado el nivel entre pacientes con severidad distinta pero sin referencia al serotipo del virus y los resultados no son concluyentes. Esto es, igual nivel de NS1 en casos severos y leves (Lapphra et al. 2008); mayor nivel en severos (Libraty et al 2002, Arivutnan et al. 2006) o mayor nivel en leves (Chuansumrit et al. 2008).

5.2. SUSCEPTIBILIDAD A LA NEUTRALIZACIÓN CRUZADA COMO MARCADOR DE VIRULENCIA DE LA CEPA DEL VIRUS

La susceptibilidad a neutralización por anticuerpos contra un serotipo no relacionado, se ha sugerido como marcador de virulencia. Kochel y colaboradores (2002) reportaron que cepas del VDEN-2 genotipo III resultaron menos susceptibles que cepas del genotipo V con base en la dilución de suero anti-VDEN-1 necesaria para reducir 50% de placas en un ensayo de PRNT. Con las primeras, consideradas más virulentas, la dilución fue menor, es decir, requieren mayor cantidad de anticuerpo y por lo mismo son menos susceptibles. En este estudio no se encontraron diferencias entre cepas del mismo serotipo ni tampoco entre si usando también suero inmune contra el VDEN-1 y el PRNT con 50% de reducción (Tabla 5).

La diferencia de resultados sobre neutralización cruzada entre los dos estudios podría deberse a:

i) el diseño del ensayo - en el estudio se analizaron cepas de cada serotipo del mismo genotipo y distintas a las de Kochel que usó cepas de dos genotipos de un mismo serotipo. Diferencias en la secuencia de aminoácidos de la proteína E (el antígeno más reconocido que liga anticuerpos neutralizantes) con cambio de antigenicidad, han sido descritas para cepas usadas en el estudio de Kochel (Sanchez et al. 1996, Leitmeyer et al. 1999, Pryor et al. 2001, Rodríguez & Guzman 2005). Mientras que, las cepas de este estudio de cada serotipo no mostraron divergencia en el gen E en estudios previos (Diaz 2007, Villabona et al. 2009) sugiriendo ausencia de variación antigénica de la proteína.

ii) el suero inmune - se ha considerado que la neutralización depende de la afinidad del anticuerpo por el antígeno lo cual refleja su especificidad. Así, sueros de fase aguda estarían constituidos de un pool de anticuerpos con alta y baja especificidad debido a la respuesta robusta característica de los *Flavivirus* en esta fase. Con el tiempo, los anticuerpos menos específicos desaparecen quedando los otros de por vida (Pierson et al. 2007, Halstead 2009). En este estudio se usaron sueros colectados 15 - 30 días después de inicio de síntomas por lo que se esperaría baja especificidad de los anticuerpos y en consecuencia las diferencias entre las cepas no serían notorias. En contraste, en el estudio de Kochel se usaron sueros de individuos sanos que sufrieron dengue varios años antes de la colecta. En este caso, sería esperado que los anticuerpos presentaran mayor especificidad facilitando observar las diferencias. En este estudio también se exploró la susceptibilidad a la neutralización de cepas VDEN frente a suero reactivo a los 4 serotipos del virus de individuos que sufrieron dengue en el pasado y tampoco se encontraron diferencias (datos no mostrados).

5.3 LOS HALLAZGOS DEL ESTUDIO EN EL CONTEXTO DE LA TRASMISIÓN LOCAL DEL VDEN

En Santander, el VDEN-3 se introdujo en 2001 y hasta 2007 fue el serotipo predominante desplazando el VDEN-1 y -4 y con ocasionales aislamientos del VDEN-2. La permanencia del VDEN-3 en esos 6 años coincidió con un incremento notorio de casos que fue sostenido al menos 3 años consecutivos, siendo la frecuencia de severos menor a la de años anteriores. Además, la mayoría de las infecciones por este serotipo fueron primarias (Ocazonez et al. 2006, Gómez et al. 2008). En este contexto se podría especular que la cepa introducida porta bajo potencial para causar enfermedad severa y alto para diseminarse entre la población que no posee anticuerpos previos contra VDEN. Así, infecciones secundarias por cepas virulentas serían raras y en consecuencia raros los casos de dengue hemorrágico en la población.

La baja frecuencia de cepas virulentas del VDEN-3 en Santander podría relacionarse con dificultad para infectar al mosquito y al humano, y al contrario sería con las cepas menos virulentas favoreciendo su transmisibilidad. Se podría asumir que las cepas que tienen mayor capacidad de adaptación a la célula huésped se logran mantener circulantes entre la población y como tal serían las responsables de los brotes de la enfermedad. Al menos en relación con replicación *in vitro* los hallazgos de este estudio respaldan este supuesto. Por otro lado, se ha sugerido que la adaptabilidad a la célula determina en buena parte la predominancia de un serotipo sobre los otros. Como se anotó arriba, en Santander el VDEN-3 desplazó al VDEN-2 y esto supone que el primero sería más hábil para replicarse. Esto se observó en este estudio, las cepas del VDEN-3 de casos leves (supuestamente más frecuentes) secretaron más NS1 inclusive que las de casos severos del VDEN-2.

Holmes (2006) y Rico-Hesse (2010) han propuesto que la relación entre virulencia y transmisión se podría explicar como un “trade-off” evolutivo donde el virus y la célula logran un equilibrio que busca optimizar las condiciones dentro del hospedero; la maquinaria replicativa se limita al nivel donde no cause daño a la célula huésped. La deriva genética y la selección natural modulan la virulencia y permiten la supervivencia del virus. Así, cepas que surgen como un linaje distinto que no poseen la misma afinidad al hospedero que otro linaje tienden a desaparecer. No obstante, algunas cepas lo logran causando un daño mayor en el hospedero que desregula la relación establecida resultando en infecciones severas. Esta proposición sustenta el hecho de que el dengue tiende a ser una enfermedad de infecciones leves, y consecuentemente la ocurrencia de casos severos es un evento raro. En este contexto, podría ser que la población de VDEN-3 de Santander fue sometida a esa selección natural purificante y esto se relacione con las diferencias de replicación in vitro, y a nivel epidemiológico con la predominancia del serotipo sobre los otros y el hallazgo de que la mayoría de casos resultaron leves.

6. CONCLUSIONES

El mayor potencial de cepa del VDEN-3 para causar dengue severo se relacionó con menor habilidad para replicarse *in vitro* produciendo NS1. Así, podría inferirse que estas cepas, comparadas con las de menor potencial virulento, tendrían menor capacidad para replicarse en el infectado y el mosquito y por consiguiente menor transmisión en la población, Esto podría explicar en parte la baja frecuencia de casos de dengue severo durante 6 años de abundancia del serotipo en el Departamento de Santander.

Con respecto al VDEN-2, aunque las cepas con mayor potencial virulento produjeron más proteína NS1 que las de menor potencial, la asociación precisa con severidad no es concluyente debido a que la diferencia no fue estadísticamente significativa. Para concluir más precisamente, son necesarios estudios con más cepas locales, de otras regiones de Colombia y de otros países.

Las cepas del VDEN-3 de casos leves resultaron más hábiles para sintetizar NS1 *in vitro*, y por consiguiente replicarse, que cepas del VDEN-2. Esto podría estar relacionado con el desplazamiento del VDEN-2 visto durante los años de la mayor dominancia del VDEN-3. Se requiere confirmar si estas diferencias también se presentan con el mosquito *Aedes aegypti*.

Los resultados del estudio no permiten concluir sobre la utilidad del nivel sérico de la proteína NS1, como marcador que diferencie casos de dengue severo de los leves por infección con VDEN-3 y VDEN-2. Para definir esta relación con mayor precisión se requiere realizar un estudio con seguimiento de una cohorte de pacientes con mayor número de casos severos y controlando variables como edad y día de colecta del suero.

La síntesis in vitro de NS1 reflejó la magnitud de replicación de la cepa del VDEN y como tal podría usarse como marcador de magnitud de la viremia en el infectado. Esto podría ser de utilidad en modelos animales cuando se requiere evaluar el efecto antiviral de un compuesto o un candidato a vacuna.

La susceptibilidad a la neutralización cruzada por anticuerpos contra el VDEN-1 no resultó ser un marcador que refleje el potencial de la cepa del VDEN-3 y VDEN-2 para causar dengue severo, ni tampoco diferencias antigénicas entre los dos serotipos. Se requieren más estudios incluyendo mayor número de sueros de casos con historia pasada de dengue y otras cepas del virus para definir con mayor precisión esta asociación. Esto podría aportar al conocimiento de las causas que expliquen por qué la infección por VDEN-3 de individuos con anticuerpos previos contra dengue fue un evento muy raro en Santander.

Este estudio es el primero realizado en Colombia y constituye un aporte al conocimiento de las propiedades biológicas de las cepas del VDEN-3 y VDEN-2 determinantes del potencial para causar epidemias y mayor severidad de la enfermedad en el infectado.

BIBLIOGRAFIA

ADAMS B, Holmes EC, Zhang C, Mammen MP Jr, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Boots M Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:14234–14239

ALCON-LEPODER S, Drouet MT, Roux P. The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes : implications for viral infectivity. *J Virol* 2005, 79: 11403-11411

ALCON-LEPODER S, Sivard P, Drouet MT, Talarmin A, Rice C, Flamand M. Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis. *Novartis Found Symp.* 2006;277:233-47; discussion 247-53.

ALVAREZ D, Lodeiro M, Ludueña S, Pietrasanta L, Gamarnik A. Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. *J Virol* 2005; 79(11): 6631–6643.

ALVAREZ M, Pavon-Oro A, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Sanchez L, Alvarez AM, Guzmán MG. Neutralizing antibody response variation against dengue 3 strains. *J Med Virol.* 2008;80(10):1783-9.

ANDERSON JR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(5):886-92.

AQUINO VH, Anatriello E, Gonçalves PF, DA Silva EV, Vasconcelos PF, Vieira DS, Batista WC, Bobadilla ML, Vazquez C, Moran M, Figueiredo LT. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(4):710-5.

ARIAS, C. F., F. Preugschat, & J. H. Strauss. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology* 1993; 193:888–899.

ARMSTRONG PM & Rico-Hesse R. Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2001; 1:159–168

ARMSTRONG P & Rico-Hesse R. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti* *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(5) pp. 539-544

AVIRUTNAN, P., N. Punyadee, S. Noisakran, C. Komoltri, S. Thiemmecca, K. Auethavornanan, A. Jairungsri, R. Kanlaya, N. Tangthawornchaikul, C. Puttikhunt, S. N. Pattanakitsakul, P. T. Yenchitsomanus, J. Mongkolsapaya, W. Kasinrerak, N. Sittisombut, M. Husmann, M. Blettner, S. Vasanawathana, S. Bhakdi, and P. Malasit. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J. Infect. Dis.* 2006; 193:1078–1088.

AVIRUTNAN P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate *E. PLoS Pathog* 2007; 3(11): e183. doi:10.1371/journal.ppat.0030183

BENNETT SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Mol Biol Evol.* 2003; 20(10):1650-8.

BENTE DA, Melkus MW, Garcia JV, Rico-Hesse R. Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J Virol* 2005; 79, 13797-13799

BLACKSELL SD, Mammen MP Jr, Thongpaseuth S, Gibbons RV, Jarman RG, Jenjaroen K, Nisalak A, Phetsouvanh R, Newton PN, Day NP. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60(1):43-9.

BRAY M, Men R, Tokimatsu I, Lai CJ. Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. *J Virol* 1998;72(2):1647-51.

BRISEÑO-GARCÍA B, Gómez-Dantés H, Argott-Ramírez E, Montesano R, Vázquez-Martínez AL, Ibáñez-Bernal S, Madrigal-Ayala G, Ruíz-Matus C, Flisser A, Tapia-Conyer R. Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue-3 in Mexico. *Emerg Infect Dis.* 1996;2(2):133-5.

CDC - Centers for Disease Control. Dengue type 3 infection-Nicaragua and Panama, October-November,1994. *MMWR* 1995; 44: 21-24.

CHATURVEDI UC, Nagar R, Shrivastava R. Macrophage and dengue virus: friend or foe? *Indian J Med Res.* 2006;124 (1):23-40.

CHUA, JJ, Ng MM, Chow VT. The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Virus Res.* 2004; 102:151–163.

CHUANSUMRIT A, Chaiyaratana W, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for

the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Jan;27(1):43-8.

CLYDE K & Harris E. RNA Secondary Structure in the Coding Region of Dengue Virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selection and Is Required for Viral Replication. *J Virol* 2006; 80: 2170–2182

----- . Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of virology* 2006; 80: 11418-11431

COLOGNA R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 2005; 79:853–859

----- . American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* 2003; 77:3929–3938

CORTÉS F, Gómez S, Ocazonez R. Subtipos de virus dengue serotipos 2, 3 y 4 aislados en el Departamento de Santander, Colombia. *Rev Cub Med Trop* 2007; 59(3)

DIAMOND MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol.* 2000;74(17):7814-23.

DIAZ FJ. Molecular Characterization of Dengue Viruses Isolated in Medellin, Colombia and surrounding areas. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 2007; 77 (5):128 - 128

DUANGCHANDA S, Tanaka M, Morita K, Rojanasuphot S, Igarashi A. Comparative nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope

glycoprotein gene among three dengue virus type 2 strains isolated from patients with different disease severities in Maha Sarakham, northeast Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1994;25(2):243-51.

EGLOFF, M. P., D. Benarroch, B. Selisko, J. L. Romette, and B. Canard. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J*. 2002; 21:2757–2768.

ENDY TP, Nisalak A, Chunsuttitwat S, Vaughn DW, Green S, Ennis FA, Rothman AL, Libraty DH. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis*. 2004;189(6):990-1000.

FLAMAND M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey F & Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 1999; (73)7: 6104-6110

GERMI, R., J. M. Crance, D. Garin, J. Guimet, H. Lortat-Jacob, R. W. Ruigrok, J. P. Zarski, and E. Drouet. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 2002; 292:162–168.

GÓMEZ SY, Villabona-Arenas C, Torres F, Miranda-Esquivel D, Ocazonez R. Dengue virus serotype 3 (genotype III) from Colombia: A perspective of its pathogenic potential. *Dengue Bulletin* 2008; (32): 126-137

GOTTFREDSSON M, Halldorsson BV, Jonsson S, Kristjansson M, Kristjansson K, Kristinsson KG, Love A, Blondal T, Viboud C, Thorvaldsson S et al. Lessons from the past: Familial aggregation analysis of fatal pandemic influenza (Spanish flu) in Iceland in 1918. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:1303–1308

GREEN S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, Lew R, Innis BL, Kurane I, Rothman AL, Ennis FA. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis* 1999; 179: 755–62.

GUBLER DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp.* 2006;277:3-16; discussion 16-22, 71-3, 251-3. Review.

GUILARDE A, Turchi M, Bosco Siqueira J Jr., Feres V, Rocha B, Levi J, Souza V, Vilas Boas L, Pannuti C, & Martelli C. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults: Clinical Outcomes Related to Viremia, Serotypes, and Antibody Response. *Journal of Infectious Diseases* 2008; 197:817–24

GUZMÁN MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, Delgado I, & Halstead S. Epidemiologic Studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *American Journal of Epidemiology* 2000; (152)9: 793-799

----- . Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(1):33-42

HALSTEAD, S.B. Neutralization and antibody dependent enhancement of dengue viruses. *Adv. Virus Res.* 2003; 60: 421–467.

----- . Dengue. *Lancet* 2007; 370: 1644–52

HALSTEAD S. Antibodies Determine Virulence in Dengue. *Immunology and Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2009. 1171: E48–E56.

HANLEY KA, Nelson JT, Schirtzinger EE, Whitehead SS, Hanson CT. Superior infectivity for mosquito vectors contributes to competitive displacement among strains of dengue virus. *BMC Ecol.* 2008; 13;8:1.

HARRIS E, Sandoval E, Xet-Mull AM, Johnson M, Riley LW. Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR. *Virology.* 1999;253(1):86-95.

HOLDEN KL, Stein DA, Pierson TC, Ahmed AA, Clyde K, Iversen PL, Harris E. Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. *Virology* 2006; 344: 439–452

HOLMES EC, Nee S, Rambaut A, Garnett GP, Harvey PH. Revealing the history of infectious disease epidemics using phylogenetic trees. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1995;349:33-40.

----- . Molecular epidemiology and evolution of emerging infection diseases. *Bnhsh Medical Bulletin* 1998;54:533-43).

----- . The evolutionary biology of dengue virus. *Novartis Found Symp.* 2006;277:177-87; discussion 187-92, 251-3.

IGARASHI A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol.* 1978;;40(3):531-44.

JACOBS MG, Robinson PJ, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *Faseb J* 2000; 14(11):1603-10.

KING AD, Nisalak A, Kalayanrooj S, Myint KS, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S, Innis BL. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999;30(4):718-28

KOCHEL TJ, Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinoza A, Felices V, Caceda R, Bautista CT, Montoya Y, Douglas S, Russell KL. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 2002;360(9329):310-2.

KOU, Z., Quinn, M., Chen, H., Rodrigo, W.W., Rose, R.C., Schlesinger, J.J., Jin, X. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Virol.* 2008; (80) 134–146.

KOURI GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons learned from the Cuban epidemic. *Bull World Health Organ* 1989; 67: 375–80

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

KURANE I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, Ennis FA. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections: high levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest* 1991; 88: 1473–80.

-----, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Ennis FA. High levels of interferon-alpha in the sera of children with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 222–29.

KUROSU T, Chaichana P, Yamate M, Anantapreecha S, Ikuta K. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 3;362(4):1051-6.

KURUVILLA JG, Troyer RM, Devi S, Akkina R. Dengue virus infection and immune response in humanized RAG2(-/-)gamma(c)(-/-) (RAG-hu) mice. *Virology* 2007; 369:143–152

LAPPHRA K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyaakarnsakul W, Chakorn T, Yoksan S, Wattanamongkolsil L, Thamlikitkul V. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60(4):387-91.

LEE YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, Lin YS, Yeh TM, Chen SH, Liy HS. 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: 3623–30.

LEITMEYER KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999;73(6):4738-47.

LEWIS JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology* 1993;197(1):216-224.

LIBRATY DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1165-8.

LIBRATY D, Endy T, Houg H, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Chansiriwongs W, Vaughn D, Nisalak A, Ennis F. & Rothman A. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *Journal of Infectious Diseases* 2002b;185:1213–21

LINDENBACH BD & Rice CM. Trans-complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *Journal of Virology* 1997; 71: 9608-9617

----- . Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003; 59: 23-61.

LÓPEZ L. Estudio de propiedades biológicas de cepas de Dengue de los serotipos 2 y 3 causantes de las epidemias de 1997 (Santiago de Cuba) y 2001-2002 (Ciudad de la Habana). Tesis de Maestría: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2003.

LUDERT JE, Mosso C, Ceballos-Olvera I, del Angel RM. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *Virol J.* 2008;5:51.

MACKENZIE J, Jones M, and Westaway E. Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in Flavivirus-infected cells. *Journal of Virology* 1999; 73: 9555-9567

MANGADA MN & Igarashi A. Sequences of terminal non-coding regions from four dengue-2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virus Genes.* 1997;14(1):5-12.

----- . Molecular and in Vitro Analysis of Eight Dengue Type 2 Viruses isolated from Patients Exhibiting Different Disease Severities. *Virology* 1998; 244, 458–466

MEDIN, C. L., K. A. Fitzgerald, and A. L. Rothman. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J. Virol.* 2005; 79:11053–11061.

MENESES R, Ocazonez RE, Martínez JR, Stashenko EE. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009 Mar 6;8:8.

MESSER WB, Vitarana UT, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala LD, Ramesh R, et al. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:765–73.

-----, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, & de Silva A. Emergence and Global Spread of a Dengue Serotype 3, Subtype III Virus. *Emerging Infectious Diseases.* 2003; (9)7: 800-809

MODIS, Y., S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison. A ligandbinding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100:6986–6991.

MONTOYA Y, Holechek S, Caceres O, Palacios A, Burans J, Guevara C, Quintana F, Herrera V, Pozo E, Anaya E, Mamani E, Guitierrez V, Ladron de Guevara A, Fernandez E, Asmat P, Alva-Dávalos V, Holguin C, Laguna VA, Morales AM, Minaya P and Kochel T. Circulation of dengue viruses in north-western Peru, 2000-2001. *Dengue Bulletin.* 2003;27:52-62.

MOTA J, Rico-Hesse R. Humanized mice show clinical signs of dengue fever according to infecting virus genotype. *J Virol.* 2009;83(17):8638-45.

MUKHOPADHYAY S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3(1):13-22.

MUNOZ-JORDAN, J. L., G. G. Sanchez-Burgos, M. Laurent-Rolle, and A. Garcia-Sastre. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100:14333–14338.

NAGAO Y, & Koelle K. Decreases in dengue transmission may act to increase the incidence of dengue hemorrhagic fever. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:2238–2243

NEVES-SOUZA PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis* 2005; (5):64

NISALAK A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Thisayakorn U, Scott R, Burke D, Hoke C, Innis B, & Vaughn D. serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in bangkok, thailand from 1973 to 1999. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(2):191–202

NOGUEIRA R, Gonçalves H, Bispo de Filippis A, Barreto dos Santos F, Venâncio da Cunha R, Oliveira Coelho J, De Souza LJ, Ramos Guimarães F, Machado de Araújo E, Santos De Simone T, Baran M, Teixeira G Jr, & Miagostovich M. Dengue Virus Type 3, Brazil, 2002 *Emerging Infectious Diseases* 2005; (11)9: 1376-1381

OCAZIONEZ R, Cortés F, Villar L, Gómez S. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2006; 101(7): 725-731

-----, Gómez SY, Cortés F. Serotipo, patrón de infección y dengue hemorrágico en área endémica Colombiana. Rev. Salud Pública, Colombia 2007; 9 (2): 262-274

-----, Meneses R, Torres F, Stashenko E. Virucidal activity of Lippia species essential oils from Colombia on dengue virus replication in vitro. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 2010 (aceptado para publicación)

Organización Panamericana de la Salud PAHO. 2008: Number of Reported Cases of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). Publicado en 2009. Disponible en: <http://www.paho.org/common/Display.asp?Lang=E&ReclD=11173>. Consultado en abril de 2010.

O'SULLIVAN MA & Killen HM. The differentiation state of monocytic cells affects their susceptibility to infection and the effects of infection by dengue virus. J. Gen. Virol. 1994; 75, 2387–2392

Pan American Health Organization, Regional Program on Dengue through the PAHO/WHO Representation in Paraguay (PAHO-Paraguay). Ministry of Public Health and Social Welfare (Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social/MSPBS) of Paraguay. Dengue Outbreak Continues to Subside in Paraguay. Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Region of the Americas 2007; Vol 4. No. 1,3,7

PANDEY BD, Morita K, Hasebe F, Parquet MC, Igarashi A. Molecular evolution, distribution and genetic relationship among the dengue 2 viruses isolated from different clinical severity. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2000;31(2):266-72.

PANG T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol.* 2007;85(1):43-5.

PASSOS MN, Santos LM, Pereira MR, Casali CG, Fortes Bde P, Ortiz Valencia LI, Alexandre Ade J, Medronho Rde A. Clinical differences observed in patients with dengue caused by different serotypes in the epidemic of 2001/2002, occurred in Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37(4):293-5.

PEARSON T, Greiner DL, Shultz LD. Humanized SCID mouse models for biomedical research. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 324, 25-51

PELÁEZ O, Guzmán MG, Kourí G, Pérez R, San Martín JL, Vázquez S, Rosario D, Mora R, Quintana I, Bisset J, Cancio R, Masa AM, Castro O, González D, Avila LC, Rodríguez R, Alvarez M, Pelegrino JL, Bernardo L, Prado I. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(4):719-22.

PIERSON, T.C., Xu, Q., Nelson, S., Oliphant, T., Nybakken G.E., Fremont, D.H., Diamond, M.S. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. *Cell Host Microbe* 2007; (1): 135-145

PITZER VE, Olsen SJ, Bergstrom CT, Dowell SF, Lipsitch M. Little evidence for genetic susceptibility to influenzaA(H5N1) from family clustering data. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1074–1076

PRICE W & Thind I. Protection against West Nile virus induced by a previous injection with dengue virus. *American Journal of Epidemiology* 1971; 94: 596-606.

PRYOR, M. J., J. M. Carr, H. Hocking, A. D. Davidson, P. Li, and P. J. Wright. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages:

comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65:427–434.

RAMIREZ AH, Moros Z, Comach G, Zambrano J, Bravo L, Pinto B, Vielma S, Cardier J, Liprandi F. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with dengue virus in Venezuela. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 65(3):247-53.

RICE CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Fields BM, editor. *Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996. p. 931-960.

RICO-HESSE, R., M. L. Harrison, R. A. Salas, D. Tovar, A. Nisalak, C. Ramos, J. Boshell, M. T. R. Mesa, M. R. Nogueira, and A. T. D. Rosa. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997; 230:244–251.

-----, Harrison LM, Nisalak A, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Green S, Rothman AL, Ennis FA. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(1):96-101.

----- . Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003; 59:315–341

----- . Dengue virus markers of virulence and pathogenicity. *Future Virology* 2009; 4(6): 581-589

----- . Dengue virus virulence and transmission determinants. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;338:45-55.

RIGAU-PÉREZ JG, Ayala-López A, García-Rivera EJ, Hudson SM, Vorndam V, Reiter P, Cano MP, Clark GG. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67(4):355-62.

ROCHE C, Cassar O, Laille M, Murgue B. Dengue-3 virus genomic differences that correlate with in vitro phenotype on a human cell line but not with disease severity. *Microbes Infect.* 2007;9(1):63-9.

RODRÍGUEZ R, Guzman M. Caracterización molecular de cepas de dengue aisladas en epidemias cubanas. Instituto de Medicina Trópicos Pedro Kouri 2005; 1-122

SANCHEZ IJ, Ruiz BH. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol* 1996; 77 (Pt10):2541-5.

SEKARAN S, Lan C, Kanthesh B, Ramapraba A, Geetha S. Evaluation of a Dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of Dengue . *J Infect Developing Countries* 2007; 1(2) : 182-188

TAN BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH, Chan YC, Tan YH. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology* 1996; 216:317–325.

THANT KZ, Morita K, Igarashi A. Detection of the disease severity-related molecular differences among new Thai dengue-2 isolates in 1993, based on their structural proteins and major non-structural protein NS1 sequences. *Microbiol Immunol.* 1996;40(3):205-16.

TARR GC & Hammon WM. Cross-protection between group B arboviruses: resistance in mice to Japanese B encephalitis and St. Louis encephalitis viruses induced by Dengue virus immunization. *Infection and Immunity* 1974; 9: 909-915.

TASSANEETRITHEP, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumpherer, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger, and M. A. Marovich. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003; 197:823–829

UCHIL P, and Satchidanandam V. Architecture of the flaviviral replication complex. *Journal of biological chemistry.* 2003; 278: 24388-24398

UZCATEGUI NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcategui R, Holmes EC, Gould EA. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol.* 2001;82(Pt 12):2945-53.

-----, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M, Sierra G, Cuello de Uzcategui R, James WS, Turner S, Holmes EC, Gould EA. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol.* 2003; (Pt 6):1569-75.

VAN DER SCHAAR HM, Rust MJ, Waarts BL, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *Journal of Virology* 2007; 81(21):12019-28.

----- et al., Role of antibodies in controlling dengue virus infection. *Immunobiology* 2009; doi:10.1016/j.imbio.2008.11.008

VAUGHN DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000;181(1):2-9

VILLABONA-ARENAS CJ, Miranda-Esquivel DR, Jimenez RE. Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007. *Trop Med Int Health.* 2009;14(10):1241-50.

WANG W, CHAO D, Kao C, Wu H, Liu Y, Li C et al. High levels of plasma dengue viral load during defervesce in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology* 2003; 305: 330-338.

WARD R, Davidson AD. Reverse genetics and the study of dengue virus. *Future virol* 2008; 3: 279-290

WATANABE S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N et al. Humanized NOD/SCID/IL2Rgamma(null) mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *J Virol* 2007; 81:13259–13264

WATTS D, Porter K, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes C, & Halstead S. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *The Lancet* 1999; (354): 1431-1434

WEARING HJ, & Rohani P. Ecological and immunological determinants of dengue epidemics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:11802–11807

WEAVER SC, & Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol.* 2009 Jul;9(4):523-40.

World Health Organization. Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009. Disponible en:

http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf . Consultado en abril 2010

WU SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola J, Brachtel E, Putvatana R, Louder M, Filgueira L, Marovich M, Wong H, Blauvelt A, Murphy G, Robb M, Innes B, Birx D, Hayes C & Frankel S. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Medicine* 2000; (6): 816-820 doi:10.1038/77553

YAUCH LE, Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res* 2008; 80, 87-93

ZHANG YJ, Corver PR, Chipman, et al. Structures of immature flavivirus particles. *EMBOJ.* 2003; 22:2604–2613.

ZHOU Y, Mammen MP Jr, Klungthong C, Chinnawirotpisan P, Vaughn DW, Nimmannitya S, Kalayanaroj S, Holmes EC, Zhang C. Comparative analysis reveals no consistent association between the secondary structure of the 3'-untranslated region of dengue viruses and disease syndrome. *J Gen Virol.* 2006 Sep;87(Pt 9):2595-603.

ZULUETA A, Martin J, Hermida L, Alvarez M, Valdes I, Prado I, China G, Rosario D, Guillen G, Guzman MG. Amino acid changes in the recombinant Dengue 3 Envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. *Virus Res* 2006; 121:65–73.