

Papel del sistema inmune en la patogenia de la infección por el virus del dengue

Yunys Pérez Betancourt*

RESUMEN

La infección por el virus del dengue (DV) es una seria causa de morbilidad y mortalidad en la mayoría de las áreas tropicales y subtropicales del mundo. La infección puede ser asintomática o causar dos formas de la enfermedad, la fiebre del dengue (DF) o la fiebre hemorrágica del dengue (DHF), la cual es la forma más severa de la enfermedad y a menudo fatal. En infecciones secundarias con un serotipo diferente de DV la severidad de la enfermedad está relacionada con altos niveles de anticuerpos potenciadores y replicación viral en etapas tempranas de la infección, la cual es seguida de la activación de linfocitos T de memoria y otras células del sistema inmune y la producción de citocinas inflamatorias y otros mediadores químicos que causan el incremento de la permeabilidad capilar. Los avances en este campo de la inmunología han demostrado que la patogénesis del DHF/DSS es un proceso complejo y multifactorial relacionado con los factores virales y del hospedero.

Palabras clave: Infección por dengue virus, inmunopatogenia de DHF, dengue y sistema inmune.

ABSTRACT

Dengue virus (DV) infections are a serious cause of morbidity and mortality in most tropical and subtropical areas of the world. Dengue virus infection can be asymptomatic or causes two forms of illness, dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF), which is the severe form of dengue illness and often fatal. In subsequent infection with a dengue virus of different serotype, severe disease is linked to high levels of antibody-enhanced viral replication early in illness which is followed by a cascade of memory T-cell activation, other cells of immune system and a production of inflammatory cytokines and other chemical mediators that cause an increase in vascular permeability. Advances in that field of immunology have shown that DHF/DSS pathogenesis is a complex, multifactorial process related with host and viral factors that influence disease severity.

Key words: *Dengue virus infection, DHF immunopathogenesis, dengue virus and immune system.*

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus del dengue (DV) es una de las enfermedades transmitidas por artrópodos más difundidas a lo largo del mundo. Se caracteriza por manifestarse clínicamente de dos formas fundamenta-

les: una conocida como la fiebre del dengue (DF) y la otra como fiebre hemorrágica del dengue o dengue hemorrágico (DHF); aunque la mayoría de los pacientes transita la infección de forma asintomática.¹

Esta enfermedad es una seria causa de morbilidad y mortalidad en la mayoría de las áreas tropica-

* Licenciado en Bioquímica. Profesor Instructor de Bioquímica de la Facultad de Tecnología de la Salud de la Universidad de Ciencias Médicas de La Habana.

les y subtropicales, Sudeste y Sur de Asia, Centro, Sudamérica y el Caribe. Existen en el mundo aproximadamente 2.5 billones de personas con riesgo de infectarse con DV; cerca de 100 países y áreas tienen riesgo doméstico de contraer la infección, lo que representa un número aproximado de 100 millones de personas infectadas por DV anualmente.²

Uno de los retos de la medicina moderna es encontrar patrones de comportamiento en las personas infectadas con DV, de forma tal, que sea posible predecir el desarrollo o no de la forma más severa de la enfermedad. Está claro que entre otros factores el sistema inmune tiene un papel trascendental en la patogenia de DHF, sin embargo existen aún espacios en blanco que no permiten establecer generalizaciones y entorpecen el desarrollo de una medicina preventiva y personalizada. El propósito de esta revisión es reunir evidencias actuales que permitan explicar el papel del sistema inmune en la patogenia de la infección por DV.

DESARROLLO

1. Características generales del dengue virus

DV es transmitido entre humanos por mosquitos infectados, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*,³ *Homo sapiens* es el hospedero natural de DV, el cual es mantenido en la naturaleza entre mosquitos y humanos. DV pertenece a la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus*. Existen cuatro serotipos de DV: 1, 2, 3 y 4.^{4,5}

El genoma de DV es una simple cadena de ARN positivo infeccioso de aproximadamente 11kb de longitud. Es trascrito como una sola poliproteína que se divide en tres proteínas estructurales, la proteína de la cápside, proteína C, prM, precursor de la proteína de membrana, M, y la de la envoltura, proteína E, además codifica para 7 proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5.^{6,7} El virión de DV tiene una forma esférica con un diámetro que oscila entre 40 y 50 nm.⁸ La envoltura es una bicapa lipídica derivada de la membrana de las células hospederas que contiene dos proteínas insertadas, la E y la M.^{9,10}

Se ha demostrado que *in vitro*, en modelos animales y en humanos, DV es capaz de infectar numerosas células, incluyendo células dendríticas (CDs), monocitos/macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, células endoteliales, hepatocitos y células neuronales.¹¹⁻¹³ Sin embargo existe un consenso general con respecto al hecho que los miembros del linaje fagocitos mononucleares (monocitos, macrófagos, y células dendríticas) son *in vivo* los blancos primarios de DV.^{14,15}

De forma general se considera que DV entra a la célula a través un proceso de endocitosis mediada por receptores,¹⁶ asimismo se ha demostrado que puede penetrar a través de las balsas lipídicas.¹⁷

Un considerable número de moléculas han sido propuestas como receptores celulares de DV, la lista incluye: heparán sulfato,¹⁸⁻²⁰ Hsp 70 (del inglés, heat shock protein 70) y Hsp 90,^{21,22} GRP78 (del inglés, Glucose-Regulated Protein)^{23,24} CD14²⁵ y los DC-SIGN o CD-209.^{26,27} Más recientemente se han propuesto los receptores de manosa, los cuales están relacionados con la entrada de los cuatro serotipos de DV a macrófagos y fagocitos mononucleares.²⁸

2. Principales manifestaciones clínicas de la infección por dengue virus

DF es una enfermedad febril limitada.^{8,29} Luego de un periodo de incubación de 2 a 7 días aparece la fiebre, la cual, es generalmente acompañada de dolores de cabeza frontales y retroorbitales, mialgia; luego de la aparición de la fiebre se puede manifestar un fuerte dolor en los huesos, aberraciones del sabor, náuseas, vómito y linfoadenopatía.⁵

Algunos pacientes infectados con DV manifiestan una infiltración del plasma sanguíneo dentro de los espacios intersticiales, trombocitopenia y manifestaciones hemorrágicas;^{29,30} este síndrome severo es llamado DHF. Las manifestaciones hematológicas incluyen un incremento del hematocrito, trombocitopenia, un tiempo prolongado de sangramiento y un incremento del tiempo de protrombina. La temperatura retorna a la normalidad cuando la infiltración capilar ocurre. La OMS clasifica a DHF en 4 grados del menos severo (grado 1) al más severo (grado 4) en el cual la infiltración del plasma es tan profunda que el choque ocurre, lo cual también es referido como DSS (del inglés dengue shock syndrome).²⁹

3. Patogénesis DHF

Existen tres teorías fundamentales para explicar la patogénesis de DHF.

3.1 Hipótesis basada en la virulencia de DV

Plantea que en la medida que el DV infectante tenga mayor virulencia la probabilidad de desarrollar un DHF es mayor. En este sentido se ha reportado en algunos trabajos que el serotipo DV 2 es mucho más virulento que el resto.^{31,32} Más recientemente se refiere que la virulencia de DV está relacionada con la presencia de anticuerpos heterólogos que se forman en infecciones primarias, en las que generalmente no se desarrolla la forma severa de la enfermedad.³³ El ries-

go de desarrollar un DHF/DSS es mayor en la infección secuencial DV1/DV2, seguida de DV3/DV2 y no en otro orden.³⁴⁻³⁶ Sin embargo DHF se puede desarrollar en infecciones primarias en adultos que no han sido expuestos con anterioridad a una infección por DV.³⁷ La virulencia de DV es claramente diferente. *In vitro* varias cepas se replican en magnitud variable en la misma línea celular y una misma cepa se replica en diferentes niveles en líneas celulares distintas.^{38,39}

A través de la aplicación de diferentes técnicas de Biología Molecular se ha revelado que DV exhibe una extensiva diversidad genética en humanos infectados^{40,41} y que dentro de los mismos serotipos DV2 y DV3 algunos genotipos son más virulentos que otros, manifestado en cultivos celulares y en infecciones naturales. En investigaciones recientemente realizadas se ha propuesto que la estructura secundaria del ARN viral de diferentes cepas de un mismo serotipo, específicamente la región proximal 3'UTR, está asociada a la posibilidad de manifestar la forma severa de la enfermedad,⁴² sin embargo no existe una explicación certera que justifique tal hallazgo. Un determinante de la variabilidad de la virulencia DV es la capacidad replicativa en macrófagos humanos *in vitro*.⁴³ Otra explicación para justificar tal variabilidad puede ser el hecho de que los virus más virulentos tengan tendencia a suprimir la activación de genes antivirales en el hospedero e inducir más muertes por apoptosis de monocitos humanos infectados en comparación con los virus menos virulentos,⁴⁴ estos virus estimulan la secreción de factores virulentos como son: la IL-6, IL-8, RANTES, factores inflamatorios y la producción de IFN- γ .⁴⁵

3.2 Hipótesis de la potenciación mediada por anticuerpos (ADE)

Existen abundantes datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio que son un fuerte respaldo a la hipótesis que plantea que la potenciación mediada por anticuerpos de las infecciones virales es crítico en el desarrollo de DHF/DSS.^{46,47} La hipótesis postula que la presencia de anticuerpos antidengue cruzados, no neutralizantes inducidos por una infección previa forma complejos inmunológicos con virus heterotípicos durante las infecciones secundarias.⁴⁸ Los complejos inmunológicos se unen a los receptores Fc de los monocitos, fagocitos y células dendríticas maduras para facilitar la entrada viral y la replicación.^{49,50} Este evento desencadena un elevado nivel de viremia y la activación de otras células del sistema inmune que consecuentemente aumentan la severidad de la enfermedad.⁵¹

La naturaleza precisa de los anticuerpos neutralizantes antidengue es aún desconocida, pero la habi-

lidad de éstos de unirse y ocupar un área suficientemente amplia de la superficie del virión parece ser importante para el proceso de neutralización.^{52,53} Como soporte de esta teoría acerca del número de sitios ocupados, ha sido reportado que un mínimo de 30 de 180 proteínas E de la envoltura del virus del Oeste del Nilo deben ser ocupados para que ocurra la neutralización en un modelo de cultivo de células.⁵³ Un aspecto importante es que la neutralización de DV está modulada por la región Fc de las IgG de manera tal que distintas subclases pueden tener efectos diferentes en este proceso, por lo que el perfil de IgGs generado por una infección por DV o una vacuna puede independientemente influenciar la magnitud de la neutralización.⁵⁴

Los mecanismos de acción de los anticuerpos potenciadores de la infección están poco esclarecidos; se conoce que actúan a bajas concentraciones. *In vitro* se ha demostrado que anticuerpos monoclonales murinos y de chimpancé pueden neutralizar a DV a altas concentraciones pero potencian la infección a bajas concentraciones,^{55,56} la afinidad de la unión del anticuerpo y el virión es un factor que podría afectar la capacidad neutralizante de la inmunoglobulina.^{53,57} Es aún incógnito cómo las partículas de DV pueden escapar de la vía de degradación endocítica. Una posible explicación es el bajo número de anticuerpos unidos a la superficie del virión, de forma tal que la glicoproteína E libre hace un reordenamiento y media la fusión con la membrana desde dentro del lumen ácido del endosoma, dejando el virión libre para infectar la célula.⁵⁸

La habilidad de los anticuerpos de neutralizar o potenciar una infección viral puede estar también influenciada por su interacción con los receptores Fc (Fc γ Rs). Tanto Fc γ R I y Fc γ R II afectan al ADE de la infección por DV de líneas celulares y células primarias humanas *in vitro*. Los Fc γ R activadores (Fc γ R I y Fc γ R IIa) y los inhibidores Fc γ R (Fc γ R IIb) son expresados sobre los monocitos/macrófagos y CDs, en los cuales se ha visto que los eventos de superficie, tales como la avidez entre los inmunocomplejos y los respectivos Fc γ Rs pueden influenciar los procesos de potenciación o neutralización.⁵⁹ Poco se ha descrito acerca de la influencia de las vías de señalización intracelular. Al respecto se ha reportado que las regiones citoplasmáticas de los receptores juegan un papel esencial en la posibilidad de desarrollar una potenciación de forma tal que receptores con los residuos de tirosina alterados no desencadenan las señales intracelulares necesarias para originar la potenciación.⁶⁰

3.3 Hipótesis de los linfocitos T

La acumulación de datos sugiere que las células T pueden contribuir a la protección durante infecciones

primarias con DV y causar daños durante infecciones secundarias.^{61,62}

La activación de células T y la producción de diversos patrones de citoquinas proinflamatorias son observadas frecuentemente en pacientes con DF o DHF/DSS. Las células T activadas pueden desempeñar diversas acciones. En infecciones secundarias los linfocitos T CD8⁺ NS3 específicos cruzados y de baja avidez están incrementados y pueden causar efectos indeseados, producción de citoquinas inflamatorias que condicionan la inmunopatogenia; mientras que los linfocitos T CD8⁺ de alta avidez que normalmente son responsables del aclaramiento de las células infectadas por DV pueden estar preferencialmente reducidos.^{62,63}

En respuesta a estimulación *in vitro* con péptidos alterados, simulando un serotipo heterólogo, los clones de linfocitos T CD8⁺ específicos para NS5 que fueron aislados de individuos previamente infectados con DV1 mostraron una actividad citotóxica y producción de patrones de citoquinas diferentes a aquellos que fueron estimulados con péptidos relacionados, mimetizando al serotipo homólogo.^{64,65} Aberraciones similares de la producción de citoquinas han sido observadas en linfocitos T CD4⁺ aislados de candidatos vacunales monovalentes; los péptidos de serotipos de DV heterotípicos inducen mayor cantidad de TNF- α que de IFN- γ mientras que péptidos de un serotipo homólogo estimula en mayor cuantía la secreción más de IFN- γ que de TNF- α ;⁶⁶ otras investigaciones han expuesto que los linfocitos T CD4⁺ pueden modular la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ en infecciones secundarias demostrando una interacción entre las células T y la inmunopatogenia de infecciones secundarias por DV.⁶⁷

4. Mecanismos de infiltración del plasma sanguíneo

En DHF/DSS, los factores asociados a la disfunción del endotelio tienen un tiempo de vida medio corto y sus efectos son reversibles. De forma general no es evidente el daño en el microendotelio ni detección de antígenos virales en muestras de autopsias en pacientes con DHF/DSS.⁶⁸

Sin embargo en modelos animales se ha manifestado la inducción de apoptosis mediada por el aumento de la producción de TNF- α por parte de macrófagos infiltrados en la vecindad del endotelio vascular en el cual hubo un aumento en la concentración de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS),⁶⁹ y se ha logrado *in vitro* infecciones productivas de DV en células endoteliales humanas que tienen un efecto similar.^{13,70} La infección por DV puede causar muerte apoptótica de las células endoteliales *in vitro* y contribuir al incremento de la permeabilidad capilar

observada en DHS/DSS.⁷¹ Tanto la cantidad de virus inoculado en el tejido y la producción de TNF- α está relacionado con el daño al endotelio vascular y la hemorragia en ratones infectados con DV.⁷⁰

Las proteínas virales específicas han sido asociadas con la disfunción del endotelio. NS1 en forma soluble (NS1s) es producida en abundancia en pacientes con DF,⁷² y sus niveles en sangre son proporcionales a los niveles de viremia y al riesgo de padecer DHF. NS1 puede causar daño en el endotelio vascular a través de la activación del complemento.⁷³ Los anticuerpos anti-NS1 inhiben la agregación plaquetaria por el efecto que produce su unión sobre proteínas de membrana específicas de las plaquetas,⁷⁴ lo cual es otro factor importante en la inducción de la hemorragia que se observa en los pacientes con DHF. Por otro lado, NS5 puede también afectar la permeabilidad de células endoteliales *in vitro* en las cuales induce la producción de IL-8 que es un reconocido inductor de permeabilidad vascular.⁷⁵ El daño al endotelio de hecho está más asociado a efectos indirectos de la infección por DV que a los directos. Muchas citocinas que son indetectables en sangre de individuos sanos están significativamente elevadas en pacientes infectados por DV, entre éstas se acentúan: TNF- α , IL-1 β ,^{76,77} IL-6,^{77,78} IL-8,^{78,79} IL-10,⁸⁰ IFN- γ ,⁸¹ y MCP-1,⁸¹ varias tienen tendencia a estar más asociada a DHF/DSS que otras. Bajo condiciones normales IL-6 es producida por monocitos/macrófagos activados, linfocitos T y B y células endoteliales, esta citosina tiene la habilidad de producir permeabilidad vascular, es capaz de provocar aumento en la producción de autoanticuerpos antiendotelio y antiplaquetas de forma sistémica o local⁸² lo que provoca aumento de la hemorragia. La IL-8 es secretada por muchos tipos de células para reclutar linfocitos, eosinófilos y neutrófilos a sitios específicos, su síntesis se ha visto en modelos animales, está modulada por la acción de los TLR (del inglés Toll Like Receptor) específicamente el TLR3,⁸³ los cuales están relacionados con el reconocimiento de ARN de agentes infecciosos.

5. Sistema inmune innato en la infección por DV

La rápida activación de la respuesta inmune innata del hospedero podría ser el paso limitante de la proliferación de la infección por DV. En este sentido se cree que los interferones tipo I (IFN α/β) secretados por las CDs presentes en la periferia son la primera defensa contra la infección por DV.

A nivel molecular, el pretratamiento de CDs con IFN- α/β que posteriormente fueron infectadas con DV, redujo tanto el número de células infectadas como la cantidad de viriones infecciosos producidos

en células cultivadas *in vitro*. Sin embargo las células que no fueron pretratadas con IFNs tipo I presentaron una infección por DV mucho más marcada, dejando entrever un mecanismo de evasión del sistema inmune innato por parte de DV.⁸⁴ Relacionado con este fenómeno ha sido reportado que una de las vías que tiene DV para evadir la respuesta innata es a través de la NS5, la expresión del dominio polimérica de esta proteína es capaz de inhibir la cascada de señalización producida por IFN α que desencadena los mecanismos innatos efectores,⁸⁵ por lo que el efecto antiviral que ejercen estas citocinas no tiene el efecto esperado.

Existen diferencias en la respuesta inmune innata entre pacientes con DF y DHF. En un estudio realizado en el cual se comparó la activación de la vía alternativa del complemento entre pacientes con DF y DHF se reportó que los niveles de dos proteínas regulatorias tuvo una diferencia marcada entre estos dos grupos de enfermos. Los pacientes con DHF mostraron altos niveles del factor D que hidroliza el factor B para rendir la forma activa de la convertasa C3 y bajos niveles del factor H, el cual inactiva la convertasa C3, lo que sugiere que los pacientes con la forma severa de la enfermedad presentan desregulación de la vía alternativa del complemento,⁸⁶ la cual en algún modo puede tener un efecto supresor una respuesta inmune excesiva que podría condicionar positivamente la inmunopatogenia del DHF.

CONCLUSIONES

Existen significativos avances en la inmunopatogenia de DV en infecciones naturales, existen datos epidemiológicos que apoyan las teorías que sustentan la patogenia de DV. *In vitro* se ha demostrado el papel de los anticuerpos antidengue tanto en la potenciación de infecciones secundarias como en el daño al endotelio vascular, sin embargo ha sido difícil demostrar tales fenómenos en el transcurso de infecciones naturales. La complejidad de los procesos que ocurren durante las infecciones con DV no ha permitido, hasta ahora, describir con exactitud los fenómenos fisiológicos, bioquímicos e inmunológicos que tienen lugar, lo cual obstaculiza el desarrollo de terapias preventivas y terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007 Sep;30(5-6):329-40. on "http://preview.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645944?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=5"
- Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007; 370(9599): 1644-52.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 480-96.
- Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001: 1043-125.
- Castleberry JS, Mahon CR. Dengue fever in the Western Hemisphere. *Clin Lab Sci* 2003 Winter; 16(1): 34-8.
- Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001: 991-1041.
- Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003; 59: 23-61.
- Monath TP, Tsai TF. Flaviviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical Virology*. Washington, DC: ASM Press; 2002: 1097-151.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 2004; 427: 313-319.
- Rey FA. Dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6986-6991.
- Anderson R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003; 59: 229-274.
- Paes MV, Lenzi HL, Nogueira AC, Nuovo GJ, Pinhão AT, Mota EM, Basílio-de-Oliveira CA, Schatzmayr H, Barth OM, Alves AM. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest* 2009; 89(10): 1140-51.
- Arévalo MT, Simpson-Haidaris PJ, Kou Z, Schlesinger JJ, Jin X. Primary human endothelial cells support direct but not antibody-dependent enhancement of dengue viral infection. *J Med Virol* 2009; 81(3): 519-28.
- Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *J Infect Dis* 2004; 189: 1411-1418.
- Wati S, Soo ML, Zilm P, Li P, Paton AW, Burrell CJ, Beard M, Carr JM. Dengue virus infection induces GRP78 which acts to chaperone viral antigen production. *J Virol* 2009 Sep 30. Epub 2009 Sep 30.
- Hase T, Summers PL, Eckels KH. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch Virol* 1989; 104(1-2): 129-43.
- Lee CJ, Lin HR, Liao CL, Lin YL. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *J Virol* 2008; 82(13): 6470-80.
- Chen JP, Lu HL, Lai SL, Campanella GS, Sung JM, Lu MY et al. Dengue virus induces expression of CXC chemokine ligand 10/IFN-gamma-inducible protein 10, which competitively inhibits viral binding to cell surface heparan sulfate. *J Immunol* 2006; 177(5): 3185-92.
- Lee E, Pavly M, Young N, Freeman C, Lobigs M. Antiviral effect of the heparan sulfate mimetic, PI-88, against dengue and encephalitic flaviviruses. *Antiviral Res* 2006; 69(1): 31-8.
- Prestwood TR, Prigozhin DM, Sharar KL, Zellweger RM, Shresta S. A mouse-passaged dengue virus strain with reduced affinity for heparan sulfate causes severe disease in mice by establishing increased systemic viral loads. *J Virol* 2008; 82(17): 8411-21.
- Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* 2005; 79(8): 4557-67.
- Kolli R, Khanam S, Jain M, Ganju L, Ram MS, Khanna N, Swaminathan S. A synthetic dengue virus antigen elicits enhanced antibody titers when linked to, but not mixed with,

- Mycobacterium tuberculosis* HSP70 domain II. *Vaccine* 2006; 24(22): 4716–26.
23. Jindadamrongwech S, Thepparat C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* 2004; 149(5): 915–27.
24. Limjindaporn T, Wongwiwat W, Noisakran S, Srisawat C, Netsawang J, Puttikhunt C et al. Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379(2): 196–200.
25. Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol* 1999; 73(4): 2650–7.
26. Tassaneetrithip B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpheller C, Finke J, Sun W et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 197(7): 823–9.
27. Kwan WH, Heit AM, Maraño C, Barbaroux JB, Hosmalin A, Harris E et al. Dendritic cell precursors are permissive to dengue virus and human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2005; 79(12): 7291–9.
28. Miller JL, de Wet BJ, Martínez-Pomares L et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog* 2008; 4: e17.
29. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control. Geneva: *World Health Organization*; 1997: 12–23.
30. Wilder-Smith A, Schwartz E. Dengue in travelers. *N Engl J Med* 2005; 353(9): 924–32.
31. Pandey BD, Igarashi A. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. *Microbiol Immunol* 2000; 44(3): 179–88.
32. Anzai S, Fukuda M, Otsuka Y, Eshita Y. Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of dengue type 2 virus isolated in the Dominican Republic. *Virus Genes* 2004; 29(2): 219–27.
33. Halstead SB. Antibodies determine virulence in dengue. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1171 Suppl 1: E48–56.
34. Álvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vázquez S, Morier L, Gonzalez D et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75(6): 1113–7.
35. Guzmán MG, Kouri G, Valdés L, Bravo J, Vázquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Pública* 2002; 11(4): 223–7.
36. Guzmán MG, Kouri G, Bravo J, Soler M, Martínez E. Sequential infection as risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) during the 1981 dengue hemorrhagic Cuban epidemic. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86(3): 367.
37. Ong A, Sandar M, Chen MI, Sin LY. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. *Int J Infect Dis* 2007; 11(3): 263–7.
38. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* 2000; 74(17): 7814–23.
39. Edgil D, Diamond MS, Holden KL, Paranjape SM, Harris E. Translation efficiency determines differences in cellular infection among dengue virus type 2 strains. *Virology* 2003; 317(2): 275–90.
40. Holmes EC. RNA virus genomics: a world of possibilities. *J Clin Invest* 2009; 119(9): 2488–95.
41. Shu PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC et al. Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003–2007: geographic distribution and genotype shift. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80(6): 1039–46.
42. Koraka P, Williams MM, Djamiatun K, Setiati TE, van Batenburg FH, Stittelaar KJ et al. RNA secondary structures in the proximal 3'UTR of Indonesian Dengue 1 virus strains. *Virus Res* 2009; 142(1–2): 213–6. Epub 2009 Mar 13.
43. Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(5): 427–34.
44. Rabablk J, Wasi C, Kinney R, Kasisith J, Pitidhambarn D, Ubol S. Attenuating characteristics of DEN-2 PDK53 in flavivirus-naïve peripheral blood mononuclear cells. *Vaccine* 2007; 25(19): 3896–905.
45. Ubol S, Charoensirisuthigul T, Kasisith J, Klungthong C. Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. *Virology* 2008; 376(2): 290–6.
46. Cummings DA, Schwartz IB, Billings L, Shaw LB, Burke DS. Dynamic effects of antibody-dependent enhancement on the fitness of viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(42): 15259–64.
47. Recker M, Blyuss KB, Simmons CP, Hien TT, Wills B, Farrar J, Gupta S. Immunological serotype interactions and their effect on the epidemiological pattern of dengue. *Proc Biol Sci* 2009; 276(1667): 2541–8. Epub 2009 Apr 15.
48. Morens DM. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis* 1994; 19(3): 500–12.
49. Boonnak K, Slike BM, Burgess TH, Mason RM, Wu SJ, Sun P et al. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol* 2008; 82(8): 3939–51.
50. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the Fc γ receptor IIA cytoplasmic domain in antibody dependent enhancement of dengue virus infection. *J Gen Virol* 2009; [Epub ahead of print].
51. Jin X. Cellular and molecular bases of antibody-dependent enhancement in human dengue pathogenesis. *Future Virol* 2008; 3(4): 343–61.
52. Klasse PJ, Sattentau QJ. Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J Gen Virol* 2002; 83(Pt 9): 2091–108.
53. Pierson TC, Xu Q, Nelson S, Oliphant T, Nybakken GE, Fremont DH et al. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. *Cell Host Microbe* 2007; 1(2): 135–45.
54. Rodrigo WW, Block OK, Lane C, Sukupolvi-Petty S, Goncalvez AP, Johnson S et al. Dengue virus neutralization is modulated by IgG antibody subclass and Fc γ receptor subtype. *Virology* 2009; 394(2): 175–82. Epub 2009 Oct 14.
55. Goncalvez AP, Engle RE, St Claire M, Purcell RH, Lai CJ. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection *in vitro* and *in vivo* and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(22): 9422–7.
56. Yamanaka A, Kosugi S, Konishi E. Infection-enhancing and -neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *J Virol* 2008; 82(2): 927–37.
57. Lai CJ, Goncalvez AP, Men R, Wernly C, Donau O, Engle RE, Purcell RH. Epitope determinants of a chimpanzee dengue virus type 4 (DENV-4)-neutralizing antibody and protection against DENV-4 challenge in mice and rhesus monkeys

- by passively transferred humanized antibody. *J Virol* 2007; 81(23): 12766-74. Epub 2007 Sep 19.
58. van der Schaar HM, Wilschut JC, Smit JM. Role of antibodies in controlling dengue virus infection. *Immunobiology* 2009; [Epub ahead of print].
59. Rodrigo WW, Jin X, Blackley SD, Rose RC, Schlesinger JJ. Differential enhancement of dengue virus immune complex infectivity mediated by signaling-competent and signaling-incompetent human Fcgamma RIA (CD64) or FcgammaRIIA (CD32). *J Virol* 2006; 80(20): 10128-38.
60. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the Fc γ receptor IIA cytoplasmic domain in antibody dependent enhancement of dengue virus infection. *J Gen Virol* 2010 Jan;91(Pt 1):103-11.
61. Rothman AL. T lymphocyte responses to heterologous secondary dengue virus infections. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171 Suppl 1: E36-41.
62. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53(3): 287-99.
63. Dong T, Moran E, Vinh Chau N, Simmons C, Luhn K, Peng Y et al. High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. *PLoS One* 2007; 2(12): e1192.
64. Imrie A, Meeks J, Gurary A, Sukhbataar M, Kitsutani P, Effler P, Zhao Z. Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. *J Virol* 2007; 81(18): 10081-91. Epub 2007 Jul 11.
65. Beaumier CM, Mathew A, Bashyam HS, Rothman AL. Cross-reactive memory CD8(+) T cells alter the immune response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. *J Infect Dis* 2008; 197(4): 608-17.
66. Mangada MM, Rothman AL. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J Immunol* 2005; 175(4): 2676-83.
67. Beaumier CM, Rothman AL. Cross-reactive memory CD4+ T cells alter the CD8+ T-cell response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. *Viral Immunol* 2009; 22(3): 215-9.
68. Leong AS, Wong KT, Leong TY, Tan PH, Wannakrairat P. The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Semin Diagn Pathol* 2007; 24(4): 227-36.
69. Levy A, Valero N, Espina LM, Añez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; [Epub ahead of print].
70. Yen YT, Chen HC, Lin YD, Shieh CC, Wu-Hsieh BA. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol* 2008; 82(24): 12312-24.
71. Vásquez-Ochoa M, García-Cordero J, Gutiérrez-Castañeda B, Santos-Argumedo L, Villegas-Sepúlveda N, Cedillo-Barón L. A clinical isolate of dengue virus and its proteins induce apoptosis in HMEC-1 cells: a possible implication in pathogenesis. *Arch Virol* 2009; 154(6): 919-28.
72. Phuong HL, Thai KT, Nga TT, Giao PT, Hung le Q, Binh TQ et al. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63(4): 372-8.
73. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmeca S, Auethavornanan K et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* 2006; 193(8): 1078-88.
74. Chen MC, Lin CF, Lei HY, Lin SC, Liu HS, Yeh TM, et al. Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J Immunol* 2009; 183(3): 1797-803.
75. Rawlinson SM, Pryor MJ, Wright PJ, Jans DA. CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. *J Biol Chem* 2009; 284(23): 15589-97.
76. Jaiyen Y, Masrinoul P, Kalayanaroj S, Pulmanausahakul R, Ubol S. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol* 2009; 53(8): 442-50.
77. Levy A, Valero N, Espina LM, Añez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104(1): 16-23.
78. Valero N, Larreal Y, Espina LM, Reyes I, Maldonado M, Mosquera J. Elevated levels of interleukin-2 receptor and intercellular adhesion molecule 1 in sera from a venezuelan cohort of patients with dengue. *Arch Virol* 2008; 153(1): 199-203.
79. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S et al. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS One* 2010; 5(1): e8709.
80. Chen RF, Yang KD, Wang L, Liu JW, Chiu CC, Cheng JT. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101(11): 1106-13.
81. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol* 2006; 87(Pt 12): 3623-30.
82. Rachman A, Rinaldi I. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. *Acta Med Indones* 2006; 38(2): 105-8.
83. Tsai YT, Chang SY, Lee CN, Kao CL. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication *in vitro*. *Cell Microbiol* 2009; 11(4): 604-15.
84. Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, Lin YL, et al. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol* 2005; 174(12): 8163-72.
85. Mazzon M, Jones M, Davidson A, Chain B, Jacobs M. Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *J Infect Dis* 2009; 200(8): 1261-70.
86. Nascimento EJ, Silva AM, Cordeiro MT, Brito CA, Gil LH, Braga-Neto U et al. Alternative complement pathway desregulation is correlated with dengue severity. *PLoS One* 2009; 4(8): e6782.

Dirección para correspondencia:
Yunys Pérez Betancourt
Libertad Núm. 183 entre 4ta y 5ta,
Mantilla Arollo Naranjo.
Ciudad de la Habana. Cuba.