



**Universidad Surcolombiana**

**- USCO -**

**NIT 891.180.084-2**



Neiva, 15 de dic. de 14.

Señores

**CONSEJO DE FACULTAD**

Facultad de Salud

Universidad Surcolombiana

Neiva

Cordial saludo.

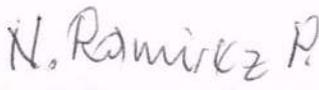
Como Jurados del Trabajo de grado del Posgrado de Pediatría titulado **"CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS TOTALES Y ESPECÍFICAS DE PROTEÍNA DE ENVOLTURA DEL VIRUS DENGUE EN NIÑOS CON INFECCIÓN NATURAL Y SU ASOCIACIÓN CON LA SEVERIDAD CLÍNICA"**, presentado por la Residente Jessica Fernanda Toro Maldonado y Dirigido por el Dr. Carlos Fernando Narváez, proponemos que a éste trabajo se le de el aval de ustedes para el reconocimiento de "Laureada" otorgado por el Consejo Académico, por las siguientes razones:

- Fue un trabajo de grado bien escrito y su defensa fue sobresaliente.
- Los aportes al conocimiento mundial en la respuesta inmune a dengue son muy relevantes, en especial para la búsqueda de correlatos de protección para la vacuna de dengue que esta actualmente en proceso de licenciamiento para uso en humanos.
- Esta en preparación un artículo que será sometido a revista extranjera categorizada A1.
- Los resultados del trabajo fueron presentados en 1 evento internacional, 3 nacionales y 1 regional.
- El trabajo de grado es un producto de proyecto que tiene financiación externa por Colciencias.

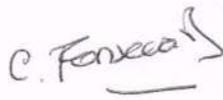
Por todo lo anterior el comité evaluador propone que este trabajo sea reconocido con el grado de Laureado.

Quedaremos atentos para aclarar cualquier inquietud.

Cordialmente,

  
**Dr. Nelson Ramírez P.**  
**Jurado 1**

  
**Dr. Milton Molano**  
**Jurado 2**

  
**Dr. Carlos Fonseca**  
**Jurado 3**

Neiva, 15 de dic. de 14.

Señores

**CONSEJO DE FACULTAD**

Facultad de Salud

Universidad Surcolombiana

Neiva

Cordial saludo.

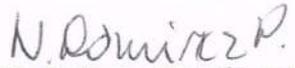
Como Jurados del Trabajo de grado del Posgrado de Pediatría titulado **"CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS TOTALES Y ESPECÍFICAS DE PROTEÍNA DE ENVOLTURA DEL VIRUS DENGUE EN NIÑOS CON INFECCIÓN NATURAL Y SU ASOCIACIÓN CON LA SEVERIDAD CLÍNICA"**, presentado por la Residente Jessica Fernanda Toro Maldonado y Dirigido por el Dr. Carlos Fernando Narváez, proponemos que a éste trabajo se le de el aval de ustedes para el reconocimiento de "Laureada" otorgado por el Consejo Académico, por las siguientes razones:

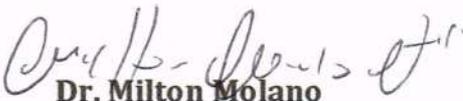
- Fue un trabajo de grado bien escrito y su defensa fue sobresaliente.
- Los aportes al conocimiento mundial en la respuesta inmune a dengue son muy relevantes, en especial para la búsqueda de correlatos de protección para la vacuna de dengue que esta actualmente en proceso de licenciamiento para uso en humanos.
- Esta en preparación un artículo que será sometido a revista extranjera categorizada A1.
- Los resultados del trabajo fueron presentados en 1 evento internacional, 3 nacionales y 1 regional.
- El trabajo de grado es un producto de proyecto que tiene financiación externa por Colciencias.

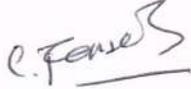
Por todo lo anterior el comité evaluador propone que este trabajo sea reconocido con el grado de Laureado.

Quedaremos atentos para aclarar cualquier inquietud.

Cordialmente,

  
**Dr. Nelson Ramírez P.**  
Jurado 1

  
**Dr. Milton Molano**  
Jurado 2

  
**Dr. Carlos Fonseca**  
Jurado 3

	<b>GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS</b>					  	
	<b>DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO</b>						
<b>CÓDIGO</b>	<b>AP-BIB-FO-07</b>	<b>VERSIÓN</b>	<b>1</b>	<b>VIGENCIA</b>	<b>2014</b>	<b>PÁGINA</b>	<b>1 de 4</b>

**TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:** CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE CELULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS TOTALES Y ESPECIFICAS DE PROTEINA DE ENVOLTURA DEL VIRUS DENGUE EN NIÑOS CON INFECCION NATURAL Y SU ASOCIACIÓN CON LA SEVERIDAD CLÍNICA

**AUTOR O AUTORES:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
<b>TORO MALDONADO</b>	<b>JESSICA FERNANDA</b>

**DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
<b>NARVAEZ ROJAS</b>	<b>CARLOS FERNANDO</b>

**ASESOR (ES):**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE: PEDIATRA**

**FACULTAD: MEDICINA**

**PROGRAMA O POSGRADO: PEDIATRIA**

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://www.usco.edu.co), link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

	<b>GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS</b>					  	
	<b>DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO</b>						
<b>CÓDIGO</b>	<b>AP-BIB-FO-07</b>	<b>VERSIÓN</b>	<b>1</b>	<b>VIGENCIA</b>	<b>2014</b>	<b>PÁGINA</b>	<b>2 de 4</b>

**CIUDAD:** NEIVA                      **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2014                      **NÚMERO DE PÁGINAS:** 89

**TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):**

Diagramas\_\_\_ Fotografías\_\_\_ Grabaciones en discos\_\_\_ Ilustraciones en general\_\_\_ Grabados\_\_\_ Láminas\_\_\_  
 Litografías\_\_\_ Mapas\_\_\_ Música impresa\_\_\_ Planos\_\_\_ Retratos\_\_\_ Sin ilustraciones\_\_\_ Tablas o Cuadros X

**SOFTWARE** requerido y/o especializado para la lectura del documento: Adobe

**MATERIAL ANEXO:** CD

**PREMIO O DISTINCIÓN** (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria): Sometida a tesis Laureada

**PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:**

Español

1. Dengue
2. Células secretoras de anticuerpos
3. ELISPOT
4. Plasmablastos

Inglés

1. Dengue
2. Antibody-secreting cells
3. ELISPOT
4. Plasmablast

**RESUMEN DEL CONTENIDO:** (Máximo 250 palabras)

El dengue constituye un serio problema de salud pública. La infección sintomática por virus dengue afecta a 100 millones de personas y se reportan 25,000 muertes anualmente en el mundo. Aunque la fisiopatología de la enfermedad no es completamente entendida, se sabe que el sistema inmune desempeña un papel crítico en ella y factores como el complemento, las citocinas y los anticuerpos virus-específicos han sido relacionados con la patogénesis. Los anticuerpos (Ac) juegan un papel relevante en la protección y la fisiopatología de la enfermedad y han sido blanco extensivo de estudios. Sin embargo, hasta hace poco se empezó a conocer las características de las células secretoras de anticuerpos (CSA) inducida por la infección



natural con dengue, así que la información disponible acerca de ellas es aún limitada. Particularmente, son desconocidas la características de las CSA durante una infección primaria, las diferencias de la respuesta de CSA en relación con la edad y la asociación entre la magnitud de la respuesta y la severidad clínica. Estos aspectos son de especial interés para las vacunas de dengue que están actualmente en evaluación. Usando citometría de flujo multiparamétrica, ELISPOT de dos colores y ELISA, aquí se caracterizó la cinética, isotipo, reactividad y relación de la severidad clínica con la respuesta de CSA totales y específica para proteína de envoltura (Prot E) inducida por la infección con dengue, en 116 niños con infección primaria (1a) o secundaria (2a) y diferentes grados de severidad clínica. De notar, 34 de los niños analizados con infección 1a fueron lactantes (<12 meses de edad). Comparado con la infección 2a, la respuesta de CSA totales y E-específica en lactantes fue retardada y de menor magnitud. Tinción intracelular de las CSA circulantes con anti-isotipos mostró que en niños con infección 1a, las CSA IgM fueron predominantes en lactantes pero no en niños mayores. Consistentemente, fue encontrada una correlación negativa entre la frecuencia de CSA IgM totales y prot E-específicas y la edad, que no

existió para las CSA IgG en infección 1a o 2a. Sólo las CSA IgG prot E-específicas correlacionaron débilmente con los respectivos títulos de Ac plasmáticos en niños con infección subsecuente. La respuesta de CSA específicas fue altamente "cross- reactiva" entre los 4 serotipos, independientemente del tipo de infección. No hubo diferencia en la respuesta de CSA totales y prot E-específicas entre niños con dengue sin signos de alarma y niños severamente enfermos. Sin embargo, al clasificarlos en infecciones 1a y 2a, niños con infección primaria y dengue severo tuvieron significativamente más alta frecuencia de CSA IgM totales y E-específicas que niños con formas clínicamente leves. Así, la respuesta de CSA circulantes inducida por dengue en población pediátrica mostró importantes diferencias que dependen del tipo de infección y de la edad en la que ésta ocurre. Estos resultados son de especial relevancia para las vacunas contra dengue que están actualmente en prueba.

**ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)**

Dengue is a serious public health problem. The symptomatic infection caused by dengue virus affects 100 million of people and is responsible of 25,000 fatal cases worldwide per year. The Pathophysiology of the illness is not completely understood, however is widely accepted that immune system plays a critical role in the disease, and factors such as the complement, cytokines and antibodies have been implied. The antibodies (Ab) plays a relevant role in the protection as well as pathophysiology of these illness, and they have been objective of a lot of studies. However, just a short time ago we started to know the main characteristics of antibody-secreting cells (ASC) induced by the dengue infection, so the information about them is still limited, particularly, issues like the ASC response in primary infection, their changes age-related and the association of the magnitude of the response with the clinical severity are controversial. Here, using multi-parametric flow cytometry, two color ELISPOT and ELISA in 116 children with primary (1<sup>st</sup>) or secondary (2<sup>nd</sup>) infection and clinically ranging from no warning signs to severe dengue, we determine the dynamic, isotype expression, reactivity and association of clinical severity with the frequency of total and envelop (E)-protein specific ASC inducted by dengue infection. Of note, 34 of the analyzed children with primary infection were infants (<12 months old). Compared to secondary infection, the total and E-specific ASC response in infants was delayed and lower magnitude. Intracellular staining of bulk of ASC with anti-

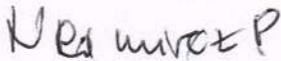
	<b>GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS</b>				  		
	<b>DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO</b>						
<b>CÓDIGO</b>	<b>AP-BIB-FO-07</b>	<b>VERSIÓN</b>	<b>1</b>	<b>VIGENCIA</b>	<b>2014</b>	<b>PÁGINA</b>	<b>4 de 4</b>

isotypes show that IgM was the immunoglobulin predominantly expressed in infants but not in older children and a significant negative correlation was found between the frequency of prot E-specific ASC and the age, which didn't exist for ASC IgG in 1<sup>st</sup> or 2<sup>nd</sup> infection. Only IgG Prot E-specific ASC correlated with the respective serum titers in children with subsequent infection. Globally, the ASC response was highly cross-reactive between 4 dengue serotypes. Finally, there was no significant differences in the frequency of total and prot E-specific ASC circulating in children with no severe

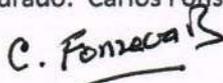
and severe dengue. However, when classified in 1a and 2a infections, higher frequency of specific IgM ASC was found in severely ill children with primary dengue infection. Thus, the response of circulating ASC in pediatric dengue showed important differences depending of type of infection and age in which the infection is got. These results have special implications for the vaccines against dengue that are currently in testing

**APROBACION DE LA TESIS**

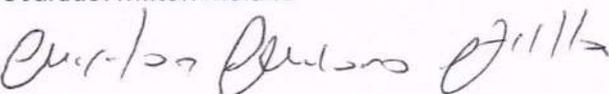
Nombre Presidente Jurado: Nelson Ramírez

Firma: 

Nombre Jurado: Carlos Fonseca

Firma: 

Nombre Jurado: Milton Molano

Firma: 

**Nota de aceptación:**

SI.

BUEN TRABAJO

SE MANDA NOTAR CON LO QUE  
FIRMAMOS PARA RECONOCERLO  
COMO EL SUYO LAUREDO

H. Romero R.

Firma del presidente del jurado

*[Handwritten signature]*

Firma del jurado

*[Handwritten signature]*

Firma del jurado

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE CELULAS SECRETORAS DE  
ANTICUERPOS TOTALES Y ESPECIFICAS DE PROTEINA DE ENVOLTURA  
DEL VIRUS DENGUE EN NIÑOS CON INFECCION NATURAL Y SU  
ASOCIACIÓN CON LA SEVERIDAD CLÍNICA

JESSICA FERNANDA TORO MALDONADO

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA  
NEIVA - HUILA  
2015

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE CELULAS SECRETORAS DE  
ANTICUERPOS TOTALES Y ESPECIFICAS DE PROTEINA DE ENVOLTURA  
DEL VIRUS DENGUE EN NIÑOS CON INFECCION NATURAL Y SU  
ASOCIACIÓN CON LA SEVERIDAD CLÍNICA

JESSICA FERNANDA TORO MALDONADO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Especialista en  
Pediatria.

Asesor

CARLOS FERNANDO NARVAEZ ROJAS  
MD, M.Sc., Ph D.  
Grupo de parasitología y medicina tropical

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA  
NEIVA - HUILA  
2015

**Nota de aceptación:**

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

-----  
Firma del presidente del jurado

-----  
Firma del jurado

-----  
Firma del jurado

Neiva, Enero del 2015.

## DEDICATORIA

***A Dios por regalarme una vida llena de oportunidades, a mi familia por creer en mí y apoyarme siempre y al Doctor Carlos por toda su paciencia.***

*Jessica Fernanda*

## **AGRADECIMIENTOS**

La autora expresa sus agradecimientos:

A los niños que aceptaron participar voluntariamente en el estudio.

A mis compañeros residentes y a los docentes que colaboraron en la fase de inclusión de los pacientes.

A COLCIENCIAS por la financiación de esta idea a través del proyecto 112451929049.

A todos mil gracias...

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	22
4.1 CARACTERISTICAS DEL VIRUS DENGUE	22
4.2 PATOGENESIS DEL DENGUE	23
4.3 INMUNOPATOGENESIS DENGUE	24
4.3.1 Proteínas del complemento en la infección por dengue	25
4.3.2 El papel de los anticuerpos en la infección por VD	25
4.3.3 Estado del arte: Células B en la infección por Virus Dengue	25
4.4 CARACTERISTICAS CLINICAS Y MANEJO DEL DENGUE	29
5. HIPOTESIS	32
6. METODOLOGIA	33
6.1 TIPO DE ESTUDIO	33
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.2.1 Cohorte de estudio	33
6.2.2 Muestras de sangre	34

	Pág.
6.2.3	Detección de NS1, IgM e IgG VD-específicas en plasma para diagnóstico de dengue y clasificación de infección primaria y secundaria <span style="float: right;">35</span>
6.2.4	Aislamiento del ARN y tipificación del serotipo de VD causante de la infección <span style="float: right;">36</span>
6.2.5	Detección de CSA por citometría de flujo <span style="float: right;">36</span>
6.2.6	Detección de CSA totales y VD-específicas por ELISPOT de dos colores <span style="float: right;">37</span>
6.2.7	Identificación de IgM e IgG intracelulares en CSA circulantes por CF <span style="float: right;">37</span>
6.2.8	Detección de IgG e IgM específicas de proteína E en plasma <span style="float: right;">38</span>
6.3	SEGUIMIENTO CLINICO <span style="float: right;">38</span>
6.4	ANALÍISIS ESTADISTICO <span style="float: right;">39</span>
6.5	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES <span style="float: right;">40</span>
7.	RESULTADOS <span style="float: right;">42</span>
7.1	CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS, CLINICAS Y PARACLINICAS <span style="float: right;">42</span>
7.2	CINÉTICA DE LAS CSA EN NIÑOS CON INFECCIÓN POR VD <span style="float: right;">42</span>
7.3	RESPUESTA DE CSA TOTALES Y ESPECÍFICA ES MODULADA POR LA EDAD <span style="float: right;">43</span>
7.3.1	La respuesta de CSA Proteína E-específica de dengue es modulada por la edad <span style="float: right;">45</span>
7.4	RELACION DE LA RESPUESTA DE CSA CIRCULANTES Y LA SEVERIDAD CLÍNICA <span style="float: right;">45</span>
7.5	FRECUENCIA DE CSA ESPECIFICAS DE PROTEINA E CIRCULANTES Y SU ASOCIACION CON LOS TITULOS DE ANTICUERPOS SÉRICOS <span style="float: right;">46</span>
8.	ASPECTOS ÉTICOS <span style="float: right;">55</span>
9.	DISCUSIÓN <span style="float: right;">56</span>
10.	CONCLUSIONES <span style="float: right;">60</span>

	Pág.
11. RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFIA	62
ANEXOS	71

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1</b> Características demográficas y clínicas de los niños incluidos en el estudio	47

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1</b>	Cinética de las CSA circulantes en sangre periférica, medidas por citometría de flujo multiparamétrica	48
<b>Figura 2</b>	Respuesta de CSA en lactantes y niños menores, determinada por citometría de flujo multiparamétrica con marcadores intracelulares	49
<b>Figura 3</b>	Respuesta de las CSA IgM e IgG totales y específicas para Prot E, en infección primaria y secundaria medida por ELISPOT y su relación con la edad de los pacientes	50
<b>Figura 4</b>	Frecuencia de CSA totales y específicas para Prot E, medidas por ELISPOT y su relación con la severidad clínica	51
<b>Figura 5</b>	Frecuencia de CSA isotipo M y G totales y específicas para Prot E, medidas por ELISPOT en infección primaria y secundaria	52
<b>Figura 6</b>	Comparación de los títulos de anticuerpos G y M específicos para la Prot E, en niños con infección primaria vs secundaria	53
<b>Figura 7</b>	La respuesta de CSA y los niveles de anticuerpos son dependientes de la edad y el tipo de infección por VD	53

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo A</b> PCR Convensional	72
<b>Anexo B</b> Formato de recolección de datos demográficos, clínicos y para clínicos	73
<b>Anexo C</b> Consentimiento informado	76

## RESUMEN

El dengue constituye un serio problema de salud pública. La infección sintomática por virus dengue afecta a 100 millones de personas y se reportan 25,000 muertes anualmente en el mundo. Aunque la fisiopatología de la enfermedad no es completamente entendida, se sabe que el sistema inmune desempeña un papel crítico en ella y factores como el complemento, las citocinas y los anticuerpos virus-específicos han sido relacionados con la patogénesis. Los anticuerpos (Ac) juegan un papel relevante en la protección y la fisiopatología de la enfermedad y han sido blanco extensivo de estudios. Sin embargo, hasta hace poco se empezó a conocer las características de las células secretoras de anticuerpos (CSA) inducida por la infección natural con dengue, así que la información disponible acerca de ellas es aún limitada. Particularmente, son desconocidas la características de las CSA durante una infección primaria, las diferencias de la respuesta de CSA en relación con la edad y la asociación entre la magnitud de la respuesta y la severidad clínica.

Estos aspectos son de especial interés para las vacunas de dengue que están actualmente en evaluación. Usando citometría de flujo multiparamétrica, ELISPOT de dos colores y ELISA, aquí se caracterizó la cinética, isotipo, reactividad y relación de la severidad clínica con la respuesta de CSA totales y específica para proteína de envoltura (Prot E) inducida por la infección con dengue, en 116 niños con infección primaria (1ª) o secundaria (2ª) y diferentes grados de severidad clínica. De notar, 34 de los niños analizados con infección 1ª fueron lactantes (<12 meses de edad). Comparado con la infección 2ª, la respuesta de CSA totales y E-específica en lactantes fue retardada y de menor magnitud. Tinción intracelular de las CSA circulantes con anti-isotipos mostró que en niños con infección 1ª, las CSA IgM fueron predominantes en lactantes pero no en niños mayores. Consistentemente, fue encontrada una correlación negativa entre la frecuencia de CSA IgM totales y prot E-específicas y la edad, que no existió para las CSA IgG en infección 1ª o 2ª. Sólo las CSA IgG prot E-específicas correlacionaron débilmente con los respectivos títulos de Ac plasmáticos en niños con infección subsecuente.

La respuesta de CSA específicas fue altamente “cross-reactiva” entre los 4 serotipos, independientemente del tipo de infección. No hubo diferencia en la respuesta de CSA totales y prot E-específicas entre niños con dengue sin signos de alarma y niños severamente enfermos. Sin embargo, al clasificarlos en infecciones 1ª y 2ª, niños con infección primaria y dengue severo tuvieron significativamente más alta frecuencia de CSA IgM totales y E-específicas que niños con formas clínicamente leves. Así, la respuesta de CSA circulantes inducida por dengue en población pediátrica mostró importantes diferencias que dependen del tipo de infección y de la edad en la que ésta ocurre. Estos

resultados son de especial relevancia para las vacunas contra dengue que están actualmente en prueba.

Palabras Claves. Dengue, Células secretoras de anticuerpos, ELISPOT, Plasmablastos.

## ABSTRACT

Dengue is a serious public health problem. The symptomatic infection caused by dengue virus affects 100 million of people and is responsible of 25,000 fatal cases worldwide per year. The Pathophysiology of the illness is not completely understood, however is widely accepted that immune system plays a critical role in the disease, and factors such as the complement, cytokines and antibodies have been implied. The antibodies (Ab) plays a relevant role in the protection as well as pathophysiology of these illness, and they have been objective of a lot of studies. However, just a short time ago we started to know the main characteristics of antibody-secreting cells (ASC) induced by the dengue infection, so the information about them is still limited, particularly, issues like the ASC response in primary infection, their changes age-related and the association of the magnitude of the response with the clinical severity are controversial. Here, using multi-parametric flow cytometry, two color ELISPOT and ELISA in 116 children with primary (1<sup>st</sup>) or secondary (2<sup>nd</sup>) infection and clinically ranging from no warning signs to severe dengue, we determine the dynamic, isotype expression, reactivity and association of clinical severity with the frequency of total and envelop (E)-protein specific ASC induced by dengue infection. Of note, 34 of the analyzed children with primary infection were infants (<12 months old). Compared to secondary infection, the total and E-specific ASC response in infants was delayed and lower magnitude. Intracellular staining of bulk of ASC with anti-isotypes show that IgM was the immunoglobulin predominantly expressed in infants but not in older children and a significant negative correlation was found between the frequency of prot E-specific ASC and the age, which didn't exist for ASC IgG in 1<sup>st</sup> or 2<sup>nd</sup> infection. Only IgG Prot E-specific ASC correlated with the respective serum titers in children with subsequent infection.

Globally, the ASC response was highly cross-reactive between 4 dengue serotypes. Finally, there was no significant differences in the frequency of total and prot E-specific ASC circulating in children with no severe and severe dengue. However, when classified in 1<sup>a</sup> and 2<sup>a</sup> infections, higher frequency of specific IgM ASC was found in severely ill children with primary dengue infection. Thus, the response of circulating ASC in pediatric dengue showed important differences depending of type of infection and age in which the infection is got. These results have special implications for the vaccines against dengue that are currently in testing.

Key words. Dengue, antibody-secreting cells , ELISPOT, Plasmablast.

## GLOSARIO

Ac	Anticuerpos
ADA	Amplificación dependiente de anticuerpos
Ag	Antígeno
ARN	Acido ribonucleico
CF	Citometría de flujo
CSA	Células Secretoras de Anticuerpos
DCSA	Dengue con signos de alarma
DS	Dengue Severo
DSSA	Dengue sin signos de alarma
DC-SIG	Molécula de adhesión específica de célula dendrítica (Dendritic Cell- Specific Intercellular adhesion molecule- Grabbing Non-integrin)
E	Envoltura
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ELISPOT	Ensayo de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas (Enzyme- Linked ImmunoSorbent SPOT)
Ig	Inmunoglobulina
ICAM	Molécula de adhesión intracelular (( <a href="#">Intercellular Adhesion Molecule</a> ))
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
M	Membrana
NS	Proteína no estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud
Prot-E	Proteína de Envoltura
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
VD	Virus Dengue

## INTRODUCCIÓN

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores más importante a nivel mundial con una incidencia anual estimada de 100 millones de personas con infecciones sintomáticas, 500,000 de ellos afectados por formas severas de la enfermedad (Murray, Quam et al. 2013). Durante el año 2013 en Colombia se confirmaron 62,132 casos de dengue, el 2.5% de los casos correspondió a dengue severo con 148 casos fatales confirmados (Mercado 2013).

La prevalencia y mortalidad de la infección por dengue ha motivado el estudio de los factores involucrados en su patogénesis. La respuesta inmune al virus ha sido propuesta como un eje fundamental responsable de eventos fisiopatológicos de la infección. De ella, los anticuerpos (Ac) séricos virus-específicos juegan un papel dual en la infección frente al dengue. Ac homotípicos neutralizantes han sido asociados con protección. Sin embargo, preexistencia de Ac heterotípicos subneutralizantes o no neutralizantes puede incrementar la captación e infección de células inmunes por el virus (fenómeno conocido como amplificación dependiente de anticuerpos [ADA]). Aunque los Ac séricos virus-específicos en dengue han sido extensamente estudiados, muchos aspectos de las células secretoras de anticuerpos (CSA) encargadas de producir dichos Ac son desconocidos.

El análisis de las CSA sobre los Ac, permitiría en teoría por ejemplo evaluar aspectos de la respuesta inmune generada frente al virus actualmente infectante, sin interferencia dada por Ac séricos preexistentes. Previamente en el estudio de otros virus como el rotavirus y el virus de la influenza, el análisis de las CSA ha proporcionado invaluable información que permiten el mejor entendimiento de aspectos inmunes como los patrones de migración celular y el análisis de la reactividad de dichas células (Gonzalez, Jaimes et al. 2003, Wrammert, Smith et al. 2008). Además, para el caso del virus de la influenza, el análisis de la cinética de la respuesta de CSA específicas para el virus en adultos vacunados permitió usarlas como punto de partida para la generación de Ac monoclonales humanos virus específicos, algunos de ellos con alta actividad neutralizante (Wrammert, Smith et al. 2008). En el presente trabajo se caracterizó fenotípica y funcionalmente a las células secretoras de anticuerpos (CSA) totales y específicas de virus dengue (VD), inducidas por la infección natural en niños.

Para el caso del dengue, sólo recientemente se enfocó la atención en la CSA que circulan en la fase aguda de pacientes infectados con dengue (Balakrishnan, Bela-Ong et al. 2011). Los pocos estudios existentes consistentemente muestran que la infección induce una fuerte respuesta de CSA, que es dominada por células IgG+

de reactividad cruzada. A pesar de esto, muchos aspectos de la inmunobiología de las CSA en dengue y otros aspectos como sus características siguen siendo blanco de debate o aún son desconocidos.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue en el 2012 fue nuevamente clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante del mundo, debido a la rápida propagación geográfica del virus y su vector en áreas que previamente no estaban afectadas y a la gran carga económica que trae esta enfermedad (Murray, Quam et al. 2013). Cerca 3.6 billones de personas viven en áreas tropicales y subtropicales, donde tienen riesgo de adquirir la infección por el VD (Ferreira 2012). La estimación global varía, pero se acepta que aproximadamente 96 millones de casos nuevos de dengue sintomático ocurren al año, 500,000 episodios son dengue severo (DS) y más de 20,000 muertes por dengue se reportan anualmente (Murray, Quam et al. 2013).

En América Latina durante el 2010, se registraron más de 1.6 millones de casos de dengue, 49,000 de los cuales fueron DS (San Martín, Brathwaite et al. 2010). En Colombia durante el 2013 se reportaron al sistema nacional de vigilancia en salud pública (SIVIGILA) 125,554 casos de dengue, con una incidencia calculada de 469.9 casos por 100,000 habitantes, una de las cifras más altas en América Latina. El porcentaje de letalidad nacional para este año fue de 4.8%, con 148 muertes confirmadas (Mercado 2013).

Estudios epidemiológicos previos, han identificado a la infección secundaria como un factor de riesgo para el desarrollo de formas severas de la enfermedad (Thein, Aung et al. 1997). Esta relación ha motivado desde hace años el estudio del papel del sistema inmune en la fisiopatología de la infección por dengue. Se han logrado establecer relación entre algunos factores inmunes y la severidad clínica de la enfermedad, entre ellos están: La presencia de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes, la formación de complejos Ag-Ac que a su vez activan el complemento, el rápido incremento de los niveles de citoquinas pro inflamatorias, la expresión de marcadores de activación celular como el CD69 y la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA). Sin embargo, a los Ac se les ha descrito un papel dual ya que están involucrados en la protección y la patogénesis. Ac homotípicos y algunos de reacción cruzada contra la proteína de envoltura (E) en son capaces de generar protección (Endy, Nisalak et al. 2004). Por otro lado, Ac heterotípicos no neutralizantes facilitan la entrada del virus a células del sistema monocito-macrófago través de los receptores para la fracción cristalizante gamma (FC $\gamma$ R) (Rothman 2004), incrementando la infección y activación de éstas.

Aunque la respuesta sérica de Ac ha sido extensamente caracterizada, poco se sabe acerca las células secretoras de anticuerpos (CSA) inducidas naturalmente por la infección con VD. A diferencia de la clásica medición de los Ac séricos, cuyo

análisis incluye la acumulación de Ac generados por infecciones previas, la mayor parte de las CSA específicas de VD que circulan en fase aguda de la infección podrían ser por ejemplo, inducidas por el serotipo infectante y probablemente no ser afectada por las historia de infecciones previas, como se ha descrito parcialmente para el virus de la influenza (Sasaki, Sullivan et al. 2011). Por otro lado, los linfocitos B (LB) y por lo tanto posiblemente las CSA, tienen funciones inmunes no relacionadas con la producción de inmunoglobulinas y que están asociadas a su capacidad de presentación antigénica.

Debido a la importante función de las CSA y el crítico papel de los Ac en la respuesta del virus dengue, la relación entre estos dos factores es vital para el análisis general de la respuesta inmune, no sólo a la infección natural sino también para la respuesta a vacunas anti-VD que están actualmente en evaluación o aprobación.

Conocer la respuesta de las CSA en los niños con infección por VD y la influencia de factores como la edad, infecciones subsecuentes o su relación con la severidad clínica, ofrecerá la posibilidad de establecer por ejemplo, la edad ideal de vacunación o podría constituirse como un factor predictor de severidad. Por lo anterior, la pregunta que se desea resolver con este trabajos es: ¿Cuáles son las características fenotípicas, reactividad y la frecuencia de las CSA generadas en la infección natural por el virus dengue en niños, cuáles son las diferencias dependientes de la edad y si hay relación entre la intensidad de la respuesta de CSA y las características clínicas en niños?

## 2. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas la transmisión del VD ha aumentado, se estima que 3.6 billones de personas viven en zonas endémicas y son susceptibles a la infección. En estudios realizados en América Latina (con datos disponibles de la OPS, 2000-2007), se calculó un costo anual de 2.1 billones de dólares para la atención de los pacientes con dengue. A pesar de esto, aún no se cuenta con medicamentos para el manejo. Recientemente una vacuna tetravalente viva atenuada contra los 4 serotipos ha mostrado prometedores resultados en especial en la prevención de las formas severas de la enfermedad (Villar, Dayan et al. 2014). Sin embargo tomará aún algún tiempo antes de que ésta sea licenciada en el país y se conozcan resultados de eficacia resultantes de su aplicación masiva.

Se sabe que el sistema inmune juega un papel crítico en la patogénesis del dengue y en estudios previos se ha descrito el papel de los Ac en la amplificación de la infección en células inmunes (Dejnirattisai, Jumnainsong et al. 2010). Sin embargo, poco se sabe acerca del papel de las CSA, quienes producen estos Ac, en el desarrollo de la enfermedad.

En enfermedades ocasionadas por agentes como rotavirus y el virus de la influenza, el análisis de las CSA ha proporcionado invaluable información para el mejor entendimiento de aspectos inmunes como los patrones de migración celular y el análisis de la reactividad de dichas células. En el caso del virus de la influenza, el análisis de la cinética de la respuesta de CSA específicas para el virus en adultos vacunados, permitió usarlas como punto de partida para la generación de Ac monoclonales humanos virus específicos con una alta actividad neutralizante (3).

El análisis del comportamiento de CSA en pacientes con dengue brindará importante información de la respuesta humoral inducida por el virus infectante actual, a diferencia de lo que sucede cuando se estudia el suero de los pacientes, donde se encuentran anticuerpos circulantes generados en infecciones previas. Se cree que los datos obtenidos en este trabajo pueden tener implicaciones en los estudios de vacunas que actualmente están en prueba, como por ejemplo de cómo se induce la respuesta de CSA en niños lactantes, o niños con infecciones primarias o subsecuentes, quienes seguramente serán una población crítica al momento de la aplicación de una potencial vacuna.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar fenotípica y funcionalmente a las células secretoras de anticuerpos totales y específicos de virus dengue inducidas por la infección natural y su relación con la edad, infecciones previas y las manifestaciones clínicas de niños infectados con dengue.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la frecuencia de las CSA totales y específicas de virus dengue y el isotipo expresado durante la fase aguda en infecciones primarias y secundarias.

Evaluar si la edad de los niños modula la respuesta de CSA a la infección por VD.

Establecer si existe relación entre las CSA totales y específicas con el grado de severidad de la enfermedad.

Establecer si alguno (s) de los factores inmunes antes evaluados se asocian con la severidad clínica.

## 4. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

### 4.1 CARACTERISTICAS DEL VIRUS DENGUE

El virus dengue (VD) hace parte de la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* con cuatro serotipos conocidos (denominados de 1 a 4). Éstos son virus envueltos, icosaédricos, con un genoma constituido por ARN de cadena sencilla y polaridad positiva. La envoltura rodea el core viral y está compuesta de fosfolípidos, además de contener las proteínas de envoltura (E) y de membrana (M). La proteína E es crítica para la unión a receptores celulares y media la fusión con la membrana de la célula hospedera (Simmons, Farrar et al. 2012). El dengue es la arbovirosis más importante a nivel mundial por su alta morbilidad y mortalidad. El *Aedes* es el género del vector, habita en áreas tropicales del mundo, siendo las principales especies transmisoras del VD el *A. aegypti* (en América), *A. albopictus* y *A. polynesiensis* (en Asia) (Halstead 2007).

La infección viral comienza poco después de la inoculación del virus por el vector y allí localmente, se produce la primera replicación en las células blanco. Veinticuatro a 48h después, éstas células migran a ganglios linfáticos locales y regionales, sitio donde se produce una mayor replicación viral debido a la infección de un gran número de células del sistema monocito-macrófago presentes allí. Posteriormente se produce la diseminación del virus a bazo e hígado, causando el pico de viremia entre las 18 y 24h luego del inicio de los síntomas, para finalmente ser aclarada por el sistema inmune (Rothman 2004).

El ciclo viral comprende desde la internalización del virus a la célula blanco (células dendríticas, monocitos, macrófagos), hasta la liberación de nuevas partículas infectantes. La entrada del virus a la célula blanco se produce a través de endocitosis mediada por receptores, siendo el DC-SIGN uno de los más importantes (Tassaneeritthep, Burgess et al. 2003). Otras moléculas, como proteínas de choque térmico, heparán sulfato e ICAM-3 también participan en el proceso, dependiendo del tipo celular analizado (Reyes-Del Valle, Chávez-Salinas et al. 2005, Rodenhuis-Zybert, Wilschut et al. 2010). Luego de la internalización, el ARN viral se traduce a una poliproteína, que es llevada al retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi. Allí sufre modificaciones co y postraduccionales, originando 3 proteínas estructurales (C, M y E) y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Inicialmente, el virus está cubierto por complejos de proteína preM (que caracteriza las partículas inmaduras), pero gracias al ambiente ácido endosomal de la célula hospedera y al clivaje de preM por la proteína celular furina en la red del aparato de Golgi, se convierte en proteína M, se completa la maduración del virión y sus proteínas estructurales son

ancladas a las partículas virales, siempre en asocio con organelos celulares membranosos. Finalmente se ensambla el core formado por la proteína C, conteniendo el ARN viral y se libera la partícula infectante a través de la fusión con la membrana celular hospedera. Partículas virales infectantes inmaduras también son liberadas y pueden ser inductoras de fuerte respuesta de anticuerpos (Clyde, Kyle et al. 2006)..

## **4.2 PATOGENESIS DEL DENGUE**

Aún no se han establecido claramente los factores que intervienen en el desarrollo de ésta enfermedad. Éstos se pueden clasificar en virales o del hospedero. Por ejemplo, se ha descrito una mayor severidad de la enfermedad en infecciones por causadas por serotipos 1 y 2 (Laur, Murgue et al. 1998, Vaughn, Green et al. 2000, Ong, Sandar et al. 2007).

Por otro lado, entre los factores del hospedero, se encuentran los anticuerpos pre-existentes heterotípicos no neutralizantes (existentes en una segunda infección con un serotipo diferente), factores genéticos como polimorfismos del factor de necrosis tumoral [TNF]- $\alpha$  que proceden cuadros menos severos en población afrodescendiente (Fernández-Mestre, Gendzekhadze et al. 2004) o genes del antígeno leucocitario humano (HLA) específicos en población cubana, tailandesa y vietnamita (Loke, Bethell et al. 2001, Zivna, Green et al. 2002), la edad (mayor susceptibilidad en los extremos de la vida) y nivel en circulación de factores inmunes solubles, como citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , asociados positivamente con la severidad clínica (Chakravarti and Kumaria 2006, Chareonsirisuthigul, Kalayanarooj et al. 2007, Martina, Koraka et al. 2009).

Dos eventos son característicos en la fisiopatología del dengue: el aumento de la permeabilidad endotelial y los fenómenos hemorrágicos. Aunque no se ha evidenciado directamente el daño del virus sobre el endotelio, se ha descrito disrupción de la capa de glicocálix endotelial, con la consecuente fuga vascular entre los espacios interendoteliales (Wills, Oragui et al. 2004) . Además, la masiva producción de factores proinflamatorios descritos previamente, la liberación de histamina, factor activador plaquetario y productos del complemento como C3a y C5a, llevan a un estado de vasodilatación que contribuye a éste proceso (Green and Rothman 2006). En adición a la salida de plasma del compartimento intravascular, se produce pérdida de factores de coagulación y destrucción directa de las plaquetas por el virus, que sumado al daño endotelial, producen las manifestaciones hemorrágicas típicas de ésta enfermedad (Gubler 1998). Daño por infección directa del virus sobre órganos como corazón e hígado se han

descrito también en estudios anatomopatológicos de casos fatales de la infección (Salgado, Panqueba et al. 2009, Salgado, Eltit et al. 2010).

#### **4.3 INMUNOPATOGENESIS DENGUE**

En la inmunopatogénesis del dengue actúan diversos factores, muchos de ellos no aclarados totalmente. Uno de los factores inmunes que ha sido más relacionado con la severidad, es la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), que se debe a la presencia de anticuerpos circulantes producidos en infecciones previas o transferidos pasivamente de la madre al feto, que no son neutralizantes en infecciones secundarias por virus heterólogos, pero sí facilitan la entrada del virus en las células diana a través del receptor FcγRII (Halstead, Porterfield et al. 1980, Dejnirattisai, Jumnainsong et al. 2010). El resultado es la infección de un mayor número de células, la producción elevada de proteínas de fase aguda, citocinas y factores quimiotácticos, formación de complejos inmunes y activación del complemento; todo esto crea un ambiente inflamatorio que finalmente lleva al aumento de la permeabilidad capilar, una característica fundamental del dengue severo (Halstead 2007).

La masiva producción de citocinas proinflamatorias por parte de linfocitos T es otro de los mecanismos fisiopatológicos más aceptados que explican las manifestaciones graves presentes en pacientes con dengue. Por ejemplo, se ha demostrado que NS5 induce la secreción de IL-8, un conocido quimioatrayente de neutrófilos, en varias líneas celulares humanas y en cultivos primarios de células dendríticas (Medin, Fitzgerald et al. 2005). Otras citocinas y quimiocinas como IL-6, TNF- $\alpha$  y ST2, además de quimoquinas se han asociado positivamente con la severidad clínica de la enfermedad (Becerra, Warke et al. 2008, Houghton-Triviño, Salgado et al. 2010, Guerrero, Arrieta et al. 2013). A este incremento marcado de citocinas asociado a la infección con VD se le conoce como tormenta de citocinas. (Rothman 2004, Chakravarti and Kumaria 2006, Rothman 2011, Guerrero, Arrieta et al. 2013, Hottz, Medeiros-de-Moraes et al. 2014).

Modelos *in vitro* con células mononucleares de sangre periférica totales o subpoblaciones purificadas como monocitos primarios humanos tratados con DV, han mostrado su activación y secreción de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ , soportando la idea que posiblemente células inmunes son por lo menos parcialmente las responsables del patrón de citocinas encontradas en el plasma de niños infectados con el virus (Huang, Lei et al. 2000, Chaturvedi 2009). Por otro lado en estudio reciente se encontro que los monocitos CD14+CD16+ aumentan la expresión de BAFF/APRIL e IL-10, factores que favorecen la sobrevivencia de células B y su diferenciación de las CSA (Kwissa, Nakaya et al. 2014).

**4.3.1 Proteínas del complemento en la infección por dengue.** Estudios en pacientes con dengue durante la fase de defervencia, periodo dónde se produce fuga vascular, han podido demostrar un aumento en plasma de los productos de degradación del complemento, C3a y C5a, además de acelerado consumo y marcada reducción de los factores del complemento en pacientes que progresan a dengue severo (Nishioka 1974). Se ha podido demostrar que la activación del complemento mediada por NS1 conduce a la generación local y sistémica de anafilotoxinas y C5b-9, el complejo de ataque a membrana, que puede contribuir a la patogénesis de la fuga vascular que se produce durante la fase crítica de los pacientes con dengue (Avirutnan, Punyadee et al. 2006)

**4.3.2 El papel de los anticuerpos en la infección por VD.** El papel de los Ac séricos en dengue ha sido previamente estudiado (Gubler 1998, Green and Rothman 2006, Halstead 2007, Beltramello, Williams et al. 2010, Wahala and Silva 2011). Se sabe que juegan un papel dual en la respuesta inmune al VD; en la primo infección, se genera una respuesta de Ac (principalmente contra la proteína E) que es homotípicamente protectora y de larga duración (Green and Rothman 2006) incluso, esta respuesta es capaz de conferir alguna protección heteróloga en un período próximo a la primo infección (SABIN 1952). Otras proteínas inmunodominantes en la respuesta al virus son la proteína prM (debido a la gran cantidad de partículas virales inmaduras disponibles) y algunas proteínas estructurales como NS1 y NS3. Sin embargo, tiempo después, los Ac generados durante la infección primaria presentan reacción cruzada frente a otros serotipos y su presencia se ha asociado epidemiológicamente a cuadros severos de la enfermedad durante una segunda infección (Sangkawibha, Rojanasuphot et al. 1984, Thein, Aung et al. 1997). Actualmente, es controversial el papel protector de los Ac neutralizantes *in vivo* presentes antes de la infección, capaces de disminuir la viremia e intensidad de las manifestaciones clínicas y un papel protector de estos ha sido demostrado más claramente para el serotipo 3 (Endy, Nisalak et al. 2004). Estudios *in vitro*, usando monocitos y células dendríticas humanas, mostraron que la existencia de estos Ac incrementa la captación e infección viral de la célula y que este incremento en la infección es dependiente de la interacción entre el complejo antígeno (Ag)-Ac IgG y receptores para la fracción constante de las Igs, expresados especialmente sobre la superficie de estos dos tipos celulares (Dejnirattisai, Jumnainsong et al. 2010). El aumento de la infección viral mediada por la ADA es uno de los factores detonantes de la producción de gran cantidad de mediadores solubles inflamatorios previamente descritos.

**4.3.3 Estado del arte: Células B en la infección por Virus Dengue.** Luego del reto antigénico, las células B vírgenes se activan, proliferan y se diferencian en células secretoras de anticuerpos (CSA) o células B de memoria, siendo las primeras las directas responsables de la inducción de los niveles de anticuerpos presentes durante la fase aguda de la infección (Gourley, Wherry et al. 2004).

Fenotípicamente, las CSA expresan marcadores de superficie como que son utilizados para su identificación, como el CD19, CD20<sup>bajo</sup>, CD27<sup>alto</sup> y CD38<sup>alto</sup>. Se denominan plasmablastos cuando el patrón de marcadores de superficie más que su función, es tenido en cuenta para su identificación. La población de CSA circulantes inducida por el reto antigénico es heterogénea. Por ejemplo, sólo una fracción de ellas expresa el marcado CD138, un clásico marcador de células plasmáticas (Kantele, Kantele et al. 1996). En las CSA hay además, una intensa expresión del antígeno Ki-67, un marcador de división celular que soporta el fenotipo de blastos de al menos una fracción de las CSA (Fink 2012).

Tanto en infecciones primarias como en secundarias por DENV, las células B que son activadas, se diferencian a CSA (Wrasmert, Onlamoon et al. 2012) y secretan Ac dirigidos principalmente principalmente contra la proteína E viral, demostrando la inmunodominancia de esta proteína (MeiHui, Vey et al. 2012). Llamativamente, durante la fase aguda de la infección primaria o secundaria, hay un rápido aumento de las CSA que corresponde con el aumento de los Ac de isotipo IgG que tiene reacción cruzada para los otros tres serotipos (Balakrishnan, Bela-Ong et al. 2011).

Para el mejor entendimiento, durante una infección primaria por VD las células B vírgenes situadas en los órganos linfoides secundarios pueden ser activadas y se diferencian a CSA en la zona extrafolicular, proceso que contribuye a la respuesta inmune temprana (Shapiro-Shelef and Calame 2005). Generalmente, estas células no sufren maduración de afinidad y producen Ac de isotipo M. Alternativamente, las células B vírgenes que se unen a antígeno, migran a los centros germinales donde, con ayuda linfocitos T CD4+ a través de la interacción CD40-CD40L, hacen hipermutaciones somáticas y por lo tanto maduración de afinidad. Luego salen a circulación diferenciadas como células de memoria o CSA. Las células B de memoria permanecen en los órganos linfoides secundarios y son capaces de activarse con rapidez después de un reto antigénico secundario, convirtiéndose en CSA. Las CSA, pueden ser identificadas por citometría de flujo como células CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>++</sup> CD21<sup>-</sup>, CD38<sup>++</sup> CD20<sup>inter/bajo</sup>. Se distinguen de las células B de memoria activadas, que éstas tienen expresión intermedia de CD38 y CD27 y expresan mayores niveles de CD20 (Nascimento, Hottz et al. 2014).

La infección aguda por VD resulta en un aumento masivo de CSA circulantes. Aunque no de forma precisa, se ha descrito que el pico está generalmente entre el 4 a 7 día después de la aparición de los síntomas, lo que coincidiendo con la fase crítica de la enfermedad (Balakrishnan, Bela-Ong et al. 2011, Garcia-Bates, Cordeiro et al. 2013). Las CSA pueden llegar a dominar el compartimiento de células B circulante durante la fase aguda de la infección, alcanzando a ser hasta un 70% del total de los linfocitos B circulantes, la gran mayoría de estas CSA son

específicas para VD (Wrarmert, Onlamoon et al. 2012, Zompi, Montoya et al. 2012). Los datos actuales sugieren que la frecuencia de CSA específicas del VD en los individuos con infección secundaria puede ser sustancialmente mayor que la inducida por otras infecciones virales (Garcia-Bates, Cordeiro et al. 2013). Además de la masiva presencia de CSA en circulación, la infección con VD induce la expresión de marcadores de activación y la proliferación en LB. Llamativamente, además de la proliferación, marcadores de muerte celular como el Fas y la Caspasa 3, también han mostrado estar incrementados en los LB circulantes de adultos con infección por VD y aunque no es claro aún, esto tal vez contribuya a la autolimitación de la respuesta inmune. Aún quedan muchos aspectos por determinar de las células B, por ejemplo, si las células B activadas producen citoquinas pro inflamatorias y contribuyen a la activación inmune en el dengue (Nascimento, Hottz et al. 2014).

Estudios de la dinámica de las CSA, la mayoría de ellos realizados en adultos con infección secundaria, han mostrado que la frecuencia de CSA se eleva entre 10 a mil veces comparado con la frecuencia de CSA que circulan en individuos sanos, alcanzado a ser hasta el 30% del total de células mononucleares de sangre periféricas (CMSP) (Balakrishnan, Bela-Ong et al. 2011, Wrarmert, Onlamoon et al. 2012, Zompi, Montoya et al. 2012, Garcia-Bates, Cordeiro et al. 2013). Llamativamente, en pacientes adultos infectados con dengue, la respuesta primaria y secundaria tiene fuerte presencia de CSA isotipo G dengue-específicas que circulan tempranamente (Sangkawibha, Rojanasuphot et al. 1984, Wrarmert, Onlamoon et al. 2012). La respuesta a dengue en las CSA en infección secundaria a DV ha mostrado ser inmunodominante ya que cerca del 60% de las que circulan en individuos agudamente infectados son específicos contra el virus. Sin embargo, esta respuesta no ha mostrado ser serotipo específica en la mayoría de casos y sólo un estudio reportó una respuesta de CSA serotipo-específica en infección secundaria (Garcia-Bates, Cordeiro et al. 2013).

Recientemente se inició a evaluar la magnitud de la respuesta de CSA y su relación con la severidad clínica. Los estudios se han realizado en infección secundaria y usualmente en adultos o niños >10 años de edad. Globalmente, no se ha encontrado relación entre estos dos factores (Wrarmert, Onlamoon et al. 2012, Zompi, Montoya et al. 2012) y sólo un estudio realizado en adultos con infección secundaria y células criopreservadas ha descrito relación entre la magnitud de la respuesta y el desarrollo de formas severas (Garcia-Bates, Cordeiro et al. 2013). Así, este continúa siendo un muy importante punto que es aún controversial.

Una pregunta inherente al análisis de la respuesta de CSA es si está relacionada con los respectivos títulos de anticuerpos circulantes. Una débil pero significativa

correlación entre la frecuencias de CSA VD-específica y los respectivos títulos de IgG sérica ha sido demostrada (Wrarmert, Onlamoon et al. 2012, Zompi, Montoya et al. 2012). Sin embargo esta desapareció cuando se comparó la frecuencia de las CSA VD-específicas IgG y los títulos de Ac neutralizantes determinado por PNRT50 (Garcia-Bates, Cordeiro *et al.* 2013). En resumen aunque hay alguna evidencia que soporta la participación de las CSA virus-específicas inducida en la fase aguda de pacientes con infección secundaria y los respectivos títulos de Ac séricos, ésta es aún no concluyente y mucho menos cuando se habla de niveles de Ac neutralizantes.. La respuesta a esta pregunta es de particular interés puesto que tiene una fuerte potencial aplicación en los estudios de vacunas para dengue que se están llevando a cabo actualmente.

La mayoría de estudios han analizado la respuesta de CSA en infecciones subsecuentes. En adultos con infección primaria y secundaria ha sido mostrado que la infección por VD genera la temprana aparición de una respuesta de CSA IgG. Además, esta temprana respuesta mostró tener capacidad neutralizante (Balakrishnan T, 2011). Así que actualmente la respuesta de CSA en niños con infección primaria continúa siendo grandemente desconocida.

Los estudios a la fecha coinciden en la descripción de la fuerte respuesta de CSA en la infección secundaria por dengue, dominada por CSA IgG de reactividad cruzada entre los 4 serotipos. Sin embargo, aspectos como las características de la respuesta de CSA en infección primaria, la influencia de la edad en la respuesta, la relación entre la frecuencia de CSA virus-específicas con los títulos de Ac séricos y la relación con la severidad clínica son aspectos actualmente controversiales que se abordan en este trabajo. Los aspectos relevantes descritos sobre la respuesta de LB y CSA se resumen a continuación.

Hallazgo	n	A/N	IP/IS	Referencia
La infección por VD promueve elevación de CSA de isotipo G en fase aguda de la enfermedad entre 4-7 día. Y los niveles de Ac dengue específicos se correlacionan con esta elevación.	31	Si/No	Si/Si	Balakrishnan T, y col. 2011. Singapur
La respuesta de CSA en infección secundaria es más fuerte para el serotipos previos. No fue posible establecer relación con severidad clínica	46	Si/No	Si/Si	Wrarmert J, y col. 2012. Tailandia
	204	No/Si	Si/Si	Zompi S, y col. 2012. Nicaragua

Temprana elevación de CSA isotipo G son serotipo-especificas y se encontró correlación con la severidad clínica.	354	Si/Si	Si/Si	Garcia-Bates TM, y col 2013. Brazil
--	-----	-------	-------	-------------------------------------

A/N: Adultos/Niños incluidos en el estudio

IP/IS: Infección secundaria/Infección secundaria

#### 4.4 CARACTERISTICAS CLINICAS Y MANEJO DEL DENGUE

Luego de un periodo de incubación de 3 a 7 días, los síntomas inician repentinamente y su presentación se puede dividir en 3 fases clínicas: una fase febril inicial, donde predominan altas temperaturas (>38.5°C), acompañadas de cefalea, vómito, mialgias y artralgias. Ésta fase comprende los primeros 3 días de fiebre y va seguida de la fase crítica, que se caracteriza por la defervescencia y en la minoría de paciente aparecen las complicaciones (choque, hemorragias y daño de órganos). Posteriormente se presenta la fase de recuperación, con la reabsorción de líquidos característica y el retorno a la normalidad de las variables hemodinámicas (Rojas, Padilla et al. 2010).

El dengue tiene un espectro de manifestaciones clínicas que va desde formas asintomáticas, síndrome febril auto limitado, hasta la presencia de complicaciones severas, potencialmente letales. En el 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó clínicamente el dengue en dos grandes grupos: dengue, que a su vez se divide en dengue sin o con signos de alarma, y dengue grave; éste último incluye manifestaciones hemorrágicas severas, choque o lesión de órgano blanco como corazón, cerebro o hígado (Organization 2009). Estos criterios clínicos fueron adaptados en la Guía de Atención Integral del Paciente con Dengue, Colombia 2010, documento guía que rige el diagnóstico, manejo y seguimiento de pacientes con dengue en el país y en donde el Grupo de Parasitología y Medicina Tropical de la Universidad Surcolombiana tubo activa participación en la elaboración (Rojas, Padilla et al. 2010)

El cuadro más leve es el dengue sin signos de alarma, abarcando manifestaciones como fiebre con una duración menor a siete días, mialgias, artralgias, dolor retroocular, cefalea, postración y exantemas. De mayor severidad es el dengue con signos de alarma, que incluye las manifestaciones mencionadas anteriormente y uno o más de los siguientes signos: dolor abdominal intenso y continuo, vómitos persistentes, hepatomegalia dolorosa mayor a 2 cm, hipotermia,

oliguria, hipotensión postural, somnolencia y/o irritabilidad, acumulación de líquidos (ascitis, derrames pleurales, edema), manifestaciones hemorrágicas (como hematemesis o melenas) y caída abrupta de las plaquetas con aumento del hematocrito. Finalmente, el cuadro de mayor severidad es el dengue grave, que puede cursar con extravasación severa de plasma, hemorragias graves y/o daño de órganos (miocarditis, encefalitis, hepatitis, colecistitis alitiásica, insuficiencia renal aguda y afección de otros órganos) (Rojas, Padilla et al. 2010).

La infección por VD debe confirmarse en el laboratorio y para esto varios métodos están disponibles. Las técnicas pueden ser clasificadas como directas (detección de proteínas virales, amplificación de su genoma o aislamiento viral) o indirectas (detección de anticuerpos séricos específicos para VD). En los primeros días de la enfermedad, los métodos de elección son los directos, siendo la reacción en cadena de polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR) la más ampliamente utilizada debido a su alta sensibilidad (Harris, Roberts et al. 1998); el aislamiento viral no es frecuentemente utilizado debido a la infraestructura especializada que requiere y que no está disponible en la mayoría de lugares. La detección de la proteína NS1 circulante, ha mostrado una sensibilidad del 90% en la fase febril y la antigenemia puede persistir por algunos días hasta la defervescencia (Zainah, Wahab et al. 2009). Sin embargo, tiene limitaciones como la corta ventana de tiempo en que puede ser usada, además ha sido reportado que en infecciones secundarias la sensibilidad de la detección de NS1 es menor (60-80%) (Kumarasamy, Chua et al. 2007). El diagnóstico basado en la detección de Ac específicos séricos es ampliamente usado y se debe emplear después del cuarto día de iniciada la fiebre. La seroconversión de inmunoglobulinas (Ig) M o G entre dos muestras pareadas es confirmatoria para la infección (Simmons, Farrar et al. 2012).

A pesar del avance en el entendimiento de la enfermedad, no existe actualmente un tratamiento farmacológico específico para el dengue, siendo sólo la corrección de líquidos y la prevención de la hipovolemia, el manejo que ha disminuido la mortalidad (Organization 2009). Sin embargo, recientemente una vacuna contra el virus terminó los estudios de fase III y esta actualmente en trámite para ser licenciada su uso en humanos. De ella se sabe que es una vacuna viva atenuada, tetravalente que recombina genes del virus de la fiebre amarilla y de los 4 serotipos de dengue. Ha mostrado ser segura e inmunogénica. Cuando su eficacia fue evaluado, mostró globalmente un 60% de protección (aunque varió de serotipo a serotipo), con reducción de un 50% de hospitalización y 95% de formas severas de la infección (Villar, Dayan et al. 2014). Así esta es una esperanzadora alternativa para la prevención de la enfermedad, aunque con ella quedan muchos interrogantes por resolver como por ejemplo la edad ideal de vacunación.

Los cuadros de dengue sin signos de alarma pueden manejarse de forma ambulatoria recomendándose una adecuada hidratación por vía oral y el control de la fiebre, además de un control clínico y paraclínico diario. El dengue con signos de alarma debe manejarse intrahospitalariamente, ya que debe hacerse la reposición hídrica por vía parenteral. El dengue severo, debido a su alta tasa de complicaciones, debe manejarse en la unidad de cuidados intensivos, con monitorización estricta y continua (Rojas, Padilla et al. 2010).

## **5. HIPOTESIS**

La cinética, especificidad e isotipo de las CSA circulantes totales y dengue-específicas será modulada por infecciones previas y la edad de los niños infectados. Además habrá una relación positiva entre la frecuencia de CSA circulantes totales y específicas para VD y la severidad clínica de los niños

## 6. METODOLOGIA

### 6.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio descriptivo, longitudinal, prospectivo, experimental, con la participación de pacientes provenientes del servicio de pediatría del Hospital Universitario de Neiva y la ESE Carmen Emilia Ospina de Neiva, realizado entre febrero de 2011 y septiembre de 2013. Todos los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Infección e Inmunidad (I&I Lab) de la Facultad de Salud, Programa de Medicina de la Universidad Surcolombiana. Este estudio y su consentimiento informado fueron aprobados por los comités de ética de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana y del Hospital Universitario de Neiva.

### 6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

**6.2.1 Cohorte de estudio.** En este estudio fueron incluidos 116 niños mayores de 6 meses y menores de 14 años de edad con diagnóstico clínico de dengue, que acudieron al Hospital Universitario de Neiva y la ESE Carmen Emilia Ospina, sede IPC de Neiva. El diagnóstico de infección por VD y la clasificación clínica de la enfermedad se basó en la Guía Integrada de Atención al Paciente con Dengue para Colombia, 2010 (Rojas, Padilla *et al.* 2010) y los criterios clínicos revisados de la organización mundial de la salud (OMS) 2009 (Organization 2009). Los criterios de inclusión al estudio fueron:

- Caso probable de dengue: Todo paciente que presente una enfermedad febril aguda de hasta siete días, de origen no aparente, acompañada de 2 o más de los siguientes síntomas: cefalea, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias, postración, exantema y que además tenga antecedente de desplazamiento (hasta 15 días antes del inicio de síntomas) o que resida en un área endémica de dengue.
- Caso probable de Dengue con Signos de alarma: Paciente que cumple con la anterior definición y además presenta cualquiera de los siguientes signos de alarma: Dolor abdominal intenso y continuo, vómitos persistentes, diarrea, somnolencia y/o irritabilidad, hipotensión postural, hepatomegalia dolorosa >2cms, disminución de la diuresis, caída de la temperatura, hemorragias en mucosas, caída abrupta de plaquetas (<100,000) asociada a hemoconcentración.

- Caso probable de Dengue Severo: Cumple con cualquiera de las manifestaciones que se mencionan a continuación: 1) Extravasación severa de plasma que conduce a síndrome de choque por dengue o acumulo de líquidos con dificultad respiratoria. 2) Hemorragias severas 3) Daño grave de órganos como miocarditis, encefalitis, hepatitis (transaminasas >1,000), colecistitis alitiásica, insuficiencia renal aguda y afección de otros órganos.
- Caso confirmado de dengue: Caso probable de dengue con o sin signos de alarma o dengue grave, confirmado por al menos dos de las siguientes pruebas:
  - Detección de genoma viral por RT-PCR.
  - NS1 sérica positiva por ELISA.
  - IgM específica de dengue sérica positiva por prueba de ELISA.

El diagnóstico de la infección primaria o secundaria se hizo basado en la detección por ELISA de captura de Ac de isotipo IgG específicos para VD presentes en el plasma de los niños infectados realizado hasta el 5 día o menos desde el inicio de los síntomas. Como infección primaria se tomó la relación IgM/IgG virus específicas en plasma  $\geq 3$  (Hatch, Endy et al. 2011)

Usando los criterios anteriormente descritos, los niños incluidos fueron clasificados clínicamente en 3 grupos: Dengue severo (DS) (n= 32), dengue con signos de alarma (DCSA) (n=50) y dengue sin signos de alarma (DSSA) (n=34). Como controles, se incluyeron niños sanos (n=42) con características demográficas similares a las de los grupos de estudio y fueron clasificados como sanos mediante valoración clínica por el grupo de pediatría, junto con un hemograma completo para descartar alguna enfermedad al momento de ingresar al estudio.

**6.2.2 Muestras de sangre.** Previo consentimiento informado firmado por los acudientes, a cada niño se le tomó una muestra de sangre en la fase aguda de la enfermedad y una muestra en la fase de convalecencia ( $\geq 21$  días del inicio de los síntomas). Para conocer la dinámica de las CSA en circulación, a una fracción de niños también se les tomó muestra seriada de sangre entre el 3 y 8 día de iniciado los síntomas. Dos a cuatro mililitros (ml) de sangre venosa periférica (ajustados dependiendo de la edad del niño) fueron recolectados en tubos con ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA), en cada toma. Los tubos se centrifugaron inmediatamente a 300 x g. El plasma fue alicuotado y usado para la confirmación

del diagnóstico de dengue y la diferenciación de infección primaria o secundaria por la detección de NS1, IgM e IgG de captura VD-específicas en plasma, además de la detección del genoma viral por RT-PCR convencional. La sangre fue después diluida al tercio en PBS 1X estéril (Cell Gro, Manassas, VA) y las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron obtenidas por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll (GE Healthcare, Cleveland, OH), posteriormente lavadas en dos oportunidades con medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina 100 u/mL, estreptomina 100 ug/mL, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, piruvato de sodio 1 mM y  $\beta$ -Mercaptoetanol (medio completo, todos obtenidos desde Gibco, Carlsbad, USA), contadas con tinción de exclusión de tripán azul e inmediatamente usadas en la realización ELISPOT de dos colores y citometría de flujo multiparamétrica, para la identificación de CSA totales y proteína E-específicas (como se explicará adelante). Debido a la conocida susceptibilidad de las CSA a la muerte celular y para asegurar la viabilidad y funcionalidad de las células, todos los ensayos fueron realizados a  $\leq 4$ h de haber sido tomada la muestra.

**6.2.3 Detección de NS1, IgM e IgG VD-específicas en plasma para diagnóstico de dengue y clasificación de infección primaria y secundaria.** La detección de NS1, IgM e IgG VD-específicas en plasma por ELISA fue empleada para el diagnóstico y diferenciación de infección primaria o secundaria. Se usaron estuches comerciales obtenidos de Panbio (Dengue IgM capture Elisa [Ref: E-DEN01M], Dengue IgG capture Elisa [Ref: E-DEN02G] y Dengue Early Elisa [Ref: E-DEN02P], Alere, Australia), siguiendo todas las recomendaciones del fabricante. Brevemente, para la detección de las Igs, 100 $\mu$ L de las muestras, controles y calibradores fueron diluidos 1/100 en el diluyente proveído por el estuche y añadidos a la placa cubierta con anticuerpo anti-IgM o IgG humanas totales. Tras una hora de incubación a 37°C, se lavó la placa y se añadieron 100 $\mu$ L del antígeno viral previamente mezclado con el anticuerpo anti-dengue conjugado a peroxidasa. Se incubó nuevamente por una hora a 37°C y luego de un lavado, se reveló con 100 $\mu$ L de tetrametilbenzidina (TMB). La reacción fue detenida con 100 $\mu$ L de ácido fosfórico 1M. La lectura se realizó a 450nm (referencia 600-650 nm) en un equipo ELx 800 (BIO-TEK Instruments, Winooski, Estados Unidos).

Para la detección de la proteína NS1, 100 $\mu$ L de las muestras, controles y calibradores diluidos al medio fueron añadidos a la placa cubierta con el anticuerpo anti-NS1. Luego de una hora de incubación a 37°C, la placa se lavó y se añadieron 100 $\mu$ L del anticuerpo anti-NS1 conjugado a peroxidasa. Se incubó nuevamente la placa por una hora a 37°C y luego de otro paso de lavado, se reveló con TMB y se leyó como se describió previamente para las Igs séricas anti-dengue.

**6.2.4 Aislamiento del ARN y tipificación del serotipo de VD causante de la infección.** Para la purificación del ARN se utilizó el estuche comercial QIAmp viral RNA (QIAGEN, Valencia, CA, Cat: 52906), siguiendo todas las recomendaciones del fabricante. En resumen, 140µL de las muestras de plasma fueron mezclados con buffer AVL y “carrier” de ARN e incubados a temperatura ambiente por 10 min. Luego se añadieron 560µL de etanol al 100% y tras 2 pasos de centrifugación a 6,000 xg por un min se pasaron 1,260µL de la solución total por la columna de resina correspondiente. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con 500µL de buffer AW1 y AW2 y se hizo la elución en un volumen final de 40µL de buffer AVE. La concentración de ARN aislado de cada muestra fue determinada usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo, Wilmington, Estados Unidos), obteniendo una mediana de 98.7 ng/µL (rango 91-119.7) (datos no mostrados).

El serotipo infectante en las muestras analizadas fue determinado por RT-PCR convencional como previamente ha sido reportado (Lanciotti, Calisher et al. 1992, Harris, Roberts et al. 1998). Cinco µL del ARN previamente aislado fueron añadidos a una mezcla que contenía KCl 50 mM, Tris 10 mM (pH 8.5), Triton X-100 0.1%, gelatina 0.01%, cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (DNTPs) a una concentración de 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, ditiotreititol 5 mM, primers externos e internos (serotipo-específicos) a una concentración de 1 µg/µL y 5 U/µL de *Taq* ADN polimerasa (Promega Corp., Madison, Wis.) La secuencia de los primers serotipo-específicos usados han sido reportados previamente (Salgado, Eltit et al. 2010) y fueron las siguientes: DENV-1: 5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G-3'; DENV-2: 5'-TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC-3'; TS1: 5'-CGT CTC AGT TGA TCC GGG GG-3'; TS2: 5'-CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG-3'. La transcripción inversa y la amplificación se llevaron a cabo en un Termociclador Veriti™ (Applied Biosystem). El perfil térmico usado fue: 42°C por 60 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación a 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 7 minutos. En cada detección, ARN extraído de lisado de células VERO-76 infectadas con cada uno de los serotipos o células no infectadas (Mock) fueron incluidos como controles (Anexo 1).

**6.2.5 Detección de CSA por citometría de flujo.** CSA circulantes totales fueron identificadas por citometría de flujo multiparamétrica. Para esto, 1x10<sup>6</sup> de CMSP fueron lavadas en dos oportunidades con PBS 1x, albúmina sérica bovina 0.1, Azida de sodio 0.03% (FACS buffer) y marcadas con anti-CD19-APC Cy7 (clon SJ25Cl; BD), anti-CD20-PE-Cy7 (clon L27, BD), anti-CD27-PE (clon MT271; BD), anti-CD38-PerCP-Cy5.5 (clon HIT2; BD) y anti-IgD-FITC (clon IA6-2; BD). Tras 30 minutos de incubación a 4°C protegidas de la luz, las células fueron lavadas de nuevo con FACS buffer, fijadas con paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences) al 1% y adquiridas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD, San

Jose) usando el software DIVA (BD, San Jose, CA). Por lo menos 20,000 eventos CD19+ fueron adquiridos en cada ensayo.

**6.2.6 Detección de CSA totales y VD-específicas por ELISPOT de dos colores.** Para conocer la frecuencia e isotipo expresado por las CSA circulantes totales y específicas para proteína E de VD se usó ELISPOT de dos colores como ha sido previamente reportado para otros virus (Gonzalez, Jaimes et al. 2003, Sasaki, Sullivan et al. 2011). Placas de 96 pozos (Immobilon P membrane MAIPN4510, Millipore) fueron incubadas toda la noche con 70 uL de Ac anti-IgA/IgG/IgM humanas (1 ug/mL, KPL, Cat: 01-10-07) o con una mezcla de las proteínas E recombinantes (concentración final de 75ug/mL) de cada uno de los cuatro serotipos de VD (obtenida de Hawaii Biotech, Hawaii) diluidos en PBS estéril. De notar, estas proteínas fueron producidas usando un sistema de expresión eucariótico. Pozos cubiertos sólo con PBS sirvieron como controles negativos. Antes de ser usadas al día siguiente, las placas se bloquearon durante 2h con medio completo. CMSP se resuspendieron en medio que contenía Ac anti IgM/IgG humanas conjugados a peroxidasa o fosfatasa alcalina respectivamente (ambos a una concentración de 0.05 ug/mL; KPL, Cat: 214-1003 y 4751-1006, respectivamente) y fueron colocados en cada uno de los pozos usando diluciones seriadas. Para detectar CSA totales IgA, pozos independientes fueron creados y CMSP fueron diluidas en medio con anti-human IgA acoplada a peroxidasa.

Después de 4h de incubación a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, las placas fueron lavadas y reveladas con Aminoetil-carbazole (AEC) substrato para peroxidasa y Blue substrate kit para fosfatasa alcalina (ambos de Vector, Cat: SK-4200 y SK-5300, respectivamente), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se detuvo con agua. En este ensayo las CSA que producen IgM o IgA son observadas como puntos rojos y las que producen IgG como puntos azules. El número de “spots” se reportó como el promedio del valor determinado por dos observadores independientes usando un estereoscopio (Nikon, Japón). El número de “spots” encontrados en los pozos cubiertos con PBS fue considerado ruido de fondo y substraído del conteo final.

**6.2.7 Identificación de IgM e IgG intracelulares en CSA circulantes por CF.** Debido a que la principal función de las CSA es secretar Igs, la mayoría de ella no está expresada en superficie de las células sino a nivel intracelular. Por lo tanto, para detectar el isotipo expresado por las CSA circulantes por CF, se realizó una tinción intracelular usando Ac anti-isotipo M y G. Para esto,  $1 \times 10^6$  CMSP fueron lavadas con FACS buffer y marcadas inicialmente en superficie con los Acs mencionados anteriormente. Después, las células fueron fijadas con 300uL de Cytifix/Cytoperm (BD, San José, Cat: 554722), incubadas por 20 minutos a 4°C y lavadas en dos oportunidades con 700uL de Perm/Wash (BD, San Jose, Cat:

554723). Tras centrifugación a 300 x g, anti-IgM APC (Jackson Immunoresearch, Cat: 709-136-073) y anti-IgG Violet 450 (BD, San José, Cat: 561299) fueron adicionados. Las células fueron incubadas por 30 minutos a 4°C protegidas de la luz, lavadas con 300uL de Perm/Wash y finalmente resuspendidas en 200 uL de la misma solución, para ser adquiridas en un FACS Canto II dentro de máximo las 2h siguientes. En algunos experimentos y para comprobar que la mayoría de las inmunoglobulinas en las CSA están intracelularmente, CSA no permeabilizadas fueron usadas como control (Figura 2).

**6.2.8 Detección de IgG e IgM específicas de proteína E en plasma.** Para determinar la cantidad relativa de IgM e IgG específicas de proteína E plasmática, un ensayo de ELISA directo fue estandarizado. Para esto, placas de ELISA de 96 pozos (Nunc Maxisorp, Cat: 44-2404-21) fueron cubiertas con una mezcla de las proteínas E de cada uno de los 4 serotipos (a una concentración final total de 100ng/mL) e incubada a 4°C toda la noche. Al día siguiente, la placa fue bloqueada con blotto al 5% (leche descremada al 5% en PBS con Tween 20 al 0.1%), por 1h. Posteriormente diluciones seriadas de plasma fueron adicionadas empezando en 1/12 para la detección de IgM y 1/100 para la IgG proteína E-específica. Después de dos horas de incubación a 37°C, la placa fue lavada 4 veces con buffer de lavado (PBS 1X Tween 20 al 0.1%). Setenta uL/pozo de anti-IgM o IgG humanas biotinilados (KPL, Cat: 16-10-03 y 16-10-02, respectivamente) fueron adicionados e incubados de nuevo por 1h. Después de 4 lavados con buffer, a cada pozo se le agregó 70uL (de una dilución de 1/1,000) de Estreptavidina-Peroxidasa (Vector, Cat: SA-5004) e incubada por 1h a 37°C. Finalmente la placa fue lavada en 4 oportunidades y 70uL/pozo de TMB fueron adicionados a cada pozo. La reacción fue detenida con 17.5uL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2M. La placa fue leída en un equipo FC Multiskan (Thermo Waltham, MA, USA), a una longitud de onda de 450nm. Como controles, plasma de pacientes previamente caracterizados como seropositivos y seronegativos para dengue fueron incluidos en cada placa.

### 6.3 SEGUIMIENTO CLINICO

Los pacientes con diagnóstico de dengue con signos de alarma y dengue grave fueron captados en el Hospital Universitario de Neiva. Durante la hospitalización se llevó a cabo un estricto seguimiento clínico y paraclínico diario. El examen físico general tuvo énfasis en signos asociados con la aparición de complicaciones por infección con VD (fragilidad capilar, estrechamiento de la presión de pulso, aumento de hepatomegalia, ventilación, dolor abdominal, entre otros).

Los niños con diagnóstico de dengue sin signos de alarma fueron captados y manejados en el primer nivel de atención en la zona urbana de Neiva, en la ESE Carmen Emilia Ospina. A estos niños se les realizó seguimiento clínico y paraclínico diario en busca de signos de alarma, siguiendo todas las recomendaciones de la Guía Integrada para paciente con dengue de Colombia (Rojas, Padilla et al. 2010).

A los niños hospitalizados que presentaron formas severas de la enfermedad, se les llevó un formato escrito de seguimiento de parámetros clínicos de manera más frecuente (cada 12h). Dicho formato se desarrolló en el Departamento de Pediatría de la Universidad Surcolombiana y su utilidad ha sido validada en publicaciones previas de nuestro grupo (Salgado, Rodríguez et al. 2007, Salgado, Panqueba et al. 2009, Guerrero, Arrieta et al. 2013) Todos los datos fueron registrados en el instrumento de recolección de datos (Anexo 1). Durante la fase de convalecencia, los pacientes incluidos dentro del grupo de dengue severo y dengue con signos de alarma fueron evaluados en un control a los 15 días posteriores al egreso del hospital, para detectar secuelas de la infección y toma de la muestra en fase de convalecencia.

#### **6.4 ANALÍISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó una base de datos electrónica en el programa Microsoft Excel 2010, que incluyó las variables demográficas, de diagnóstico, paraclínicos, clínicos y resultados de los ensayos de ELISA, citometría de flujo, ELISPOT y RT-PCR. Para el análisis estadístico, la evaluación preliminar mostró que los datos no estaban distribuidos normalmente (con la prueba de Kolmogorov-Smirnov) , así que en todos los análisis posteriores se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas incluidas en el software GraphPad Prism 6.0. Los datos se presentan como medianas y rangos. Cuando dos grupos independientes se analizaron, se aplicó la prueba de Mann-Whitney. Para determinar diferencias estadísticas significativas entre más de dos grupos independientes, la prueba de Kruskal-Wallis fue la elegida. Si la P de Kruskal-Wallis fue  $<0.05$ , una prueba pos-hoc de Bonferroni modificada fue usada para realizar la comparación entre los diferentes grupos. El grado de correlación entre variables fue evaluada por la prueba de Spearman. Para todos los casos se tomó como significativo un valor de  $P < 0.05$ .

## 6.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES	DEFINICIÓN	SUBVARIABLES	INDICADOR	NIVEL DE MEDICIÓN
Características sociodemográficas	Características socio-económico-culturales presentes en la población sujeta a estudio.	-Edad	-Edad en meses	Razón
		-Género	-Masculino o Femenino	Nominal
Características fenotípicas de las Células Secretoras de Anticuerpos	Número e isotipo de células secretoras de anticuerpos circulantes en sangre periférica de niños infectados con virus dengue y sanos.	-Presencia y cantidad de células (marcadores CD19, CD20, CD27, CD38)	-Porcentaje de células secretoras de anticuerpos	Razón
		-Isotipo	-Porcentaje de células de Isotipo IgM, IgG o/e IgA	
Características clínicas	Manifestaciones clínicas de los pacientes infectados por VD.	-Dolor retroocular, mialgias, artralgias, postración, exantema. -Dolor abdominal intenso, vómitos persistentes, somnolencia y/o irritabilidad, hipotensión postural, hepatomegalia, disminución de la diuresis, hemorragias, caída abrupta de asociada a hemoconcentración	Si/No	Nominal

		n. -Extravasación severa de plasma, Hemorragias severas, miocarditis, encefalitis, hepatitis (transaminasas>1 .000), afección de otros órganos.		
Severidad Clínica	Grado de compromiso clínico de los pacientes infectados por VD.	Dengue sin signos de alarma  Dengue con signos de alarma  Dengue grave	Si/No	Nominal

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS, CLINICAS Y PARACLINICAS**

En este estudio se incluyeron 34, 50 y 32 niños con diagnóstico de DSSA, DCSA y DS, respectivamente y se compararon con 42 niños sanos como controles. Las características demográficas y clínicas entre los diferentes grupos son mostradas en la Tabla 1. La mediana de la edad en el grupo de niños con DSSA fue 54 meses, en el grupo de DCSA fue de 39 meses y en el grupo de DS fue de 38 meses, en todos los grupos hay lactantes (niños menores de 12 meses) y niños mayores. Los niños incluidos en el estudio ingresaron en el fase aguda de la enfermedad entre el segundo y sexto día de inicio de los síntomas.

El serotipo de VD infectante fue identificado en el 65% de los casos analizados, por medio de RT-PCR convencional, siendo los serotipos 1 y 2 responsables de más del 90% de las infecciones (Tabla 1).

Los exámenes paraclínicos mostrados en la Tabla 1 fueron tomados a todos los niños incluidos en los grupos, dentro de las primeras 24 horas del ingreso. El recuento plaquetario fue tres veces más bajo en el grupo de mayor severidad, comparado con el de menor severidad (Tabla 2) y es el valor del hemograma que mayor diferencia estadística mostró entre los grupos clínicos analizados ( $P < 0.001$ , test de Kruskal-Wallis). En los pacientes que requirieron manejo hospitalario, la aspartato aminotransferasa y tiempo de protrombina se encontraron significativamente aumentados en el grupo de mayor severidad comparado con el de menor ( $P < 0.005$  y  $0.03$  respectivamente, test de Mann Whitney). La relación CPK total/CK-MB, medida indirecta del compromiso miocárdico, aunque fue mayor en el grupo de DS, no tuvo valores significativamente más altos comparados con los otros grupos analizados. El derrame pleural y la hepatomegalia, signos clínicos de fuga vascular, fueron significativamente mayores en los niños con DS ( $P < 0.001$  y  $0.003$  respectivamente, test de Mann Whitney). En resumen, los resultados mostrados en la Tabla 1 y dos demuestran que los grupos son comparables y soportan la adecuada clasificación clínica realizada en cada uno de ellos.

### **7.2 CINÉTICA DE LAS CSA EN NIÑOS CON INFECCIÓN POR VD**

Para conocer la dinámica de las CSA en circulación inducida por la infección natural con VD, CMSP fueron analizadas de forma seriada por CF en niños con infección primaria y secundaria, en fase aguda y convalecencia de la enfermedad.

De notar, todos los niños con infección primaria fueron lactantes. A partir del 4° día de la enfermedad hubo un incremento en la frecuencia de CSA totales circulantes, alcanzando valores hasta del 72% del total de linfocitos B en infecciones secundarias y regresando a niveles cercanos a 0% en la fase de convalecencia (día 21 después de iniciado los síntomas) (Figura 1A). La dinámica varió según el tipo de infección (primaria o secundaria, ya que en infecciones primarias la frecuencia y el pico de CSA fue significativamente menor y más retardada, comparado con las infecciones secundarias ( $P < 0.005$ , Bonferroni post-test) (Figura 1B). En ambos tipos de infecciones, la frecuencia de CSA retornó a niveles similares a los de niños sanos en la fase de convalecencia (Figura 1B)

Para confirmar y extender estos hallazgos, se analizó también la respuesta de CSA totales por ELISPOT de dos colores en muestras seriadas de CMSP de niños con infección 1ª o 2ª. Con este ensayo funcional, se identificó la frecuencia e isotipo expresado por las CSA circulantes. Consistente con la CF, en los niños con infección secundaria la respuesta de CSA fue más intensa y temprana que la observada en niños con infección primaria ( $P < 0.005$ , test de Bonferroni) (Figura 1C). Además, en infecciones secundarias el isotipo dominante de CSA fue el G, siendo hasta 100 veces mayor su frecuencia en relación a la infección primaria ( $P < 0.005$ , test de Bonferroni) (Figura 1C). En contraste, el isotipo M fue el dominante en infecciones primarias, siendo hasta 50 veces mayor en comparación con las secundarias ( $P < 0.005$ , test de Bonferroni) (Figura 1C, centro). No hubo diferencias significativas entre la frecuencia de CSA de isotipo A en ambos grupos (Figura 1C). Así, los resultados obtenidos por ELISPOT son consistentes con lo encontrado por CF y permiten concluir que el VD induce en infecciones 2ª una rápida y fuerte respuesta de CSA totales con máxima elevación en el 5º día; en las infecciones primaria la respuesta de CSA es retardada y significativamente menor. Además, las CSA IgM, son las que dominan la respuesta en las infecciones primarias a diferencia de lo ocurrido en la infección secundaria que tiene una respuesta dominada por CSA que expresan IgG. Con respecto a la IgA no hay diferencia en la respuesta de CSA entre infecciones 1ª o 2ª.

### **7.3 RESPUESTA DE CSA TOTALES Y ESPECÍFICA ES MODULADA POR LA EDAD**

Los anteriores resultados demostraron que la respuesta de CSA totales inducida por VD en niños es diferente entre infecciones primarias y subsecuentes. En infecciones primarias se induce una respuesta de CSA dominada por el isotipo M, más baja y retardada. Sin embargo, todos los niños con infección primaria que fueron analizados en este caso correspondía a lactantes. Así que no es claro en los resultados mostrados en la Figura 1, si las diferencias observadas en niños

con infección primaria se debían al tipo de infección o si podrían estar además influenciados por la temprana edad de los niños de este grupo.

Como primer acercamiento para determinar si la edad de los niños modula la respuesta de CSA en la infección primaria con VD, se evaluó por tinción intracelular el tipo de Ig expresado por las CSA circulantes en lactantes (<12 meses) y niños mayores, ambos con infección 1<sup>a</sup>.

Para esto y debido a que la principal función de las CSA es secretar Igs, es esperado que gran cantidad de las Igs estén a nivel intracelular (Janeway 2012). Por lo tanto, la expresión de Igs en superficie e intracelular fue evaluada en CSA usando para ello células no permeabilizadas y permeabilizadas, respectivamente (n=10). Como es mostrado en la Figura 2A, una mayor frecuencia e intensidad media de fluorescencia de las Igs fue notada cuando las células fueron permeabilizadas, demostrando así que la mayoría de Igs expresadas por las CSA se encuentra intracelularmente. Además la alta presencia intracelular de Igs soporta la idea que la población celular que se está detectando por CF sí corresponden efectivamente a CSA. Esta diferencia entre células no permeabilizadas y permeabilizadas no fue notada en las otras subpoblaciones de LB, como LB vírgenes o de memoria (Figura 2A y datos no mostrados).

Para determinar si la edad modula la respuesta primaria de CSA, por CF se determinó el isotipo de Ig expresado intracelularmente por las CSA en niños menores y mayores de 12 meses, los dos con infección primaria por VD y niños mayores de 12 meses con infecciones secundarias, fueron incluidos como control. Como es mostrado en la Figura 2B, la frecuencia de CSA de isotipo M alcanzó el 70% del total de CSA en niños menores de 12 meses con infección primaria, mientras que en niños mayores también con infección 1<sup>a</sup>, esta frecuencia fue sólo del 35%. Por otro lado, la frecuencia de CSA IgG en niños mayores con infección primaria fue comparable a la de niños con infección secundaria (Figura 2B). Cuando el análisis estadístico fue realizado, la expresión intracelular de Igs fue significativamente diferentes entre los 3 grupos analizados ( $P=0.01$ , Kruskal-Wallis test) (Figura 2C), con una mayor frecuencia de CSA IgM en lactantes con infección primaria que niños mayores de 12 meses con infección primaria o secundaria (Fig 2C). En la IgG la relación se invirtió y fue significativamente mayor en niños mayores con infección secundaria que lactantes con primaria, pero no niños mayores también con primaria, tal vez debido a su alta variabilidad.

Debido a que la masa de CSA que circulan están no sólo conformado por CSA IgM e IgG, sino también IgA, la frecuencia de IgM e IgA puede ser por lo tanto modificada por la frecuencia con que CSA no IgM o IgG (posiblemente IgA) están

presentes. Por lo tanto para normalizar esto y evitar el efecto de las CSA no M, no B en la determinación de la frecuencia de CSA IgM e IgG, se determinó reportar ésta como una razón. La relación de CSA IgM+/IgG+, fue mayor en niños menores de 12 meses con infección primaria en comparación con niños mayores con infección primaria y secundaria ( $P < 0.01$ , Bonferroni test) (Figura 2D). En conclusión, la edad parece modular la respuesta de CSA que se inducen en infección primaria y los lactantes tienen una menor capacidad de generar CSA de isotipo G. No hubo diferencias en la frecuencia de CSA no IgM, no IgG (posiblemente IgA) entre los diversos grupos analizados, hecho que es consistente con los resultados de ELISPOT total que no mostró diferencias en las CSA IgA en los niños con infecciones primarias o secundarias (Figura 1C, derecha). En resumen, la respuesta total de CSA es influenciada por la edad en que los niños adquieren la infección.

**7.3.1 La respuesta de CSA Proteína E-específica de dengue es modulada por la edad.** Para analizar la respuesta de CSA específicas de VD, se desarrolló un ensayo de ELISPOT de dos colores Ag-específico que utilizó una mezcla de proteína E recombinante de los 4 serotipos de VD (proteína inmunodominante dentro de la respuesta de LB) que detecta simultáneamente a CSA que secretan Igs IgM e IgG proteína E-específicas en el mismo pozo. La especificidad de esta prueba fue confirmada por la detección de CSA IgM e IgG proteína E-específicas en niños infectados con VD pero no en niños con gastroenteritis aguda por rotavirus ( $n=3$ , datos no mostrados). La concentración de la proteína E utilizada para cubrir los pozos de la placa de ELISPOT fue adecuadamente titulada. Como muestra la Figura 3, en niños con infección primaria se encontró una significativa correlación negativa entre la edad y la frecuencia de CSA de isotipo M totales y proteína E-específicas ( $Rho = -0.51$  y  $-0.59$ ,  $P = 0.003$  y  $0.03$ , respectivamente; Coeficiente de correlación de Spearman). Por el contrario, no hubo correlación entre la frecuencia de CSA de isotipo G y la edad ( $Rho = 0.02$  y  $0.29$ ,  $P = 0.9$  y  $0.33$ , respectivamente; Coeficiente de correlación de Spearman). En el caso de infecciones secundarias sólo se encontró una positiva y débil correlación entre el número de CSA de isotipo G proteína E-específicas y la edad de los pacientes ( $Rho = 0.31$ ,  $P = 0.02$ , Coeficiente de correlación de Spearman) (Figura 3). En resumen, la edad de infección modula también la frecuencia de CSA específicas de dengue en dengue.

## **7.4 RELACION DE LA RESPUESTA DE CSA CIRCULANTES Y LA SEVERIDAD CLÍNICA**

Para establecer si la frecuencia de CSA totales y proteína E-específicas circulantes en la fase aguda de la infección por VD, determinadas por ELISPOT, se asociaba con la severidad clínica de la enfermedad, se comparó la respuesta

de CSA entre los 3 grupos de dengue clínicamente clasificados (DSSA, DCSA y DS). En general, niños con dengue tuvieron 10 a 1000 veces más alta frecuencia de CSA totales circulantes que niños sanos (Fig 4). Aunque la frecuencia de CSA IgM específicas e IgG totales y prot E-específicas fue dos a tres veces más alta en niños con formas hospitalarias de dengue comparado a niños con dengue sin signos de alarma, esta diferencia no fue estadísticamente significativa en ninguno de los casos analizados, tal vez debido a la alta variabilidad ( $P=0.6$ , Kruskal Wallis test) (Figura 4). Sin embargo, al dividir en infecciones primarias y secundarias a los pacientes de cada uno de los 3 grupos del espectro clínico, se encontró una significativa mayor frecuencia de CSA de isotipo M totales y proteína E-específicas en el grupo de DS ( $P=0.01$ , Kruskal Wallis test) (Figura 5A). Esta diferencia no se encontró en las CSA de isotipo G ni en infecciones secundarias, aunque de nuevo, las medianas de frecuencias de CSA IgG Prot E-específicas fueron de 2 a 3 veces mayores en niños con formas severas comparado con niños con dengue sin signos de alarma ( $P=0.3$ , Kruskal Wallis test) (Figura 5B). Así, en infección primaria, la IgM podría tener un role en la gravedad clínica que se presenta. Teniendo en cuenta la alta variabilidad de los grupos, el hecho de una encontrar medianas de CSA totales y Ag-específicas 2 a 3 veces mayores en los grupos de niños con dengue de tratamiento hospitalario comparado con niños con manejo ambulatorio no descarta la participación de estas células en el espectro clínico manifestado por esto niños.

## **7.5 FRECUENCIA DE CSA ESPECIFICAS DE PROTEINA E CIRCULANTES Y SU ASOCIACION CON LOS TITULOS DE ANTICUERPOS SÉRICOS**

Para determinar si las CSA VD específicas contribuyen con los títulos de Ac séricos respectivos, por medio de ELISA se determinó la cantidad relativa de IgM e IgG prot E-específica en plasma. Para la optimización de los ensayos, se usaron como controles plasmas de pacientes con un patrón serológico conocido determinado mediante el estuche comercialmente disponible de Panbio. Como se observa en la Figura 6A y 6B, niños infectados con dengue tuvieron significativamente más altos niveles de IgM e IgG anti-proteína E, que niños sanos previamente conocidos como seronegativos para IgM e IgG anti-DV. Sin embargo para la IgM sólo una diferencia de una vez más alta en los títulos estuvo presente en los niños infectados agudamente con dengue que en los niños sanos (Figura 6A). A diferencia de la IgM, IgG prot E-específica fue más fácil y confiablemente detectada y diferencias de 4 a 10 veces mayor en los títulos fue encontrada en niños con dengue que en sanos tipificados como seronegativos (Figura 6B). Para la IgG proteína E-específica, estos resultados son comparable a los obtenidos por otros grupos previamente (Rocha, Oliveira et al. 2013). Así, sólo la detección de IgG pero no IgM prot E-específica, logró ser detectada de forma confiable. Debido a lo anterior, sólo se evaluó la correlación de las CSA IgG prot E-específicas y los respectivos títulos de Ac plasmáticos.

Cómo muestra la Figura 7A, una importante correlación fue encontrada entre estos dos parámetros ( $Rho=0.67$ ,  $P=0.004$ , Spearman test), sólo en niños con infección secundaria. Los anteriores resultados sugieren que para la IgG, las CSA prot E-específicas inducidas naturalmente en infección secundaria contribuyen en los títulos de Ac respectivos que circulan en fase aguda de los niños.

Los resultados previos mostraban que en infección primaria, la edad es un factor determinante de la respuesta de CSA que se inducen en la infección con VD. Así, lactantes tienen significativamente más alta frecuencia de CSA IgM prot E-específicas circulando que niños mayores también con infección primaria (Figuras 2B, C y 3). Para determinar si esta diferencia es reflejada en el compartimento de los respectivos Ac plasmáticos y debido a que el ensayo para detección de IgM prot E-específica no tuvo la eficiencia ideal, se decidió evaluar la respuesta IgM VD-específica (no la Prot E-específica) en plasma usando el estuche comercial de Panbio y diluciones seriadas de plasma en niños lactantes y mayores, los dos con infección primaria, incluyendo a los niños con infección secundaria como controles. Como muestra la Figura 7B, y consistente con los resultados de las CSA IgM dengue-específicas, lactantes tuvieron significativamente más altos niveles de la IgM VD-específica que niños mayores con infección primaria, reflejado en un mayor título limitante y una mayor área bajo la curva (Figura 7A). Sin embargo, no hubo diferencias en la IgM plasmática VD-específica cuando lactantes o niños mayores con infección 1ª se compararon con niños con infección 2ª (Figura 7B). En resumen, lactantes con infección primaria tuvieron títulos más altos de IgM VD-específica que niños mayores también con infección primaria, resultado que es consistente con la respuesta de CSA IgM prot E-específicas (Figura 2B, C y Figura 3).

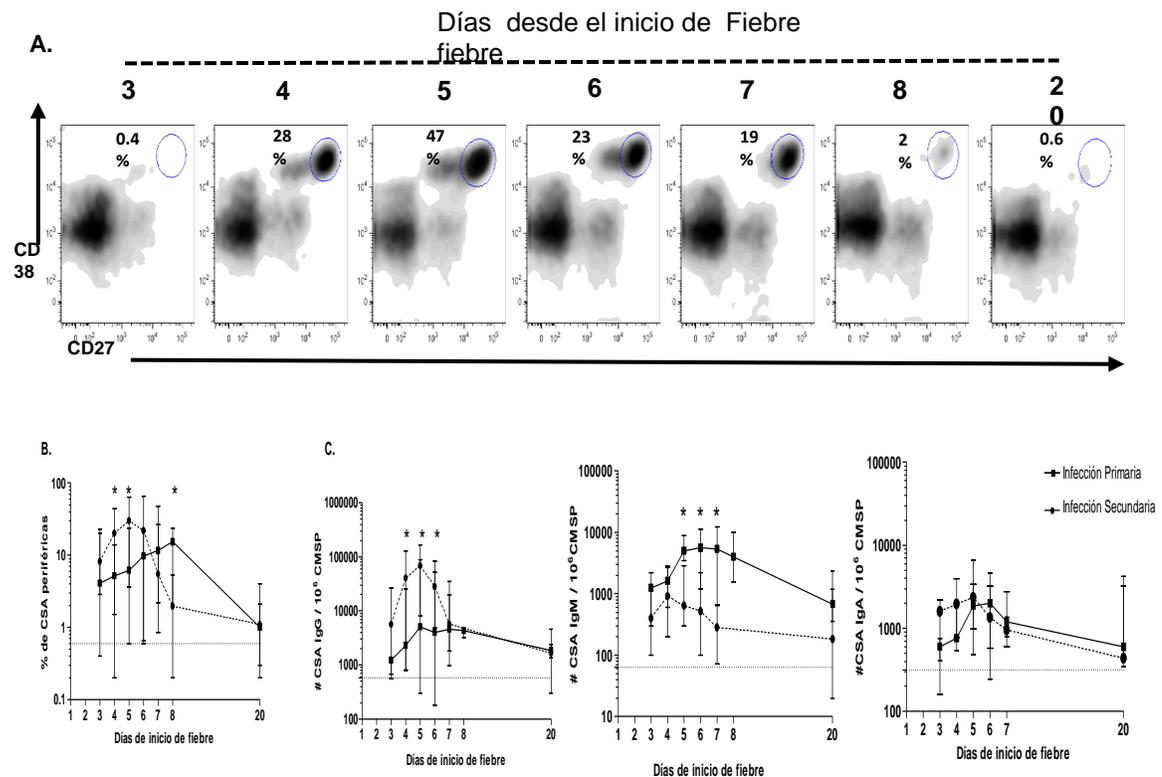
**Tabla 1.** Características demográficas y clínicas de los niños incluidos en el estudio.

Datos generales	Grupo Control n42	DSSA n 34	DCS n 50	SG n 32	p
Edad, M(r)		54(6-168)	39(4-168)	38(4-162)	0,1089 <sup>1</sup>
n<12 meses	10	6	23	12	
n >12 meses	32	28	27	20	
Día Enfermedad, M(r)	NA	4 (2-5)	4 (3-6)	4 (2-6)	0,1220 <sup>1</sup>
Infección secundaria (%)	NA	15(48)	27(56,2)	17(62,9)	0,611 <sup>2</sup>
<b>Paraclínicos</b>					
Leucocitos(Leu/ $\mu$ ), M(r)	8300(10000-12,000)	4200 (1500-9900)	7300 (2000 – 21000)	7600 (2200 – 2400)	0,0002 <sup>1</sup>
Hematocrito (%), M(r)	36 (30-40)	38 (28-44)	35.7 (46 – 26)	33 (46 - 23)	0,0172 <sup>1</sup>

Plaquetas (Pla $\mu$ )	200000 (180000- 240000)	144000 (83000 – 236000)	605000 (19000 – 334000)	42000 (13000 – 199000)	<0,0001 <sup>1</sup>
ALT mg/dl		NA	10 (20 – 87)	200 (58 – 2.964)	0,0005 <sup>3</sup>
<b>Hallazgos clínicos</b>					
Hepatomegalia		NA	3 (0-6)	4 (0-7)	0,0036 <sup>3</sup>
Derrame Pleural		NA	2 (0-25)	27 (0-40)	<0,0001 <sup>1</sup>

Pruebas estadísticas: <sup>1</sup> Kruskal-Wallis. <sup>2</sup> Fisher. <sup>3</sup> Mann-Whitney.  
M: Mediana, r: rango  
ALT: Alanino-amino transferasa NA: No aplica

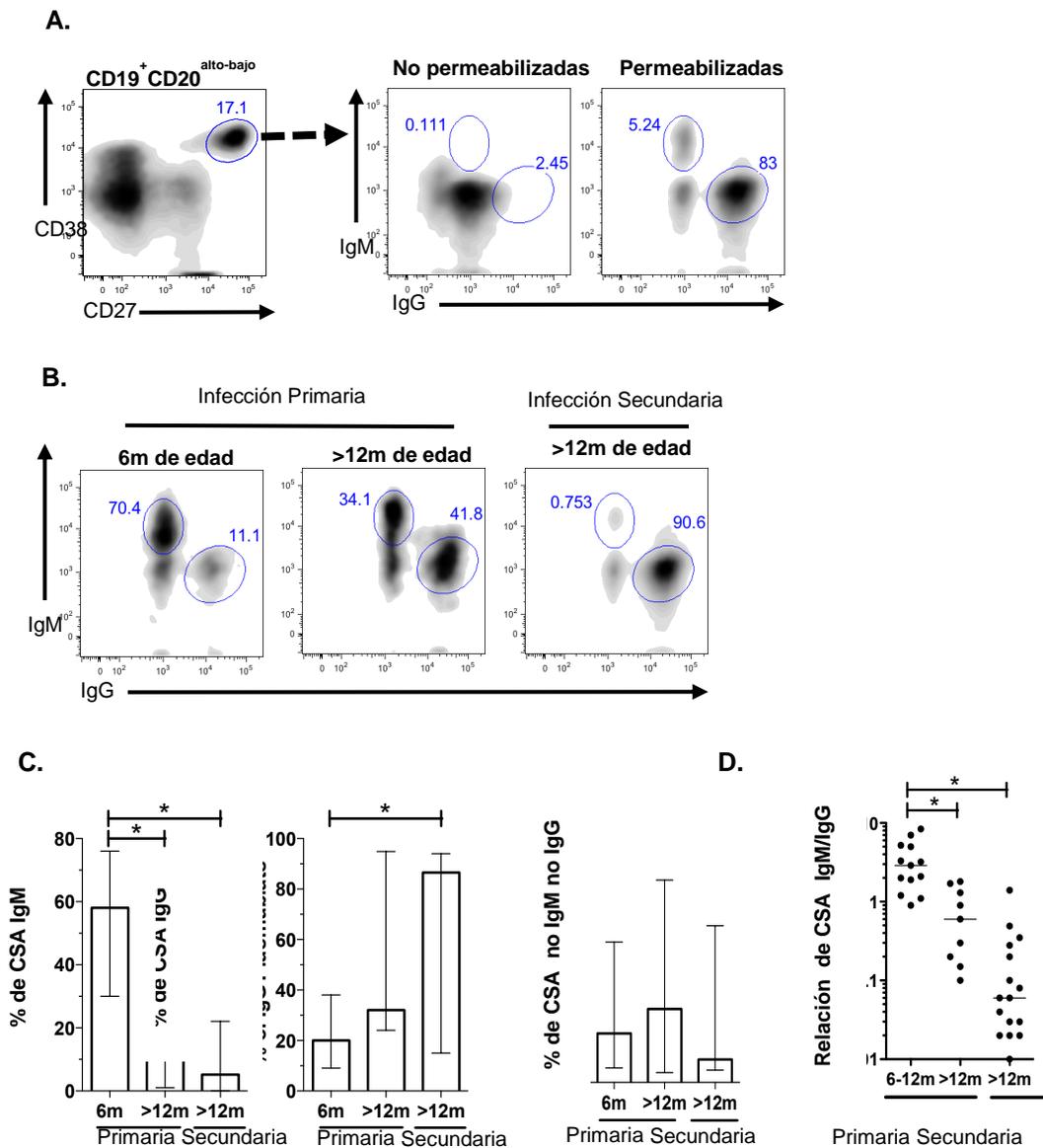
**Figura 1.** Cinética de las CSA circulantes en sangre periférica, medidas por citometría de flujo multiparamétrica.



La respuesta de CSA en lactantes es más baja, retardada y dominada por IgM. A. Cinética de CSA totales en sangre periférica evaluada diariamente en la fase aguda y una vez en la fase de convalecencia mediante citometría de flujo multiparamétrica, la población de CSA se definió como CD19+CD20<sup>High/low</sup>CD27+CD38+. B. La frecuencia de CSA circulantes en niños

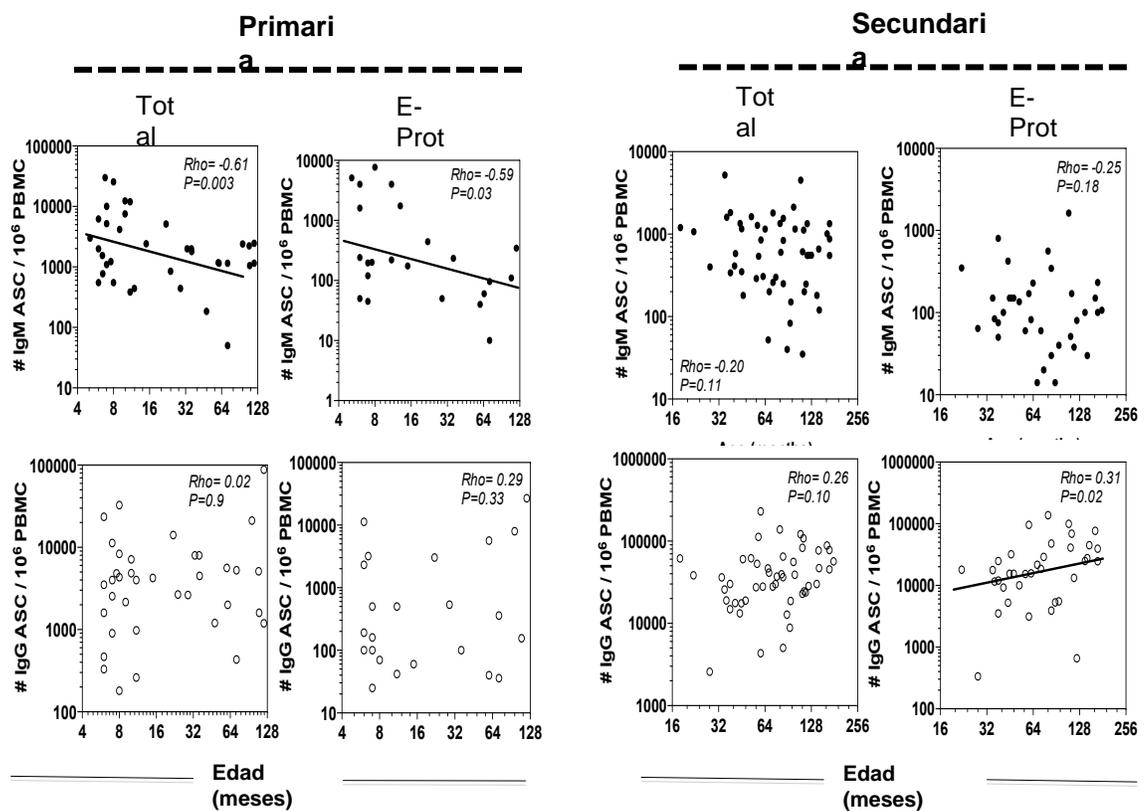
con infección primaria y secundaria (n:18 y n: 44 respectivamente.) C. Frecuencia de CSA isotipo IgA IgG y IgM fue medida por ELISPOT de dos colores para infecciones primeras y secundaria (n6-n13). Para cada día, se presenta la mediana y el rango de frecuencia de ASC. La línea horizontal representa la mediana de los resultados del grupo control. \* P<0.005, test de Bonferroni..

**Figura 2.** Respuesta de CSA en lactantes y niños menores, determinada por citometría de flujo multiparametrica con marcadores intracelulares.



CSA circulantes en los niños con infección primaria y secundaria por VD fueron marcadas intracelularmente, para determinar el isotipo expresado por citometría de flujo. A. Las CSA permeabilizadas y no permeabilizadas fueron evaluadas por citometría de flujo, en un niños con infección secundaria. B. Tinción intracelular de CSA de niños mayores y lactantes con infección primaria y CSA en niños mayores con infección secundaria. C. Frecuencia de CSA de isotipo M, G y No-M, No-G (probablemente A) de pacientes menores de 6 meses y mayores de 12 meses con infección primaria y secundaria. D. Relación de CSA que expresan IgM sobre IgG (radio IgM/IgG) de pacientes de 6-12 meses y mayores de 12 meses con infección primaria o secundaria. \* $P < 0.05$  prueba de Bonferroni modificada.

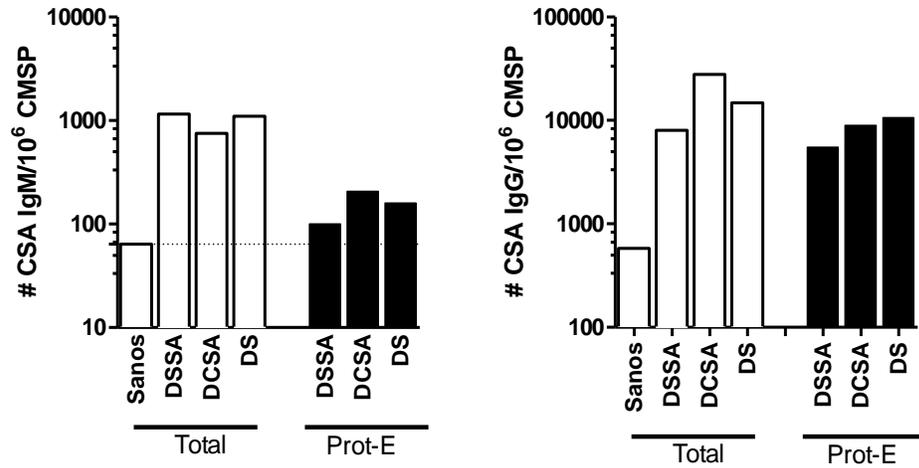
**Figura 3.** Respuesta de las CSA IgM e IgG totales y específicas para Prot E, en infección primaria y secundaria medida por ELISPOT y su relación con la edad de los pacientes.



El número absoluto por millón de CMSP de CSA totales y específicos para la proteína E obtenido por ELISPOT, se analizó en función de la edad de los niños con infección primaria y secundaria. El coeficiente de Spearman fue usado para analizar la correlación observada entre los diferentes parámetros. El coeficiente de

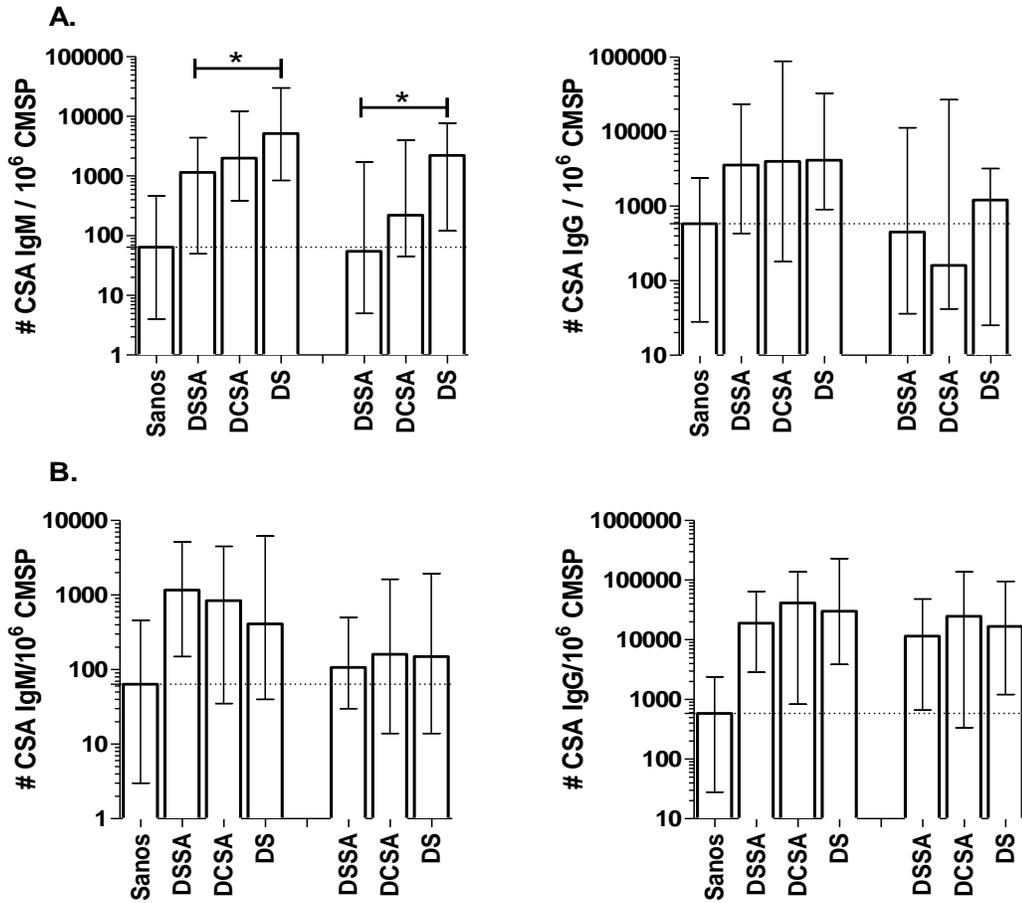
correlación, Rho de Spearman y P, son mostrados en la parte superior derecha de cada plot.

**Figura 4.** Frecuencia de CSA totales y específicas para Prot E, medidas por ELISPOT y su relación con la severidad clínica.



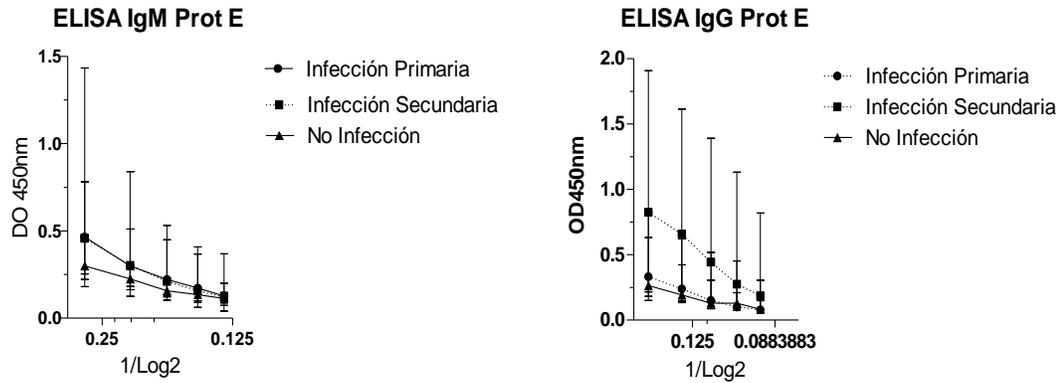
Frecuencia de CSA totales (barras vacías) y Ag-específicas (barras negras) de isotipo M y G identificadas por ELISPOT en sangre periférica, en los diferentes grupos de severidad clínica. Se aprecia una frecuencia mil veces mayor en el isotipo G, a su vez, (La línea horizontal punteada representa la media de la frecuencia de las CSA totales en el grupo de niños sanos)

**Figura 5.** Frecuencia de CSA isotipo M y G totales y específicas para Prot E, medidas por ELISPOT en infección primaria y secundaria.



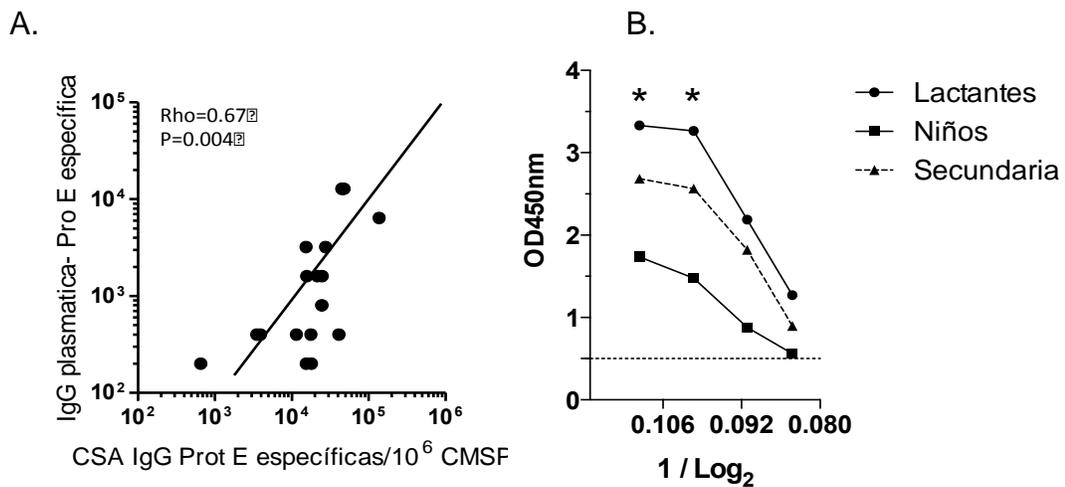
En cada uno de los tres grupos de severidad clínica por medio de ELISPOT, se determinó la frecuencia de las CSA de isotipo M y G totales y específicas para la proteína E y se reportó por millón de CMSP de niños con infección primaria (A) y secundaria (B). La línea horizontal punteada representa la mediana de la frecuencia de las CSA totales en los niños sanos. En la Figura A. Se muestra una frecuencia significativa más alta de las CSA tanto totales como específicas en los grupos de mayor severidad clínica. \*P=0.01, Mann-Whitney test.

**Figura 6.** Comparación de los títulos de anticuerpos G y M específicos para la Prot E, en niños con infección primaria vs secundaria.



Títulos de IgM e IgG (B) proteína E-específicas en plasma de niños con infección primaria y secundaria por virus dengue y controles sanos, medidos por ELISA. Los niveles de IgM son más elevados en la infección por VD aguda, con respecto al los control sanos serológicamente tipificados, pero no mostró diferencia entre la infección primaria y secundaria (A). Los niveles de IgG son más elevados en infección secundaria comparados con la infección primaria y el grupo control sano (B). \*  $P < 0.02$ , Kruskal-Wallis test realizado en cada una de la misma dilución seriada para los tres grupos.

**Figura 7.** La respuesta de CSA y los niveles de anticuerpos son dependientes de la edad y el tipo de infección por VD.



A. Existe una correlación positiva entre los títulos el nivel de IgG proteína E específica medida por ELISA y la frecuencia de las CSA determinada por ELISPOT. En el grupo de lactantes hay una marcada elevación de los títulos de IgM comparado con los niños mayores también con infección 1<sup>a</sup>. \* Diferencia significativa para la dilución respectivamente,  $P=0.01$ , Kruskal-Wallis test.

## **8. ASPECTOS ÉTICOS**

El presente estudio es financiado por Colciencias (Código: 112451929053) y la Universidad Surcolombiana, ninguno de los participantes tiene conflictos de interés.

Se tuvo en cuenta las consideraciones establecidas en la Resolución 8490 de 1993 del Ministerio de la Protección Social Capítulos 1 y 3.

Previo al inicio del proyecto éste fue presentado ante el Comité de Ética del Hospital Universitario de Neiva y al Comité de Ética de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana obteniendo la aprobación de estos comités para su realización.

Para el ingreso de cada paciente se llevó a cabo la firma del consentimiento informado por parte de padres o cuidadores legales (Anexo 2).

Toda la información concerniente al estado de cada paciente incluido se registró en los formatos previamente diseñados y luego se ingresó ésta a la base de datos que ha sido resguardada bajo los estrictos lineamientos de confidencialidad.

## 9. DISCUSIÓN

En éste trabajo se analizó la respuesta de CSA totales y proteína E-específicas en niños con infección aguda por VD, tanto primaria como secundaria. Una importante fracción de los niños con infección primaria fueron lactantes, lo que permitió relacionar el efecto de la edad sobre la respuesta de CSA circulantes totales y proteína E-específica. El VD indujo una rápida y masiva respuesta de CSA, dependiente del tipo de infección y la edad. Como se mencionó antes, este estudio incluyó un número importante de lactantes (niños de 6-12 meses de edad), en quienes se analizó en detalle la respuesta de CSA. En lactantes se encontró una respuesta de CSA más baja y retardada comparada con la respuesta en infecciones 2<sup>a</sup> (Figura 1). Se encontró además, que el isotipo M predomina en infecciones primarias de lactantes, mientras que la IgM e IgG se encuentran balanceadas en infecciones primarias de niños mayores de 12 meses (Figura 2). En general, la frecuencia de CSA totales y proteína E-específicas no estuvo asociada con la severidad clínica de la enfermedad y sólo la frecuencia de CSA de isotipo M prot E-específicas fue mayor en pacientes con infección primaria del grupo de dengue grave. Hubo una significativa correlación positiva entre la frecuencia de CSA IgG prot E-específica circulantes y los respectivos niveles plasmáticos de IgG en niños con infección secundaria.

En la fase aguda de la enfermedad hubo un incremento masivo de las CSA, constituyendo en algunos casos hasta el 50% de la población de LB circulantes, retornando a niveles casi indetectables en la fase de convalecencia. Esto coincide con reportes previos donde se obtuvieron niveles de CSA incluso del 80% del total de células B y hasta el 30% del total de linfocitos circulantes (Wrammert, Onlamoon et al. 2012). Conforme transcurrieron los días de la enfermedad, el número de CSA se fue incrementando y en algunos casos en la fase aguda hubo elevaciones mayores al 20% entre un día y otro (Figura 1A). Esto fue más notoriamente visible entre los días 4-6, días en los que se alcanzaron los picos más altos en la frecuencia de CSA (Figura 1B). Estos hallazgos son similares a los encontrados en pacientes de Brasil, Singapur, Nicaragua y Tailandia, donde también se observaron picos de CSA en este periodo (Balakrishnan, Bela-Ong et al. 2011, Zompi, Montoya et al. 2012, Garcia-Bates, Cordeiro et al. 2013), lo que podría estar relacionado con el comienzo de la fase crítica de la enfermedad durante estos días.

Sin embargo, la respuesta de CSA parece ser modulada por la edad de presentación de la enfermedad. La población de este estudio estuvo conformada por niños de edades entre 6 meses y 14 años con infecciones primarias y secundarias y se encontraron importantes diferencias en la respuesta de CSA entre ambos tipos de infecciones, siendo menor y más retardada en las primarias

(Figura 1B). Clásicamente, diferencias en la velocidad de la inducción y magnitud entre respuesta primaria y secundaria ha sido descritas, así que dengue parece ser un modelo que cumple parcialmente con estas características.

En este trabajo, la mayoría de infecciones primarias (59%) de presentaron en niños menores de 12 meses. Se ha descrito que infecciones primarias se presentan en pacientes de menor edad (Velasco, Alera et al. 2014), sin embargo hasta ahora, no se había hecho la diferenciación entre pacientes pediátricos lactantes y mayores. La menor respuesta de CSA en éstos niños puede deberse a las características del sistema inmune propias de la edad. Han sido descritas diferencias en el sistema inmune presentes en edad temprana de la vida. Por ejemplo, la distribución de las subpoblaciones de LB es diferente en etapas tempranas de la vida (0-12 meses) (Dowling and Levy 2014), con disminuida expresión de receptores como CD21, CD40, CD80 y CD86, con una menor eficiencia de activación de LB por parte de células dendríticas foliculares y el limitado acceso a nichos en la médula ósea para la supervivencia de células plasmáticas y de memoria (Siegrist and Aspinall 2009), llevan a una menor inducción y persistencia de CSA en ésta edad. También se ha descrito diferencias asociadas con la edad en células innatas como por ejemplo disminución en la expresión de moléculas de co-estimulación y menor capacidad de producción de citocinas (Velilla, Rugeles et al. 2006)

Algunos de los procesos más importantes que se pueden afectar debido a la limitada respuesta de LB durante el primer año de vida es el cambio de isotipo. En concordancia a esto, Lactantes tuvieron más alta frecuencia de CSA IgM que niños mayores también con infección primaria (Figura 2).

En general, la dominancia de uno u otro isotipo según el tipo de infección representa el balance en la activación de células B vírgenes y células B de memoria conmutada, además de los factores necesarios para la inducción del cambio de isotipo que se presentan en cada una de ellas (Balakrishnan, Bela-Ong et al. 2011). La diferenciación de LB de memoria a CSA también es modulado por la edad (Siegrist and Aspinall 2009), lo que explica la retardada respuesta de CSA de isotipo M (en lactantes con infección primaria) en comparación con las de isotipo G (Figura 1C).

Además de estudiar la respuesta de CSA totales, se analizaron las CSA específicas para la proteína E de VD. El uso de esta proteína en el ensayo funcional ELISPOT -en lugar de virus completo- es soportado por reportes previos donde se ha comprobado su inmunodominancia en la respuesta humoral contra VD (Rothman 2004, MeiHui, Vey *et al.* 2012). Se encontró una correlación

negativa entre la edad y la frecuencia de CSA de isotipo M totales y proteína E-específicas y una correlación positiva entre el número de CSA de isotipo G proteína E-específicas y la edad de los pacientes con infección secundaria (Figura 3). La asociación entre la frecuencia de CSA totales, proteína E-específica y el tipo de infección en dengue ha sido previamente descrita, se encontró para el caso de infección por VD del serotipo 1 hay una mayor frecuencia en infección primaria, sin embargo esto no encontró este hallazgo en infección con el serotipo 3 (Mathew, West et al. 2011). Pero la asociación entre el isotipo de las CSA y la edad no ha sido reportado, hasta ahora. Consistentes con nuestros resultados y trabajos previos (Balakrishnan, Bela-Ong et al. 2011, Zompi, Montoya et al. 2012), la asociación encontrada entre la respuesta de CSA totales, proteína E-específicas y la edad de los niños con infección primaria y secundaria demuestra que en niños menores de 12 meses (y pacientes que con un primer reto antigénico por VD) la respuesta inmune humoral esta mediada por CSA de isotipo M proteína E-específicas durante los primeros días de la enfermedad. Ante infecciones subsecuentes la respuesta es mediada por LB de memoria conmutada (de isotipo G), que probablemente han realizado maduración de afinidad, por lo que en infección secundaria la frecuencia de CSA de isotipo G proteína-E específica se asocia con una mayor magnitud y positivamente con la edad (Figura 3).

Debido a la masiva respuesta de CSA durante la fase aguda de la infección por VD, se intento establecer relación entre la frecuencia de estas células y la severidad clínica de la enfermedad. Contrario a lo que se esperaba, no hubo claras diferencias entre la frecuencia de CSA de isotipo M y G totales y proteína E-específicas en los tres grupos de dengue clasificados desde el punto de vista clínico (Figura 4), pero sí se encontró una mayor frecuencia de CSA de isotipo M totales y proteína E-específicas en el grupo de niños con DS comparados con niños con DSSA, ambos infectados primariamente (Figura 5A). Hasta el momento sólo un estudio ha encontrado una correlación positiva entre la frecuencia de CSA totales (de isotipo G) y la severidad del dengue (Garcia-Bates, Cordeiro et al. 2013) y éste hallazgo podría ser atribuido al tipo de infección -ya que la mayoría de los individuos con DS en esa cohorte presentaban infección secundaria, a diferencia de los no severos, que cursaban con infecciones primarias. Es probable que en niños menores de 12 meses, debido a las características propias de su sistema inmune, la respuesta ante VD mediada por CSA predominantemente de isotipo M contribuya a la patogénesis de la enfermedad, aunque es difícil discernirlo del efecto de los anticuerpos IgG transferidos por vía placentaria que pueden durar hasta un año de edad. Sin embargo, en apoyo del papel de la IgM específica inducida por la infección en los lactantes con formas clínicamente relevantes de la enfermedad, no se evidenciaron niveles detectables de IgG VD-específica o anti-proteína E plasmática en esta población por los dos tipos de ELISA usados, cuando este grupo fue evaluado. Es posible que la baja y retardada respuesta de las CSA de isotipo M en comparación con las de isotipo G durante los primeros 4 a 6 días de la enfermedad, favorezcan la evolución a

estadios más graves, ya que es en estos días donde se presentan la mayoría de complicaciones. De hecho, la presencia de IgM específica para VD detectada tempranamente ha sido asociada con mayor riesgo de formas graves de la infección por VD (De La Cruz Hernández, Ortiz-Navarrete et al. 2013)

En lactantes se encontró una correlación positiva entre los títulos de IgG y las células secretoras de anticuerpos, y la frecuencia de IgG en los lactantes es mayor, posiblemente por la suma de IgG materna aún circulantes. Estos hallazgos no habían sido descritos previamente.

En resumen, el VD induce una masiva respuesta de CSA totales y proteína E-específicas, pero ésta es más baja y retardada en niños menores de 12 meses. En este grupo, las CSA son predominantemente de isotipo M y podrían contribuir al desarrollo de formas severas de la enfermedad. La diferencia en la respuesta de CSA ante la infección por VD según la edad constituye un aspecto crítico a tener en cuenta a la hora del diseño e implementación de vacunas contra éste virus.

## 10. CONCLUSIONES

El VD induce una rápida y masiva respuesta de CSA, siendo la mayor frecuencia entre el cuarto y sexto día desde el inicio de los síntomas. Estos niveles caen en la fase de convalecencia (21 días después del inicio de la fiebre).

La respuesta de CSA es dependiente de la edad, siendo más baja y retardada en niños menores de 12 meses comparados con niños mayores a ésta edad, ambos con infección primaria.

El isotipo de CSA dominante en infecciones primarias es el M, mientras que en secundarias es el G.

Existe una correlación negativa entre la frecuencia de CSA totales y proteína E-específicas de isotipo M y la edad de niños con infección primaria por VD y una correlación positiva entre CSA IgG proteína E-específicas y la edad de niños con infección secundaria.

La frecuencia de CSA totales y proteína E-específicas no se asocia con la severidad clínica de la enfermedad, pero en pacientes con DS e infección primaria hay una mayor frecuencia de CSA de isotipo M.

Hubo una asociación positiva entre los niveles de IgG proteína E-específica y la frecuencia de CSA de isotipo G proteína E-específica en niños con infección secundaria por VD.

## 11. RECOMENDACIONES

Contribuir en los estudios de vacunas con virus atenuados actualmente en curso, orientando en la elección del grupo de etario ideal para recibir el esquema de vacunación, teniendo en cuenta que aquí se demostró que la respuesta de las CSA es dependiente de la edad, en los lactantes existe una respuesta retardada, menos intensa y dominada por el isotipo M.

Continuar con estudios que permitan la síntesis de Anticuerpos monoclonales a partir de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas provenientes de CSA inducidas por infección natural, después de conocer y entender mejor la cinética de las CSA.

## BIBLIOGRAFIA

Avirutnan, P., N. Punyadee, S. Noisakran, C. Komoltri, S. Thiemmecca, K. Auethavornanan, A. Jairungsri, R. Kanlaya, N. Tangthawornchaikul, C. Puttikhunt, S. N. Pattanakitsakul, P. T. Yenchitsomanus, J. Mongkolsapaya, W. Kasinrerak, N. Sittisombut, M. Husmann, M. Blettner, S. Vasanawathana, S. Bhakdi and P. Malasit (2006). "Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement." *J Infect Dis* 193(8): 1078-1088.

Balakrishnan, T., D. B. Bela-Ong, Y. X. Toh, M. Flamand, S. Devi, M. B. Koh, M. L. Hibberd, E. E. Ooi, J. G. Low, Y. S. Leo, F. Gu and K. Fink (2011). "Dengue virus activates polyreactive, natural IgG B cells after primary and secondary infection." *PLoS One* 6(12): e29430.

Becerra, A., R. V. Warke, N. de Bosch, A. L. Rothman and I. Bosch (2008). "Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients." *Cytokine* 41(2): 114-120.

Beltramello, M., K. L. Williams, C. P. Simmons, A. Macagno, L. Simonelli, N. T. Quyen, S. Sukupolvi-Petty, E. Navarro-Sanchez, P. R. Young, A. M. de Silva, F. A. Rey, L. Varani, S. S. Whitehead, M. S. Diamond, E. Harris, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2010). "The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity." *Cell Host Microbe* 8(3): 271-283.

Chakravarti, A. and R. Kumaria (2006). "Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak." *Indian J Med Res* 123(1): 25-30.

Chareonsirisuthigul, T., S. Kalayanaroj and S. Ubol (2007). "Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells." *J Gen Virol* 88(Pt 2): 365-375.

Chaturvedi, U. C. (2009). "Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever." *Indian J Med Res* 129(1): 1-3.

Clyde, K., J. L. Kyle and E. Harris (2006). "Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis." *J Virol* 80(23): 11418-11431.

De La Cruz Hernández, S. I., V. Ortiz-Navarrete, J. E. Ludert and R. M. Del Angel (2013). "Dengue specific IgM seropositivity correlates with severe clinical outcome." *J Clin Virol* 58(4): 751.

Dejnirattisai, W., A. Jumnainsong, N. Onsirirakul, P. Fitton, S. Vasanawathana, W. Limpitikul, C. Puttikhunt, C. Edwards, T. Duangchinda, S. Supasa, K. Chawansuntati, P. Malasit, J. Mongkolsapaya and G. Screaton (2010). "Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans." *Science* 328(5979): 745-748.

Dowling, D. J. and O. Levy (2014). "Ontogeny of early life immunity." *Trends Immunol* 35(7): 299-310.

Endy, T. P., A. Nisalak, S. Chunsuttitwat, D. W. Vaughn, S. Green, F. A. Ennis, A. L. Rothman and D. H. Libraty (2004). "Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand." *J Infect Dis* 189(6): 990-1000.

Fernández-Mestre, M. T., K. Gendzekhadze, P. Rivas-Vetencourt and Z. Layrisse (2004). "TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients." *Tissue Antigens* 64(4): 469-472.

Ferreira, G. L. (2012). "Global dengue epidemiology trends." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54 Suppl 18: S5-6.

Fink, K. (2012). "Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections." *Front Immunol* 3: 78.

Garcia-Bates, T. M., M. T. Cordeiro, E. J. Nascimento, A. P. Smith, K. M. Soares de Melo, S. P. McBurney, J. D. Evans, E. T. Marques, Jr. and S. M. Barratt-Boyes (2013). "Association between magnitude of the virus-specific plasmablast response and disease severity in dengue patients." *J Immunol* 190(1): 80-87.

Gonzalez, A. M., M. C. Jaimes, I. Cajiao, O. L. Rojas, J. Cohen, P. Pothier, E. Kohli, E. C. Butcher, H. B. Greenberg, J. Angel and M. A. Franco (2003). "Rotavirus-specific B cells induced by recent infection in adults and children predominantly express the intestinal homing receptor alpha4beta7." *Virology* 305(1): 93-105.

Gourley, T. S., E. J. Wherry, D. Masopust and R. Ahmed (2004). "Generation and maintenance of immunological memory." *Semin Immunol* 16(5): 323-333.

Green, S. and A. Rothman (2006). "Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever." *Curr Opin Infect Dis* 19(5): 429-436.

Gubler, D. J. (1998). "Dengue and dengue hemorrhagic fever." *Clin Microbiol Rev* 11(3): 480-496.

Guerrero, C. D., A. F. Arrieta, N. D. Ramirez, L. S. Rodríguez, R. Vega, I. Bosch, J. A. Rodríguez, C. F. Narváez and D. M. Salgado (2013). "High plasma levels of soluble ST2 but not its ligand IL-33 is associated with severe forms of pediatric dengue." *Cytokine* 61(3): 766-771.

Halstead, S. B. (2007). "Dengue." *Lancet* 370(9599): 1644-1652.

Halstead, S. B., J. S. Porterfield and E. J. O'Rourke (1980). "Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera." *Am J Trop Med Hyg* 29(4): 638-642.

Harris, E., T. G. Roberts, L. Smith, J. Selle, L. D. Kramer, S. Valle, E. Sandoval and A. Balmaseda (1998). "Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR." *J Clin Microbiol* 36(9): 2634-2639.

Hatch, S., T. P. Endy, S. Thomas, A. Mathew, J. Potts, P. Pazoles, D. H. Libraty, R. Gibbons and A. L. Rothman (2011). "Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection." *J Infect Dis* 203(9): 1282-1291.

Hottz, E. D., I. M. Medeiros-de-Moraes, A. Vieira-de-Abreu, E. F. de Assis, R. Vals-de-Souza, H. C. Castro-Faria-Neto, A. S. Weyrich, G. A. Zimmerman, F. A. Bozza

and P. T. Bozza (2014). "Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue." *J Immunol* 193(4): 1864-1872.

Houghton-Triviño, N., D. M. Salgado, J. A. Rodríguez, I. Bosch and J. E. Castellanos (2010). "Levels of soluble ST2 in serum associated with severity of dengue due to tumour necrosis factor alpha stimulation." *J Gen Virol* 91(Pt 3): 697-706.

Huang, Y. H., H. Y. Lei, H. S. Liu, Y. S. Lin, C. C. Liu and T. M. Yeh (2000). "Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production." *Am J Trop Med Hyg* 63(1-2): 71-75.

Janeway, C. (2012). *The Development and Survival of Lymphocytes* Janeway's immunobiology. Garland Science. New York, NY 10017, USA, Garland Science,. 1: 275-334.

Kantele, J. M., A. Kantele and H. Arvilommi (1996). "Circulating immunoglobulin-secreting cells are heterogeneous in their expression of maturation markers and homing receptors." *Clin Exp Immunol* 104(3): 525-530.

Kumarasamy, V., S. K. Chua, Z. Hassan, A. H. Wahab, Y. K. Chem, M. Mohamad and K. B. Chua (2007). "Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection." *Singapore Med J* 48(7): 669-673.

Kwissa, M., H. I. Nakaya, N. Onlamoon, J. Wrammert, F. Villinger, G. C. Perng, S. Yoksan, K. Pattanapanyasat, K. Chokephaibulkit, R. Ahmed and B. Pulendran (2014). "Dengue virus infection induces expansion of a CD14(+)CD16(+) monocyte population that stimulates plasmablast differentiation." *Cell Host Microbe* 16(1): 115-127.

Lanciotti, R. S., C. H. Calisher, D. J. Gubler, G. J. Chang and A. V. Vorndam (1992). "Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction." *J Clin Microbiol* 30(3): 545-551.

Laur, F., B. Murgue, X. Deparis, C. Roche, O. Cassar and E. Chungue (1998). "Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92(6): 654-656.

Loke, H., D. B. Bethell, C. X. Phuong, M. Dung, J. Schneider, N. J. White, N. P. Day, J. Farrar and A. V. Hill (2001). "Strong HLA class I--restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword?" *J Infect Dis* 184(11): 1369-1373.

Martina, B. E., P. Koraka and A. D. Osterhaus (2009). "Dengue virus pathogenesis: an integrated view." *Clin Microbiol Rev* 22(4): 564-581.

Mathew, A., K. West, S. Kalayanarooj, R. V. Gibbons, A. Srikiatkachorn, S. Green, D. Libraty, S. Jaiswal and A. L. Rothman (2011). "B-cell responses during primary and secondary dengue virus infections in humans." *J Infect Dis* 204(10): 1514-1522.

Medin, C. L., K. A. Fitzgerald and A. L. Rothman (2005). "Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion." *J Virol* 79(17): 11053-11061.

MeiHui, X., H. Vey, A. Ramaprabha and F. Katja (2012). "Dengue Infection Are Virus Glycoprotein Plasmablasts Generated during Repeated Specific and Bind to Multiple Virus Serotypes " *J Immunol* 189: 5877–5885.

Mercado, M. (2013). Informe Final Dengue. Procesos de vigilancia y control en salud pública. I. N. d. Salud. [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe de Evento Epidemiologico/DENGUE 2013.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/DENGUE%202013.pdf). 1: 1-28.

Murray, N. E., M. B. Quam and A. Wilder-Smith (2013). "Epidemiology of dengue: past, present and future prospects." *Clin Epidemiol* 5: 299-309.

Nascimento, E. J., E. D. Hottz, T. M. Garcia-Bates, F. Bozza, E. T. Marques and S. M. Barratt-Boyes (2014). "Emerging concepts in dengue pathogenesis: interplay between plasmablasts, platelets, and complement in triggering vasculopathy." *Crit Rev Immunol* 34(3): 227-240.

Nishioka, K. (1974). "Serum complement level in dengue hemorrhagic fever." *Allerg Immunol (Leipz)* 20-21(4): 385-392.

Ong, A., M. Sandar, M. I. Chen and L. Y. Sin (2007). "Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore." *Int J Infect Dis* 11(3): 263-267.

Organization, W. H. (2009). *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. France.

Reyes-Del Valle, J., S. Chávez-Salinas, F. Medina and R. M. Del Angel (2005). "Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells." *J Virol* 79(8): 4557-4567.

Rocha, E. S., J. G. Oliveira, J. R. Santos, G. O. Rodrigues, L. B. Figueiredo, J. E. Pessanha, F. A. Proietti, F. G. Fonseca, C. A. Bonjardim, P. C. Ferreira and E. G. Kroon (2013). "Recombinant envelope protein-based enzyme immunoassay for IgG antibodies is comparable to neutralization tests for epidemiological studies of dengue infection." *J Virol Methods* 187(1): 114-120.

Rodenhuis-Zybert, I. A., J. Wilschut and J. M. Smit (2010). "Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity." *Cell Mol Life Sci* 67(16): 2773-2786.

Rojas, D. P., J. C. Padilla, J. P. Escobar, L. A. Villar and D. Salgado (2010). *Guía de Atención Clínica Integral del Paciente con Dengue*. M. d. P. Social. 1: 1-45.

Rothman, A. L. (2004). "Dengue: defining protective versus pathologic immunity." *J Clin Invest* 113(7): 946-951.

Rothman, A. L. (2011). "Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms." *Nat Rev Immunol* 11(8): 532-543.

SABIN, A. B. (1952). "Research on dengue during World War II." *Am J Trop Med Hyg* 1(1): 30-50.

Salgado, D. M., J. M. Eltit, K. Mansfield, C. Panqueba, D. Castro, M. R. Vega, K. Khaja, D. Schmidt, K. J. Martin, P. D. Allen, J. A. Rodriguez, J. H. Dinsmore, J. R.

López and I. Bosch (2010). "Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection." *Pediatr Infect Dis J* 29(3): 238-242.

Salgado, D. M., C. A. Panqueba, D. Castro, M. R. Vega and J. A. Rodríguez (2009). "[Myocarditis in children affected by dengue hemorrhagic fever in a teaching hospital in Colombia]." *Rev Salud Publica (Bogota)* 11(4): 591-600.

Salgado, D. M., J. A. Rodríguez, M. Garzón, G. Cifuentes, M. Ibarra, M. R. Vega and D. Castro (2007). "[Clinical and epidemiological characterisation of dengue haemorrhagic fever in Neiva, Colombia, 2004]." *Rev Salud Publica (Bogota)* 9(1): 53-63.

San Martín, J. L., O. Brathwaite, B. Zambrano, J. O. Solórzano, A. Bouckenoghe, G. H. Dayan and M. G. Guzmán (2010). "The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality." *Am J Trop Med Hyg* 82(1): 128-135.

Sangkawibha, N., S. Rojanasuphot, S. Ahandrik, S. Viriyapongse, S. Jatanasen, V. Salitul, B. Phanthumachinda and S. B. Halstead (1984). "Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak." *Am J Epidemiol* 120(5): 653-669.

Sasaki, S., M. Sullivan, C. F. Narvaez, T. H. Holmes, D. Furman, N. Y. Zheng, M. Nishtala, J. Wrammert, K. Smith, J. A. James, C. L. Dekker, M. M. Davis, P. C. Wilson, H. B. Greenberg and X. S. He (2011). "Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies." *J Clin Invest* 121(8): 3109-3119.

Shapiro-Shelef, M. and K. Calame (2005). "Regulation of plasma-cell development." *Nat Rev Immunol* 5(3): 230-242.

Siegrist, C. A. and R. Aspinall (2009). "B-cell responses to vaccination at the extremes of age." *Nat Rev Immunol* 9(3): 185-194.

Simmons, C. P., J. J. Farrar, v. Nguyen and B. Wills (2012). "Dengue." *N Engl J Med* 366(15): 1423-1432.

Tassaneeritthep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumppheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger and M. A. Marovich (2003). "DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells." *J Exp Med* 197(7): 823-829.

Thein, S., M. M. Aung, T. N. Shwe, M. Aye, A. Zaw, K. Aye, K. M. Aye and J. Aaskov (1997). "Risk factors in dengue shock syndrome." *Am J Trop Med Hyg* 56(5): 566-572.

Vaughn, D. W., S. Green, S. Kalayanarooj, B. L. Innis, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, T. P. Endy, B. Raengsakulrach, A. L. Rothman, F. A. Ennis and A. Nisalak (2000). "Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity." *J Infect Dis* 181(1): 2-9.

Velasco, J. M., M. T. Alera, C. A. Ypil-Cardenas, E. M. Dimaano, R. G. Jarman, P. Chinnawirotpisan, B. Thaisomboonsuk, I. K. Yoon, D. A. Cummings and M. P. Mammen, Jr. (2014). "Demographic, clinical and laboratory findings among adult and pediatric patients hospitalized with dengue in the Philippines." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 45(2): 337-345.

Velilla, P. A., M. T. Rugeles and C. A. Chougnet (2006). "Defective antigen-presenting cell function in human neonates." *Clin Immunol* 121(3): 251-259.

Villar, L., G. H. Dayan, J. L. Arredondo-García, D. M. Rivera, R. Cunha, C. Deseda, H. Reynales, M. S. Costa, J. O. Morales-Ramírez, G. Carrasquilla, L. C. Rey, R. Dietze, K. Luz, E. Rivas, M. C. Montoya, M. C. Supelano, B. Zambrano, E. Langevin, M. Boaz, N. Tornieporth, M. Saville, F. Noriega and t. C. S. Group (2014). "Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America." *N Engl J Med*.

Wahala, W. M. and A. M. Silva (2011). "The human antibody response to dengue virus infection." *Viruses* 3(12): 2374-2395.

Wills, B. A., E. E. Oragui, N. M. Dung, H. T. Loan, N. V. Chau, J. J. Farrar and M. Levin (2004). "Size and charge characteristics of the protein leak in dengue shock syndrome." *J Infect Dis* 190(4): 810-818.

Wrammert, J., N. Onlamoon, R. S. Akondy, G. C. Perng, K. Polsrila, A. Chandele, M. Kwissa, B. Pulendran, P. C. Wilson, O. Wittawatmongkol, S. Yoksan, N. Angkasekwina, K. Pattanapanyasat, K. Chokephaibulkit and R. Ahmed (2012). "Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans." *J Virol* 86(6): 2911-2918.

Wrammert, J., K. Smith, J. Miller, W. A. Langley, K. Kokko, C. Larsen, N. Y. Zheng, I. Mays, L. Garman, C. Helms, J. James, G. M. Air, J. D. Capra, R. Ahmed and P. C. Wilson (2008). "Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus." *Nature* 453(7195): 667-671.

Zainah, S., A. H. Wahab, M. Mariam, M. K. Fauziah, A. H. Khairul, I. Roslina, A. Sairulakhma, S. S. Kadimon, M. S. Jais and K. B. Chua (2009). "Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA." *J Virol Methods* 155(2): 157-160.

Zivna, I., S. Green, D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, H. A. Stephens, D. Chandanayingyong, A. Nisalak, F. A. Ennis and A. L. Rothman (2002). "T cell responses to an HLA-B\*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity." *J Immunol* 168(11): 5959-5965.

Zompi, S., M. Montoya, M. O. Pohl, A. Balmaseda and E. Harris (2012). "Dominant cross-reactive B cell response during secondary acute dengue virus infection in humans." *PLoS Negl Trop Dis* 6(3): e1568.

# ANEXOS

**Anexo A. PCR Convencional.**



Serotipificación de las muestras de plasma de niños infectados con DENV por RT-PCR convencional. MP: Marcador de peso; D1: Virus Dengue 1; D2: Virus Dengue 2; D3: Virus Dengue 3; D4: Virus Dengue 4; Sev 61 y Sev 56: Plasma de niños con infección por DENV; CN: Control negativo.

**Anexo B.** Formato de recolección de datos demográficos, clínicos y para clínicos.

Formato de recolección datos generales y de diagnostico

SEROTECA	HC	PROCEDENCIA	GENER	FECHAING	DIA ENF.	NS 1	IgM	IgG	1°/2°	RT-PCR
6NP	365194	NEIVA	M	6/10/09	4	+	+	+	2°	D2
92	491798	NEIVA	F	10/09/09	6	+	+	+	2°	D2
168	447404	RIVERA	M	22/11/09	3	-	+	+	2°	NEG
170	472192	NEIVA	M	24/11/09	5	+	+	-	1°	NEG
180	491869	CAMPOALEGRE	F	2/12/09	5	-	+	+	2°	D1/2
496	512954	NEIVA	M	28/06/10	3	+	+	-	1°	NEG
569	519065	NEIVA	F	20/09/10	5	+	+	-	1°	NEG
698	543661	NEIVA	M	9/09/11	6	-	+	+	2°	NEG
705	545411	NEIVA	M	27/09/11	4	+	+	+	2°	NEG
783	546210	NEIVA	F	12/01/12	5	+	+	-	1°	NEG
786	553168	NEIVA	M	14/01/12	5	+	+	+	2°	D2
792	553589	NEIVA	M	21/01/12	4	+	+	+	2°	D2
795	553641	TELLO	M	23/01/12	4	+	+	+	2°	D2
808	284276	NEIVA	M	1/02/12	5	+	+	+	2°	NEG
939	559754	NEIVA	F	17/04/12	4	+	+	-	1°	NEG
965	560729	NEIVA	F	30/04/12	4	+	+	-	1°	D3
967	560767	NEIVA	F	1/05/12	5	+	+	-	1°	NEG
987	562190	NEIVA	F	19/05/12	4	+	+	+	2°	NEG
1014	522334	NEIVA	F	5/06/12	5	+	+	+	2°	NEG
1015	415733	NEIVA	M	5/06/12	4	-	+	+	2°	NEG
1116	565666	NEIVA	F	13/07/12	4	+	+	+	2°	NEG
1017	563599	NEIVA	F	5/06/12	5	+	+	-	1°	D2
1025	563762	NEIVA	F	7/06/12	5	+	+	-	1°	D2
1062	542734	ALGECIRAS	M	19/06/12	2	+	+	-	1°	D1

Formato de recolección resultados clínicos y para clínicos

LEUCOS	HB	HCTO	PLAQ	TGO	TGP	PT	PTT	ALB	CPK	CK-MB	CREA	TI	HIGADO cm	DERRAME %
4900	14	41,4	13000	55	19	25,6	115,1	2,9	301	9	-	-	3,0	30
8900	14,2	41,1	39000	183	49	16,4	37,8	2,7	1174	21	0,5	-	4,0	30
7100	15,3	46	148000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	26
10300	13,5	39,6	56000	76	27	21,2	15,6	2,5	58	14	0,32	-	4,0	35
5600	11,3	38,5	15000	145	61	17	68,9	2,2	22	6	0,49	-	5,0	22
6400	10,5	28,4	129000	60	28	23,6	70,4	-	-	-	-	-	5,0	28
7000	10,3	31,4	54000	250	61	22,6	70,9	2,5	-	-	0,33	-	6,0	25
17500	18,1	52,9	17000	1165	591	20,4	48,9	2,1	79	51	0,41	0,15	6,0	12
25300	14	40,3	40000	1874	489	30	96,2	2	236	98	0,48	0,08	5,0	28
4400	11,5	35,5	54000	890,5	309,7	13,5	63,2	3,6	130	36,9	0,23	0,08	3,5	25
1500	14,5	42,2	23000	696	242	17,4	45,4	3,2	171,0	38,8	0,4	0,01	7,0	30
10500	14,2	42,3	42000	135,6	39,5	14,8	49,2	2,7	94,0	70,2	0,58	0,01	5,0	25
4600	12,3	37,4	105000	129,6	49,8	17,1	40,2	3,8	789	482	0,3	0,01	2,0	30
4100	11,3	33,6	16000	616,4	287,3	20	50	2,4	483,0	36,5	-	0,01	3,0	40
11100	9,2	26	54000	642,5	221,5	15,8	83,4	2,5	45,0	31,8	0,4	0,1	4,0	32
1100	10,6	30,4	56000	125,8	36	13,6	49,2	-	764	33,7	0,19	0,01	5,0	27
12400	9,9	29,3	37000	358	1035	11,6	72,4	3	116,0	67,0	0,58	0,08	2,0	0
9500	14,3	42,8	20000	443	162,9	28,5	52	2,5	74	71,7	-	-	6,0	35
3700	11,7	33,2	90000	174,2	42,7	14,7	55,7	-	-	-	-	-	4,0	30
4600	10,7	32,1	53000	56,5	17,5	13,6	32,7	-	37,0	33,3	0,36	0,01	0,0	30
4900	10,1	29,3	67000	128,4	49,4	17,4	45,3	-	-	-	0,42	-	3,0	20
3600	13	39,9	44000	184,5	48,2	11,9	41,2	3	46	30,7	0,24	0,01	4,0	30
5900	12	37	46000	176	50	14	47	2,4	208	33,1	0,32	0,01	4,0	25
7400	10,3	32,2	130000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	0
2900	12,9	38,2	27000	34,3	26,9	16,4	45	1,9	55	30,1	0,23	0,77	4,0	20

5000	13,4	38,9	9000	374,2	217,9	13,8	28,1	-	36	13,6	0,5	0,01	3,0	11
11000	9,6	26,4	59000	6524	2518.6	19.6	54,6	2.8	-	-	0.42	-	6,0	14

**Anexo C. Consentimiento informado.**

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
PROGRAMA DE MEDICINA

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA UN NIÑO QUE VA A PARTICIPAR EN  
EI PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“Caracterización de la respuesta de células secretoras de anticuerpos circulantes totales y específicas de virus dengue en niños infectados naturalmente y su relación con la severidad de la enfermedad”

Usted está invitado a participar en un estudio de investigación realizado por la Universidad Surcolombiana en colaboración con el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, la Universidad de Stanford y la Universidad de Massachusetts.

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

(a) Su participación y la de su hijo(a) en este estudio es totalmente voluntaria. (b) NO PODEMOS GARANTIZARLE Y NO LE GARANTIZAMOS O PROMETEMOS QUE USTED RECIBIRA ALGUN BENEFICIO DIRECTO DE ESTE ESTUDIO. Sin embargo, esta investigación nos permite clarificar muchos conceptos sobre los mecanismos fisiopatológicos e inmunológicos del dengue, una enfermedad importante en nuestra región, de manera que los beneficios posteriores sean para usted, su familia u otros individuos afectados. (c) Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocación de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico-paciente ni consecuencia alguna en la calidad de atención médica que se le suministre. (d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. (e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras. (f) Participar en este estudio no tiene ningún costo para usted. (g) CONFIDENCIALIDAD: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana y en la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que,

solamente usted y el equipo de investigación tendrán acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. (h) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador. Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas. (i) No hay ningún procedimiento o protocolo alterno al propuesto por este estudio. Su alternativa es no participar en el mismo. (j) Si cualquier complicación se presenta durante la investigación, los investigadores lo ayudaran a obtener el tratamiento médico adecuado, pero este estudio no le suministrará ayuda financiera para costos médicos y no médicos adicionales. (k) Al firmar esta forma usted no esta renunciando a sus derechos en caso de que se le cause un daño personal.

Para mayor información, por favor llame a los números 8718310 extensión 124, 8718077 o escriba al Comité de Ética de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana en Neiva, calle 9, carrera 14, segundo piso. Adicionalmente, si usted no está satisfecho con la forma como se está conduciendo este estudio o tiene otras preguntas concernientes a sus derechos como participante del estudio, por favor contacte al mismo Comité en los teléfonos y dirección mencionados antes.

## **EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO**

**OBJETIVO:** El dengue es un virus que causa una enfermedad severa y potencialmente letal en niños. Este estudio busca analizar los mecanismos fisiopatológicos generados por el virus dengue. Concretamente, estudiaremos las células inmunes circulantes que producen anticuerpos que son inducidas naturalmente por la infección con virus dengue en 75 niños infectados en diferentes estadios clínicos y 25 niños sanos.

**PROCEDIMIENTO:** Después de que usted haya leído, entendido, aceptado y firmado este consentimiento, a su hijo (a) se le recolectará una muestra de sangre de 2-4 mililitros (menos de una cucharadita). Si su hijo (a) tiene diagnóstico de infección por dengue, se le tomarán dos muestras de sangre de 2-4 mililitros (menos de una cucharadita) dentro de los primeros 7 días de inicio de los síntomas de la infección con dengue y se repetirá una toma de muestra de sangre, similar a la descrita, 14 días después del inicio de los síntomas (fase

de convalecencia). En total se tomarán 3 muestras de sangre, en las cuales se les aplicarán pruebas diagnósticas para dengue y se evaluarán las células productoras de anticuerpos que probablemente están involucradas en la fisiopatología y respuesta inmune a la infección. La toma de la muestra será realizada por personal especializado y con experiencia. La vinculación de su hijo(a) al proyecto será hasta 14 días después del inicio de los síntomas. En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar las muestras nuevamente pero la decisión final de toma de la nueva muestra será personal y voluntaria.

**RIESGOS E INCOMODIDADES:** La participación en este estudio representa riesgo mínimo para la salud e integridad de su hijo(a) y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento que pueden incluir dolor mínimo, infecciones, sangrado y/o hematomas (morados).

**BENEFICIOS ADICIONALES:** Este estudio tiene para usted o su hijo(a) (los) siguiente(s) beneficio(s) adicional(es):

En caso de que su hijo (a) tenga infección por dengue, se le realizarán pruebas especializadas que permiten el diagnóstico y tipificación del dengue infectante.

**RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES:** Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

Debe seguir las indicaciones y tratamientos de su médico tratante.

**MANEJO DE RESULTADOS:** Los resultados de las pruebas son UNICAMENTE para fines de investigación y serán facilitados a usted si así lo desea, pero sólo si usted lo solicita se le comunicarán los resultados de exámenes practicados en el futuro.

**OTRA INFORMACIÓN PERTINENTE:** En el curso del estudio se le suministrará a usted cualquier tipo de información nueva, derivada de éste, que pueda modificar su participación en el mismo. Las muestras en ningún momento serán utilizados con fines distintos a la investigación. Usted podrá, en el momento que lo desee, retirar las muestras del almacenamiento y/o obtener información sobre su uso posterior. A discreción del investigador principal, en cualquier momento,

cualquier voluntario puede ser retirado del estudio.

Si usted cree que ha sufrido una lesión relacionada con la investigación, o desea cualquier información adicional, por favor llame al Dr. Carlos Fernando Narváez., MD., PhD Tel 8718310 ext 124 Facultad de Salud, Programa de Medicina Universidad Surcolombiana.

AUTORIZACION: La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la entidad anteriormente mencionada. Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Usted tiene el derecho a no permitir que sus tejidos (células de la sangre) sean estudiados inmediatamente o guardados para estudios en el futuro. Usted se puede retirar del estudio en cualquier momento. Los investigadores podrán guardar las muestras como parte del tratamiento clínico rutinario sin que éstas sean incluidas en la investigación. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.

Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:

En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia : Si No

En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: Si No

En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: Si No

En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación: Si No

**AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO: "Caracterización de la respuesta de células secretoras de anticuerpos circulantes totales y específicas de virus dengue en niños infectados naturalmente y su relación con la severidad de la enfermedad"**

Yo, \_\_\_\_\_ identificado con documento de identificación: No. \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, acepto voluntariamente que se tome a mi hijo(a) \_\_\_\_\_ las muestras de \_\_\_\_\_ con el fin de realizar análisis de \_\_\_\_\_. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

Fecha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Paciente, Acudiente, Representante legal

c.c.

\_\_\_\_\_  
Testigo

c.c.

\_\_\_\_\_  
Testigo

c.c.

\_\_\_\_\_  
Investigador

c.c.

