

**VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DENGUE 2 Y DESENLACE
CLÍNICO DURANTE LA EPIDEMIA DEL 2009 – 2010 EN COLOMBIA**

ROSA MARGARITA GÉLVEZ RAMÍREZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2015**

**VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DENGUE 2 Y DESENLACE
CLÍNICO DURANTE LA EPIDEMIA DEL 2009 – 2010 EN COLOMBIA**

ROSA MARGARITA GÉLVEZ RAMÍREZ

CÓDIGO 2138725

**Trabajo de investigación para optar por el título de Magíster en Ciencias
Básicas Biomédicas**

Director

MD, MSc LUIS ÁNGEL VILLAR CENTENO

Asesores

MD, PhD Francisco Javier Díaz

MD, PhD Victor Mauricio Herrera

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

BUCARAMANGA

2015

DEDICATORIA

A Adriancito, por ser mí adorable e incondicional apoyo.

A Marthica, por siempre creer que todo lo puedo.

A Lucianito, por enseñarme que la firmeza, constancia y honestidad forman al verdadero ser.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Dr Luis Ángel Villar Centeno por su maravillosa orientación y formación científica.

A mis asesores, Dr Francisco Javier Díaz y Dr Victor Mauricio Herrera por su contribución académica y científica.

Al grupo de Epidemiología Clínica-UIS.

A cada uno de los integrantes del Centro de Investigaciones Epidemiológicas-UIS por su amistad y apoyo incondicional.

Al grupo de Inmunovirología de la UdeA.

Al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP)-UIS.

A cada uno de los grupos y miembros de la Red AEDES: Abordando Áreas Endémicas del Dengue para el Estudio de su Severidad.

CONTENIDO

pág.

INTRODUCCIÓN	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
3. MARCO TEÓRICO.....	23
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo general.....	29
5. JUSTIFICACIÓN	30
6. HIPÓTESIS	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
7.1 TIPO DE ESTUDIO.....	33
7.2 POBLACIÓN.....	34
7.3 DEFINICIONES.....	35
7.3.1 Caso.....	35
7.3.2 Control.....	36
7.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA ESTE ESTUDIO.....	37
7.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN PARA ESTE ESTUDIO.....	37
7.6 TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	38
7.7 VARIABLES.....	38
7.7.1 Variables independientes.....	38

7.7.2 Variable dependiente o de resultado.	38
7.7.3 Variables de Confusión.	38
7.8 ESPECIMEN DE ANÁLISIS.....	39
7.9 PROCESAMIENTO.....	39
7.9.1 Determinación de serotipo infectante.	39
7.9.2 Aislamiento viral.	40
7.9.3 Amplificación de los genes NS4B y E.....	42
7.9.4 Secuenciación de los productos de PCR.	43
7.9.5 Tipo de infección.	44
7.10 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.....	45
7.10.1 Diseño de primers.	45
7.10.2 Edición de secuencias.....	45
7.10.3 Análisis filogenético.	46
7.10.4 Determinación de polimorfismos en el gen NS4B y gen E.	47
7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	47
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS VIGENTES	48
9. RESULTADOS	50
9.1 ASOCIACIÓN ENTRE SEROTIPO Y SEVERIDAD CONSIDERANDO SIMULTÁNEAMENTE EL EFECTO QUE INTRODUCE EL TIPO DE INFECCIÓN.....	51
9.2 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO GENÓMICO.....	54
9.3 IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS CIRCULANTES DE VDEN-2. ..	60
9.4 VARIACIÓN DEL GEN NS4B ENTRE CEPAS DE VDEN-2 Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESENLACE CLÍNICO.	61

9.5 VARIACIÓN DEL GEN E ENTRE CEPAS DE VDEN-2 Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESENLACE CLÍNICO.	68
9.6 LINAJES DEL VDEN-2 Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESENLACE CLÍNICO.....	78
9.7 VARIACIÓN GENÓMICA DE VDEN-2 Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESENLACE CLÍNICO AJUSTANDO POR TIPO DE INFECCIÓN.....	79
10. DISCUSIÓN	80
10.1 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	86
11. CONCLUSIONES.....	87
12. ESTRATEGIAS DE COMUNICACIÓN	88
BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	99

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Flujograma de selección de pacientes de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión del estudio.	50
Figura 2. Flujograma resultados de aislamiento viral.	54
Figura 3. Efecto citopático del VDEN-2 en células C6/36 HT (P1).	55
Figura 4. Inmunofluorescencia indirecta positiva.	56
Figura 5. Flujograma amplificación genómica directamente suero/plasma.	57
Figura 6. Amplificación gen E y NS4B directamente suero/plasma.	57
Figura 7. Análisis filogenético del gen E del VDEN-2.	61
Figura 8. Asociación de los polimorfismos del gen ns4b y el desenlace clínico.	65
Figura 9. Asociación de los polimorfismos del gen ns4b y la procedencia.	68
Figura 10. Asociación de los polimorfismos del gen E y el desenlace clínico.	74
Figura 11. Asociación de los polimorfismos del gen E y la procedencia.	75

LISTA DE TABLAS

	pag.
Tabla 1. Genotipos VDEN.....	18
Tabla 2. Descripción de cohortes de estudio.	33
Tabla 3. Primers utilizados para amplificación del gen NS4B y E.	42
Tabla 4. Primers usados para secuenciación de los genes NS4B y E.....	44
Tabla 5. Secuencias representativas de los genotipos del VDEN-2	46
Tabla 6. Características de la muestra de acuerdo a la presencia del desenlace compuesto en la línea de base o a su incidencia durante el seguimiento.	52
Tabla 7. Modelo predicción para la presencia del desenlace compuesto en la línea de base o a su incidencia durante el seguimiento.	53
Tabla 8. Secuencias analizadas en este estudio.	59
Tabla 9. Polimorfismos identificados en el gen NS4B con 2 o más secuencias exhibiendo cada alelo.....	62
Tabla 10. Análisis estadístico de asociación de los polimorfismos del gen NS4B con el desenlace clínico.	64
Tabla 11. Análisis estadístico de la asociación de los polimorfismos del gen NS4B según la procedencia.	67
Tabla 12. Polimorfismos identificados en el gen E con 2 o más secuencias exhibiendo cada alelo.....	69
Tabla 13. Polimorfismos en el gen E con 2 o más secuencias exhibiendo cada alelo.....	72
Tabla 14. Análisis estadístico de la asociación de los polimorfismos del gen E según la procedencia.	76
Tabla 15. Asociación de linaje de VDEN-2 y el desenlace clínico.	78
Tabla 16. Tipo de infección por desenlace clínico.	79

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Presupuesto.....	99
ANEXO B. Cronograma de actividades.....	100

RESÚMEN

TÍTULO: Variabilidad genética del virus dengue 2 y desenlace clínico durante la epidemia del 2009 – 2010 en Colombia[†].

AUTOR: Rosa Margarita Gélvez Ramírez^{††}.

PALABRAS CLAVE: Dengue, dengue grave, inmunidad, serotipo, genotipo, polimorfismo genético.

DESCRIPCIÓN: El desenlace severo obedece a un proceso multifactorial dado por el huésped y el virus. Los objetivos de este estudio fueron determinar el serotipo más asociado a severidad considerando el efecto que introduce el tipo de infección y establecer la variación del gen NS4B y E entre cepas de virus dengue serotipo 2 (VDEN-2) aisladas de pacientes con diferente desenlace clínico en ciudades endémicas de Colombia. La hipótesis fue evaluada mediante un estudio de casos y controles anidado a cohorte. Se incluyeron pacientes febriles con diagnóstico de infección por virus dengue (RT-PCR, PCR-Tiempo Real, ELISA NS1, ELISA IgM o IgG anti-dengue). Los casos fueron pacientes que desarrollaron el desenlace compuesto (hemorragia mayor o hipotensión) en línea de base o en el seguimiento. El serotipo infectante se determinó por RT-PCR o PCR-Tiempo Real. El aislamiento viral fue en células C6/36 HT. La amplificación genómica fue realizada por PCR convencional. La reconstrucción filogenética se realizó por *Máximo Likelihood*. El soporte estadístico de las ramas se obtuvo aplicando “*bootstrap*” de 1000 réplicas. La determinación de polimorfismos se hizo por Sequence Data Explorer (MEGA v6.06). Se evaluaron 198 pacientes en línea de base como en el seguimiento. El VDEN-2 mostró asociación con los pacientes complicados (OR 6.06; IC95%: 2.10, 17.5). El tipo de infección, no se asoció con la presencia del desenlace compuesto (OR 1.58; IC95%: 0.83, 3.00). Se evaluaron 54 secuencias genómicas, en donde el genotipo fue asiático-americano; distinguiéndose el linaje 1, 2 y 3. Los polimorfismos del gen NS4B y E no se asociaron al desenlace clínico, pero sí a la procedencia. En conclusión, durante el periodo de estudio en Colombia circuló el genotipo Asiático-Americano del VDEN-2. El serotipo asociado al desarrollo de formas severas de la enfermedad fue el VDEN-2. Los polimorfismos presentes en el gen E y gen NS4B del virus dengue no se asociaron a severidad, pero sí con la procedencia del virus.

[†] Proyecto de grado.

^{††} Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas. Director: Luis Ángel Villar Centeno.

ABSTRACT

TITLE: Genetic variability of dengue virus type 2 and outcome during the epidemic of 2009-2010 in Colombia [†].

AUTHOR: Rosa Margarita Gélvez Ramírez^{††}.

KEY WORDS: Dengue, severe dengue, immunity, serotype, genotype, polymorphism genetic.

DESCRIPTION: Severe outcome of the disease due to a multifactorial process given by the host and the virus. The aims of this study were to determine the serotype associated with more severe simultaneously considering the effect that introduces the type of infection and the variation of NS4B and E gene among strains of dengue serotype 2 virus (DENV-2) isolated from patients with different outcome clinical cities in different endemic Colombia. The hypothesis was evaluated through a study of cases and controls nested cohort. Febrile patients with confirmed dengue virus infection (RT-PCR, Real Time PCR, ELISA NS1, IgM or IgG ELISA anti-dengue) diagnosis. The cases were patients who develop the compound outcome (hypotension or bleeding) in higher baseline or follow-up. The infecting serotype was determined by RT-PCR or PCR Real-Time. Isolation was performed on C6 / 36 HT cells . Amplification of the genes was performed by conventional PCR. Phylogenetic reconstruction was performed by *Maximum Likelihood* method. Statistical support branch was obtained by applying "bootstrap" 1000 replicates. The determination of polymorphisms are identified in the Sequence Data Explorer module MEGA v6.06. 198 patients were evaluated at baseline and follow-up. Serotype distribution was heterogeneous, with serotype DENV-2 which seems to have a partnership with complicated patients (OR 6.06, 95% CI: 2.10, 17.5). The type of infection (primary vs. secondary) was not associated with the presence of the compound outcome (OR 1.58, 95% CI 0.83, 3.00). 54 genomic sequences, wherein the identified genotype was evaluated Asian-American; distinguishing lineage 1, 2 , 3. NS4B gene polymorphisms and E was not associated with clinical outcome but was associated with the origin. In conclusion, during the study period, circulated Asian-American genotype DENV-2. Serotype associated with developing severe forms of the disease was the DENV-2. Polymorphisms present in the NS4B gene and gene E of dengue virus were not associated with severe forms of the disease, but were associated with the origin of the virus.

[†] Master's thesis.

^{††} Healthy Faculty. Master in Biomedical Basic Science. Director: Luis Ángel Villar Centeno.

INTRODUCCIÓN

El dengue se considera un problema de salud pública en al menos 100 países alrededor del mundo (Periago & Guzmán 2007). Según reportó la Organización Panamericana de la Salud (OPS), hasta la semana 45 del 2009 se reportaron 853.468 casos de dengue en el continente americano, incluyendo 20.832 casos de dengue grave y 326 muertes, siendo la tasa de letalidad regional de 1,56. En el año 2010 aumentaron alarmantemente los brotes de dengue en Centroamérica, México, el Caribe y Suramérica, este aumento fue considerable comparado con el año 2009. En Colombia para el año 2010 se reportaron al SIVIGILA 147.670 casos de dengue de los cuales 9.482 corresponden a dengue grave y 217 muertes, para una letalidad de 2,28% (Instituto Nacional de Salud-Colombia 2010).

El curso clínico de esta enfermedad es de naturaleza sistémica y dinámica con un amplio espectro de manifestaciones. La enfermedad varía desde un caso asintomático de corta duración hasta casos graves que pueden llevar al choque y por ende a la muerte.

Investigaciones sugieren que la patogénesis del desenlace severo es el resultado de múltiples factores atribuidos al huésped y al virus. Dentro de los factores del huésped encontramos la amplificación dependiente de anticuerpos (ADE, siglas en inglés de Antibody dependent enhancement), en donde, los pacientes que experimentan una infección secundaria con un serotipo diferente tendrá un riesgo mayor a desarrollar dengue severo (Halstead 2003).

El virus por si solo también constituye un determinante en la severidad. Dentro de estos factores determinantes del virus se han propuesto el serotipo, genotipo y variaciones puntuales dentro del genoma. Las diferencias genéticas entre cepas de un mismo genotipo que pudieran explicar la divergencia con un desenlace diferente (Whitehead et al. 2013; Singh et al. 1999; Halstead 2006),

indican que se requiere de herramientas avanzadas como la secuenciación de nucleótidos que permiten encontrar variaciones a este nivel y poder relacionarse con su expresión fenotípica (Camacho García et al. 2009).

El propósito de esta investigación es contribuir al campo de determinantes del huésped y del virus que influyen en el desenlace clínico de la enfermedad en pacientes de ciudades endémicas de Colombia.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue se considera un problema de salud pública en al menos 100 países alrededor del mundo (Periago & Guzmán 2007). En América, el incremento alarmante del número de casos severos en las últimas décadas es un tema de gran interés. En la década de los 80s se reportaron 13,398 casos y 242 fatales y en la de los 90s se vio incremento en por lo menos cuatro veces llegando a 58,419 y en el doble de fatales que fueron 577. En el período 2000 – 2007 el incremento continuó con 111,724 casos severos reportados y 1,391 fatales (San Martín et al. 2010). Las cifras muestran que en las últimas 3 décadas los casos severos de dengue se incrementaron al menos 8,3 veces con respecto a décadas anteriores. En Colombia el dengue es un problema de salud pública. Al comparar las dos últimas décadas podemos entender la magnitud del mismo. En el período 1990 – 1999 se reportaron 14,408 casos de dengue severo mientras que en 2000 - 2009 se incrementaron a 47,108. Esta misma situación se observa con la mortalidad: 86 casos fatales en el primer período mientras para el segundo fueron 1,325. El mayor número de fatales se vio en la epidemia del 2010 cuando se reportaron 217 (San Martín et al. 2010; Instituto Nacional de Salud-Colombia 2010).

El agente causal de esta infección es el virus dengue (VDEN), su genoma es de RNA que contiene 10 genes que codifican para una sola poli proteína, la cual es clivada en 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales (NS, siglas de non-structural), una de ellas la proteína NS4B (Miller et al. 2006). Existen cuatro serotipos denominados VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4. Cada serotipo es una población de cepas genéticamente diferentes que se pueden agrupar en genotipos así: VDEN-1 en cinco (I, II, III, IV y V); VDEN-2 en seis (Americano, Asiático/Americano, Cosmopolita, Asiático 1, Asiático 2 y selvático); VDEN-3 en cuatro (I, II, III y IV); VDEN-4 en tres (I, II, III y selvático) (Weaver & Vasilakis 2009). A continuación, se presenta la tabla 1 de equivalencia de los genotipos descritos:

Tabla 1. Genotipos VDEN.

Genotipo	Distribución geográfica
VDEN-1	
I	Japón, Hawaii, China, Taiwán y Sudeste asiático
II	Tailandia
III	Área selvática de Malasia
IV	China, Taiwán y Sudeste asiático
V	África, Sudeste asiático y América
VDEN-2	
Asia I	Tailandia, Myanmar y Malasia
Asia II (Subtipo I y II)	China, las Filipinas, Sri Lanka, Taiwan y Vietnam
América/Asia (Subtipo III)	China, Vietnam, Tailandia y América Latina
Cosmopolita (subtipo IV)	Australia, Islas del Pacífico, Sudeste asiático, India, islas del Océano Índico, Oriente Medio, Este y Oeste de África
Americano (Subtipo V)	América Latina, Cepas antiguas de la India, El Caribe y las islas del Pacífico
Selvático	Aislado de primates no humanos en África Occidental y Malasia
VDEN-3	
I	Indonesia, Malasia, Tailandia, Birmania, Vietnam, Filipinas y el sur de las islas del Pacífico
II	Tailandia, Vietnam y Bangladesh
III	Singapur, Indonesia, islas del Pacífico Sur, Sri Lanka, India, África, Samoa y América Latina.
IV	Puerto Rico y la Polinesia Francesa
VDEN-4	
I	Tailandia, Malasia, Filipinas y Sri Lanka
II	Indonesia, Malasia, Tahití, Islas del Caribe y las Américas
III	Tailandia
Selvático	Aislado de primates no humanos en Malasia

El desenlace clínico por la infección con VDEN varía desde un cuadro asintomático hasta enfermedad severa que puede llevar a la muerte (World Health Organization 2009). Se ha propuesto que la severidad de la enfermedad está determinada por varios factores del individuo (Moraes et al. 2013; Pawitan 2011). Trabajos clínicos y epidemiológicos demuestran que aspectos relacionados con la respuesta inmune del infectado tienen papel preponderante (Lei et al. 2001; Halstead 2009). Uno de estos aspectos bien reconocido es el fenómeno de la amplificación dependiente de anticuerpos (Halstead 2003; Wahala & Silva 2011). Estudios sugieren que el riesgo de sufrir dengue severo / fatal, incrementa en quienes sufren un segundo episodio por distinto serotipo del virus (infección secundaria) comparados con quienes padecerán un primer episodio por cualquier serotipo (infección primaria). Así, el tipo de infección, primaria o secundaria se reconoce como un factor determinante de la severidad (Libraty et al. 2009).

El virus por sí mismo es otro factor establecido como determinante del desenlace clínico en pacientes con dengue. Al parecer existen diferencias entre serotipos con respecto al potencial para causar dengue severo, esto teniendo en cuenta hallazgos en estudios clínicos realizados en países de América y de Asia. Los hallazgos de estos estudios sugieren que el VDEN-2 es el serotipo más asociado a dengue severo seguido por el VDEN-1 y que el VDEN-4 está más asociado a dengue leve (Balmaseda et al. 2006; Halsey et al. 2012; Ocazonez 2007; Ocazonez-jiménez et al. 2013; Thomas et al. 2008). Con respecto al VDEN-3 existe controversia, en algunos estudios se ha propuesto que se asocia a manifestaciones severas y en otros con manifestaciones leves (Anantapreecha et al. 2005; Fried et al. 2010; Nisalak et al. 2003; Ocazonez 2007).

Considerando el tipo de infección y serotipo, las infecciones secundarias por el VDEN-2 y VDEN-1 se han postulado como los escenarios que más favorecen el desenlace a dengue severo. Sin embargo, también se han evidenciado hallazgos opuestos: en pacientes con infección secundaria por cualquier serotipo el dengue

leve es el desenlace clínico más frecuente e igualmente, se han reportado infecciones primarias con desenlace fatal (Balmaseda et al. 2006; Fried et al. 2010; Guzmán et al. 2000; Nisalak et al. 2003; Naves et al. 2004). Estos hallazgos sugieren que cepas de un mismo serotipo, se podrían diferenciar entre sí con respecto al potencial para causar dengue severo; esta característica biológica del virus se conoce como virulencia (Cologna et al. 2005; Sánchez 1996; Kelley et al. 2012).

Las diferencias en virulencia entre cepas del VDENV-2 se han estudiado comparando cepas del genotipo Americano (subtipo V) versus Asiático-Americano (Subtipo III), dado que el primero se ha relacionado con casos leves y el otro con muertes y epidemias severas (Bray et al. 1998; Chaudhry et al. 2006; Diamond et al. 2000; Mangada & Igarashi 1998; Pryor et al. 2001; Rodríguez & Guzmán 2005; Singh et al. 1999; Leitmeyer et al. 1999); los resultados de esos estudios concluyen que existe variabilidad genética y cambios evolutivos de cepas de VDENV-2 durante epidemias, además que los cambios genéticos como variaciones en las posiciones 181, 278, 390, 394 de las proteínas E, NS1, NS3 y NS2a, así como las posiciones 3' y 5' de la región UTR del VDENV-2, se encuentran asociados como posibles factores de virulencia, debido a su posible asociación con el desenlace clínico.

La base genética que podría explicar las diferencias entre cepas del VDENV-2 se ha explorado en varios estudios (Castillo & Díaz 2009; Cologna & Rico-hesse 2003; Leitmeyer et al. 1999; Singh et al. 1999; Rodríguez-Roche & Gould 2013) en ellos se ha encontrado reemplazo de aminoácidos en las proteínas no estructurales en cepas aisladas de pacientes con desenlace severo, sugiriendo que la genética viral podría ser el factor que explique la divergencia clínica. Cambios en las proteínas NS1, NS2A y NS4B contribuyen positivamente o negativamente en el fitness viral, aceptando que estas mutaciones específicas podrían estar asociadas a la variedad clínica de la enfermedad, dependiendo de la naturaleza de la cepa

infectante. También, proteínas no estructurales como la NS1 y NS4 pueden estar involucradas en procesos de atenuación viral; aunque la proteína NS4B incrementa la eficiencia de la replicación y podría asociarse en aumento de la virulencia. Específicamente se ha demostrado que una sola mutación en la proteína NS4B, nombrada L52F, confiere poder virulento a cepas de VDEN-2 en ratones AG129 a través del incremento de la síntesis de RNA viral (Grant et al. 2011). Los anteriores resultados permiten postular que los genes no estructurales tienen un rol importante en la determinación del fitness viral.

El propósito de este estudio es aportar al conocimiento sobre la influencia del tipo de infección (primaria o secundaria) y variantes genéticas virales como determinantes del desenlace clínico del dengue. El objetivo es evaluar la posible asociación entre las variantes genéticas de la proteína NS4B del VDEN-2 y el desenlace clínico de la enfermedad.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre polimorfismos presentes en el gen de la proteína NS4B del serotipo dengue 2 y el desenlace clínico de la enfermedad?

3. MARCO TEÓRICO

La infección por dengue es considerada la enfermedad transmitida por vectores más prevalente en el mundo, siendo endémica en cerca de 100 países en donde 3 billones de personas están en riesgo de infectarse (World Health Organization 2009).

Según reportó la Organización Panamericana de la Salud (OPS), hasta la semana 45 del 2009 se reportaron 853.468 casos de dengue en el continente americano, incluyendo 20.832 casos de dengue grave y 326 muertes, siendo la tasa de letalidad regional de 1,56. En el año 2010 aumentó alarmantemente los brotes de dengue en Centroamérica, México, el Caribe y Suramérica, este aumento fue considerable comparado con el año 2009. En Colombia para el año 2010 se reportaron al SIVIGILA 147.670 casos de dengue de los cuales 9.482 corresponden a dengue grave y 217 muertes, para una letalidad de 2,28% (Instituto Nacional de Salud-Colombia 2010).

El curso clínico de esta enfermedad es de naturaleza sistémica y dinámica con un amplio espectro de manifestaciones. La enfermedad varía desde un caso asintomático de corta duración hasta casos graves que pueden llevar al choque y por ende a la muerte. De acuerdo la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 1997, la fiebre por dengue es clínicamente definido como una enfermedad febril con dos o más manifestaciones como dolor de cabeza, dolor retroorbital, mialgia, artralgia, sarpullido. El dengue hemorrágico es definido por los siguientes criterios: fiebre alta persistente, manifestaciones hemorrágicas, hemoconcentración ($>20\%$), recuento de plaquetas < 100.000 . El dengue severo es clasificado en 4 grados diferentes de acuerdo a las hemorragias y a la fuga plasmática, el choque por dengue corresponde a los grados III y IV (World Health Organization 1997; Sun & Kochel 2013). La nueva guía para la clasificación de la severidad de la enfermedad corresponde a las de la OMS de 2009, en donde

clasifican el cuadro clínico en dengue leve: presencia de náuseas, vómito, sarpullido, dolor generalizado, prueba del torniquete positivo, leucopenia; dengue con signos de alarma: dolor abdominal, vómito persistente, edemas, sangrado de mucosas, letargia, hepatomegalia (> 2 cm), aumento del hematocrito, recuento de plaquetas < 100.000 ; dengue severo: fuga plasmática, edema, dificultad respiratoria, sangrado mayor, compromiso de órganos (World Health Organization 2009).

Investigaciones sugieren que la patogénesis del desenlace severo y letal es el resultado de múltiples factores atribuidos al huésped y al virus. Dentro de los factores del huésped encontramos la edad, la genética, el estado nutricional, condiciones preexistentes como las comorbilidades y la respuesta inmune (Suárez-Ognio et al. 2011; Cardoso et al. 2011; Kalayanarooj et al. 2007; Lan & Hirayama 2011; Boonnak et al. 2011; Marón et al. 2010).

Varios estudios han mostrado que la respuesta inmune del huésped juega un papel importante en el desarrollo de dengue grave, incluyendo las células mediadoras de la respuesta inmune, producción de citoquinas, respuesta inmune innata y adaptativa, así como la respuesta inmune humoral, donde es propuesta la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) como desencadenante de una respuesta agresiva (Pawitan 2011). La teoría más comúnmente aceptada que sugiere explicar la patogénesis del dengue grave es el fenómeno de ADA. Se postuló que la respuesta inmune humoral en una infección primaria por un serotipo de VDEN, da origen a la producción de anticuerpos neutralizantes para VDEN homólogos y también origina anticuerpos no neutralizantes para VDEN heterólogos, responsables del efecto ADA. Este efecto se produce por anticuerpos de tipo IgM e IgG. El complejo virus y anticuerpo, formado en la infección secundaria, se unen al virus haciendo posible la unión con los receptores de tipo Fc γ de las células fagocíticas mononucleares a través de la porción Fc de los anticuerpos. De esta

manera se amplifica el éxito de la entrada del VDEN a la célula huésped (Halstead 2003).

De acuerdo a esta teoría, los pacientes que experimentan una infección secundaria con un serotipo diferente tendrá un riesgo mayor a desarrollar dengue severo (Halstead 2003). La más fuerte evidencia ha sido aportada por los estudios realizados en Cuba, en donde al comparar las dos epidemias, la primera causada por VDEN-1 en 1977 y la otra 20 años después por VDEN-2 en 1997, se mostró que la mayoría de infectados con síntomas severos eran adultos con infección secundaria y las personas asintomáticas experimentaron infección primaria (Guzmán et al. 2000). Sin embargo se han reportado resultados que muestran que personas con infección primaria cursan con dengue severo, y por el contrario, personas que cursan con infección secundaria tienen un desenlace leve (Chaudhry et al. 2006). Lo anterior supone que existen otros factores que aparte del ADA también determinan el desenlace severo, como por ejemplo factores atribuidos al virus.

Dentro de los factores determinantes del virus se ha propuesto el serotipo. Varios estudios de cohortes bien conducidos se han realizado en países de Asia y América (Anantapreecha et al. 2005; Balmaseda et al. 2006; Fried et al. 2010; Halsey et al. 2012; Nisalak et al. 2003; Ocazonez 2007; Ocazonez et al. 2006; Ocazonez-jiménez et al. 2013; Guzmán et al. 2000). En Nicaragua, se encontró que el VDEN-2 produce más manifestaciones severas comparadas con VDEN-1. En Cuba, el panorama no cambia, el desenlace severo se asocia a infecciones por VDEN-2. En Colombia, el desenlace severo fue asociado a infecciones por VDEN-2 comparado con VDEN-3. Sin embargo, en Asia se observa que el VDEN-1 y VDEN-3 son los responsables de los casos más severos. Estas divergencias en los hallazgos sugieren que existen diferencias en el potencial para causar enfermedad dentro el mismo serotipo.

Entre cepas de VDEN-2 se han comparado dos genotipos: americano y el asiático-americano. Se ha encontrado que el genotipo Americano/Asiático tiene mayor capacidad de replicación en cultivo celular (Cologna et al. 2005; Cologna & Rico-hesse 2003). Sin embargo, se ha aislado de pacientes con dengue leve. Las diferencias genéticas entre cepas de VDEN-2 que pudieran explicar esta divergencia (Whitehead et al. 2013; Singh et al. 1999; Halstead 2006), indican que se requiere de herramientas avanzadas como la secuenciación de nucleótidos que permiten encontrar variaciones a este nivel y poder relacionarse con su expresión fenotípica (Camacho García et al. 2009).

Investigaciones han logrado identificar variaciones en el gen E entre cepas de VDEN-2 aisladas de pacientes con dengue leve de América y de pacientes con dengue grave de Tailandia. Estas variaciones corresponden a mutaciones en el aminoácido 390 de la proteína E y se postula como potencial determinante de virulencia, dado que esta variación les confiere mayor unión a los receptores celulares aumentando la capacidad neurovirulenta (Sánchez 1996). Las proteínas NS también han sido reportadas como protagonistas en la replicación viral y en la formación de complejos membranosos de replicación (RCs, siglas de replication complexes) (Sampath & Padmanabhan 2009); una de estas proteínas NS es la NS4B.

En células infectadas, la proteína NS4B es clivada por la proteasa viral NS2B-NS3 a un polipéptido para luego ser modificada a una proteína madura. Se ha reportado que en células infectadas por VDEN-2, esta NS se localiza en la región perinuclear de la célula, tomando una apariencia punteada durante el curso de la infección (Miller et al. 2006). La NS4B es una de las proteínas no estructurales más grandes y está conformada por 248 aminoácidos, estudios han mostrado que esta NS está altamente conservada en los 4 serotipos virales. Por otra parte, la NS4B también ha sido analizada como un punto interés, mostrando mutaciones adaptativas en respuesta a la variación de presión selectiva.

Esta proteína ha demostrado su papel participativo en el proceso de replicación viral y por ende también la patogénesis (Kelley et al. 2012; Kelley et al. 2011; Mun et al. 2005; Bartenschlager & Miller 2008). En modelo animal se demostró que una substitución en la posición 52 de esta proteína atenúa la cepa viral, disminuyendo así su capacidad virulenta (Grant et al. 2011). Investigadores también han descrito que esta proteína NS4B, está implicada en la inhibición de la señalización del interferón (IFN), bloqueando la señalización de STAT1 y por ende evita la transcripción de cientos de genes con actividad antiviral (Muñoz-Jordan et al. 2003).

Lo anterior refuerza la idea de que esta proteína se relaciona de manera directa con la patogénesis de la enfermedad por virus dengue. Investigaciones también han explorado variaciones en la secuencia de aminoácidos de esta proteína NS4B que confiere virulencia/atenuación a cepas de VDEN y por ende contribuir a un desenlace severo (Grant et al. 2011), otros estudios también sugieren que: pases de cepas de VDEN-2 en células Vero muestran que la NS4B exhibe una mutación T108M (en la posición 108, hay cambio del aminoácido treonina por metionina), haciendo que aumente la replicación del RNA (Zou et al. 2011); en VDEN-4 la mutación P101L (en la posición 101, hay cambio del aminoácido prolina por leucina) hace que el fenotipo del tamaño de placa sea diferente, así en células C6/36HT son pequeñas, mientras que en células Vero y HuH-7 éstas placas son mucho más grandes (Hanley et al. 2003); también en VDEN-4 las mutaciones V109A, G119S y L112F (en la posición 109, 119 y 112, los aminoácidos cambiaron de valina por alanina, glicina por serina y leucina por fenilalanina, respectivamente) (Blaney J, Manipon G, Firestone C-Y, Johnson DH, Hanson CT, Murphy BR 2003).

En nuestro medio se conoce de un estudio, en el cual se ha hecho una aproximación en estudiar el papel de la proteína NS4B en la patogénesis de la enfermedad (Castillo & Díaz 2009). En este estudio conducido por el Grupo de

Inmunovirología de la Universidad de Antioquia se secuenciaron 19 cepas de VDENV-2 aisladas de pacientes de Antioquia (n=7), Santander (n=3) y Norte de Santander (n=9), en donde identificaron 5 polimorfismos presentes en este gen que se relacionaron significativamente con dengue severo (Castillo & Díaz 2009); sin embargo este hallazgo requiere estudios complementarios con una población mayor de casos severos.

El propósito de esta investigación es contribuir al campo de determinantes del huésped y del virus que influyen en el desenlace clínico de la enfermedad en pacientes colombianos. Finalizado este estudio, los resultados obtenidos a partir de un amplio número de muestras de los departamentos de Santander, Norte de Santander, Valle y Antioquia podrán concluir en conjunto con el estudio anterior (Castillo & Díaz 2009).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la posible asociación entre polimorfismos del serotipo dengue 2 y el desenlace clínico de la enfermedad durante la epidemia del 2009-2010 en ciudades endémicas de Colombia.

4.2 Objetivos específicos

1. Describir el/los genotipo/s de VDENV-2 circulantes en ciudades endémicas de Colombia durante la epidemia del 2009-2010.
2. Determinar el serotipo más asociado a severidad durante la epidemia del 2009-2010 en ciudades endémicas de Colombia, considerando simultáneamente el efecto que introduce el tipo de infección.
3. Establecer los polimorfismos del gen de la proteína NS4B entre cepas de VDENV-2 aisladas de pacientes con diferente desenlace clínico durante la epidemia del 2009-2010 en ciudades endémicas de Colombia.

5. JUSTIFICACIÓN

El dengue es un problema de salud pública que afecta a millones de personas cada año. Las cifras muestran que en las últimas décadas los casos severos de dengue se incrementaron al menos 8,3 veces con respecto a décadas anteriores (San Martín et al. 2010). Además de la carga social que produce la enfermedad, el control del *Aedes aegypti* ha resultado insuficiente y el efecto de los brotes y epidemias tiene impacto desfavorable para el desarrollo socioeconómico de los países.

En Colombia, los casos severos y muertes por dengue ha sido una constante durante los últimos años (Instituto Nacional de Salud-Colombia 2010; Instituto Nacional de Salud-Colombia 2011; Instituto Nacional de Salud-Colombia 2012; Instituto Nacional de Salud-Colombia 2013; SIVIGILA 2014). Algunos estudios realizados por investigadores de la Universidad Industrial de Santander sugieren que cuanta más abundancia del VDEN-2 circulando en el área endémica más infecciones secundarias y por lo mismo mayor número de casos de dengue severo, al contrario, con la abundancia del VDEN-3. Con VDEN-1 y VDEN-4 se presume que la abundancia del primero podría incrementar el dengue severo y que el segundo tiene papel insignificante en la ocurrencia de estos casos (Ocazonez et al. 2006; Ocazonez 2007). Para confirmar estos supuestos es necesario realizar estudios con un seguimiento clínico detallado y con un tamaño de muestra apropiado.

La base genética de la virulencia de cepas del VDEN es bastante controversial y una de las causas es la imprecisión al definir la severidad del dengue en el paciente de donde el virus se aisló. En este estudio se superará esa dificultad teniendo en cuenta que las muestras han sido obtenidas en fase temprana de pacientes con seguimiento clínico diario por un médico experto, razón por la que la clasificación de la forma clínica es confiable. Los resultados del análisis genómico

a partir de estas muestras contribuirán a establecer diferencias que expliquen mayor virulencia independientemente del tipo de infección. Este conocimiento contribuirá a sustentar intervenciones del estado que fortalezcan el sistema de vigilancia en salud y de esta manera prevenir tasas altas de severidad y mortalidad mediante la intervención oportuna.

6. HIPÓTESIS

H₁: La variabilidad genética del virus dengue serotipo 2 se asocia al desenlace clínico de la enfermedad.

H₀: La variabilidad genética del virus dengue serotipo 2 no se asocia al desenlace clínico de la enfermedad.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 TIPO DE ESTUDIO

La hipótesis fue evaluada mediante un estudio de casos y controles anidado a cohorte. La cohorte en la cual se anidó este estudio, en realidad representa 3 cohortes descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción de cohortes de estudio.

Cohorte	Nombre	Código COLCIENCIAS	Código UIS	Periodo	Lugar	SFI*	Casos Dengue confirmado
1	Identificación de marcadores tempranos de severidad en dengue	11020412919	8621	2003- 2005	Área metropolitana de Bucaramanga	504	201
2	Validación de una definición clínica de dengue y evaluación de su utilidad para identificar tempranamente las condiciones asociadas a hospitalización	11020418205	8650	2006- 2008	Área metropolitana de Bucaramanga	1160	290
3	Estudio multicéntrico colombiano "AEDES": abordando áreas endémicas de dengue para el estudio de su severidad"	110245921561	8676	2009- 2011	Área metropolitana de Bucaramanga, Barranquilla, Cali, Palmira, Neiva	2020	809

* **SFI:** Síndromes febriles inespecíficos.

7.2 POBLACIÓN

La población del estudio está constituida por pacientes con diagnóstico confirmado de infección por VDEN captados en alguna de las 3 cohortes mencionadas. Los criterios de inclusión establecidos para la captación de la información clínica y muestras biológicas en las cohortes fueron los siguientes: pacientes con 5 o más años de edad con síndrome febril agudo entre 48 horas y 96 horas de evolución, sin foco aparente después del examen físico, con recuento plaquetario $>50.000\text{mm}^3$ y con al menos dos de las siguientes manifestaciones: cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgias, exantema, manifestaciones hemorrágicas menores y leucopenia ($<5000/\text{mm}^3$), según definición operativa de la OMS de caso sospechoso de dengue (World Health Organization 2009). Se excluyeron pacientes cuyo sitio de residencia impidió completar el seguimiento requerido por el estudio. Presentar antecedente de cáncer, SIDA, enfermedades del colágeno, insuficiencia renal crónica, falla cardíaca congestiva o trastornos hematológicos o reporte de ingesta en los últimos ocho días de corticoides.

Una vez los pacientes ingresaron a las cohortes, se realizó una evaluación basal que incluyó anamnesis, examen físico y cuadro hemático automatizado, también se obtuvo una muestra de sangre para realizar pruebas de laboratorio y generar posterior almacenamiento en el biobanco. Las evaluaciones posteriores se realizaron diariamente al menos hasta el sexto día a partir del inicio de la fiebre, permitiendo: obtener muestras de sangre para realizar pruebas de laboratorio y generar posterior almacenamiento en el biobanco y el seguimiento del curso clínico de la enfermedad. Al finalizar el seguimiento, en cada paciente se logró realizar al menos tres evaluaciones médicas, vigilando la aparición posibles complicaciones.

El diagnóstico de infección por VDEN fue confirmado por la presencia de antígenos NS1 en suero agudo mediante ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), detección de anticuerpos tipo IgM o IgG anti-dengue documentando la

seroconversión de negativo a positivo o aumento de 4 veces o más en los niveles de los anticuerpos (medidos mediante ELISA o mediante la prueba de inhibición de hemaglutinación en suero pareado), detección de RNA viral mediante PCR con transcriptasa reversa y aislamiento viral en cultivo celular C6/36 HT.

7.3 DEFINICIONES

La definición de casos y controles definida en este estudio, toma criterios tanto de la clasificación OMS 1997 como la del 2009. Para este trabajo de investigación, se procuró que los casos presentaran el desenlace más severo (desenlace compuesto) y que los controles fueron el extremo opuesto de los casos. A continuación, la definición:

7.3.1 Caso.

Pacientes con infección confirmada por VDENV que presentaran el desenlace compuesto en algún punto de su enfermedad (línea de base o seguimiento), definido previamente para la cohorte AEDES. Este desenlace compuesto se definió como presencia de hipotensión o presencia de sangrado mayor (Gélvez M, Herrera V, Parra B, Ocazonez R, Salgado D 2015; Lozano A, Herrera V 2015). La hipotensión se definió por al menos uno de los siguientes criterios: taquicardia para la edad y presión de pulso <20 mm Hg, presión arterial media disminuida para la edad, presión arterial sistólica disminuida para la edad en cualquier momento del seguimiento (Goldstein et al. 2005); para este estudio, la hipotensión fue tomada como signo claro de choque descompensado, por ende su presencia es suficiente para categorizar el caso como grave (Lum et al. 2015). La presencia de sangrado mayor se definió por al menos uno de los siguientes criterios: hematemesis, melenas, hematoquecia o hematuria. La alteración de órganos no fue incluida como variable

para definir caso, debido a que fue difícil establecer la definición real de esta alteración y por tanto podría conducir a un sesgo de mala clasificación.

7.3.2 Control.

Pacientes con infección confirmada por VDENV que no presentaron el desenlace compuesto en ningún punto de su enfermedad (línea de base o seguimiento) (Gélvez M, Herrera V, Parra B, Ocazonez R, Salgado D 2015; Lozano A, Herrera V 2015).

Para el caso de pacientes que no contaron con información clínica detallada basal y de seguimiento, el desenlace clínico fue clasificado por criterios OMS 1997 (World Health Organization 1997), así:

- Fiebre dengue (DF, siglas de Dengue fever): presencia de fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ con ≥ 1 de los siguientes: rash, náuseas/vómito, mialgia, artralgia, manifestaciones hemorrágicas.
- Fiebre hemorrágica del dengue (DHF, siglas de Dengue hemorrhagic fever): evidencia de alguna de las siguientes manifestaciones: torniquete positivo, petequias, equimosis o púrpura, sangrado de mucosas, tracto gastrointestinal, hematemesis o melenas. Trombocitopenia, evidencia de fuga plasmática evidenciado por incremento del hematocrito (mayor del 20%), efusión pleural, ascitis o hipoproteinemia.
- Síndrome de shock por dengue (DSS, siglas de Dengue Shock Syndrome): Manifestaciones DHF con la presencia adicional de falla circulatoria manifestada por pulso débil y presión de pulso (<20 mmHg) o manifestaciones como hipotensión para la edad, piel fría y húmeda.

Para este grupo, los controles corresponden a pacientes que cursaron con DF y los casos a pacientes que cursaron con DHF/DSS.

7.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA ESTE ESTUDIO

En este estudio, los criterios de inclusión variaron según el objetivo a cumplir, así:

Para el objetivo #1 “Identificar el/los genotipo/s circulantes de VDENV-2 durante los años 2009-2010 en diferentes ciudades endémicas de Colombia” y objetivo #3 “Establecer variación del gen NS4B entre cepas de VDENV-2 aisladas de pacientes con diferente desenlace clínico durante los años 2009-2010 en diferentes ciudades endémicas de Colombia” se incluyeron pacientes con diagnóstico confirmado cuyo serotipo infectante fuese el VDENV-2 que contasen con información clínica completa y detallada tanto en línea de base como en el seguimiento y que tuvieran disponibilidad de muestra basal (suero/plasma).

Para el objetivo #2 “Determinar el serotipo más asociado a severidad considerando simultáneamente el efecto que introduce el tipo de infección” se incluyeron pacientes con diagnóstico confirmado, cuyo serotipo infectante e inmunidad previa (tipo de infección) estuvieran determinados y además que contaran con información clínica completa y detallada.

7.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN PARA ESTE ESTUDIO

En este estudio, se excluyeron pacientes que no contaran con muestra basal hasta el quinto día de enfermedad y que no dispusieron de muestras sin ciclos de descongelamiento.

7.6 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra fue a conveniencia. Se seleccionaron el máximo número disponible de casos y controles que cumplieran con los criterios de inclusión.

7.7 VARIABLES

7.7.1 Variables independientes.

Constituidas por los datos de serotipo y polimorfismo genómico obtenidos tanto de los casos como de los controles.

7.7.2 Variable dependiente o de resultado.

Para evaluar la asociación del serotipo viral y polimorfismo genómico con el desenlace clínico de la enfermedad se consideró como variable dependiente la severidad del dengue: esta variable se precisó teniendo en cuenta la presencia de hipotensión para la edad (Goldstein et al. 2005; World Health Organization 2009) o presencia de sangrado en cualquier momento de la enfermedad (línea de base o seguimiento).

7.7.3 Variables de Confusión.

Debido a que estas variables se han asociado con la severidad de la enfermedad se postulan como posibles variables confusoras; estas son: edad, género, horas de evolución de la enfermedad, manejo clínico e inmunidad previa (tipo de infección).

7.8 ESPECIMEN DE ANÁLISIS

Para el desarrollo del objetivo #3 se usarán sueros/plasmas humanos obtenidos durante la fase aguda de la enfermedad (entre el primer y quinto día de inicio de síntomas), congelados a -80°C desde la toma de muestra hasta el momento del procesamiento (sin ciclos de descongelación).

7.9 PROCESAMIENTO

7.9.1 Determinación de serotipo infectante.

La información del serotipo infectante para este estudio fue obtenida de dos maneras: 1) Datos secundarios; durante la ejecución de las tres cohortes, se determinó el serotipo infectante en un grupo de pacientes por medio de PCR convencional (Lanciotti et al. 1992). Por ello se tomó la información que se encontraba ya disponible. 2) Datos primarios; en este estudio se realizó la determinación del serotipo infectante en otro grupo de pacientes; a continuación, se describe el método:

El serotipo se determinó mediante la técnica de PCR en tiempo real usando el estuche CDC DENV-1–4 Real Time RT-PCR Assay (CDC, Puerto Rico, EUA) (Centers for Disease Control and Prevention 2012) y mediante la PCR convencional siguiendo el protocolo de Lanciotti y colaboradores (Lanciotti et al. 1992).

- Detección del serotipo por PCR en tiempo real: el RNA fue extraído del suero usando el estuche comercial QIAamp® Viral RNA (QIAGEN). Para el procesamiento de sueros se siguió las recomendaciones del fabricante y los detalles se encuentran publicados (Inserto KK0128 disponible en <http://www.cdc.gov/dengue>) (Santiago et al. 2013). Brevemente, el RNA fue extraído y este se pasó a cDNA; el producto de PCR al cual se hibridó la sonda marcada del serotipo correspondiente y la intensidad de la señal fluorescente se midió en el termociclador IQ5 de Bio-Rad. La amplificación se registró como incremento y

acumulación de fluorescencia sobre el tiempo en contraste a la señal de fondo (control negativo). La identificación de cada serotipo presente en el suero se basó en un ensayo de tipo multiplex (los 4 serotipos son corridos en la misma reacción), en donde cada sonda identificó un solo serotipo del VDENV y emitió una señal fluorescente que fue excitada a diferente longitud de onda: 5'-FAM DENV-1 BHQ1-3', 5'-HEX DENV-2 BHQ1-3', 5'-TR DENV-3 BHQ2-3', and 5'-Cy5 DENV-4 BHQ3-3'.

- Detección del serotipo por PCR convencional: el RNA también fue extraído del suero usando el estuche comercial QIAamp® Viral RNA (QIAGEN). La PCR fue llevada a cabo según el protocolo de Lanciotti et al, 1992 (Lanciotti et al. 1992). Brevemente, el RNA obtenido fue retrotranscrito a DNAC y llevado a una primera ronda de PCR de 40 ciclos usando primers comunes para la detección de los cuatro serotipos del VDENV. Una segunda ronda fue realizada con primers específicos para cada serotipo. Las bandas fueron observadas directamente en gel de agarosa al 1.7% teñido con SYBR Green. En todos los pasos fueron incluidos controles negativos y positivos.

7.9.2 Aislamiento viral.

Los casos y controles para el desarrollo de los objetivos #1 y #3 fueron sujetos a intentos de aislamiento viral en cultivo celular. Fueron elegidos sueros/plasmas de pacientes que en la base de datos figurasen como infectados por el serotipo 2 (VDENV-2), y cuyas muestras hubiesen sido preservadas a -80°C sin ciclos de descongelamiento.

El suero diluido fue inoculado en la línea celular de mosquito C6/36 HT, a 34°C sin CO₂. Las células fueron mantenidas en medio L-15 suplementado con suero fetal bovino al 2% y 10% (Gibco), L-glutamina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1% y vitaminas al 1% (Gibco). El cultivo infectado de primer pase (P1) fue supervisado durante 10 días o hasta que se observará efecto citopático

evidente. Transcurrido el tiempo estipulado se procedió a realizar un pase ciego o reinfección (P2) sobre un nuevo cultivo celular con las mismas condiciones que la infección inicial. Se determinó la infección por inmunofluorescencia indirecta tanto de los casos que observamos efecto citopático evidente, así como en los que no lo observamos.

El procedimiento de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se realizó de la siguiente manera: una vez fijadas las células del cultivo celular sobre una lámina de IFI, se añadió en un pozo 15 µL de anticuerpo 4G2 diluido (1:100), este anticuerpo es específico para la detección de flavivirus; y en un segundo pozo se añadió el anticuerpo específico 3H5 diluido (1:100), este anticuerpo es específico para la detección de VDENV-2. Las láminas se llevaron a incubación durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Después de transcurrida la incubación, las láminas fueron lavadas con PBS al 1% por 10 minutos en vasos de koplín. Una vez realizados los lavados, las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente. Después se procedió a agregar 15 µL del conjugado comercial biotina diluido (1:50). De nuevo, las láminas se llevaron a incubación durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Después de transcurrida la incubación, las láminas fueron lavadas con PBS al 1% por 10 minutos en vasos de koplín. Una vez realizados los lavados, las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente. Se procedió a añadir 15 µL de conjugado avidina/fluoresceína+azul Evans diluido (1:50) (el azul de Evans sirvió como contraste). Otra vez, las láminas se llevaron a incubación durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Después de transcurrida la incubación, las láminas fueron lavadas con PBS al 1% por 10 minutos en vasos de koplín. Una vez realizados los lavados, las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente. Ya secas completamente se agregó una gota de glicerina buferada y sobre esta se colocó de manera cuidadosa un cubreobjetos. Las láminas fueron observadas en un microscopio para fluorescencia y se determinó si los aislados fueron positivos o negativos teniendo en cuenta las observaciones de los controles.

7.9.3 Amplificación de los genes NS4B y E.

Se realizó amplificación de los genes NS4B y E a los casos y controles, para el desarrollo del objetivo #1 y #3.

La amplificación fue realizada de 2 fuentes:

-Sobrenadante de los cultivos celulares: en las muestras con aislamiento positivo.

-Suero paciente: en el caso de que el aislamiento viral hubiese sido negativo, se optó por amplificar directamente del suero/plasma.

Se extrajo RNA viral del sobrenadante de los cultivos celulares o directamente del suero/plasma del paciente utilizando el kit de extracción QIAamp Viral RNA Mini Kit ® de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del RNA extraído se obtuvo cDNA de cada muestra mediante transcripción reversa, usando la retrotranscriptasa y primer aleatorios del kit comercial RevertAid HMinus (ThermoScientific™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación específica de los genes NS4B y E se realizó PCR convencional usando los primers descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Primers utilizados para amplificación del gen NS4B y E.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Orientación	Tamaño (nt)	Posición genoma	Tamaño amplicón (pb)
D2NS4B S-F	CCATCCTCACAGTGGTGGCYGC	Forward	22	6772-6793	806
D2NS4B S-R	TCCAAGTGTCTCTCCTATGTTGCCA	Reverse	25	7577-7553	
D2E 739-F	ATGGGATTGGAGACACGAACTGAA	Forward	24	740-764	1800
D2E 2588-R	TCTTGTTACTGAGCGGATTC	Reverse	20	2589-2609	

Cada reacción de PCR para amplificación del gen NS4B contenía lo siguiente: 4 µL de cDNA, 25 µL DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoScientific™), 0,25 µL de primers “forward” y “reverse”; y 20,5 µL de agua ultrapura. La reacción de PCR para el gen E contenía: 5 µL de cDNA, 25 µL DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoScientific™), 0,5 µL primer forward y reverse, 19 µL agua ultrapura. El protocolo de amplificación para el gen NS4B se realizó de la siguiente manera: 2 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 57,4°C; 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72 °C. El protocolo para el gen E fue el siguiente: 1 minuto a 94°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55,4°C y 2.5 minutos + 5 segundos/ciclo a 72°C. La amplificación del gen NS4B y gen E fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 1.7% (peso/volumen), teñida con SYBR Green y usando un marcador de peso molecular de 100 pb (ThermoScientific™). Estos protocolos habían sido previamente estandarizados en el laboratorio del Grupo de Inmunovirología de la Universidad de Antioquia.

7.9.4 Secuenciación de los productos de PCR.

Los productos de PCR fueron enviados a la compañía comercial Macrogen, Inc, (Seoul, Korea) para su purificación y secuenciación. La secuenciación se llevó a cabo, usando terminadores Bigdye, en condiciones cíclicas y una vez purificados los productos, se corrieron y leyeron en el secuenciador automatizado ABI3730XL. Los primers usados para secuenciamiento fueron sintetizados por Macrogen; estos primers fueron diferentes a la amplificación para asegurar la secuenciación de todo el gen NS4B y E. Los primers se encuentran especificados en la tabla 4.

Tabla 4. Primers usados para secuenciación de los genes NS4B y E.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Orientación	Tamaño (nt)	Posición en genoma	Tamaño amplicón (pb)
D2NS4B M-F	GCCATTGCTAACCAAGCTACAGTGC	Forward	25	7002-7026	316
D2NS4B M-R	AGTCACGCAKAGGATTAGGAGCA	Reverse	23	7340-7318	
D2E 858-F	GGCATACACCATAGGAACGACAC	Forward	23	859-882	813
D2E 1648-R	GCRTGGGGATTTTTGAAAGTGAC	Reverse	23	1649-1672	
D2E 1411-F	GGCAAGGAAATCAAAATAACACCA	Forward	24	1412-1436	1080
D2E 2470-R	TGCCACATTTCAGTTCTTTAT	Reverse	21	2471-2492	

7.9.5 Tipo de infección.

La información de tipo de infección para este estudio fue obtenida de dos maneras: 1) Datos secundarios; durante la ejecución de las tres cohortes, se determinó el tipo de infección en un grupo de pacientes usando el estuche comercial PanBio® Dengue IgG Capture ELISA. Por ello se tomará la información que se encuentra ya disponible. 2) Datos primarios; en este estudio se realizó la determinación del tipo de infección en otro grupo de pacientes. Se consideró infección primaria como la ausencia de anticuerpos IgG en suero agudo e infección secundaria como la presencia de anticuerpos tipo IgG en suero agudo.

La determinación de anticuerpos tipo IgG se realizó siguiendo el método indicado por el fabricante, así:

El suero/plasma obtenido durante la fase aguda de la enfermedad (entre el primer y quinto día después de iniciados los síntomas) se procesó para la detección de anticuerpos IgG anti-dengue usando el estuche comercial PanBio® Dengue IgG Capture ELISA. Brevemente, cuando los anticuerpos de tipo IgG anti-dengue están presentes en el suero, estos se unen con los anticuerpos anti-IgG humanos con los que está recubierta la superficie de las placas de ensayo. Los antígenos recombinantes para los cuatro serotipos se diluyen y se le agrega un volumen

equivalente de anticuerpos monoclonales conjugados con peroxidasa de rábano, formado así un complejo antígeno-anticuerpo. Este complejo se une a los anticuerpos IgG específicos anti-dengue. Después de la incubación, se añade un sustrato (cromógeno). La peroxidasa de rábano hidroliza el sustrato y si está presente, el cromógeno cambia a color azul. Después de interrumpir la reacción con ácido, el cromógeno cambia a amarillo. El cambio de color indica la presencia de anticuerpos IgG contra dengue.

7.10 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

7.10.1 Diseño de primers.

Los primers que se utilizaron en la PCR convencional para la amplificación de los genes NS4B y E y en la secuenciación de los fragmentos de PCR fueron diseñados por medio de programa PrimerBlast disponible en línea en la plataforma de PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se utilizó como secuencia molde la secuencia de referencia la de la cepa DENV-2 New Guinea C (GenBank: AF038403.1). Para evitar que los polimorfismos de las cepas locales interfirieran con la óptima unión de los primers, se realizó una edición utilizando las secuencias del gen NS4B y gen E de cepas locales colombianas disponibles en PubMed, DENV-2/CO/BID-V1603/2004 (Antioquia, GenBank: FJ024477.1) y DENV-2/CO/BID-BID-V3370/2004 (Santander, GenBank: GQ868554.1).

7.10.2 Edición de secuencias

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos, todas las secuencias del gen NS4B y gen E fueron ensambladas y editadas para su posterior análisis por medio de los módulos Seqman II y Editseq del paquete de software DNASTAR (Lasergene Inc., Madison, Wisconsin). El alineamiento de las secuencias

se realizó por el método CLUSTAL W implementado en el programa MEGAV6.06 (Tamura K et al 2013). Además de las secuencias obtenidas en este estudio, se incluyeron en el alineamiento las siguientes secuencias representativas de cada uno de los genotipos previamente descritos del VDENV-2 (Holmes, E C 2003): (tabla 5).

Tabla 5. Secuencias representativas de los genotipos del VDENV-2

Genotipo	Secuencia
Americano	159_Puerto_Rico_69; AY702040_Colombia_86
Asiático-Americano	1409_Jamaica_83; AF119661_China_85; AB479041_VietNam_02
Asiático 1	16681_Tailandia_64
Asiático 2	NGC_NuevaGuinea_44
Cosmopolita	V2416_SriLanka_96; AB1891122 Indonesia_98; AB1891123 Indonesia_98
Selvático	PM33974_Guinea_81

7.10.3 Análisis filogenético.

Para el análisis filogenético se identificó como mejor modelo de substitución nucleotídica el de Tamura-Nei más gamma (TN93+G), por medio del Criterio de Información Bayesiano (BIC). La reconstrucción filogenética se realizó por medio del método de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*), aplicando el modelo de sustitución mencionado, con categorías discretas de la distribución gamma para modelar la variación entre sitios de la tasa de substitución. El soporte estadístico de las ramas del árbol filogenético se obtuvo aplicando el procedimiento de “*bootstrap*” de 1000 réplicas. Estos análisis se realizaron con el MEGAV6.06.

7.10.4 Determinación de polimorfismos en el gen NS4B y gen E.

Para la determinación de polimorfismos en los genes NS4B y E y en sus correspondientes proteínas, se identificaron en el módulo Sequence Data Explorer de MEGA V6.06. Para los análisis de asociación con el desenlace clínico sólo se consideraron los polimorfismos correspondientes a sitios informativos por parsimonia (Pi) pues los sitios con mutaciones presentes en sólo una secuencia o “singletons” (S) no permiten una asociación estadísticamente significativa.

7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se construyeron bases de datos con variables del individuo (sexo, edad, procedencia, tipo de infección) y del virus (serotipo, genotipo, linaje genético). Se realizó descripción de variables discretas mediante conteos y estimación de proporciones con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC95%). Empleamos la prueba chi-cuadrado y exacta de Fisher para evaluar hipótesis de diferencia entre proporciones, esta última en aquellos casos en los que los conteos predichos de las tablas de contingencia eran menores a 5. Evaluamos la asociación entre variables independientes y dependientes discretas (dicotómicas) mediante la estimación de *odds ratios* (OR) crudos y ajustados, empleando modelos de regresión logística múltiple.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS VIGENTES

El presente proyecto es un estudio retrospectivo de casos y controles anidado a una cohorte, tanto las historias clínicas de los casos como los controles son de los años 2005 al 2010, por tanto, no se tendrá contacto directo con pacientes ni se tomarán muestras adicionales a las que ya se tengan almacenadas. Al tratarse de un estudio de carácter observacional, sin intervención en pacientes, en donde no existe ningún riesgo, este estudio se clasifica en la categoría establecida por la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud como "Investigación sin riesgo".

Para la protección de datos de los pacientes estudiados se utilizarán códigos que serán propios para cada uno. En ningún momento se revelarán datos personales como nombre, número de documento de identidad o fecha de nacimiento. La historia clínica que será revisada de los pacientes, tendrá el mismo trato que determina la ley colombiana para las instituciones de salud, considerando que se trata de un documento privado, obligatorio y sometido a reserva. En ningún momento se sumará información a la historia clínica, ni se anotarán datos del paciente en ella.

Basados en la última actualización (2009) del libro "Principles of biomedical ethics" de Beauchamp y Childress analizamos los 4 principios éticos en lo referente a este estudio:

- Autonomía: Este principio no aplica, ya que es un estudio observacional, sin intervención de pacientes; por ello no se afecta desde ningún punto de vista la dignidad del sujeto.
- Beneficencia: No aplica directamente a los pacientes, debido a que manejaremos solo historias clínicas y muestras ya almacenadas. Pero sí aplica y se cumple este principio ya que hará todo el bien a la población que se encuentra en riesgo de enfermar o morir por dengue, ya que contribuirá con nueva información

que permitirá la toma de decisiones clínicas que aseguren un mejor abordaje del paciente con dengue.

- No maleficencia: Como hemos aclarado anteriormente al no haber ninguna intervención en pacientes, no causa daño a los demás. Se cumple el principio prioritario *primun non nocere* (lo primero es no hacer daño).
- Justicia: Al no involucrar pacientes, el principio de justicia no aplica al refiere a la obligación de igualdad en los tratamientos y, en lo que respecta al estado, a la equitativa distribución de recursos para la sanidad, los hospitales, etc. Pero sí aplica y se cumple al referirse de que uno de los productos esperados será generar conocimiento y herramientas en salud pública.

Este proyecto cuenta con aprobación y autorización del investigador principal de las cohortes a la cual el proyecto estará anidado para el uso de datos y muestras.

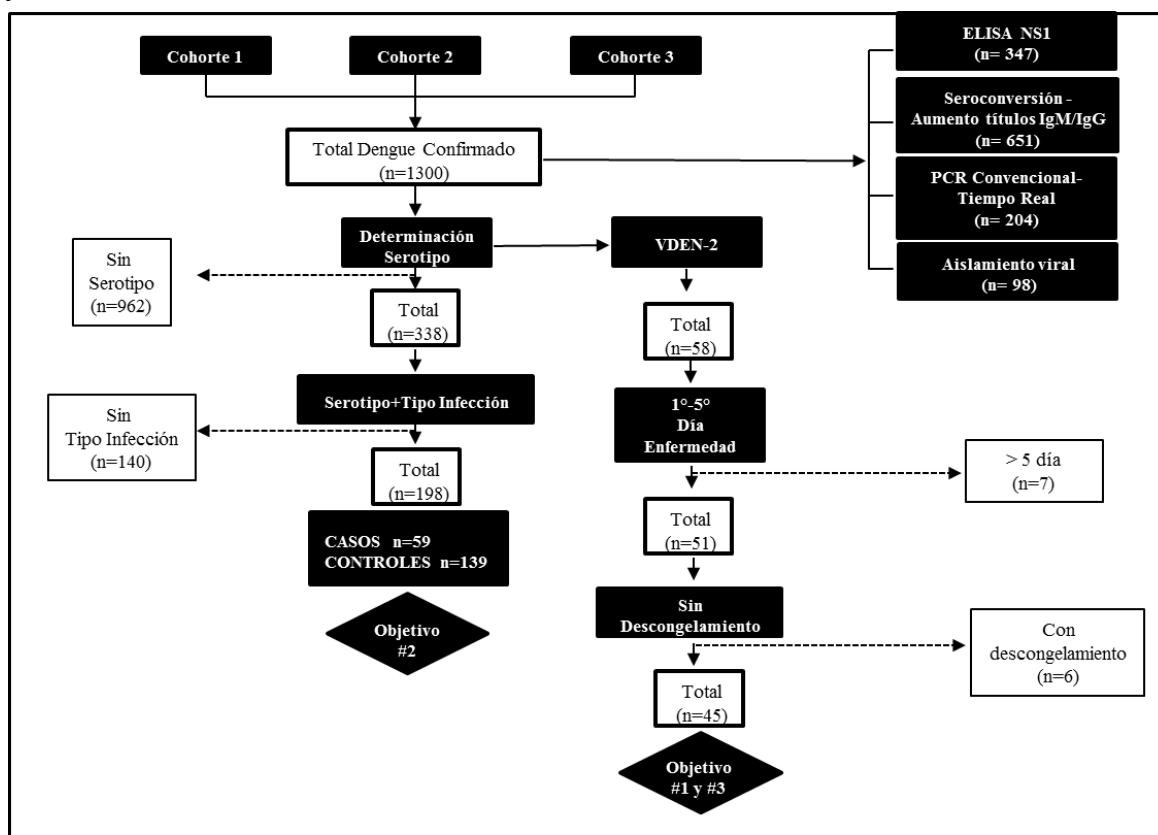
Este estudio cuenta con el aval del comité de ética de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) según acta No. 11 del 08 y 12 de mayo de 2015.

9. RESULTADOS

Las cohortes 1, 2 y 3 en las cuales se anidó este estudio, logró confirmar 1300 infecciones por VDEN; 338 pacientes cuentan con información del serotipo infectante y de estos, 198 cuentan además con información de tipo de infección (primaria vs secundaria). Dentro del total de pacientes con determinación de serotipo, 58 pacientes lo fueron por VDEN-2, pero solo 45 cuentan con muestras entre el primer y quinto día de inicio de síntomas y además no presentaban ciclos de descongelamiento (Figura 1).

Es por esto que para el desarrollo del objetivo específico #2 el tamaño de muestra lo constituye una n=198 (59 casos y 139 controles); para el cumplimiento de los objetivos específicos #1 y 3 la n=45.

Figura 1. Flujograma de selección de pacientes de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión del estudio.



9.1 ASOCIACIÓN ENTRE SEROTIPO Y SEVERIDAD CONSIDERANDO SIMULTÁNEAMENTE EL EFECTO QUE INTRODUCE EL TIPO DE INFECCIÓN.

Se evaluaron 198 pacientes en línea de base como en el seguimiento. La tabla 5 muestra las características de las muestras; entre estas podemos evidenciar que el desenlace compuesto ocurrió en pacientes jóvenes, con mayor número de horas de fiebre y que estaban hospitalizados. En cuanto a la distribución de serotipo se observó una distribución heterogénea, siendo el serotipo VDENV-2 el que pareciera tener una asociación con el grupo de pacientes complicados (OR 6.06; IC95%: 2.10, 17.5). Ahora bien, en este análisis el tipo de infección (primaria vs secundaria) no se asoció con la presencia del desenlace compuesto (OR 1.58; IC95%: 0.83, 3.00) (tabla 6).

Tabla 6.Características de la muestra de acuerdo a la presencia del desenlace compuesto en la línea de base o a su incidencia durante el seguimiento.

Predictor	Desenlace compuesto		Δ/OR (IC95%)
	Ausente (n=139)	Presente (n=59)	
Edad en años; $\bar{x}$ (%)	27.3 (16.0)	18.3 (9.7)	-9.0 (-13.4, -4.5)
Masculino; n (%)	75 (54.0)	28 (47.5)	0.77 (0.42, 1.42)
Horas de fiebre; $\bar{x}$ (%)	69.7 (19.0)	75.0 (24.0)	5.2 (1.1, 11.6)
Hospitalario; n (%)	15 (10.8)	12 (20.3)	2.11 (0.92, 4.84)
Características clínicas; n (%)			
Hemorragia menor	31 (22.3)	25 (42.4)	2.56 (1.33, 4.92)
Hemorragia mayor	0 (0.0)	23 (39.0)	...
Hipotensión			
Criterio 1	0 (0.0)	0 (0.0)	...
Criterio 2	0 (0.0)	26 (44.1)	...
Criterio 3	0 (0.0)	34 (57.6)	...
Serotipo; n (%)			
VDEN-1	40 (28.8)	11 (18.6)	1.00
VDEN-2	9 (6.5)	15 (25.4)	6.06 (2.10, 17.5)
VDEN-3	63 (45.3)	24 (40.7)	1.39 (0.61, 3.13)
VDEN-4	27 (19.4)	9 (15.3)	1.21 (0.44, 3.32)
Infección secundaria; n (%)	40 (28.8)	23 (39.0)	1.58 (0.83, 3.00)

Hemorragia menor: gingivorragia o epistaxis; hemorragia mayor: hematemesis, melenas, hematuria o rectorragia. Hipotensión criterio 1: Taquicardia para la edad y presión de pulso <20 mm Hg; criterio 2: hipotensión por presión arterial media para la edad; criterio 3: hipotensión por presión arterial sistólica para la edad (o hipotensión reportada en la historia clínica).

Para evaluar la potencial asociación entre el serotipo y la severidad de la enfermedad aplicamos un modelo de análisis multivariado, en donde la edad fue incluida como una variable de análisis por ser considerada posible confusora; al

hacerlo, observamos que existe asociación entre el serotipo VDEN-2 y el desenlace compuesto (OR 7.14; IC95%: 2.32, 22.0). Adicionalmente cuando incluimos el efecto que introduce el tipo de infección evidenciamos que el serotipo VDEN-2 sigue manteniendo su asociación con la severidad de la enfermedad (OR 6.21; IC95%: 1.97, 19.6) mientras que el tipo de infección por sí solo no mostró asociación con el desenlace compuesto (OR 1.53; IC95%: 0.72, 3.25). También se analizó la posible interacción del tipo de infección con cada uno de los serotipos y tampoco se evidenció asociación (p: 0.165) (tabla 7).

Tabla 7. Modelo predicción para la presencia del desenlace compuesto en la línea de base o a su incidencia durante el seguimiento.

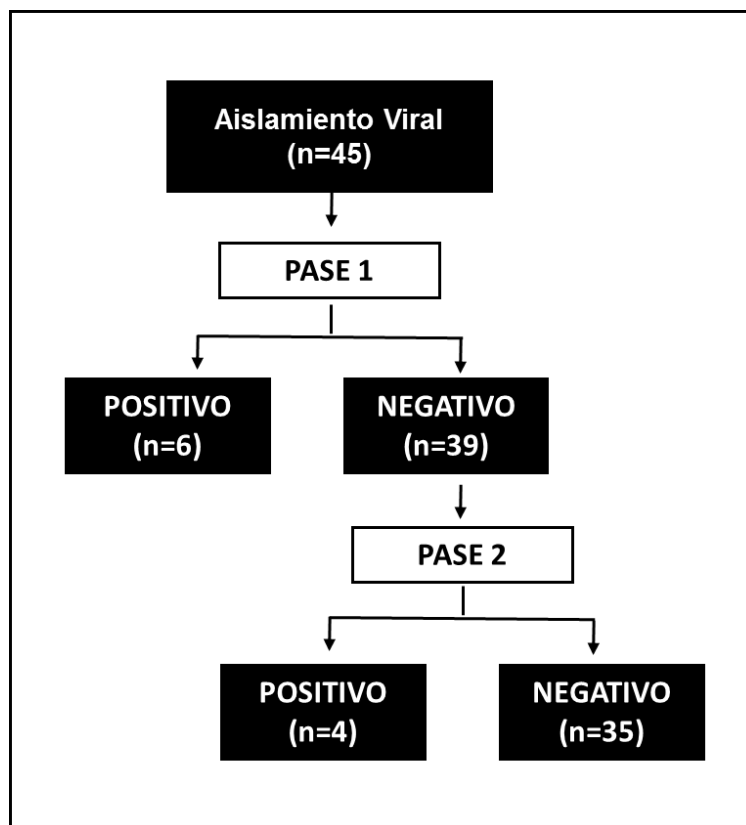
Predictor	Modelo *	
	OR (IC95%)	OR (IC95%)
Edad en años	0.94 (0.92, 0.97)	0.94 (0.91, 0.97)
Serotipo		
VDEN-1	1.00	1.00
VDEN-2	7.14 (2.32, 22.0)	6.21 (1.97, 19.6)
VDEN-3	1.60 (0.69, 3.74)	1.67 (0.71, 3.93)
VDEN-4	1.26 (0.44, 3.59)	1.27 (0.45, 3.60)
Infección secundaria	...	1.53 (0.72, 3.25)

* Incluyendo paciente a quienes se evaluó el tipo de infección (n=198). No hallamos evidencia de interacción serotipo-tipo de infección (p=0.165). Datos dados en conteos y porcentajes.

9.2 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO GENÓMICO.

Se partió de 45 muestras de suero/plasma cuyo serotipo infectante correspondió a VDEN-2, entre el primer y quinto día de enfermedad y que además no presentara ciclos de descongelamiento. Estas muestras fueron llevadas a intentos de aislamiento viral, con pases 1(P1) y pases 2 (P2-Pase Ciego) y los resultados se ilustran en la figura 2.

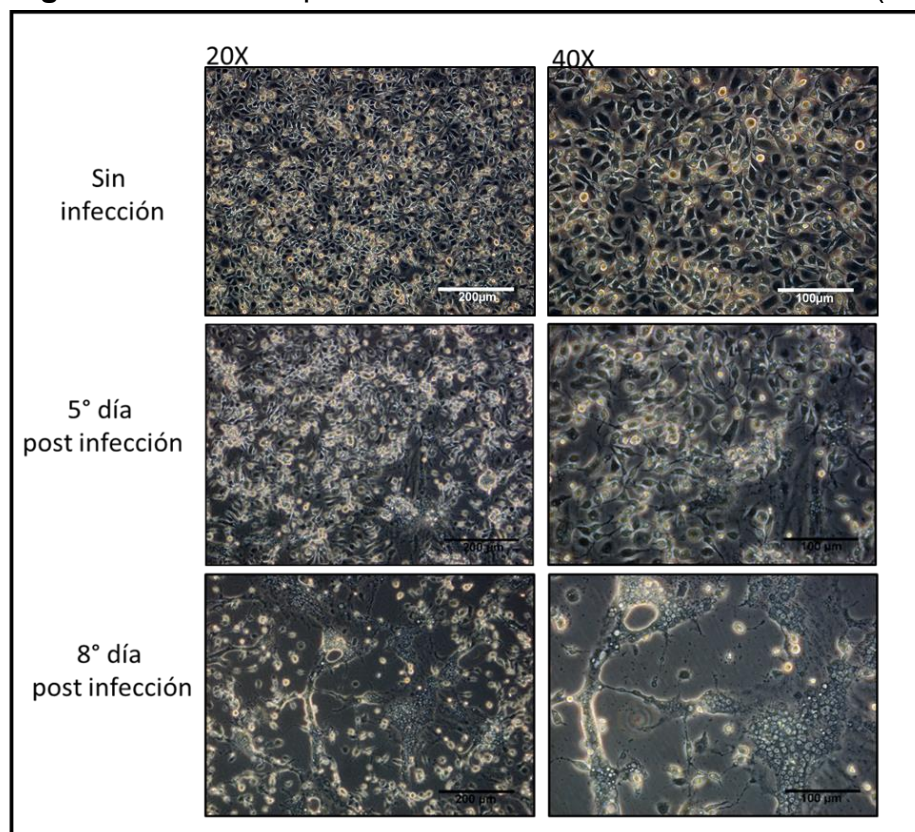
Figura 2. Flujograma resultados de aislamiento viral.



La cantidad total de aislados virales fue de 10. En P1 fueron positivos 6 aislamientos y en P2 fueron positivos los mismos 6 aislados más 4 nuevos aislados, para un total de 10 aislados.

Los aislamientos virales positivos se caracterizaron por iniciar con la formación de efecto citopático evidente, aproximadamente al quinto día post infección en el caso de los P1 y al tercer día post infección en el caso de los P2; las fotografías obtenidas de estos efectos son mostrados en la figura 3.

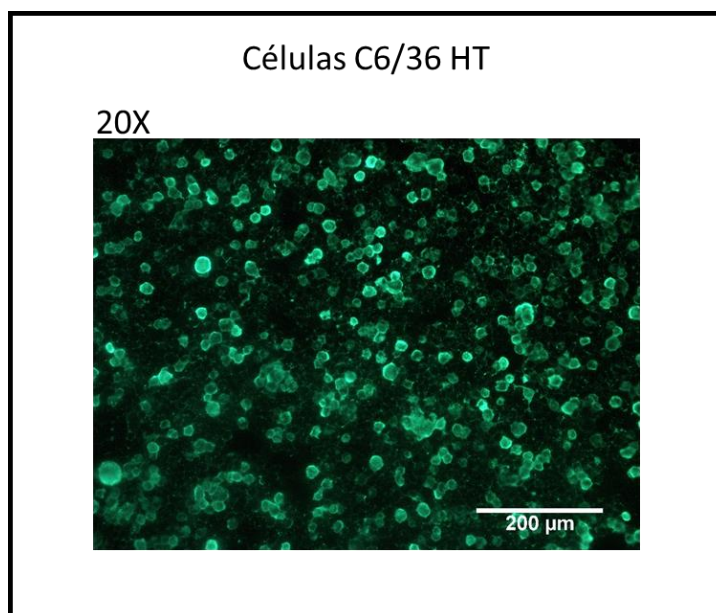
Figura 3. Efecto citopático del VDEN-2 en células C6/36 HT (P1).



Efecto citopático de VDEN-2 en línea celular C6/36 HT, para este caso pase inicial (P1). En la primera fila se evidencia en objetivo de 20X y 40X los controles negativos; es decir línea celular sin infección. En la segunda fila se ubican células después de cinco días de infección; se evidencia el inicio de efecto citopático. En la tercera fila, células después de ocho días de infección, donde el efecto citopático es evidente. **Fuente:** Fotografías originales.

Después del cultivo celular se realizó inmunofluorescencia indirecta (IFI) a todos los intentos de aislamiento; tanto a los positivos como a los que presentaron duda de hacer efecto citopático. Un ejemplo de resultado positivo de inmunofluorescencia es mostrado en la figura 4.

Figura 4. Inmunofluorescencia indirecta positiva.



Resultado de inmunofluorescencia indirecta positiva en objetivo 20X. **Fuente:** Fotografía original.

Los 10 aislados virales fueron llevados a extracción de RNA, con la posterior obtención de cDNA y amplificación de los genes NS4B y E. A los sueros/plasmas negativos para aislamiento viral se les procedió a realizar extracción de RNA directamente de esta muestra. Una vez obtenido el RNA se realizaron copias de cDNA y posteriormente PCR. Como resultado de este proceso, se pudieron obtener 4 amplificados de gen NS4B y gen E obtenidos directamente de suero/plasma (figura 5); estos amplificados fueron evidentes en el resultado de electroforesis (figura 6).

Figura 5.Flujograma amplificación genómica directamente suero/plasma.

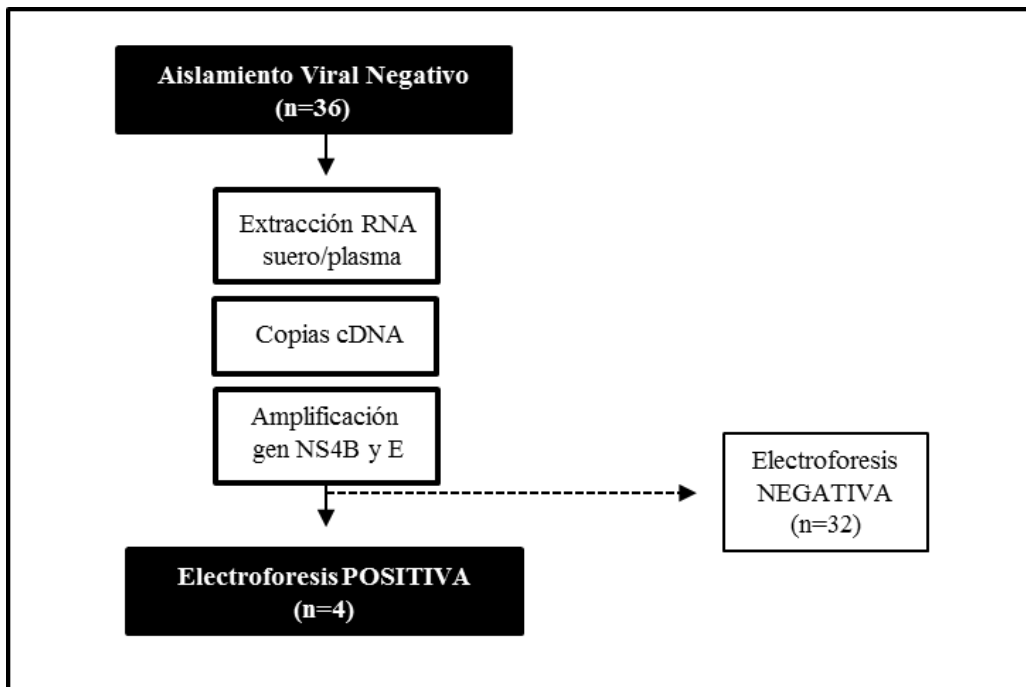
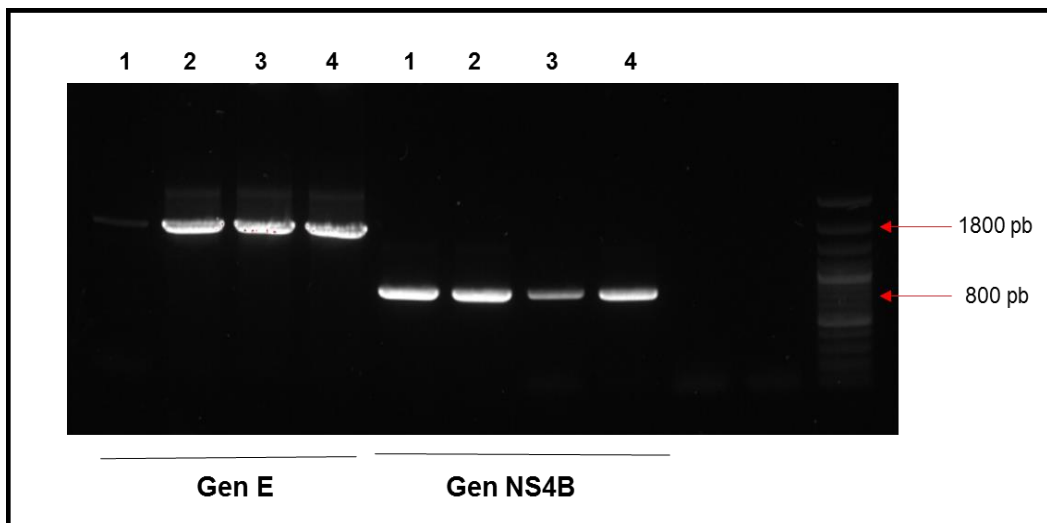


Figura 6. Amplificación gen E y NS4B directamente suero/plasma.



Amplificación directamente de las muestras 1) 311071, 2) 311057, 3) 311082, 4) 511. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7%. Las flechas señalan las bandas de amplificación de los productos esperados, que corresponden para el gen E 1800 pb y para el gen NS4B 800 pb

Debido al número relativamente bajo (14) de secuencias genómicas obtenidas en este trabajo, se decidió aumentar el número de las mismas, incorporando 40 secuencias obtenidas en un trabajo previo del Grupo de Inmunovirología (IMV) de la Universidad de Antioquia (UdeA) (Castillo & Díaz 2009) (tabla 8). Estas secuencias corresponden a aislados de VDENV-2 donados al grupo de IMV; fueron obtenidas en los laboratorios del grupo CINTROP de la UIS (aislados de los departamentos de Santander y Norte de Santander), del Laboratorio Departamental de Salud Pública de Antioquia, LDSP, (aislados de Antioquia, Córdoba) y del grupo IMV (aislado de un paciente procedente de Haití de 2010). Muchas de estas 40 secuencias adicionales se encuentran publicadas en GenBank. Estos pacientes cuentan con criterios de clasificación del desenlace clínico según criterios OMS 1997.

Tabla 8. Secuencias analizadas en este estudio.

ID	Secuenciamiento Gen	Desenlace clínico	Procedencia	Año	Fuente***
353	NS4B-E	Leve**	Santander	2004	IMV
511	NS4B-E	Leve**	Santander	2005	
604	NS4B-E	Grave**	Santander	2006	
1227	NS4B-E	Grave**	Santander	2007	
1327	NS4B-E	Grave**	Santander	2007	
1404	NS4B-E	Leve**	Santander	2007	
111137	NS4B-E	Grave**	Santander	2010	
121154	NS4B-E	Grave**	Santander	2010	
141242	NS4B-E	Grave**	Santander	2010	
311028	NS4B-E	Grave**	Valle del Cauca	2010	
311038	NS4B-E	Grave**	Valle del Cauca	2010	
311057	NS4B-E	Leve**	Valle del Cauca	2010	
311071	NS4B-E	Leve**	Valle del Cauca	2010	
311082	NS4B-E	Grave**	Valle del Cauca	2010	
AQ	NS4B-E	DHF*	Haití	2010	LDSP
14	NS4B-E	DHF*	Antioquia	2000	
302	E		Antioquia	1997	
469	E		Antioquia	1995	
477	E		Antioquia	1997	
583	E		Antioquia	1997	
768	E		Antioquia	1996	
781	E		Antioquia	1994	
2022	NS4B	DF*	Antioquia	1998	
3273	E		Antioquia	1998	
3986	E		Antioquia	2007	
6075	E		Antioquia	2006	
8496	NS4B-E	DF*	Antioquia	2007	
13072	NS4B-E	DHF*	Antioquia	2000	
13074	NS4B	DHF*	Antioquia	2000	
13517	NS4B-E	DHF*	Antioquia	2000	
13564	NS4B-E	DHF*	Antioquia	2000	
14025	E		Antioquia	2002	
16173	NS4B-E	DF*	Antioquia	2002	
17942	E		Antioquia	2002	
18975	E		Antioquia	2001	
HEL	NS4B-E	Grave**	Antioquia	2000	
634	E		Córdoba	1995	
15	NS4B-E	DF*	Norte de Santander	2005	CINTROP
51	NS4B-E	DF*	Norte de Santander	2005	
53	NS4B-E	DF*	Norte de Santander	2005	
58	NS4B	DF*	Norte de Santander	2005	
95	NS4B-E	DHF*	Norte de Santander	2005	
106	NS4B	DF*	Norte de Santander	2005	
109	NS4B-E	DF*	Norte de Santander	2005	
154	NS4B	DF*	Norte de Santander	2005	
200	NS4B-E	DHF*	Norte de Santander	2005	
210	NS4B-E	DF*	Norte de Santander	2005	
5	NS4B-E	DF*	Santander	1999	
80	NS4B-E	DF*	Santander	2004	
107	NS4B-E	DHF*	Santander	2001	
163	NS4B	DHF*	Santander	2000	
218	NS4B-E	DF*	Santander	1998	
253	NS4B-E	DF*	Santander	2007	
338	NS4B-E	DHF*	Santander	2007	

* Clasificación OMS 1997.

**Clasificación Cohorte AEDES.

***Fuente: Laboratorio donde fue obtenido el aislado.

9.3 IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS CIRCULANTES DE VDEN-2.

Los análisis filogenéticos por el método de *Maximum Likelihood* de las secuencias del gen E, permitieron clasificarlas dentro de los genotipos para VDEN-2 previamente descritos (Holmes, E C 2003). En la figura 7 se presenta el árbol filogenético obtenido. Las 14 secuencias genómicas obtenidas en este estudio y las 40 secuencias previamente obtenidas en el grupo de IMV aparecen dentro del genotipo asiático-americano. Dentro de este genotipo se pueden distinguir 3 grupos de secuencias: el linaje 1 es un grupo monofilético con soporte de 86% que contiene tres secuencias de Antioquia y Santander (1994-1998). El linaje 2 también es monofilético (soporte 100%) y contiene 20 secuencias de Santander, Norte de Santander y Antioquia de aislados obtenidos entre los años 2004 y 2010. El tercer grupo es parafilético e incluye 26 secuencias de Antioquia (1996-2007), Santander (1999-2001), Valle del Cauca (2010), Córdoba (1995), así como dos secuencias de las Antillas (Cuba 1997 y Haití 2010). Las secuencias genómicas obtenidas en este estudio serán enviadas a *GenBank* para su publicación.

Phylogenetic tree of the B1 gene region of Dengue virus serotype 1 (DENV-1) isolates. The tree is rooted at the bottom left and branches upwards. Bootstrap values are indicated at the nodes. The tree is divided into three main lineages: Linaje 1 (bottom), Linaje 2 (middle), and Linaje 3 (top). Linaje 1 includes isolates from Colombia (AY702040), Peru (PM23674), and various Asian and American isolates. Linaje 2 includes isolates from Colombia (AY702040), Peru (PM23674), and various Asian and American isolates. Linaje 3 includes isolates from Colombia (AY702040), Peru (PM23674), and various Asian and American isolates. The tree shows a clear separation between the three lineages, with Linaje 1 being the most distinct and Linaje 2 and Linaje 3 showing more internal variation.

0.03

9.4 VARIACIÓN DEL GEN NS4B ENTRE CEPAS DE VDEN-2 Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESENLACE CLÍNICO.

61

Tabla 9. Polimorfismos identificados en el gen NS4B con 2 o más secuencias exhibiendo cada alelo.

Mutación	Posición Genoma	Tipo de Substitución	Tipo Mutación	Cambio Aminoácido	Frecuencia Absoluta	Frecuencia %
C→T	6828	Transición	Silenciosa	N1N	2	5
T→C	6868	Transición	Silenciosa	L14L	3	7
T→C	6879	Transición	Silenciosa	I18I	16	39
A→G	6880	Transición	No sinónima	T18A	2	5
C→T	6892	Transición	No sinónima	P22S	38	93
G→A	6909	Transición	Silenciosa	L28L	21	51
C→T	6919	Transición	Silenciosa	L31L	2	5
T→C	6924	Transición	Silenciosa	R33R	38	93
T→C	6957	Transición	Silenciosa	A44A	5	12
C→T	6969	Transición	Silenciosa	V48V	3	7
T→C	7011	Transición	Silenciosa	N62N	2	5
C→T	7041	Transición	Silenciosa	A72A	39	95
C→T	7048	Transición	Silenciosa	L74L	1	2
A→G	7074	Transición	Silenciosa	P83P	3	7
T→C	7107	Transición	Silenciosa	L94L	3	7
T→C	7113	Transición	Silenciosa	I96I	6	15
C→T	7137	Transición	Silenciosa	P104P	37	90
C→T	7143	Transición	Silenciosa	T106T	34	83
C→T	7185	Transición	Silenciosa	I120I	38	93
G→C	7191	Transversión	Silenciosa	G122G	13	32
C→T	7200	Transición	Silenciosa	L125L	18	44
T→A	7224	Transversión	Silenciosa	A133A	6	15
G→A	7314	Transición	Silenciosa	K163K	38	93
A→G	7329	Transición	Silenciosa	L168L	2	5
A→C	7353	Transversión	Silenciosa	L176L	17	41
T→C	7362	Transición	Silenciosa	T179T	4	10
C→T	7383	Transición	Silenciosa	T186T	38	93
C→T	7393	Transición	Silenciosa	L189L	39	95
C→T	7398	Transición	Silenciosa	C191C	33	80
C→T	7405	Transición	Silenciosa	L193L	4	10
T→C	7411	Transición	Silenciosa	L195L	19	46
C→T	7435	Transición	Silenciosa	L203L	3	7
A→G	7452	Transición	Silenciosa	P209P	2	5
T→C	7470	Transición	Silenciosa	T215T	3	7
T→C	7476	Transición	Silenciosa	I217I	12	29
T→C	7491	Transición	Silenciosa	A222A	6	15

Tabla 9. Continúa.

Mutación	Posición Genoma	Tipo de Substitución	Tipo Mutación	Cambio Aminoácido	Frecuencia Absoluta	Frecuencia %
G→A	7503	Transición	Silenciosa	R226R	1	2
G→A	7515	Transición	Silenciosa	L230L	2	5
G→A	7548	Transición	Silenciosa	K241K	37	90

a: T: Timina, C: Citosina, A: Adenina, G: Guanina

b: T: Treonina, A: Alanina, Q: Glutamina, P: Prolina, S: Serin, F: Fenilalanina, E: Ácido Glutámico, D: Ácido Aspártico, V: Valina, I: Isoleucina, N: Asparagina, R: Arginina, G: Glicina, K: Lisina, C: Cisteína, H: Histidina.

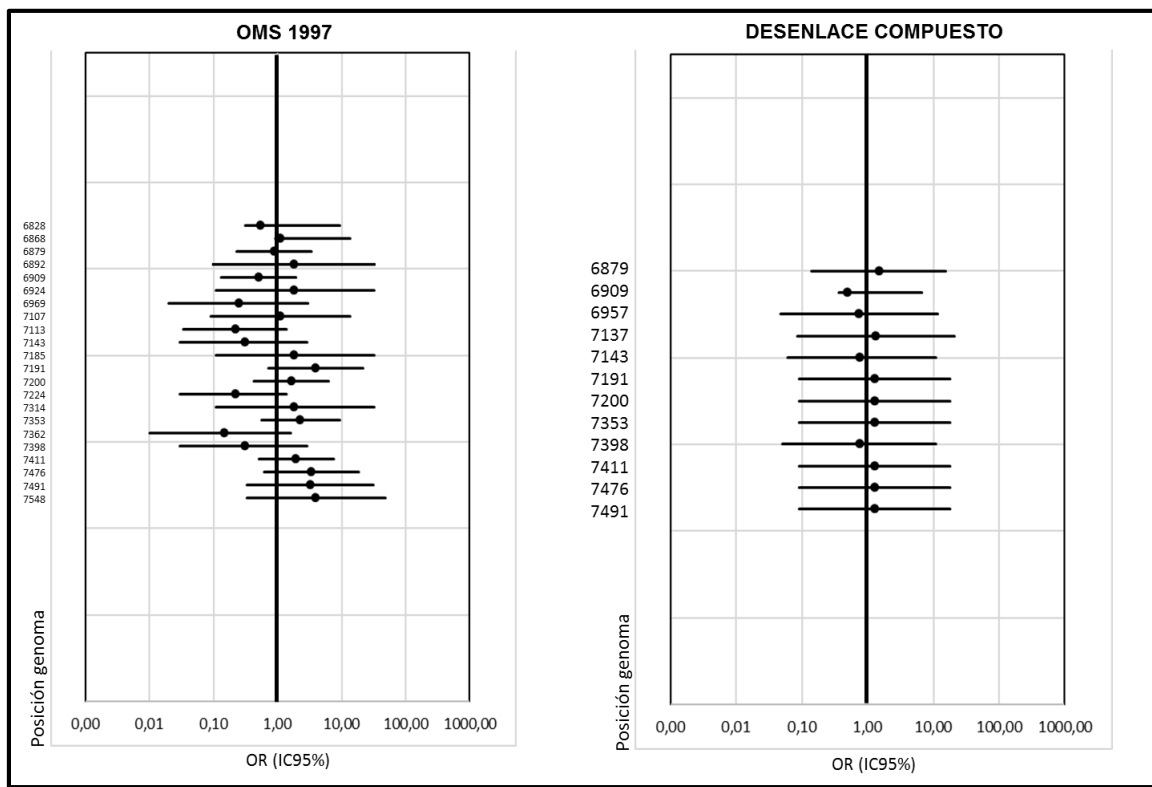
Una vez identificados los polimorfismos se procedió a evaluar la posible asociación entre la presencia de estos polimorfismos y el desenlace clínico. Para esto se manejaron 2 grupos según los criterios de clasificación del desenlace clínico: 1) OMS-1997, debido a que la información suministrada por el grupo de IMV ya contaba con esta clasificación, se decidió unificar esta información. Para esto se reclasificó el desenlace AEDES por OMS-1997, haciendo que las secuencias IMV y las generadas en este estudio tuvieran el mismo criterio de clasificación del desenlace clínico. 2) AEDES, se mantuvo la clasificación “hipohemo” en el grupo de secuencias generadas en este estudio. Para el caso de las secuencias del grupo IMV no pudimos realizar la reclasificación a AEDES, debido a que solo contamos con el criterio final de clasificación más no con datos basales y de seguimiento que nos permitieran realizar esta unificación. En resumen, para el análisis de polimorfismo vs desenlace clínico por criterios OMS-1997 se incluyeron 39/39 polimorfismos; para el análisis de polimorfismo vs desenlace clínico por criterios de las cohortes AEDES se incluyeron 31/38 polimorfismos. El resultado de este análisis mostró que, al evaluar los polimorfismos, ninguno se relacionó con el desenlace clínico de la enfermedad (tabla 10). Estos resultados son mostrados también en un diagrama de bosque (forest plot, en inglés), con el objeto de visualizar de una manera más clara las asociaciones y no asociaciones (figura 8).

Tabla 10. Análisis estadístico de asociación de los polimorfismos del gen NS4B con el desenlace clínico.

Polimorfismo	Posición Genoma	OMS 1997			Desenlace compuesto		
		Fisher (<i>p</i>)	OR	IC 95% OR	Fisher (<i>p</i>)	OR	IC 95% OR
C----T	6828	1	0,54	0,31-9,39	1	*	*
T----C	6868	1	1,13	0,93-13,7	1	*	*
T----C	6879	1	0,89	0,23-3,35	1	1,5	0,14-15,46
A----G	6880	0,53	*	*		*	
C----T	6892	1	1,84	0,10-32,0	1	*	*
G----A	6909	0,5	0,512	0,13-1,97	1	0,5	0,37-6,68
C----T	6919	0,12	*	*		*	
T----C	6924	1	1,84	0,11-32		*	
T----C	6957	0,28	*	*	1	0,75	0,048-11,6
C----T	6969	0,29	0,25	0,02-3,04	1	*	*
T----C	7011	0,53	*	*	1	*	*
C----T	7041	1	*	*	1	*	*
C----T	7048	1	*	*	0,28	*	*
A----G	7074	0,04	*	*		*	
T----C	7107	1	1,13	0,09-13,7	1	*	*
T----C	7113	0,163	0,22	0,034-1,39	1	*	*
C----T	7137	0,54	*	*	1	1,33	0,085-20,7
C----T	7143	0,39	0,31	0,03-2,94	1	0,77	0,06-10,9
C----T	7185	1	1,85	0,11-32,0	0,27	*	*
G----C	7191	0,151	4	0,73-21,8	1	1,28	0,09-17,9
C----T	7200	0,52	1,66	0,43-6,38	1	1,28	0,09-17,9
T----A	7224	0,16	0,22	0,03-1,39	1	*	*
G----A	7314	1	1,85	0,11-32,0	1	*	*
A----G	7329	0,52	*	*	1	*	*
A----C	7353	0,32	2,3	0,57-9,36	1	1,29	0,09-17,9
T----C	7362	0,12	0,15	0,01-1,63		*	
C----T	7383	0,53	*	*	1	*	*
C----T	7393	0,36	*	*		*	
C----T	7398	0,39	0,31	0,03-2,90	1	0,78	0,05-10,9
C----T	7405	0,28	*	*	0,25	*	*
T----C	7411	0,5	1,95	0,51-7,49	1	1,28	0,09-17,9
C----T	7435	0,04	*	*		*	
A----G	7452	0,53	*	*	1	*	*
T----C	7470	0,53	*	*		*	
T----C	7476	0,27	3,37	0,61-18,6	1	1,28	0,09-17,9
T----C	7491	0,39	3,25	0,33-31,1	1	1,28	0,09-17,9
G----A	7503	0,36	*	*		*	
G----A	7515	0,12	*	*		*	
G----A	7548	0,29	4	0,33-48,6		*	

*La ausencia de estimados se debe a colinealidad.

Figura 8. Asociación de los polimorfismos del gen ns4b y el desenlace clínico.



Se propuso también evaluar la asociación del polimorfismo según la procedencia del virus. Aquí encontramos que existe asociación con algunos polimorfismos y la procedencia. Para el caso del polimorfismo de la posición genómica 7143, existe más probabilidad de presentar el alelo mutado si el virus aislado proviene del departamento de Antioquia comparado con el departamento de Santander (OR 32, IC95% 1.56-656.00; p : 0.000); para el caso de los polimorfismos en las posiciones 7191, 7353 y 7476, existe mayor probabilidad de presentar la mutación si el lugar de procedencia es Antioquia (OR 24.5 IC95% 2.83-212.40; OR 24 IC95% 2.25-255.94; OR 14 IC95% 1.84-106.46, respectivamente. p =0.000) y Valle (OR 28 IC95% 1.99-394.40; OR 12 IC95% 1.02-141.30; OR 28 IC95% 1.99-394.40, respectivamente. p =0.000) comparado con Santander. También para el caso del polimorfismo de la posición 7200, la probabilidad aumenta cuando el lugar del origen es Valle del Cauca comparado con Santander (OR 12 IC95% 1.02-

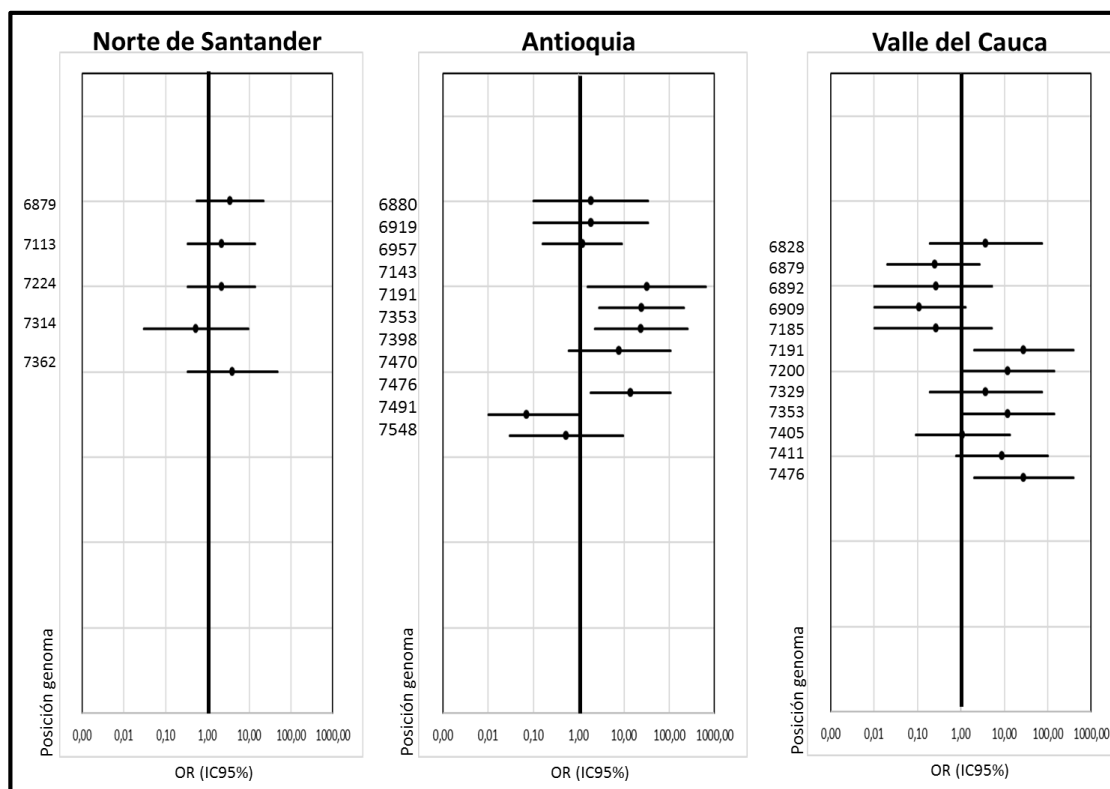
141.30; $p=0,000$) (tabla 11). Estos resultados son mostrados también en un diagrama de bosque (forest plot, en inglés), con el objeto de visualizar de una manera más clara las asociaciones y no asociaciones (figura 9).

Tabla 11. Análisis estadístico de la asociación de los polimorfismos del gen NS4B según la procedencia.

Polimorfismo	Santander		Norte de Santander		Antioquia		Valle del Cauca	
	%	OR(IC95%)	%	OR(IC95%)	%	OR(IC95%)	%	OR(IC95%)
6828_CT	6,25	1	0	---	0	---	20	3,75 (0,19-74,1)
6868_TC	18,75	1	0	---	0	---	0	---
6879_TC	50	1	77,78	3,5 (0,55-22,3)	0	---	20	0,25 (0,02-2,7)
6880_AG	6,25	1	0	---	11,1	1,87 (0,10-34,1)	0	---
6892_CT	93,75	1	100	---	100	---	80	0,27 (0,01-5,27)
6909_GA	68,75	1	100	---	0	---	20	0,11 (0,01-1,29)
6919_CT	6,25	1	0	---	11,1	1,87 (0,10-34,1)	0	---
6924_TC	93,75	1	100	---	100	---	100	---
6957_TC	18,75	1	0	---	22,22	1,24 (0,16-9,25)	0	---
6969_CT	18,75	1	0	---	0	---	0	---
7011_TC	70,11	1	12,5	---	0	---	0	---
7041_CT	100	1	100	---	100	---	80	*
7048_CT	6,25	1	0	---	0	---	0	---
7074_AG	0	1	33,33	*	0	---	0	---
7107_TC	18,75	1	0	---	0	---	0	---
7113_TC	18,75	1	33,33	2,17 (0,33-14,06)	0	---	0	---
7137_CT	81,25	1	100	---	100	---	100	---
7143_CT	100	1	100	---	88,89	32 (1,56-656,0)	20	*
7185_CT	93,75	1	100	---	100	---	80	0,27 (0,01-5,27)
7191_GC	12,5	1	0	---	77,78	24,5 (2,83-212,,4)	80	28 (1,99-394,4)
7200_CT	25	1	0	---	100	---	80	12 (1,02-141,3)
7224_TA	18,75	1	33,33	2,17 (0,33-14,1)	0	---	0	---
7314_GA	93,75	1	88,89	0,53 (0,03-9,71)	100	---	100	---
7329_AG	6,25	1	0	---	0	---	20	3,75 (0,19-74,06)
7353_AC	25	1	0	---	88,89	24 (2,25-255,94)	80	12 (1,02-141,3)
7362_TC	0	1	33	4 (0,33-48,65)	11	*	0	---
7383_CT	87,5	1	100	---	100	---	100	---
7393_CT	93,75	1	100	---	100	---	100	---
7398_CT	100	1	100	---	66,67	7,8 (0,60-106,93)	20	---
7405_CT	18,75	1	0	---	0	---	20	1,08 (0,09-13,54)
7411_TC	31,25	1	0	---	100	---	80	8,8 (0,77-100,25)
7435_CT	0	1	33	*	0	---	0	---
7452_AG	12,5	1	0	---	0	---	0	---
7470_TC	6,25	1	0	---	11,11	1,87 (0,10-34,13)	0	---
7476_TC	12,5	1	0	---	66,67	14 (1,84-106,46)	80	28 (1,99-394,40)
7491_TC	0	1	0	---	22,22	0,07 (0,01-1,06)	80	*
7503_GA	0	1	0	---	11,11	*	0	---
7515_GA	0	1	22,22	*	0	---	0	---
7548_GA	93,75	1	100	---	88,89	0,53 (0,03-9,71)	100	---

*La ausencia de estimados se debe a colinealidad.

Figura 9. Asociación de los polimorfismos del gen ns4b y la procedencia.



9.5 VARIACIÓN DEL GEN E ENTRE CEPAS DE VDENV-2 Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESENLACE CLÍNICO.

Dado que la proteína E determina características biológicas importantes como el tropismo viral, y a que es el blanco de anticuerpos tanto neutralizantes como inmunopotenciadores, se decidió explorar la presencia de polimorfismos en el gen y su asociación con el desenlace clínico.

Se obtuvieron 91 polimorfismos en el gen E; estos polimorfismos se evaluaron ya que 2 o más secuencias presentaron cada uno de los alelos del polimorfismo o porque presentaron cambios a nivel de aminoácido; de estos, 10/91

presentaron cambios no sinónimos y 81/91 presentaron mutaciones silenciosas (tabla 12).

Tabla 12. Polimorfismos identificados en el gen E con 2 o más secuencias exhibiendo cada alelo.

Mutación	Posición Genoma	Tipo de Substitución	Tipo Mutación	Cambio Aminoácido	Frecuencia Absoluta	Frecuencia %
C→T	942	Transición	Silenciosa	R2R	5	10
G→A	972	Transición	Silenciosa	V12V	28	58
A→G	990	Transición	Silenciosa	G18G	8	17
C→T	1002	Transición	Silenciosa	D22D	19	40
C→T	1008	Transición	Silenciosa	V24V	2	4
T→C	1009	Transición	Silenciosa	L25L	2	4
G→A	1041	Transición	Silenciosa	A35A	30	63
C→T	1047	Transición	Silenciosa	N37N	3	6
T→C	1095	Transición	Silenciosa	P53P	3	6
A→G	1104	Transición	Silenciosa	L56L	3	6
C→T	1137	Transición	Silenciosa	N67N	3	6
G→A	1143	Transición	Silenciosa	T69T	28	58
G→T	1152	Transversión	Silenciosa	S72S	3	6
C→T	1158	Transición	Silenciosa	C74C	2	4
C→T	1185	Transición	Silenciosa	N83N	28	58
A→G	1242	Transición	Silenciosa	G102G	6	13
T→C	1260	Transición	Silenciosa	F108F	2	4
G→A	1266	Transición	Silenciosa	K110K	5	10
G→A	1278	Transición	Silenciosa	V114V	2	4
A→T	1328	Transversión	No sinónima	Q131L	3	6
T→C	1339	Transición	Silenciosa	L134L	3	6
G→A	1389	Transición	Silenciosa	V151V	28	58
G→T	1392	Transversión	Silenciosa	G152G	47	98
G→A	1407	Transición	Silenciosa	K157K	25	52
C→T	1410	Transición	Silenciosa	H158H	28	58
T→C	1443	Transición	Silenciosa	S169S	45	94
T→C	1445	Transición	No sinónima	I170T	10	21
C→T	1479	Transición	Silenciosa	V181V	14	29
C→T	1509	Transición	Silenciosa	L191L	12	25
C→G	1545	Transversión	No sinónima	D203E	3	6
A→G	1548	Transición	Silenciosa	K204K	3	6

Tabla 12. Continúa.

Mutación	Posición Genoma	Tipo de Substitución	Tipo Mutación	Cambio Aminoácido	Frecuencia Absoluta	Frecuencia %
T→C	1563	Transición	Silenciosa	H209H	40	83
C→T	1576	Transición	Silenciosa	L213L	2	4
A→G	1587	Transición	Silenciosa	P217P	32	67
A→G	1590	Transición	Silenciosa	L218L	7	15
A→G	1599	Transición	Silenciosa	L221L	2	4
T→C	1602	Transición	Silenciosa	P222P	27	56
G→T	1608	Transversión	Silenciosa	A224A	6	13
A→G	1614	Transición	Silenciosa	T226T	3	6
C→G	1645	Transversión	Silenciosa	L236L	45	94
C→T	1683	Transición	Silenciosa	D249D	46	96
C→T	1692	Transición	Silenciosa	V252V	26	54
G→A	1698	Transición	Silenciosa	G254G	3	6
A→G	1794	Transición	Silenciosa	R286R	34	71
C→T	1806	Transición	Silenciosa	D290D	3	6
C→T	1842	Transición	Silenciosa	C302C	43	90
G→A	1851	Transición	Silenciosa	K305K	2	4
A→G	1866	Transición	Silenciosa	K310K	26	54
A→G	1878	Transición	Silenciosa	E314E	2	4
T→C	1887	Transición	Silenciosa	H317H	3	6
C→T	1899	Transición	Silenciosa	V321V	44	92
G→A	1906	Transición	No sinónima	V323I	3	6
C→T	1926	Transición	Silenciosa	G330G	45	94
C→A	1941	Transversión	Silenciosa	I335I	2	4
G→A	1956	Transición	No sinónima	T340M	45	94
C→T	1959	Transición	Silenciosa	D341D	28	58
T→C	1974	Transición	Silenciosa	H346H	45	94
C→A	1977	Transversión	Silenciosa	V347V	2	4
T→C	1983	Transición	Silenciosa	G349G	45	94
C→T	1992	Transición	Silenciosa	I352I	28	58
C→T	1998	Transición	Silenciosa	V354V	44	92
C→T	2012	Transición	No sinónima	I359T	14	29
A→G	2015	Transición	No sinónima	E360G	2	4
C→T	2022	Transición	Silenciosa	D362D	46	96
A→G	2058	Transición	Silenciosa	G374G	13	27
T→C	2070	Transición	Silenciosa	I378I	45	94
C→T	2073	Transición	Silenciosa	I379I	2	4
G→A	2080	Transición	No sinónima	V381I	3	6
A→C	2088	Transversión	Silenciosa	P384P	41	85

Tabla 12. Continúa.

Mutación	Posición Genoma	Tipo de Substitución	Tipo Mutación	Cambio Aminoácido	Frecuencia Absoluta	Frecuencia %
C→T	2095	Transición	Silenciosa	L386L	41	85
A→G	2115	Transición	Silenciosa	K393K	46	96
A→G	2118	Transición	Silenciosa	K394K	36	75
C→T	2133	Transición	Silenciosa	G399G	2	4
T→C	2142	Transición	Silenciosa	F402F	41	85
A→G	2160	Transición	Silenciosa	G408G	3	6
A→G	2163	Transición	Silenciosa	A409A	3	6
G→A	2166	Transición	Silenciosa	K410K	2	4
C→T	2175	Transición	Silenciosa	A413A	17	35
C→T	2199	Transición	Silenciosa	D421D	46	96
T→C	2202	Transición	Silenciosa	F422F	2	4
C→T	2223	Transición	Silenciosa	F429F	28	58
T→C	2229	Transición	Silenciosa	S431S	8	17
G→A	2238	Transición	Silenciosa	K434K	2	4
T→C	2256	Transición	Silenciosa	F440F	46	96
T→C	2268	Transición	Silenciosa	Y444Y	6	13
T→C	2298	Transición	Silenciosa	T454T	3	6
G→A	2320	Transición	No sinónima	V461I	28	58
G→A	2370	Transición	Silenciosa	S478S	3	6
T→C	2377	Transición	Silenciosa	L480L	19	40
A→G	2397	Transición	Silenciosa	L487L	42	88
T→C	2408	Transición	No sinónima	A491V	47	98

a: T: Timina, C: Citosina, A: Adenina, G: Guanina

b: T: Treonina, A: Alanina, Q: Glutamina, P: Prolina, S: Serin, F: Fenilalanina, E: Ácido Glutámico, D: Ácido Aspártico, V: Valina, I: Isoleucina, N: Asparagina, R: Arginina, G: Glicina, K: Lisina, C: Cisteína, H: Histidina.

Al igual que para el análisis del gen NS4B, se evaluó la asociación entre estos polimorfismos del gen E y el desenlace clínico de la enfermedad (tabla 12); y la procedencia (tabla 13). Estos resultados son mostrados también en un diagrama de bosque (forest plot, en inglés), con el objeto de visualizar de una manera más clara las asociaciones y no asociaciones (figura 10 y 11).

Tabla 13. Polimorfismos en el gen E con 2 o más secuencias exhibiendo cada alelo.

Polimorfismo	Posición Genoma	OMS 1997			Desenlace compuesto		
		Fisher (<i>p</i>)	OR	IC 95% OR	Fisher (<i>p</i>)	OR	IC 95% OR
C----T	942	1	0,45	0,02-8,02	1	*	*
G----A	972	1	1,35	0,31-5,9	1	1,28	0,09-17,9
A----G	990	1	1,59	0,26-9,5	1	1,28	0,09-17,9
C----T	1002	0,44	2,4	0,41-13,9	1	1,28	0,09-17,9
C----T	1008	1	*	*		*	
T----C	1009	1	*	*		*	
G----A	1041	0,48	1,91	0,44-8,35	1	0,67	0,06-6,87
C----T	1047	0,32	*	*		*	
A----G	1104	1	0,95	0,08-11,8	0,06	*	*
C----T	1137	0,32	*	*		*	
G----A	1143	1	1,35	0,31-5,91	1	1,28	0,09-17,9
G----T	1152	0,32	*	*		*	
C----T	1158	1	*	*	0,06	*	*
C----T	1185	1	1,35	0,31-5,91	1	1,28	0,09-17,9
A----G	1242	0,07	0,17	0,03-1,11	1	*	*
T----C	1260	1	0,45	0,03-8,02		*	
G----A	1266	1	0,95	0,07-11,8	1	*	*
A----T	1328	0,32	*	*		*	
T----C	1339	0,32	*	*		*	
G----A	1389	1	1,35	0,31-5,91	1	1,28	0,09-17,9
G----T	1392	1	*	*	0,29	*	*
G----A	1407	0,7	0,58	0,12-2,8	1	0,78	0,05-10,9
C----T	1410	1	1,35	0,31-5,9	1	1,28	0,09-17,9
T----C	1443	1	*	*	1	*	*
T----C	1445	0,38	3,53	0,37-33,7	1	1,28	0,09-17,9
C----T	1479	0,29	2,4	0,51-11,6	0,58	0,33	0,03-4,4
C----T	1509	0,23	4,37	0,47-41,1	0,58	3	0,23-39,6
C----G	1545	0,32	*	*		*	
A----G	1548	0,03	*	*		*	
T----C	1563	1	0,48	0,05-4,8	1	0,78	0,05-19,9
C----T	1576	1	0,45	0,03-8,02	1	*	*
A----G	1587	0,29	0,41	0,08-1,9	1	2	0,15-26,7
A----G	1590	0,18	0,26	0,04-1,47	1	*	*
A----G	1599	1	*	*	1	*	*
T----C	1602	0,46	2,05	0,43-9,8	1	1,28	0,09-17,9
G----T	1608	0,07	0,16	0,02-1,11	1	*	*
A----G	1614	0,53	*	*	1	0,75	0,48-11,6
C----G	1645	0,53	*	*	0,5	3	0,14-64,3
C----T	1692	1	1,12	0,25-4,9	1	1,28	0,09-17,9
G----A	1698	0,32	*	*		*	
A----G	1794	0,29	0,41	0,08-1,9	1	2	0,15-26,7

Tabla 13. Continúa

Polimorfismo	Posición Genoma	OMS 1997			Desenlace compuesto		
		Fisher (<i>p</i>)	OR	IC 95% OR	Fisher (<i>p</i>)	OR	IC 95% OR
C-----T	1806	1	0,45	0,02-8,0		*	
C-----T	1842	0,15	*	*	1	0,78	0,05-10,9
A-----G	1866	0,46	0,05	0,4-9,8	1	1,28	0,09-17,9
A-----G	1878	1	*	*	1	*	*
C-----T	1899	0,53	*	*	0,5	3	0,14-64,1
G-----A	1906	0,53	*	*	1	0,75	0,04-11,6
C-----T	1926	0,32	*	*		*	
C-----A	1941	1	*	*		*	
G-----A	1956	0,32	*	*		*	
C-----T	1959	1	1,35	0,31-5,9	1	1,28	0,09-17,9
T-----C	1974	0,03	*	*		*	
C-----A	1977	1	*	*	0,06	*	*
T-----C	1983	1	*	*		*	
C-----T	1992	0,14	0,24	0,04-1,38	0,58	0,33	0,02-4,4
C-----T	1998	1	1,05	0,08-13,0	0,5	3	0,14-64,3
C-----T	2012	0,3	2,4	0,51-11,6	1	0,5	0,03-6,7
A-----G	2058	0,23	4,4	0,47-41,1	1	1,28	0,09-17,9
T-----C	2070	0,03	*	*		*	
C-----T	2073	1	*	*	0,06	*	*
G-----A	2080	0,53	*	*	1	0,75	0,05-11,6
A-----C	2088	1	0,67	0,06-7,2	1	1,33	0,08-20,7
C-----T	2095	0,18	3,8	0,68-21,4	1	*	*
A-----G	2115	1	*	*	0,06	*	*
A-----G	2118	0,21	0,19	0,02-1,74	1	1	0,98-10,2
C-----T	2133	0,32	*	*		*	
T-----C	2142	1	0,47	0,65-4,80	1	1,33	0,08-20,7
A-----G	2160	1	0,95	0,07-11,8	1	*	*
A-----G	2163	0,32	*	*		*	
C-----T	2175	0,44	2,4	0,41-13,9	1	1,28	0,09-17,9
C-----T	2199	1	*	*	1	*	*
T-----C	2202	1	*	*		*	
C-----T	2223	1	1,35	0,31-5,9	1	1,28	0,09-17,9
T-----C	2229	1	1,59	0,26-9,50	0,5	*	*
G-----A	2238	1	*	*	1	*	*
T-----C	2256	0,1	*	*		*	
T-----C	2268	0,14	*	*	1	1,28	0,09-17,9
T-----C	2298	1	*	*	1	*	*
G-----A	2320	1	1,35	0,31-5,9	1	1,28	0,09-17,9
G-----A	2370	0,32	*	*		*	
T-----C	2377	1	0,93	0,21-4,17	1	1,28	0,09-17,9
A-----G	2397	0,07	6	0,90-40,1	1	*	*
T-----C	2408	1	*	*	1	*	*

*La ausencia de estimados se debe a colinealidad.

Figura 10. Asociación de los polimorfismos del gen E y el desenlace clínico.

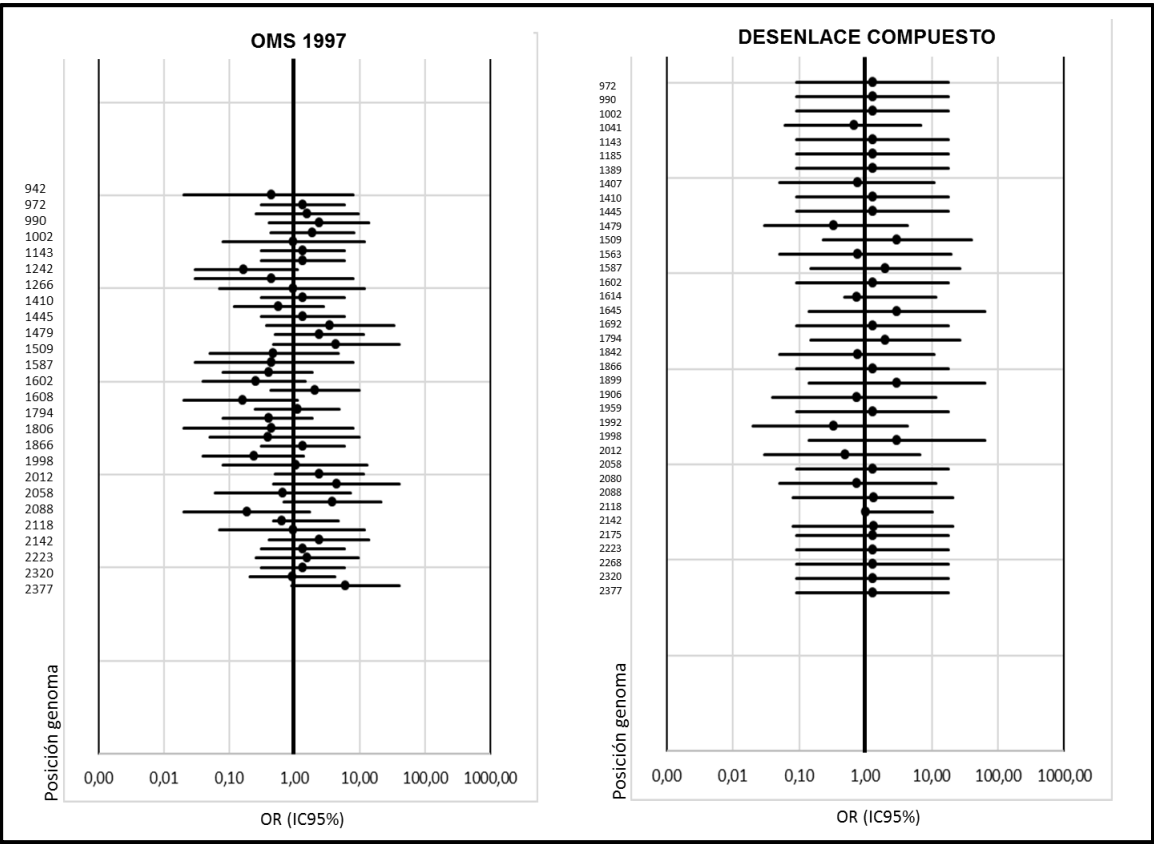
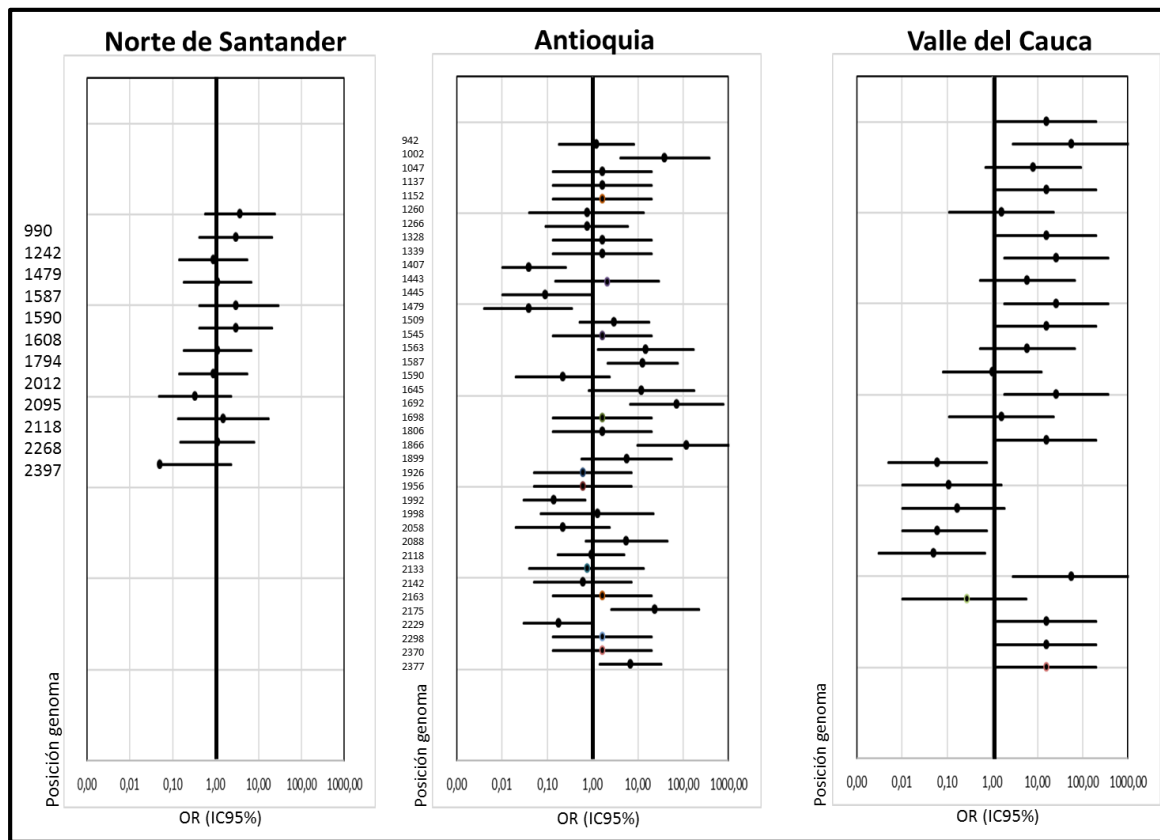


Figura 11. Asociación de los polimorfismos del gen E y la procedencia.



El resultado de este análisis mostró que, al evaluar los polimorfismos, ninguno se asoció significativamente con el desenlace clínico de la enfermedad.

Se evaluó la asociación del polimorfismo según la procedencia del virus. Aquí encontramos que existe asociación con algunos polimorfismos y la procedencia. Con respecto a los polimorfismos de las posiciones genómicas 1002, 1407, 1692, 1866, 1992, 2175 y 2377 se encontró que la procedencia de los departamentos Antioquia y Valle del Cauca se asoció significativamente con la presencia del alelo mutado. Para los polimorfismos cuya posición genómica son 1479, 1563 y 1587, se encontró que la procedencia de Antioquia se asoció significativamente con la presencia del alelo mutado. Para los polimorfismos 972, 1143, 1185, 1389, 1410, 1509, 1602, 1959, 2142, 2223 y 2320 se encontró que la procedencia de Valle del

Cauca se asoció significativamente con la presencia del alelo mutado. Con respecto a los departamentos de Norte de Santander y Córdoba no se encontraron asociaciones (tabla 14).

Tabla 14. Análisis estadístico de la asociación de los polimorfismos del gen E según la procedencia.

Polimorfismo	Santander		Norte de Santander		Antioquia		Valle del Cauca		Cordoba	
	%	OR(IC95%)	%	OR(IC95%)	%	OR(IC95%)	%	OR(IC95%)	%	OR(IC95%)
972_GA	20	1	0	---	100	---	80	16 (1,27-200,92)	100	----
990_AG	26,67	1	57,14	3,67 (0,56-24,13)	0	---	0	---	0	----
1002_CT	6,67	1	0	---	73,68	39,2 (4,04-379,9)	80	56 (2,83-1109,4)	0	----
1008_CT	0	1	0	---	5,26	*	0	---	0	----
1009_TC	0	1	0	---	10,53	*	0	---	0	----
1041_GA	33,33	1	0	---	100	---	80	8 (0,70-91,80)	100	----
1047_CT	6,67	1	0	---	10,53	1,65 (0,13-20,11)	0	---	0	----
1095_TC	0	1	0	---	10,53	*	0	---	100	----
1104_AG	20	1	0	---	0	---	0	---	0	----
1137_CT	6,67	1	0	---	10,53	1,65 (0,13-20,11)	0	---	0	----
1143_GA	20	1	0	---	100	---	80	16 (1,27-200,92)	100	----
1152_GT	6,67	1	0	---	10,53	1,65 (0,13-20,11)	0	---	0	----
1158_CT	13,33	1	0	---	0	---	0	---	0	----
1185_CT	20	1	0	---	100	---	80	16 (1,27-200,92)	100	----
1242_AG	20	1	42,86	3 (0,42-21,30)	0	---	0	---	0	----
1260_TC	6,67	1	0	---	5,26	0,78 (0,04-13,56)	0	---	0	----
1266_GA	13,33	1	0	---	10,53	0,76 (0,09-6,17)	20	1,62 (0,11-22,98)	0	----
1278_GA	0	1	0	---	10,53	*	0	---	0	----
1328_AT	6,67	1	0	---	10,53	1,65 (0,13-20,11)	0	---	0	----
1339_TC	6,67	1	0	---	10,53	1,65 (0,13-20,11)	0	---	0	----
1389_GA	20	1	0	---	100	---	80	16 (1,27-200,92)	100	----
1392_GT	93,33	1	100	---	100	---	100	---	100	----
1407_GA	86,67	1	100	---	21,05	0,04 (0,01-0,26)	20	0,04 (0,003-0,54)	0	----
1410_CT	20	1	0	---	100	---	80	16 (1,27-200,92)	100	----
1443_TC	100	1	100	---	89,47	2,12 (0,15-29,66)	80	*	100	----
1445_TC	0	1	0	---	26,32	0,09 (0,01-1,00)	80	*	0	----
1479_CT	60	1	57,14	0,89 (0,14-5,48)	5,26	0,04 (0,004-0,36)	0	---	0	----
1509_CT	33,33	1	0	---	31,58	3 (0,51-17,71)	80	26 (1,84-367,70)	0	----
1545_CG	6,67	1	0	---	10,53	1,65 (0,13-20,11)	0	---	0	----
1548_AG	0	1	42,86	*	0	---	0	---	0	----
1563_TC	100	1	100	---	78,95	15 (1,29-174,4)	20	*	100	----
1576_CT	13,33	1	0	---	0	---	0	---	0	----
1587_AG	40	1	42,86	1,12 (0,18-6,93)	89,47	12,75 (2,12-76,57)	80	6 (0,53-67,65)	100	----
1590_AG	20	1	42,86	3 (0,42-29,30)	5,26	0,22 (0,02-2,40)	0	---	0	----
1599_AG	13,33	1	0	---	0	---	0	---	0	----
1602_TC	13,33	1	0	---	100	---	80	26 (1,84-367,70)	100	----
1608_GT	20	1	42,86	3 (0,42-21,30)	0	---	0	---	0	----
1614_AG	20	1	0	---	0	---	0	---	0	----
1645_CG	100	1	100	---	90,74	12 (0,81-177,44)	60	*	100	----
1683_CT	100	1	100	---	89,47	*	100	---	100	----
1692_CT	20	1	0	---	94,74	72 (6,68-776,50)	80	16 (1,27-200,92)	100	----
1698_GA	6,67	1	0	---	10,53	1,65 (0,13-20,11)	0	---	0	----

Tabla 14. Continúa

Polimorfismo	Santander		Norte de Santander		Antioquia		Valle del Cauca		Cordoba	
	%	OR(IC95%)	%	OR(IC95%)	%	OR(IC95%)	%	OR(IC95%)	%	OR(IC95%)
1794_AG	40	1	42,86	1,12 (0,18-6,93)	100	---	80	6 (0,53-67,65)	100	----
1806_CT	6,67	1	0	---	10,53	1,65 (0,13-20,11)	0	---	0	----
1842_CT	80	1	100	---	100	---	80	1 (0,08-12,56)	100	----
1851_GA	0	1	0	---	10,53	---	0	*	0	----
1866_AG	13,33	1	0	---	94,74	117 (9,56-1431,37)	80	26 (1,84-367,70)	100	----
1878_AG	13,33	1	0	---	0	---	0	---	0	----
1887_TC	0	1	0	---	10,53	*	0	---	100	----
1899_CT	100	1	100	---	89,47	5,67 (0,56-57,23)	60	*	100	----
1906_GA	13,33	1	0	---	0	---	20	1,62 (0,11-22,98)	0	----
1926_CT	93,33	1	100	---	89,47	0,61 (0,05-7,41)	100	---	100	----
1941_CA	0	1	0	---	10,53	*	0	---	0	----
1956_GA	93,33	1	100	---	89,47	0,61 (0,05-7,41)	100	---	100	----
1959_CT	20	1	0	---	100	---	80	16 (1,27-200,92)	100	----
1974_TC	100	1	57,14	*	100	---	100	---	100	----
1977_CA	13,33	1	0	---	0	---	0	---	0	----
1983_TC	100	1	100	---	89,47	*	100	---	100	----
1992_CT	80	1	100	---	36,84	0,14 (0,03-0,70)	20	0,06 (0,005-0,78)	100	----
1998_CT	93,33	1	100	---	94,74	1,28 (0,07-22,41)	60	0,11 (0,01-1,60)	100	----
2012_CT	60	1	57,14	0,89 (0,14-5,48)	0	---	20	0,17 (0,01-1,88)	0	----
2015_AG	0	1	0	---	10,53	*	0	---	0	----
2022_CT	100	1	100	---	89,47	*	100	---	100	----
2058_AG	0	1	0	---	47,37	0,22 (0,02-2,40)	80	*	0	----
2070_TC	100	1	57,14	*	100	---	100	---	100	----
2073_CT	13,33	1	0	---	0	---	0	---	0	----
2080_GA	20	1	0	---	0	---	0	---	0	----
2088_AC	100	1	100	---	78,95	5,62 (0,69-46,02)	40	*	100	----
2095_CT	80	1	57,14	0,33 (0,047-2,37)	100	---	100	---	100	----
2115_AG	86,67	1	100	---	100	---	100	---	100	----
2118_AG	80	1	85,71	1,5 (0,13-17,67)	78,95	0,94 (0,17-5,02)	20	0,06 (0,01-0,78)	100	----
2133_CT	6,67	1	0	---	5,26	0,78 (0,04-13,56)	0	---	0	----
2142_TC	93,33	1	100	---	89,47	0,61 (0,05-7,41)	40	0,05 (0,003-0,71)	100	----
2160_AG	20	1	0	---	0	---	0	---	0	----
2163_AG	6,67	1	0	---	10,53	1,65 (0,13-20,11)	0	---	0	----
2166_GA	0	1	0	---	10,53	*	0	---	0	----
2175_CT	6,67	1	0	---	63,16	24 (2,57-223,79)	80	56 (2,83-1109,43)	0	----
2199_CT	93,33	1	100	---	100	---	80	0,28 (0,01-5,66)	100	----
2202_TC	0	1	0	---	10,53	*	0	---	0	----
2223_CT	20	1	0	---	100	---	80	16 (1,27-200,92)	100	----
2229_TC	40	1	0	---	10,53	0,18 (0,03-1,06)	0	---	0	----
2238_GA	13,33	1	0	---	0	---	0	---	0	----
2256_TC	100	1	71,43	*	100	---	100	---	100	----
2268_TC	26,67	1	28,57	1,1 (0,15-8,12)	0	---	0	---	0	----
2298_TC	6,67	1	0	---	10,53	1,65 (0,13-20,11)	0	---	0	----
2320_GA	20	1	0	---	100	---	80	16 (1,27-200,92)	100	----
2370_GA	6,67	1	0	---	10,53	1,65 (0,13-20,11)	0	---	0	----
2377_TC	20	1	0	---	63,16	6,86 (1,42-33,0)	80	16 (1,27-200,92)	0	----
2397_AG	80	1	57,14	0,33 (0,05-2,37)	100	---	100	---	100	----
2408_TC	100	1	100	---	100	---	80	*	100	----

*La ausencia de estimados se debe a colinealidad.

9.6 LINAJES DEL VDEN-2 Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESENLACE CLÍNICO.

Los polimorfismos genómicos encontrados fueron agrupados dentro de los linajes 1, 2 y 3 para VDEN-2. Se evaluó la asociación de cada uno de los linajes con el desenlace clínico y se encontró que ninguno se asoció significativamente (tabla 15).

Tabla 15. Asociación de linaje de VDEN-2 y el desenlace clínico.

Linaje	OMS 1997			Desenlace compuesto		
	%	OR	IC 95% OR	%	OR	IC 95% OR
2	56,52	1	–	70	1	–
3	43,48	1,79	0,37-8,75	30	1,28	0,09-17,95

Fisher's exact= 1.0

9.7 VARIACIÓN GENÓMICA DE VDEN-2 Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESENLACE CLÍNICO AJUSTANDO POR TIPO DE INFECCIÓN.

Antes de evaluar la potencial asociación entre cada uno de los polimorfismos y el desenlace clínico ajustando por tipo de infección, se realizó un análisis global donde se pudo observar, que las infecciones primarias y secundarias no están ejerciendo un papel confusor (tabla 16); para lo cual, ajustar por tipo de infección nos arrojará los mismos resultados descritos anteriormente, por ende, se mantendrá el modelo ya estipulado.

Tabla 16. Tipo de infección por desenlace clínico.

		Desenlace compuesto (línea de base o seguimiento)		Total
		No	Si	
Tipo de infección	Primaria	16 66.67	13 65.00	29 65.91
	Secundaria	8 33.33	7 35.00	15 34.09
Total		24 100.00	20 100.00	44 100.00

Fisher's exact= 1.0

10. DISCUSIÓN

La infección por VDEN puede cursar de forma asintomática o causar una enfermedad de amplio espectro, desde un síndrome febril autolimitado a formas severas cuya característica clínica principal es la hipotensión sostenida y el choque debido a un incremento de la permeabilidad vascular (World Health Organization 2009). Generalmente los casos fatales causados por esta infección ocurren en pacientes con disminución de la tensión arterial para la edad y presencia de hemorragias mayores, por lo cual se ha reportado que la mortalidad en este grupo de pacientes en estado de shock es 50 veces más alta comparada con pacientes que no entran en shock (Anders et al. 2011).

En el momento no existe una vacuna licenciada o algún medicamento antiviral contra la enfermedad; sin embargo se han hecho enormes aportes y esfuerzos en la comunidad científica para poder llegar a la obtención de un tratamiento eficaz y seguro (Villar et al. 2014; Wilder-Smith et al. 2010). Las estrategias que existen en la actualidad para la prevención de estas formas severas, se basan en la atención oportuna y temprana de la enfermedad e intervenciones públicas como lo son el control vectorial y programas educativos para la población a riesgo. Paralelo a esto, desde hace algunos años, se han venido publicando estudios basados en la búsqueda de herramientas y métodos que pretendan encontrar marcadores de severidad que logren explicar y dar solución a estas formas graves de la enfermedad (Huy et al. 2013).

Dentro de estos avances, se ha postulado que el factor que modula el desenlace clínico de la enfermedad, no es en realidad uno solo, sino que es un proceso multifactorial que promete ser el mejor y más completo mecanismo explicativo de la severidad de la enfermedad. Dentro de este modelo multifactorial encontramos 3 determinantes constituidos por el virus, la inmunidad previa y el componente genético (Clyde et al. 2006; Huy et al. 2013; Anders et al. 2011). Dentro

de este trabajo de investigación se abordaron dos de estos determinantes: inmunidad previa y virus; más específicamente tipo de infección, serotipo y variación genómica viral (polimorfismos) con el objeto de determinar su asociación con la severidad de la enfermedad.

Trabajos previos han mostrado que el riesgo de enfermedad severa es mucho más alta cuando el serotipo infectante es el VDEN-2 (Thomas et al. 2014; Ohainle et al. 2015; Ocazonez et al. 2006). Thomas y colaboradores, encontraron que el VDEN-2 fue el serotipo más asociado con las formas severas del dengue (OR 2.0 IC95% 1.3-3.3) y al ajustar el modelo por edad, género y tipo de infección se encontraron que el VDEN-2 mantuvo su asociación con la severidad (OR 1.95 IC95% 1.16-3.29) (Thomas et al. 2014). Por otro lado Ocazonez y colaboradores, encontraron que la dominancia del VDEN-2 coincidió con el periodo de tiempo en donde la frecuencia de casos DHF fue la más alta (242 de 3192 casos; 7,6%) (Ocazonez et al. 2006). Balmaseda y colaboradores, también encontraron en el grupo de casos virológicamente confirmados, que el VDEN-2 (serotipo más predominante) se asoció con mayor riesgo de fuga plasmática (OR 2.9 IC95% 1.32-6.40) (Balmaseda et al. 2006).

La infección con un serotipo del VDEN resulta en la producción de anticuerpos neutralizantes efectivos para esta primera infección. Al existir una infección secundaria con un serotipo diferente se produce un fenómeno denominado potenciación dependiente de anticuerpos (ADE, siglas de antibody dependent enhancement). Este fenómeno se ha postulado que favorece el incremento en la interiorización de partículas virales opsonizadas por el receptor II para el Fc de la IgG (FC_γRII) en macrófagos y células dendríticas; por lo cual las infecciones secundarias se han asociado en algunos estudios con formas severas de la enfermedad (Halstead 2003; Guzmán et al. 2002; Kouri et al. 1989).

En este estudio, se evaluó el serotipo del VDEN más asociado a la severidad de la enfermedad, considerando simultáneamente el efecto que introduce el tipo de infección. Los resultados obtenidos mostraron que cursar con una infección por serotipo VDEN-2, por sí solo, aumenta el riesgo de desarrollar una forma severa de la enfermedad (OR 7.14 IC95% 2.32-22.0). Cuando introducimos el efecto que produce el tipo de infección secundaria, esta misma asociación se mantuvo (OR 6.21 IC95% 1.97-19.6); sin embargo, el tipo de infección secundaria, por sí sola, no aumentó el riesgo de cursar con formas severas (OR 1.53 IC95% 0.72-3.25). También se evaluó la posible interacción entre el serotipo viral y el tipo de infección; donde no hallamos evidencia ($p=0.165$).

Los resultados obtenidos en este trabajo son contrarios a los reportados por varios estudios; Guzmán y colaboradores describieron que durante la epidemia cubana por VDEN-2 en el año 1997 la proporción de infecciones secundarias que cursaron con DHF/DSS fue de 4.2 comparado con las infecciones primarias que sólo fue de 0.02; lo mismo ocurrió durante la epidemia cubana del 2001-02 por VDEN-3 en donde la proporción fue de 2.8 vs 0. Otro estudio también en Latino América conducido por Hammond y colaboradores, mostró que existe mayor riesgo de presentar hemorragias internas, fuga plasmática e incluso shock cuando se cursa con una infección secundaria (OR 2.99 IC95% 1.0-9.8; 1.59 IC95% 1.1-2.4 y OR 2.06 IC95% 1.1-3.9, respectivamente). Sin embargo, en concordancia con los resultados de este trabajo existen en la actualidad estudios que coinciden con nuestros hallazgos, en donde la falta de asociación entre tipo de infección y severidad es un tema de debate. Harris y colaboradores publicaron un estudio en donde evaluaron muestras de pacientes con diferente desenlace clínico e investigaron el mecanismo de avidez de los anticuerpos (IgG) desarrollados después de una infección secundaria. Ellos encontraron que los pacientes que cursaron con un desenlace severo (DHF/DSS) experimentaron una gran disminución en la avidez de sus anticuerpos (IgG) a través del tiempo, comparado con los pacientes que cursaron con un desenlace leve (DF) (LR: 1.73-8.08 [rango

de avidez $\leq 80.00\%$ a $\leq 65.16\%$], $p=0.00178$, $AUC=0.796$). Estos datos permiten sugerir que la severidad de la enfermedad podría estar asociada con la baja avidez de los anticuerpos en diferentes momentos de la enfermedad (Lau et al. 2015). Nikin-Beers y Ciupe, investigaron el rol del efecto ADE en la severidad de la enfermedad mediante un modelo matemático de interacción huésped-virus. Este estudio permitió predecir que el tipo de infección secundaria contribuye a desarrollo de casos DHF; sin embargo la verdadera contribución de estos anticuerpos es promover una eliminación del virus de manera deficiente, interfiriendo con la actividad de los anticuerpos neutralizantes (Nikin-Beers & Ciupe 2015). Boonnak y colaboradores, exploraron el efecto ADE sobre células mieloides (blanco del VDEN). Estos investigadores encontraron que el efecto ADE es específico según el tipo de célula y que además su efecto está influenciado por la genética del huésped y la variabilidad del virus (Boonnak et al. 2011).

También encontramos que dentro de los factores virales que podrían modular la severidad está la variabilidad del virus. Desde los años 70's se ha introducido la posibilidad de que existen formas virulentas de un mismo virus que modulan el desenlace clínico (Gubler y cols, 1978). Mangada y colaboradores estudiaron secuencias de VDEN-2 aislados de pacientes que exhibían diferente desenlace clínico. Ellos secuenciaron el genoma completo de cada uno de estos virus, con la traducción a proteínas y encontraron cambios considerables a nivel de las proteínas no estructurales. Sorprendentemente los aislados de pacientes con desenlace severo presentaron gran divergencia en el genoma completo comparado con otros aislados, en especial a nivel de la proteína NS1. Los autores sugieren que los determinantes virales, en este caso genómicos, podrían estar jugando un rol central en el desenlace clínico de la enfermedad (Mangada & Igarashi 1998). Bray y colaboradores, al trabajar con un modelo animal encontraron que la mutación E₁₂₆K confiere propiedad de neurovirulencia a las cepas que las poseían, argumentando que este tipo de cambio podría jugar un rol importante en la patogénesis de la enfermedad (Bray et al. 1998). Leitmeyer y colaboradores, han realizado uno de los

más detallados estudios en este campo. En un esfuerzo para identificar los determinantes virales, compararon secuencias de genoma completo de virus aislados de pacientes con diferente desenlace clínico. Este trabajo logró sugerir que los determinantes primarios del desenlace severo podrían residir en cambios a nivel de las proteínas E, NS y regiones UTR. El principal hallazgo se basó en las proteínas NS4B y NS5, en donde se presume ser importantes determinantes en la patogénesis del dengue (Leitmeyer et al. 1999).

La proteína E ha sido reportada como el mayor componente antigénico sobre la superficie del virus (Kielian et al. 2010) y por ende cambios en su estructura podrían estar condicionando la entrada del virus a la célula y de esta manera sugerir que variaciones en este nivel podrían influenciar el desenlace clínico (Duangchanda et al. 1994). La proteína NS4B ha sido ampliamente estudiada (Grant et al. 2011; Astillo & Díaz 2012; Kakumani et al. 2013; Miller et al. 2006; Leitmeyer et al. 1999; Fernandez et al. 2011). Se ha sugerido que esta proteína participa en la interferencia de la señalización mediada por STAT y por ende se bloquea la señalización de los elementos de respuesta inmediata (Mun et al. 2005; Morrison et al. 2012).

Es este estudio evaluamos la variación del gen E y NS4B entre cepas de VDEN-2 aisladas de pacientes con diferente desenlace clínico provenientes de diferentes ciudades endémicas de Colombia.

Los resultados en base al gen E demostraron que existe un único genotipo circulante en Colombia (asiático-americano) como se ha descrito anteriormente (Méndez et al. 2012). Los polimorfismos observados en este gen fueron 91, de los cuales 10, presentaron cambios no sinónimos a nivel de proteína. Al evaluar la posible asociación entre los polimorfismos que produjeron mutaciones sinónimas y no sinónimas con el desenlace clínico de la enfermedad, encontramos que ninguno presentaba asociación estadísticamente significativa. Estos hallazgos son

consistentes con estudios en donde la variabilidad en esta proteína no se asocia con la severidad de la enfermedad (Duangchanda et al. 1994). Al explorar la posible asociación entre el polimorfismo presentado y la procedencia del virus, encontramos que en estos existe asociación significativa con la presencia del alelo mutado.

Los polimorfismos obtenidos en el gen NS4B fueron 39, de los cuales sólo 2 fueron de tipo no sinónimo. Al evaluar la posible asociación entre la presencia del alelo mutado y el desenlace clínico, encontramos que no existe asociación estadísticamente significativa. Al explorar la asociación con la procedencia del virus encontramos que existe asociación estadísticamente significativa, así como lo fue para el gen E.

Zmurko y cols (Zmurko et al. 2015), realizaron una revisión de las mutaciones más relevantes del gen de la proteína NS4B, entre ellas: L52F y V115A que aumenta la virulencia y viremia en cepas de VDENV-2; P101L disminuye replicación en cultivo celular C6/36 pero lo aumenta en células Vero y además modifica el tamaño de placa; T108M, V109, G119S aumenta la replicación viral; K143A inhibe completamente la replicación en cepas VDENV-2. En este estudio, ninguna de estas mutaciones fueron encontradas, probablemente esto se debió al número insuficiente de secuencias incluidas para poder encontrar este tipo de mutaciones, también a que se hace importante incluir cepas representativas de todo el país, así como de otros países.

Estos hallazgos sugieren que los polimorfismos encontrados en el gen E y NS4B podría deberse más a deriva genética que sufren los diferentes linajes circulantes en las distintas procedencias de los aislados (Santander, Antioquia, Valle del Cauca, Norte de Santander y Haití) independientemente del desenlace clínico causado por el virus.

Aunque el serotipo infectante, virulencia viral y respuesta inmune se perfilan como protagonistas en el desenlace severo, el mecanismo global que contribuye a explicar la patogénesis del dengue sigue sin ser elucidado en gran parte. Los hallazgos generados en este estudio podrían sugerir que existe una dinámica multifactorial entre el huésped y el virus que interactúan en la inmunopatogénesis de la enfermedad. Evaluar otros factores como el fondo genético del individuo, virulencia viral y determinantes atribuidos al vector permitirá el manejo integral y desarrollo de medidas terapéuticas efectivas, eficaces y seguras que intervengan en el curso de la infección y prevenir así las formas graves de la enfermedad.

10.1 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La información de secuencias genómicas aisladas en estudios anteriores, contó con la limitación de no poseer una información clínica amplia y detallada tanto de la línea de base como en el seguimiento. Sólo se contaban con la clasificación final según definición OMS 1997. Esto no permitió realizar una consolidación de casos y controles (definidos en este estudio) y por ello se debió realizar el análisis de asociación de polimorfismos genéticos con las dos clasificaciones de desenlace clínico (OMS 1997 y desenlace compuesto).

A pesar de que para este tipo de estudios el tamaño de muestra es considerable, se espera que para futuros estudios el tamaño muestral sea incrementado para aumentar el poder al estudio.

11. CONCLUSIONES

Durante los años 1994 a 2010 en los departamentos de Santander, Norte de Santander, Antioquia, Valle del Cauca y Córdoba circuló el genotipo Asiático-Americano del serotipo 2 del virus dengue.

En este estudio, el serotipo asociado al desarrollo de formas severas de la enfermedad fue el serotipo 2 del virus dengue.

En este estudio, la inmunidad previa (tipo de infección secundaria) no se asoció al desarrollo de formas severas de la enfermedad.

En este estudio, los polimorfismos presentes en el gen E y gen NS4B del virus dengue no se asociaron a formas severas de la enfermedad, pero sí con la procedencia del virus.

12. ESTRATEGIAS DE COMUNICACIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se socializaron mediante las siguientes estrategias:

- Ponencia oral en el XVII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología (API). Este evento se realizó en la ciudad de Quito-Ecuador, durante los días 15 al 19 de mayo de 2015.
- Ponencia oral en el VI Simposio Colombiano de Virología. Este evento se llevó a cabo en la ciudad de Bogotá-Colombia, durante los días 27-29 de mayo de 2015.

BIBLIOGRAFÍA

- Anantapreecha, S. et al., 2005. Serological and virological features of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002. *Epidemiology and infection*, 133(3), pp.503–7.
- Anders, K.L. et al., 2011. Epidemiological Factors Associated with Dengue Shock Syndrome and Mortality in Hospitalized Dengue Patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(1), pp.127–134.
- Astillo, A. & Díaz, F., 2012. Polimorfismos en el gen NS4B del virus dengue 2 y su relación con la gravedad de la enfermedad. *Revista Hechos Microbiológicos-Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.*, 17, p.27.
- Balmaseda, A. et al., 2006. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 74(3), pp.449–56.
- Bartenschlager, R. & Miller, S., 2008. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future microbiology*, 3(2), pp.155–65.
- Blaney J, Manipon G, Firestone C-Y, Johnson DH, Hanson CT, Murphy BR, W.S., 2003. Mutations which enhance the replication of dengue virus type 4 and an antigenic chimeric dengue virus type 2/4 vaccine candidate in Vero cells. *Vaccine*, 21(27-30), pp.4317–4327.
- Boonnak, K. et al., 2011. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Journal of virology*, 85(4), pp.1671–83.
- Bray, M. et al., 1998. Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. *Journal of virology*, 72(2), pp.1647–51.
- Camacho García, D.E. et al., 2009. Propiedades biológicas de cepas venezolanas

de DENV-2 aisladas de pacientes con fiebre de dengue y fiebre hemorrágica del dengue. *Revista cuabana de medicina tropical*, 61(3), pp.259–268.

Cardoso, I.M. et al., 2011. Dengue: clinical forms and risk groups in a high incidence city in the southeastern region of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(4), pp.430–435.

Castillo, J. & Díaz, F., 2009. Polimorfismos en el gen NS4B del virus dengue 2 y su relación con la gravedad de la enfermedad. *Hechos microbiológicos. Universidad de Antioquia.*, 106(31), p.27.

Centers for Disease Control and Prevention, 2012. *CDC DENV-1-4 Real-Time RT-PCR Assay for Detection and Serotype Identification of*,

Chaudhry, S., Swaminathan, S. & Khanna, N., 2006. Viral Genetics as a Basis of Dengue Pathogenesis. *Dengue Bulletin*, 30, pp.121–132.

Clyde, K., Kyle, J.L. & Harris, E., 2006. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*, 80(23), pp.11418–11431.

Cologna, R., Armstrong, P.M. & Rico-hesse, R., 2005. Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitoes. *Journal of virology*, 79(2), pp.853–859.

Cologna, R. & Rico-hesse, R., 2003. American Genotype Structures Decrease Dengue Virus Output from Human Monocytes and Dendritic Cells. *Journal of virology*, 77(7), pp.3929–3938.

Diamond, M.S. et al., 2000. Infection of Human Cells by Dengue Virus Is Modulated by Different Cell Types and Viral Strains Infection of Human Cells by Dengue Virus Is Modulated by Different Cell Types and Viral Strains. *Journal of virology*, 74(17), pp.7814–7823.

Duangchanda, S. et al., 1994. 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. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 25(2), pp.243–51.
- Fernandez, S. et al., 2011. Antibody recognition of the dengue virus proteome and implications for development of vaccines. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 18(4), pp.523–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3122577&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2014].
- Fried, J.R. et al., 2010. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(3), p.e617.
- Gélvez M, Herrera V, Parra B, Ocazonez R, Salgado D, V.L., 2015. Contribución del serotipo viral y el tipo de infección al desenlace clínico del dengue en Colombia. In *VI Simposio Colombiano de Virología*. pp. 58–59.
- Goldstein, B., Giroir, B. & Randolph, A., 2005. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatric critical care medicine: a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*, 6(1), pp.2–8.
- Grant, D. et al., 2011. A single amino acid in nonstructural protein NS4B confers virulence to dengue virus in AG129 mice through enhancement of viral RNA synthesis. *Journal of virology*, 85(15), pp.7775–87.
- Guzmán, M.G. et al., 2002. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health*, 11(4), pp.223–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049030>.
- Guzmán, M.G. et al., 2000. Epidemiologic Studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *American journal of epidemiology*, 152(9).

- Halsey, E.S. et al., 2012. Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(5), p.e1638.
- Halstead, S.B., 2009. Antibodies determine virulence in dengue. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171 Suppl, pp.E48–56.
- Halstead, S.B., 2006. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health*, 20(6), pp.407–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17341332>.
- Halstead, S.B., 2003. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Advances in Virus Research*, 60, pp.421–467.
- Hanley, K.A. et al., 2003. A trade-off in replication in mosquito versus mammalian systems conferred by a point mutation in the NS4B protein of dengue virus type 4. *Virology*, 312(1), pp.222–232.
- Holmes, E C, T.S., 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(1), pp.19–28.
- Huy, N.T. et al., 2013. Factors Associated with Dengue Shock Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9), p.e2412.
- Instituto Nacional de Salud-Colombia, I., 2012. *Boletín epidemiológico dengue semana 51 de 2012*,
- Instituto Nacional de Salud-Colombia, I., 2013. *Boletín epidemiológico, 2013*,
- Instituto Nacional de Salud-Colombia, I., 2011. *Boletín epidemiológico, semana epidemiológica 52 de 2011*,
- Instituto Nacional de Salud-Colombia, I., 2010. *Rol del Laboratorio Nacional de Referencia en la epidemia de dengue, Colombia 2010.*,
- Kakumani, P.K. et al., 2013. Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. *Journal of*

virology, 87(16), pp.8870–83.

- Kalayanarooj, S. et al., 2007. Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. *The Journal of infectious diseases*, 195(7), pp.1014–7.
- Kelley, J.F. et al., 2011. Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines. *Virology*, 418(1), pp.27–39.
- Kelley, J.F., Kaufusi, P.H. & Nerurkar, V.R., 2012. Dengue hemorrhagic fever-associated immunomediators induced via maturation of dengue virus nonstructural 4B protein in monocytes modulate endothelial cell adhesion molecules and human microvascular endothelial cells permeability. *Virology*, 422(2), pp.326–37.
- Kielian, M., Chanel-Vos, C. & Liao, M., 2010. Alphavirus Entry and Membrane Fusion. *Viruses*, 2(4), pp.796–825.
- Kouri, G.P. et al., 1989. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bulletin of the World Health Organization*, 67(4), pp.375–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2491263&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Lan, N.T.P. & Hirayama, K., 2011. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Tropical medicine and health*, 39(4 Suppl), pp.73–81.
- Lanciotti, R.S. et al., 1992. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(3), pp.545–551.
- Lau, L. et al., 2015. Antibody avidity following secondary dengue virus type 2 infection across a range of disease severity. *Journal of Clinical Virology*, 69, pp.63–67.

- Lei, H. et al., 2001. Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *Biomedical Science*, 8, pp.377–388.
- Leitmeyer, K.C. et al., 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of virology*, 73(6), pp.4738–47.
- Libraty, D.H. et al., 2009. A prospective nested case-control study of Dengue in infants: rethinking and refining the antibody-dependent enhancement dengue hemorrhagic fever model. *PLoS medicine*, 6(10), p.e1000171.
- Lozano A, Herrera V, V. LA, 2015. Respuesta antioxidante en pacientes con complicaciones por dengue. In *VI Simposio Colombiano de Virología*. p. 26.
- Lum, L.C.S. et al., 2015. Cohorting Dengue Patients Improves the Quality of Care and Clinical Outcome. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(6), p.e0003836.
- Mangada, M.N. & Igarashi, A., 1998. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology*, 244(2), pp.458–66.
- Marón, G.M. et al., 2010. Association between nutritional status and severity of dengue infection in children in El Salvador. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(2), pp.324–9.
- Méndez, J. a et al., 2012. Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. *Virology journal*, 9(1), p.64.
- Miller, S., Sparacio, S. & Bartenschlager, R., 2006. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *The Journal of biological chemistry*, 281(13), pp.8854–63.
- Moraes, G.H., de Fátima Duarte, E. & Duarte, E.C., 2013. Determinants of mortality from severe dengue in Brazil: a population-based case-control study. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 88(4), pp.670–6.
- Morrison, J., Aguirre, S. & Fernandez-Sesma, A., 2012. Innate Immunity Evasion by

- Dengue Virus. *Viruses*, 4(12), pp.397–413.
- Mun, J.L. et al., 2005. Inhibition of Alpha / Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. *Jo*, 79(13), pp.8004–8013.
- Muñoz-Jordan et al., 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), pp.14333–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3624364&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Naves, M. et al., 2004. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001 / 2002 , ocorrida no município do Rio de Janeiro Clinical differences observed in patients with dengue caused by different serotypes in the epidem. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(4), pp.293–295.
- Nikin-Beers, R. & Ciupe, S.M., 2015. The role of antibody in enhancing dengue virus infection. *Mathematical biosciences*, 263, pp.83–92.
- Nisalak, A. et al., 2003. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 68(2), pp.191–202. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12641411>.
- Ocazonez, R.E., 2007. Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana. *Revista de salud pública*, 9(2), pp.262–274.
- Ocazonez, R.E. et al., 2006. 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(7), pp.725–31.
- Ocazonez-jiménez, R.E. et al., 2013. Virus del dengue de serotipo 1 (DENV-1) de Colombia : su contribución a la presentación del dengue en el departamento de

- Santander. *Biomédica*, 33, pp.22–30.
- Ohainle, M. et al., 2015. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Science Translational Medicine*, 3(114).
- Pawitan, J. a, 2011. Dengue virus infection: predictors for severe dengue. *Intern Med Indones*, 43(2), pp.129–35.
- Periago, M.R. & Guzmán, M.G., 2007. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. *Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health*, 2007(3), pp.187–191.
- Pryor, M.J. et al., 2001. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(5), pp.427–34.
- Rodríguez, R. & Guzmán, M.G., 2005. *Caracterización molecular de cepas de dengue aisladas en epidemias cubanas. Instituto de medicina tropical Pedro Kouri*.
- Rodriguez-Roche, R. & Gould, E. a, 2013. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *BioMed research international*, 2013, p.690835.
- Sampath, A. & Padmanabhan, R., 2009. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Research*, 81(1), pp.6–15.
- San Martín, J.L. et al., 2010. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(1), pp.128–35.
- Sánchez, I.J., 1996. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *Journal of general virology*, 77, pp.2541–2545.

- Santiago, G. a et al., 2013. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(7), p.e2311.
- Singh, U.B. et al., 1999. Partial nucleotide sequencing and molecular evolution of epidemic causing Dengue 2 strains. *The Journal of infectious diseases*, 180(4), pp.959–65.
- SIVIGILA, 2014. *Boletín epidemiológico de Colombia. Semana 15 de 2014.*,
- Suárez-Ognio, L. et al., 2011. Factores asociados a dengue grave durante la epidemia de dengue en la ciudad de Iquitos, 2010-2011. *REvista peruana de epidemiologia*, 15(1), pp.1–7.
- Sun, P. & Kochel, T.J., 2013. The battle between infection and host immune responses of dengue virus and its implication in dengue disease pathogenesis. *TheScientificWorldJournal*, 2013, p.843469.
- Thomas, L. et al., 2014. Clinical Presentation of Dengue by Serotype and Year of Epidemic in Martinique. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(1), pp.138–145.
- Thomas, L. et al., 2008. Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(6), pp.990–998.
- Villar, L. et al., 2014. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *New England Journal of Medicine*, 372(2), p.141103114505002.
- Wahala, W.M.P.B. & Silva, A.M. De, 2011. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*, 3(12), pp.2374–95.
- Weaver, S.C. & Vasilakis, N., 2009. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, genetics and evolution : journal of*

molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 9(4), pp.523–40.

Whitehead, S.S., Hanley, K.A. & Weaver, S.C., 2013. Genetic and phenotypic characterization of sylvatic dengue virus type 2 strains. *Virology*, 377(2), pp.296–307.

Wilder-Smith, A. et al., 2010. Update on Dengue: Epidemiology, Virus Evolution, Antiviral Drugs, and Vaccine Development. *Current Infectious Disease Reports*, 12(3), pp.157–164.

World Health Organization, W., 2009. *Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*,

World Health Organization, W., 1997. *Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control* P. Jevon, ed., Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

Zmurko, J., Neyts, J. & Dallmeier, K., 2015. Flaviviral NS4b , chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis , and a molecular target for antiviral intervention. *Rev. Med. Virol.*, 25(April), pp.205–223.

Zou, G. et al., 2011. Development and characterization of a stable luciferase dengue virus for high-throughput screening. *Antiviral Research*, 91(1), pp.11–19.

ANEXOS

ANEXO A. PRESUPUESTO

Rubros	Fuente		Total
	Efectivo	Contrapartida	
Amplificación gen NS4B-E	5.000.000	0	5.000.000
Primer NS4B	230.000	0	230.000
Primer E	230.000	0	230.000
Servicio de secuenciamiento	5.500.000	0	5.500.000
Determinación del tipo de infección	0	5.200.000	5.200.000
Identificación de serotipo infectante	0	17.000.000	17.000.000
Total	\$10.960.000	\$22.200.000	\$33.160.000

ANEXO B. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	2015								
	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Sometimiento comité de ética									
Identificación del serotipo: análisis de sueros por PCR- tiempo real									
Determinación de tipo de infección: análisis de sueros por ELISA IgG									
Divergencia genética de cepas/sueros VDEN-2, amplificación y secuenciamiento genómica									
Análisis de secuencias y de datos									
Participación evento internacional									
Sometimiento artículo (s) científico(s)									
Elaboración de manuscrito y sustentación									