



## CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, 20 mayo 2015

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Andrés Felipe Romero Andrade, con C.C. No. 1075216876,  
\_\_\_\_\_, con C.C. No. \_\_\_\_\_,  
\_\_\_\_\_, con C.C. No. \_\_\_\_\_,  
\_\_\_\_\_, con C.C. No. \_\_\_\_\_,

autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado o

titulado Identificación de las células productoras de  
citocinas circulantes naturalmente inducidas en  
niños con virus dengue y su asociación con severidad clínica  
presentado y aprobado en el año 2015 como requisito para optar al título de  
especialista en pediatría;

autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.

Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: Andrés Felipe Parro

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: \_\_\_\_\_

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: \_\_\_\_\_

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: \_\_\_\_\_

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

**TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:** IDENTIFICACION DE LAS CELULAS PRODUCTORAS DE CITOQUINAS CIRCULANTES NATURALMENTE INDUCIDAS EN NIÑOS CON VIRUS DENGUE Y SU ASOCIACION CON LA SEVERIDAD CLINICA

**AUTOR O AUTORES:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
ROMERO ANDRADE	ANDRES FELIPE

**DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
NARVAEZ ROJAS	CARLOS FERNANDO

**ASESOR (ES):**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE: PEDIATRA****FACULTAD: MEDICINA**

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.



## GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS

### DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 4

PROGRAMA O POSGRADO: PEDIATRIA

CIUDAD:  
NEIVA

AÑO DE PRESENTACIÓN:  
2015

NÚMERO DE PÁGINAS:  
83

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):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

Español

Inglés

1. Dengue

1. Dengue

2. Citocinas

2. Cytokines

3. Ceculas circulantes productoras de citocinas

3. Producing cytokines circulating cells.

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

En las últimas décadas la infección por virus dengue (VD) ha aumentado, estimándose que 3.6 billones de personas viven en áreas endémicas y son susceptibles de infección. Cada año se calcula que entre 50 y 100 millones de infecciones por VD ocurren en el mundo según cifras de la organización mundial de salud. Las Américas y especialmente Colombia no son ajenas al problema, mostrando una incidencia en aumento de esta enfermedad en los últimos años y actualmente se reporta en 18.2 casos por cada 100,000 habitantes, con obvias implicaciones en el gasto en salud. Las citocinas (CT) juegan un papel clave en la fisiopatología de



## GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS

### DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

3 de 4

la enfermedad y en algunos casos particulares, como el del TNF- $\alpha$  e IL-10, se ha encontrado una asociación entre el nivel sérico de estas CT y la severidad clínica. Sin embargo otros estudios no han sido concluyentes, debido a la variabilidad inducida por el tipo y tiempo de toma de la muestra, el ensayo usado para su medición y el espectro clínico que tiene la enfermedad. Estudios *in vitro*, han mostrado que monocitos, células dendríticas y linfocitos son la principal fuente de CT tras el contacto con el virus, pero es mucho menos conocida la célula productora de CT circulante inducidas naturalmente por la infección. En este estudio se identificaron las células que producen citocinas que circulan en niños con dengue, su relación con los niveles de CT plasmáticas y la severidad clínica de la enfermedad. Mediante ELISA, citometría de flujo multiparamétrica y cultivos celular se analizaron niños con infección primaria y secundaria por VD durante la fase aguda de la enfermedad, además de niños sanos como control.

La infección con VD indujo la aparición de una baja, pero detectable cantidad de células productoras de CT circulantes (CPCC), que no estuvo presente en los niños sanos. Cuando el linaje de las CPCC detectadas fue analizado, monocitos y linfocitos B productores de IL-6, además de monocitos productores de TNF- $\alpha$  fue detectada, no así linfocitos T para ninguna de las CT analizadas. Células dendríticas plasmocitoides obtenidas de niños con dengue tuvieron un significativa reducción en su capacidad de producir IFN- $\alpha$  tras estímulos con agonistas de de toll like-receptors (TLR), mostrando un mecanismo de inmuno-evasión viral.

A pesar de que existe de forma simultánea elevación de los niveles de CPCC y CT en la fase aguda de la enfermedad, no se encontró correlación entre estos niveles y la frecuencia de CPCC. Niños con formas severas de dengue tuvieron significativos altos niveles de CPCC (particularmente monocitos productores de TNF- $\alpha$  e IL-6) que niños con formas no severas de la enfermedad. En resumen CPCC en fase aguda de dengue pueden ser detectadas por citometría de flujo y parecen estar implicadas en la severidad clínica. Estos resultados podrían revelar un nuevo biomarcador de la infección por dengue.

#### ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Recently, incidence of dengue virus infection (VD) has been increased, and is now estimated that 3.6 billion people living in endemic areas. Every year it is estimated that 50 to 100 million infections occur worldwide, according World Health Organization. Dengue input in the Americas and especially Colombia is not different, reporting an increased incidence of 18.2 cases per 100,000 inhabitants. This obviously has direct implications for health spending. Cytokines (CT) play a critical role in pathophysiology of dengue and in some cases, such as TNF- $\alpha$  and IL-10, association between serum levels of these CT and clinical severity has been reported. However, others studies have been inconclusive due to the variability induced by the type and time of sample collecting, test used and their clinical range. *In vitro* studies have shown that monocytes, dendritic cells and T lymphocytes are the source of CT after dengue treatment, but is much less known the circulating CT-producing cell induced by natural infection in children. In this study, we determine the frequency of cytokine producing circulating cells (CPCC) in children with ongoing dengue infection, its relationship with plasma CT and clinical severity. By ELISA, multiparameter cytometry and cell cultures, we analyzed children with primary and secondary DV infection during the acute phase of the disease, and also healthy children as controls. Low but detectable frequency of CPCC was induced by dengue infection, which was not present in healthy children. When the detected CPCC lineage was analyzed, monocytes and B lymphocytes producing IL-6 as well as monocytes producing TNF- $\alpha$  were detected. However, producing T lymphocytes for any of analyzed CT were not detected. Plasmacytoid dendritic cells obtained from children



## GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS

### DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

4 de 4

with dengue had a significant reduction in their capacity to produce IFN- $\gamma$  following stimulation with TLR-9 agonists, showing a mechanism of viral immunoevasion. Although there is simultaneously elevated levels of CCCP and CT in the acute phase of the pediatric dengue, no correlation between CT levels and frequency of CCCP was found. Children with severe forms of dengue had significant high levels of CPCC (particularly monocytes producing TNF- $\alpha$  and IL-6) than children with non-severe forms of the disease. In short, CCCP in dengue acute phase can be detected by flow cytometry and could be involved in the clinical severity of this disease. These results could reveal a new biomarker in dengue infection.

#### APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Diana Castañeda.

Firma:

Nombre Jurado: Darlin Carvajal Duque

Firma:

Nota de aceptación:

Aprobado 4,5.

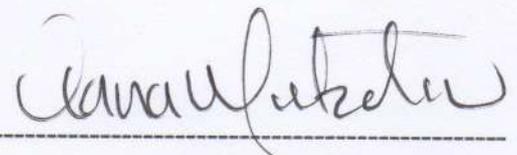
---

---

---

---

---



Firma del presidente del jurado



Firma del jurado

Neiva, Mayo del 2015.

IDENTIFICACION DE LAS CELULAS PRODUCTORAS DE CITOQUINAS  
CIRCULANTES NATURALMENTE INDUCIDAS EN NIÑOS CON VIRUS DENGUE  
Y SU ASOCIACION CON LA SEVERIDAD CLINICA

ANDRES FELIPE ROMERO ANDRADE

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

IDENTIFICACION DE LAS CELULAS PRODUCTORAS DE CITOQUINAS  
CIRCULANTES NATURALMENTE INDUCIDAS EN NIÑOS CON VIRUS DENGUE  
Y SU ASOCIACION CON LA SEVERIDAD CLINICA

ANDRES FELIPE ROMERO ANDRADE

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

Neiva, Mayo del 2015.

DEDICATORIA

***A mis padres y profesores por haberme enseñado todo lo  
que soy.***

Andrés Felipe

## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos:

A los niños que aceptaron participar voluntariamente en el estudio.

A todos aquellos que colaboraron con la realización de este proyecto.

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

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
2. JUSTIFICACION	20
3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	21
3.1 CARACTERISTICAS DEL VIRUS DENGUE	21
3.2 INMUNOPATOGENESIS	22
3.3 PAPEL DE LAS CT LA INFECCION POR VD	23
3.4 CARACTERISTICAS CLINICAS Y MANEJO DEL DENGUE	25
4. HIPOTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 OBJETIVO GENERAL	29
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
6. METODOLOGIA	30
6.1 TIPO DE ESTUDIO	30
6.1.1 Cohorte de estudio	30
6.2 TIPO DE MUESTRA	31
6.3 DIAGNOSTICO DE INFECCION POR VD Y DIFERENCIACION ENTRE INFECCION PRIMARIA O SECUNDARIA	31
6.4 TIPIFICACION DEL VD INFECTANTE	31
6.5 DETECCION DE CELULAS CIRCULANTES PRODUCTORES DE CT	32

		Pág.
6.6	MEDICION DE LAS TC EN PLASMA Y SOBRENADANTES	33
6.7	SEGUIMIENTO CLINICO Y PARACLINICO DE LOS NIÑOS INCLUIDOS	34
6.8	ANALISIS ESTADISTICO	34
6.9	ASPECTOS ETICOS	35
7.	RESULTADOS	36
7.1	CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS, CLINICAS Y PARACLINICAS	36
7.2	SEROTIPOS INFECTANTES Y RELACIÓN DE INFECCIONES PRIMARIAS Y SECUNDARIAS	36
7.3	ESTRATEGIA DE ANALISIS DE CPCC Y SU RELACION CON LA PRODUCCION DE CITOQUINAS	37
7.4	FRECUENCIA DE LINFOCITOS B Y MONOCITOS PRODUCTORES DE CITOQUINAS EN PACIENTES CON INFECCION POR VD	37
7.5	DINAMICA DE LAS CPCC EN NIÑOS CON INFECCION POR VD	38
7.6	FRECUENCIA DE CPCC EN PACIENTE CON INFECCION POR VD LUEGO DE ESTIMULACION CON LPS Y ANTI BCR	38
7.7	PATRON DE CITOCINAS PLASMÁTICAS PRODUCIDA POR LOS NIÑOS CON DENGUE Y DIFERENTES ESTADÍOS CLÍNICOS	39
7.8	CORRELACION ENTRE LA FRECUENCIA DE CPCC Y LOS NIVELES SERICOS DE CITOQUINAS	40
7.9	FRECUENCIA DE CPCC Y RELACION CON LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD	41
8.	DISCUSION	52
9.	CONCLUSIONES	55

	Pág.
BIBLIOGRAFIA	56
ANEXOS	64

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Características clínicas y demográficas	41

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Estrategia de análisis de monocitos productores de CT. La producción de TNF- $\alpha$ (arriba) e IL-6 (abajo) es mostrada	42
Figura 2	Estrategia de análisis de los linfocitos B productoras de CT. La producción de TNF- $\alpha$ (arriba) e IL-6 (abajo) es mostrada	43
Figura 3	Estrategia de análisis de las células dendríticas mieloides y plasmocitoides productoras de CT. La producción de IFN- $\alpha$ es mostrada	44
Figura 4	Frecuencia de monocitos y linfocitos B productores de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL -10 en niños sanos y niños con infección por VD	45
Figura 5	Cinética de las CPCC en niños con infección por VD	46
Figura 6	Respuesta de monocitos y linfocitos B en niños sanos y niños con infección por VD posterior a estimulación con LPS + anti-BCR	47
Figura 7	Respuesta de CDm y CDp en niños sanos y niños con infección por VD posterior a estimulación con LPS o CpG22	48
Figura 8	Patrón de CT plasmáticas en niños con dengue y dengue grave	49
Figura 9	Relación entre la frecuencia de CPCC y los niveles de CT	50
Figura 10	Frecuencia de CPCC y su relación con la severidad clínica de la enfermedad	51

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A Formato de recolección de información	65
Anexo B Consentimiento informado	69

## RESUMEN

En las últimas décadas la infección por virus dengue (VD) ha aumentado, estimándose que 3.6 billones de personas viven en áreas endémicas y son susceptibles de infección. Cada año se calcula que entre 50 y 100 millones de infecciones por VD ocurren en el mundo según cifras de la organización mundial de salud. Las Américas y especialmente Colombia no son ajenas al problema, mostrando una incidencia en aumento de esta enfermedad en los últimos años y actualmente se reporta en 18.2 casos por cada 100,000 habitantes, con obvias implicaciones en el gasto en salud. Las citocinas (CT) juegan un papel clave en la fisiopatología de la enfermedad y en algunos casos particulares, como el del TNF- $\alpha$  e IL-10, se ha encontrado una asociación entre el nivel sérico de estas CT y la severidad clínica.

Sin embargo otros estudios no han sido concluyentes, debido a la variabilidad inducida por el tipo y tiempo de toma de la muestra, el ensayo usado para su medición y el espectro clínico que tiene la enfermedad. Estudios *in vitro*, han mostrado que monocitos, células dendríticas y linfocitos son la principal fuente de CT tras el contacto con el virus, pero es mucho menos conocida la célula productora de CT circulante inducidas naturalmente por la infección. En este estudio se identificaron las células que producen citocinas que circulan en niños con dengue, su relación con los niveles de CT plasmáticas y la severidad clínica de la enfermedad. Mediante ELISA, citometría de flujo multiparamétrica y cultivos celular se analizaron niños con infección primaria y secundaria por VD durante la fase aguda de la enfermedad, además de niños sanos como control.

La infección con VD indujo la aparición de una baja, pero detectable cantidad de células productoras de CT circulantes (CPCC), que no estuvo presente en los niños sanos. Cuando el linaje de las CPCC detectadas fue analizado, monocitos y linfocitos B productores de IL-6, además de monocitos productores de TNF- $\alpha$  fue detectada, no así linfocitos T para ninguna de las CT analizadas. Células dendríticas plasmocitoides obtenidas de niños con dengue tuvieron una significativa reducción en su capacidad de producir IFN- $\alpha$  tras estímulos con agonistas de de toll like-receptors (TLR), mostrando un mecanismo de inmuno-evasión viral.

A pesar de que existe de forma simultánea elevación de los niveles de CPCC y CT en la fase aguda de la enfermedad, no se encontró correlación entre estos niveles y la frecuencia de CPCC. Niños con formas severas de dengue tuvieron significativos altos niveles de CPCC (particularmente monocitos productores de TNF- $\alpha$  e IL-6) que niños con formas no severas de la enfermedad. En resumen CPCC en fase aguda de dengue pueden ser detectadas por citometría de flujo y

parecen estar implicadas en la severidad clínica. Estos resultados podrían revelar un nuevo biomarcador de la infección por dengue.

Palabras Claves. Dengue, Cytokines, Produciendo cytikines, células circulantes

## ABSTRACT

Recently, incidence of dengue virus infection (VD) has been increased, and is now estimated that 3.6 billion people living in endemic areas. Every year it is estimated that 50 to 100 million infections occur worldwide, according World Health Organization. Dengue input in the Americas and especially Colombia is not different, reporting an increased incidence of 18.2 cases per 100,000 inhabitants. This obviously has direct implications for health spending. Cytokines (CT) play a critical role in physiopathology of dengue and in some cases, such as TNF- $\alpha$  and IL-10, association between serum levels of these CT and clinical severity has been reported. However, others studies have been inconclusive due to the variability induced by the type and time of sample collecting, test used and their clinical range. In vitro studies have shown that monocytes, dendritic cells and T lymphocytes are the source of CT after dengue treatment, but is much less known the circulating CT-producing cell induced by natural infection in children. In this study, we determine the frequency of cytokine producing circulating cells (CPCC) in children with ongoing dengue infection, its relationship with plasma CT and clinical severity.

By ELISA, multiparameter cytometry and cell cultures, we analyzed children with primary and secondary DV infection during the acute phase of the disease, and also healthy children as controls. Low but detectable frequency of CPCC was induced by dengue infection, which was not present in healthy children. When the detected CPCC lineage was analyzed, monocytes and B lymphocytes producing IL-6 as well as monocytes producing TNF- $\alpha$  were detected. However, producing T lymphocytes for any of analyzed CT were not detected. Plasmacytoid dendritic cells obtained from children with dengue had a significant reduction in their capacity to produce IFN- $\gamma$  following stimulation with TLR-9 agonists, showing a mechanism of viral immunoevasion. Although there is simultaneously elevated levels of CPCC and CT in the acute phase of the pediatric dengue, no correlation between CT levels and frequency of CPCC was found. Children with severe forms of dengue had significant high levels of CPCC (particularly monocytes producing TNF- $\alpha$  and IL-6) than children with non-severe forms of the disease. In short, CPCC in dengue acute phase can be detected by flow cytometry and could be involved in the clinical severity of this disease. These results could reveal a new biomarker in dengue infection.

Key words. Dengue, Cytokines, Producing cytokines circulating cells.

## GLOSARIO

ARN Acido Ribonucleico

Ac Anticuerpos

CBA Cytometric bead array

CD Células Dendríticas

CMSP Células mononucleares de sangre periférica.

CF Citometría de flujo.

CT Citocinas

CPCC Células productoras de citocinas circulantes

ELISA Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FD Fiebre Dengue

FDH Fiebre dengue hemorrágico.

IL Interleuquina

IFN Interferón

LT Linfocitos T

LB Linfocitos B

LPS Lipopolisacarido

Mo Monocitos

RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

TNF- $\alpha$  Factor de necrosis tumoral alfa

TLR Toll Like Receptors

VD Virus Dengue

## INTRODUCCION

El dengue es una enfermedad viral causada por la infección con cualquiera de los 4 serotipos de virus (VD 1 - 4), que es transmitida por la picadura de mosquitos del género *Aedes*. Esta patología ha pasado de ser una enfermedad esporádica, a ser un problema de salud pública mayor con un efecto económico y social substancial debido al incremento en su extensión geográfica, número de casos y severidad (Guzmán, Harris et al 2015). En las últimas décadas, ha aumentado la incidencia de dengue enormemente en el mundo. Más de 2,500 millones de personas está en riesgo de contraer dengue, calculándose cada año entre 50 millones y 100 millones de infecciones por VD en el mundo (Organización Mundial de salud, 2015). En Colombia, la tasa de incidencia de dengue ha sido fluctuante desde 1978 con clara tendencia al incremento a través del tiempo, pasando de 5.2 casos por 100,000 habitantes en 1990 a 18.2 casos por cada 100,000 habitantes en los últimos 5 años. El aumento de la incidencia tiene impacto directo en la mortalidad que pasó de 0.07 defunciones a finales de los 90, a 0.19 defunciones por cada 100,000 habitantes en la presente dedada (Instituto Nacional de Salud, 2015)

En el Huila según reporte de semana epidemiología número 51 del 2014, se han notificado un total de 9,395 casos de dengue, de los cuales 141 casos fueron dengue grave, con una mortalidad calculada de 1.41%, siendo el tercer Departamento en número de muertes por dengue después de Valle y Santander (Instituto Nacional de Salud, 2014).

La infección con VD aumenta la concentración de citocinas (CT) proinflamatorias plasmáticas. El aumento de CT circulantes, es uno de los factores inmunes que se ha asociado con la severidad clínica de la infección (Rothman. A, 2011). Las CT han sido extensamente estudiadas en dengue y por medición directa en plasma o por experimentos de estimulación *in vitro* de células primarias humanas, se sabe que monocitos (Mo), linfocitos T (LT) y células dendríticas (CD) producen CT después del contacto con el virus (Rothman A, 2011). Sin embargo, hasta ahora no es claro cuáles son las células productoras de CT que son inducidas por la infección natural viral en niños y es desconocido, además, si dichas células circulan o si su frecuencia se asocia con los altos niveles de algunas CT plasmáticas presentes en los humanos infectados con VD.

Aquí, se estudió las células circulantes productoras de citoquinas (CCPC) que son naturalmente inducidas por la infección con VD en niños y se analizó si existe una asociación entre la frecuencia y patrón de CT producidas por éstas células y la severidad de la enfermedad. Esto mediante el uso de técnicas como la detección intracelular de CT por citometría de flujo (CF), cuantificación de CT por

“cytometryc bead array” (CBA), ELISA y cultivo celular. Con el presente trabajo se determinó la existencia de CCPC naturalmente inducidas por la infección con VD en niños. Dentro de los resultados obtenidos se detectó la presencia de CPCC en paciente con infección por VD en la etapa aguda de la enfermedad, especialmente entre el 4 y 6 día de iniciados los síntomas. Dentro de los grupos celulares identificados se encontraron células linfocitos B productores de IL-6 y monocitos productores de IL-6 y TNF- $\alpha$ . Se encontró además que existe disminución significativa de la capacidad de producción de citocinas en monocitos y CD plasmocitoides en pacientes con infección por VD, después de estimulación con LPS o CpG 2216 (agonistas TLR-4 y TLR-9, respectivamente) en pacientes con dengue comparado con pacientes sanos. No se encontró correlación entre los niveles de citoquinas circulantes con la frecuencia de CPCC, sin embargo éstas fueron más frecuentemente detectadas en niños con formas severas de la infección, lo que soporta su posible participación en la fisiopatología de la enfermedad.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue es una enfermedad endémica en más de 100 países del sudeste asiático, las Américas, el pacífico occidental y el Mediterráneo oriental, y su incidencia se ha incrementado en más de 30 veces en los últimos 50 años. En el 2013 se presentaron 390 millones de casos de dengue con 96 de ellos sintomáticos al año, estadística que supero 3 veces lo descrito por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el 2012. Sin embargo la estadística no es exacta, especialmente por subregistros en países como india, indonesia, Brasil, China y África y variaciones en la estadística de país a país (Guzmán, Harris 2015).

En América Latina durante el 2010, se registraron más de 1.6 millones de casos de dengue, 49,000 de los cuales fueron dengue severo (San Martín, Brathwaite et al. 2010). En Colombia, la enfermedad es endemo-epidémica con picos ascendentes en la última década. En el 2010 el SIVIGILA notifico 157,203 casos de los cuales 9,777 fueron dengue grave y 277 muertes por dengue, a pesar de que el número de casos disminuyo la letalidad aumento (Instituto Nacional de Salud, 2012).

Las CT juegan un papel clave en la fisiopatología de la enfermedad y en algunos casos particulares, como en el caso del TNF- $\alpha$  e IL-10, se ha encontrado una asociación entre el nivel sérico de estas CT y la severidad clínica de la enfermedad (Azeredo et al., 2001). Sin embargo, en otros reportes (Chen et al., 2006; Srikiatkachorn and Green, 2009) esta asociación no ha sido evidente, hecho probablemente debido a la variabilidad inducida por el tiempo de toma y tipo de muestra, el ensayo y el gran espectro clínico que tiene la enfermedad. Se hace necesario por lo tanto la búsqueda de marcadores inmunes seguros que puedan estar asociados con las características clínicas. Estudios de infección *in vitro*, la gran mayoría de ellos llevados a cabo en muestras de niños del sureste asiático y pocos en sur américa, han mostrado que monocitos (Mo), linfocitos T (LT) y células dendríticas (CD) son la principal fuente de CT tras el contacto con el virus (Chaturvedi, 2009; Mangada et al., 2002; Reis et al., 2007).

Aunque las CT solubles son uno de los factores inmunes más importantes en la fisiopatología de la enfermedad, su papel en la predicción de las manifestaciones clínicas es aún controversial. Por lo tanto, es posible que la medición de las células circulantes que producen CT tenga una mejor correlación, que la medición de las CT solubles, con las variables clínicas.

Ya que el VD es endémico en la región y causa la hospitalización de cientos de niños en el país, la infección es responsable de un alto costo económico y social.

Este estudio contribuirá a la búsqueda de nuevos factores inmunes que permitan identificar a los niños que sufrirán formas severas y por tanto podría incidir directamente en su manejo y pronóstico.

Por lo anterior, la pregunta que se desea resolver con este trabajo fue:

¿Cuáles son las características fenotípicas y la frecuencia de las células productoras de citoquinas circulantes y su relación con los niveles de citoquinas plasmáticas y su relación con la severidad clínica de la enfermedad en paciente con infección natural por dengue?

## 2. JUSTIFICACION

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. La infección por VD implica un costo elevado tanto para el gobierno como para cada uno de los individuos que la padecen. En las Américas tiene un costo de 2.1 billones de dólares por año en promedio, excluyendo el costo del control vectorial. Esto excede el presupuesto dado para otras enfermedades virales. En el sudeste asiático, 2.9 millones de casos de dengue ocurren al año con 5,906 muertes debido a esta enfermedad. Su emergencia global es rápida y relacionada con los cambios sociodemográficos en los últimos 50 - 60 años, incluyendo crecimiento no esperado de la población, movilización de la población, urbanización no controlada, cambios climáticos, fallas en la infraestructura de los planes de salud pública y los programas de control vectorial (Guzman, Harris 2015).

Es claro que el sistema inmunológico juega un papel importante en la fisiopatogénesis de la enfermedad y la posible relación que tienen los niveles de citoquinas con la severidad clínica, sin embargo estudios *in vitro* no han sido concluyentes. Por tal razón el estudio de las células productoras de citoquinas y su relación con los niveles de citoquinas en paciente con infección por VD naturalmente inducido, brindará información de la respuesta inmune celular de la infección actual y su posible relación con la severidad de la enfermedad. Los datos obtenidos podrían dar lugar a ayudas que permitan predecir severidad clínica y plantear estrategias terapéuticas tempranas para disminuir morbilidad y mortalidad.

### 3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

#### 3.1 CARACTERISTICAS DEL VIRUS DENGUE

La infección por VD constituye un serio problema de salud pública. Anualmente 50 millones de personas en el mundo sufren la infección y de ellos 500,000 son afectados por formas severas de la enfermedad (World Health Organization., 2009). Debido a la presencia del vector (mosquito *Aedes aegypti*) y del virus en zonas tropicales y sub tropicales, 2.5 billones de personas en el mundo están en riesgo de contraer la enfermedad. En Colombia, entre enero y junio del 2010 se reportaron 77,939 casos de dengue, de los cuales 6,124 corresponden a dengue severo (Instituto Nacional de Salud., 2010). En el Huila, a la misma fecha, se reportaron 4,281, 708 y 8 casos de dengue, dengue severo y casos fatales confirmados respectivamente (Instituto Nacional de Salud., 2010).

El VD es miembro de la familia *Flaviviridae*, grupo de virus envueltos, icosaédrico, con un genoma constituido por ARN de cadena sencilla y polaridad positiva. De este grupo también hacen parte otros importantes patógenos para el hombre como el virus de la Fiebre Amarilla (Gubler, 1998). El genoma tiene una longitud de 10Kb y codifica 3 proteínas estructurales, llamadas proteínas C (de core), M (de membrana), E (de envoltura) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) (Green, 2014).

En humanos, DV infecta principalmente células inmunes de la línea mieloide incluyendo monocitos, macrófagos y células dendríticas además de hepatocitos, células del endotelio y miocitos (Salgado, D. M. 2010).

El VD entra a las células hospederas vía endocitosis mediada por receptor dependientes de clatrina. Numerosos receptores se han identificado en humanos y mosquitos, mientras que en células dendríticas el receptor DC SIGN sirve como principal. En infecciones secundarias, anticuerpos preexistentes se unen al virion e incrementa la unión con receptores Fc- $\gamma$  y la entrada e infección de la célula, proceso conocido como ampliación dependiente de anticuerpos. Luego de la endocitosis, cambios conformacionales pH-dependientes permiten el escape del RNA viral del endosoma, seguido por la traducción en el retículo endoplasmico. Luego de la asociación del RNA viral con la capsida proteica y entrar al retículo endoplasmico para adquirir una cubierta de membrana proteica y una envoltura proteica, el virion sale a través de la vía secretora del huésped (Guzman, 2015).

El rango de células susceptibles a la infección por VD es amplio; va desde células primarias humanas como Mo, hasta líneas celulares de distintos orígenes (Rodenhuis-Zybert, Wilschut, and Smit, 2010). Esto hace pensar que pueden ser varios los receptores usados por el VD para infectar la célula. De hecho, se ha demostrado que proteínas de choque térmico, heparán sulfato, receptor de manosa y moléculas de la familia de las lectinas tipo C como el DC-SIGN funcionan como receptores virales (Germi et al., 2002; Reyes-Del Valle et al., 2005; Tassaneetrithep et al., 2003). La expresión de proteínas no estructurales, con capacidad de proteasas y ARN polimerasa, permite la producción de proteínas maduras y la síntesis de una cadena de ARN simple intermediaria de polaridad negativa, la cual será usada como molde para la síntesis de nuevo ARN viral (Clyde, Kyle, and Harris, 2006) y la posterior generación de nuevas partículas virales. La formación de viriones siempre ocurre en cercanía a organelos celulares membranosos como el aparato del Golgi y su salida es por secreción activa, aunque en algunas líneas celulares la salida de la partícula viral se ha asociado a lisis.

### 3.2 INMUNOPATOGENESIS

La enfermedad causada por la infección por VD tiene un espectro de manifestaciones clínicas que van desde la infección asintomática, pasando por un síndrome febril auto limitado, hasta la presencia de complicaciones severas potencialmente letales. Según la clasificación revisada de la OMS (World Health Organization., 2009), clínicamente el dengue se puede dividir en dos grandes grupos: dengue (que a su vez se divide en dengue con o sin signos de alarma) y dengue severo, que abarca manifestaciones hemorrágicas, choque o lesión de órgano blanco como corazón, cerebro o hígado (World Health Organization., 2009). Epidemiológicamente, en el 90% de los casos de dengue severo se ha demostrado la existencia previa de anticuerpos (Ac) generados contra un serotipo diferente al actualmente infectante (Halstead, Porterfield, and O'Rourke, 1980; Sabin, 1952). Estudios *in vitro* usando líneas celulares derivadas de Mo humanos, mostraron que la existencia de estos Ac incrementa la captación e infección viral de la célula (fenómeno denominado amplificación dependiente de anticuerpos). Este es uno de los factores inductores de la producción de importantes cantidades de mediadores solubles, como TNF $\alpha$ , IL-6 y Factor Activador plaquetario, entre muchos otros. El incremento rápido y auto limitado de factores inflamatorios ha sido uno de los mecanismos fisiopatológicos más aceptados que explican las manifestaciones presentes en pacientes con formas graves de dengue y es conocido como tormenta de CT (Gubler, 1998). Por otro lado, se ha observado un efecto directo del virus sobre otras células, especialmente células endoteliales, con la inducción de la producción de IL-8 (Reyes-Del Valle et al., 2005).

### 3.3 PAPEL DE LAS CT LA INFECCION POR VD

Varios estudios han reportado un incremento en los niveles de CT como la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  tipo I, dos a tres días después de la infección, inducidas probablemente por la infección de Mo y CD, apoyando la idea de la activación temprana del sistema inmune innato durante la interacción virus-célula hospedera (Huang et al., 2000; Libraty et al., 2001; Srikiatkachorn and Green, 2009).

También se ha mostrado la aparición de CT producidas por LT, como la IL-4, IL-13 y el IFN- $\gamma$ , más tardíamente (después del 7 día de iniciados los síntomas), lo que podría ser interpretado como un inicio en la participación de las moléculas producidas por células de la inmunidad adquirida. Este patrón de CT probablemente refleja, además, unos perfiles de polarización de linfocitos T CD4+ (Th) que podrían estar modulando la aparición de las complicaciones en esta etapa (Chaturvedi, 2009; Srikiatkachorn and Green, 2009).

Varios estudios han buscado la asociación que existe entre los niveles séricos de CT y la severidad clínica. Ha sido mostrado, por ejemplo, un significativo incremento en el nivel de TNF- $\alpha$  en niños con fiebre dengue hemorrágico (DFH), en comparación con fiebre dengue (FD) y a su vez un mayor nivel en niños infectados que en controles normales (Azeredo et al., 2001; Braga et al., 2001).

Otra citoquina inflamatoria, la IL-6, estuvo relacionada con el porcentaje de sobrevivida de los niños con (FDH), al observarse niveles mayores de la citoquina en el plasma de niños con DFH que fallecieron, comparado a los niños con la misma condición clínica que sobrevivieron (Hober et al., 1993; Suharti et al., 2003). A pesar del incremento en los niveles de algunas CT en formas severas, la responsabilidad de éstas en la generación de síntomas claves dentro de la enfermedad, como el sangrado y el choque, no es clara, ya que el pico máximo en el plasma es anterior a la aparición de manifestaciones clínicas cardinales como el choque o la hemorragia (Srikiatkachorn and Green, 2009). Es así como el significado de los cambios de los niveles de CT séricas durante la infección con dengue es controversial y difícil de interpretar. Esta variabilidad puede ser explicada por el día de toma de muestra, el gran espectro clínico de la enfermedad y características genéticas de cada población. En este sentido, un estudio, realizado en dos poblaciones étnicas colombianas, mostró diferencias significativas en la respuesta de TNF- $\alpha$  e IL-6 entre pacientes afro-colombianos y mestizos con FDH (Restrepo et al., 2008). La búsqueda de otros acercamientos que permitan esclarecer el papel de las CT en la fisiopatología es una urgente necesidad.

Los Mo, macrófagos y CD, que incluyen a las células de Langerhans, han sido considerados los principales blancos celulares de la infección por VD (Jessie et al., 2004; Wu et al., 2000), mientras que los LT y LB parecen ser resistentes a la infección, aunque la susceptibilidad de los LB es controversial (Blackley et al., 2007; King et al., 1999; Kou et al., 2008; Lin et al., 2002). Recientemente ha sido mostrado que DV infecta CD dérmicas y posteriormente Mo reclutados en el sitio de la infección en un modelo de ratones inmunodeficientes (Schmid MA., 2014) La interacción del VD con las células inmune tiene diferentes efectos. Se ha reportado un incremento en la expresión de marcadores de activación en Mo circulantes de niños en fase aguda de la infección, en comparación con niños sanos (Durbin et al., 2008).

De igual forma, el tratamiento de CD derivadas de Mo, CDm y CDp humanas primarias incrementa la expresión de moléculas de activación como el CD86 y HLA-DR (Ho et al., 2001; Sun et al., 2009). La infección de Mo y CD es favorecida por la amplificación dependiente de Ac, la cual puede ser explicada por el incremento en la captación e infección de las células, mediada por la interacción entre complejos inmunes formados por VD/Ac de reacción cruzada y los receptores para la fracción cristalizante de la IgG (FcγR) (Durbin et al., 2008; Green, Rothman, 2006; Rothman, 2004; Shresta et al., 2004).

El incremento en la captación e infección de Mo y CD, debido a la amplificación dependiente de Ac, es de importancia para la generación de una respuesta inmune adquirida, en especial en la generación de clones de LT tanto CD4+ como CD8+ virus-específicos y de reacción cruzada. Un estudio analizó el perfil de CT producidas por LT CD4+ de memoria después de la estimulación con VD homólogo o heterólogo (Mangada and Rothman, 2005). Interesantemente, la relación de LT CD4+ productores de TNF- $\alpha$  Vs LT CD4+ productores de IFN- $\gamma$  variaba substancialmente dependiendo del virus usado en la estimulación. La estimulación con virus homólogo favorecía los clones productores de IFN- $\gamma$ , mientras que la estimulación con virus heterólogos favorecía preferentemente a clones productores de TNF- $\alpha$ .

Estas dos citoquinas están ampliamente ligadas al aclaramiento y las complicaciones de la infección, respectivamente. La funcionalidad de los LT CD8+ de memoria generados después de inmunización de adultos sanos con vacunas experimentales vivas atenuadas también fue muy dependiente de la historia previa de infecciones con VD y del serotipo presente durante la primo infección (Bashyam, Green, and Rothman, 2006). Estos resultados sugieren que el serotipo causante de la primera y segunda infección además de la historia secuencial individual de infecciones previas, podrían ser factores determinantes en las manifestaciones clínicas y que la identificación de las CCPC puede ser una

herramienta potencial para entender el desarrollo de los mecanismos inmunes antivirales.

Ahora se conoce que los LB también son capaces de producir CT (Duddy, Alter, and Bar-Or, 2004) y se ha sugerido la participación de éstas células, a través de dicha producción de CT, en la fisiopatología de enfermedades autoinmunes e infecciosas (Gray, Gray, and Barr, 2007). Los Ac contra antígenos propios son el eje en la fisiopatología de enfermedades como el lupus eritematoso sistémico y la esclerosis múltiple. Sin embargo, la disminución/eliminación de células que secretan Ac reduce considerablemente los niveles séricos de Igs, pero no modifica las manifestaciones clínicas de la enfermedad, lo que soporta la idea que otras funciones, Ac independientes, por parte de los LB son las responsables de dichas manifestaciones (Fillatreau, Gray, and Anderton, 2008). Consistente con estos datos, un estudio reciente muestra cómo el perfil de CT producidas por LB varía dependiendo de la subpoblación analizada (Duddy et al., 2007). Mientras los LB vírgenes produjeron importantes cantidades de IL-10, los LB de memoria preferentemente produjeron TNF- $\alpha$  e IL-6, dos de las CT ampliamente asociadas con las complicaciones por VD (Duddy et al., 2007). Más interesante aún fue el hecho de que la cantidad de estas CT era ampliamente modificado si los LB provenían de pacientes con Esclerosis Múltiple, sugiriendo que los LB productores de CT podrían estar implicados en el proceso fisiopatológico. En resumen, la medición, no de las CT solubles, sino de las células que producen dichas CT y que son inducidas naturalmente por la infección, podría brindar nuevos marcadores inmunes que aportarían al esclarecimiento del papel de dichos mediadores en la fisiopatología del VD.

### 3.4 CARACTERISTICAS CLINICAS Y MANEJO DEL DENGUE

La primera manifestación clínica de la enfermedad es la fiebre, que puede ser de intensidad variable, aunque puede estar precedida de diferentes pródromos, como cefalea, dolor retroocular, mialgias ya artralgias, sin embargo estas últimas manifestaciones son difíciles de diferenciar en los niños pequeños, quienes van a presentar de forma más florida sintomatología gastrointestinal como múltiples episodios eméticos, diarrea o dolor abdominal. La fiebre puede tener una duración de 2 a 7 días y acompañarse de hiporexia como único síntoma concomitante. En la población infantil, entre el tercer y sexto día de enfermedad la fiebre desciende, el dolor abdominal se hace constante y el paciente entra en la fase crítica de la enfermedad en el cual se instaura el proceso de fuga vascular, compromiso de órgano blanco, manifestación de los signos de alarma y mayor riesgo de choque. Dentro de los signos de alarma referidos por la OMS encontramos dolor abdominal intenso y continuo, vómitos frecuentes, cambios en el estado de conciencia, caída brusca de la temperatura, lipotimia, disminución de la diuresis y acumulación de

líquido en terceros espacios corporales, todos estos signos indican fuga vascular, siendo este de instauración súbita generando que los fenómenos de compensación hemodinámica no sean efectivos y el paciente presente deterioro súbito.

El hematocrito comienza siendo normal y va ascendiendo de forma progresiva, a su vez los estudios imagenológicos de tórax y abdomen demuestran la acumulación de líquidos, coincidiendo la máxima elevación del hematocrito con el choque. El recuento plaquetario desciende, llegando a su nadir el día del choque, normalizándose en días posteriores. Usualmente la población infantil manifiesta estado de choque no con los valores de presión arterial, sino con estrechamiento de la presión de pulso, taquicardia sostenida, y disminución de la presión arterial media. Después de la etapa crítica, se evidencia redistribución hídrica haciéndose manifiesta aumento de la diuresis, fenómeno que es bien tolerado por todas las poblaciones, sin embargo debe observarse de forma estrecha en pacientes que cursen con enfermedades de base asociadas como cardiopatías o nefropatías. Durante la etapa de convalecencia se debe vigilar la presencia de infección bacterianas asociadas secundario a la leucopenia transitoria, además de la aparición del rash de convalecencia. Una vez finalizada esta última fase alrededor del día 10 de enfermedad el paciente recupera funcionalidad total (Rojas, Padilla et al 2010).

En todos los casos de sospecha de dengue, se debe realizar confirmación por laboratorio de la enfermedad. 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). Todos los casos de mortalidad deben investigarse mediante autopsia completa ya que se trata de un evento de vigilancia en salud pública.

Para el manejo de la enfermedad, se debe clasificar los pacientes en tres grupos dependiendo de la edad, condiciones sociodemográficas, síntomas referidos y hallazgos al examen físico. El grupo A se trata de pacientes que no presentan signos de alarma ni enfermedad de base, que pueden ser tratados de forma ambulatoria, ingestión de líquidos aumentada (Harris et al, 2003), manejo de analgesia con acetaminofén, contraindicar aines, y control paraclínico cada 24 horas hasta llegar a fase de convalecencia. El segundo grupo es el B, en el cual el paciente presenta algún signo de alarma, en este caso el manejo debe realizarse de forma intrahospitalaria, líquidos endovenosos, monitoreo hemodinámico horario y seguimiento paraclínico. El grupo C, corresponde a paciente con clínica de choque o compromiso de órgano en cuyo caso el manejo debe ser realizado en unidades de emergencias de mayor complejidad o cuidado intensivo pediátrico (Rojas, Padilla et al 2010).

Finalmente el paciente debe cumplir con los siguientes criterios para dar egreso, 24 horas afebril, mejoría del estado clínico, tendencia al incremento de plaquetas y hematocrito estable sin líquidos endovenosos (Rojas, Padilla et al 2010).

#### 4. HIPOTESIS

La infección natural por VD en niños induce la aparición de células productoras de CT circulantes (CPCC), existe relación entre las CPCC y los respectivos niveles de CT plasmáticas y la severidad clínica de la enfermedad.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las células circulantes productoras de citoquinas (CCPC) inducidas por la infección natural con VD en niños y su relación con la severidad de la enfermedad.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la frecuencia de monocitos, células dendríticas mieloides, células dendríticas plasmocitoides, linfocitos T CD4+, CD8+ y linfocitos B circulantes productoras de IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  , e IFN- $\gamma$  inducidas por la infección natural con VD en niños.

Establecer si existe asociación entre la frecuencia de las células circulantes productoras de citoquinas antes mencionadas y los respectivos niveles plasmáticos de citoquinas.

Establecer si existe relación entre la frecuencia de alguna población celular productora de citoquinas y la severidad de las manifestaciones clínicas.

## 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 E.S.E Carmen Emilia Ospina, realizado entre los años 2011 a 2014. 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.

6.1.1 Cohorte de estudio. En este estudio fueron incluidos 62 niños mayores de 6 meses y menores de 14 años de edad con diagnóstico clínico de dengue con signos de alarma, dengue sin signos de alarma, dengue severo, grupo control sano, que acudieron al Hospital Universitario de Neiva y E.S.E Carmen Emilia Ospina. 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 (Organización Mundial de Salud, 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 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:  
o Detección de genoma viral por RT-PCR o NS1 sérica positiva por ELISA o IgM

específica de dengue sérica positiva por prueba de ELISA.

## 6.2 TIPO DE MUESTRA

Previo consentimiento informado firmado por los acudientes, se incluyeron 3 grupos de pacientes, usando los criterios clínicos revisados de la OMS 2010: niños sanos (n= 25), niños con dengue (que incluye niños con y sin signos de alarma, n= 42) y niños con dengue severo (n=20). A cada niño se le tomó una muestra en la fase aguda de la enfermedad (4 a 5 día del inicio de los síntomas) y una muestra 14 días después del inicio de los síntomas. Dos a cuatro mL de sangre venosa total en tubos con EDTA en cada toma. Los tubos se centrifugaron inmediatamente a 300 x g. El plasma se recolectó en 2 viales. Uno se usó para diagnóstico de infección primaria o secundaria y la medición de las CT plasmáticas por citometría de flujo. El otro vial fue usado para la tipificación del VD por PCR convencional. Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) fueron obtenidas por centrifugación en gradiente de densidad en ficoll, posteriormente lavadas, contadas e inmediatamente usadas para la realización del ensayo de detección de CT intracelulares, como se describe detalladamente adelante.

## 6.3 DIAGNOSTICO DE INFECCION POR VD Y DIFERENCIACION ENTRE INFECCION PRIMARIA O SECUNDARIA

El diagnóstico de infección por VD y la clasificación de la enfermedad se realizó usando los criterios clínicos revisados de la OMS 2010 (World Health Organization., 2009). El diagnóstico de la infección se confirmó por la presencia de IgM específica de VD y/o NS1 y/o la detección de ARN viral en plasma. El diagnóstico de la infección primaria o secundaria se basó en la detección por ELISA de anticuerpos de isotipo IgM e isotipo IgG específicos para VD presentes en el plasma de los niños. Para clasificar la infección como primaria, una relación de inmunoglobulinas dengue-específicas IgM/IgG >3.0 en fase aguda fue usada. Para esto, se usaron estuches comerciales (Panbio), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Estos productos han sido extensamente usados para el diagnóstico y clasificación de infección primaria y secundaria por VD (Endy et al., 2004; Salgado, 2008; Salgado et al., 2007).

## 6.4 TIPIFICACION DEL VD INFECTANTE

El serotipo infectante en las muestras analizadas fue determinado por RT-PCR convencional como previamente ha sido reportado (Harris, E et al 1998; Lanciotti

et al 1992), con pocas modificaciones. Brevemente, 12.2 ul del ARN previamente aislado por columnas (QIAGEN), 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 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.) Las secuencias de los primers serotipo-específicos usados fueron las siguientes: DV-1: 5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G-3'; DV-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 el 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.

## 6.5 DETECCION DE CELULAS CIRCULANTES PRODUCTORES DE CT

Para la detección y cuantificación de las CCPC se uso una técnica previamente usada por nosotros y otros (Narvaez, Angel, and Franco, 2005; Narvaez et al., 2010). Dos millones/mL de CMSP frescas aisladas como se mencionó antes, fueron cultivadas en RPMI, SFB 10%, penicilina 100U/mL, estreptomina 100mg/mL, L-glutamina 2mM, piruvato sódico 1mM y aminoácidos no esenciales 0.1mM (medio completo), por 5 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, en presencia de 10ug/mL de brefeldina A (un inhibidor selectivo del transporte de proteínas). Después de la incubación, las células fueron distribuidas en 3 tubos que se usaron para detectar marcadores de superficie de la siguiente forma:

Tubo 1 (para detección de CDm y CDp): anti CD11c APC Cy7, CD123 PerCP Cy5.5, HLA-DR Vibrant 500 y linaje -1 (anti-CD3, CD14, CD19, CD20, CD56)-FITC.

Tubo 2 (para detectar LB y Mo activados): anti CD19 FITC, CD14 PerCP Cy5.5.

Tubo 3 (para detectar LT CD4+ y LT CD8+ activados): Anti CD3 APC Cy7, CD4 Vibrant 500, CD8 PerCP Cy5.5.

De notar, cada una de las tinciones usadas fue estandarizada en voluntarios sanos. La tinción se hizo por lo tanto con dosis optimizadas de cada uno de los anticuerpos mencionados.

Una vez realizada la tinción de superficie, a cada tubo se le agregaron 250ul de solución de fijación/permeabilización (Cytfix/cytoperm, BD, San José) y fueron incubados a 4°C por 20 min. Los tubos se lavaron con solución de lavado (Perm/wash, BD, San José) y centrifugados. Para bloquear las uniones inespecíficas se adicionaron 10uL de reactivo bloqueante de los FcγR (FcR blocking reagent, Miltenyi Biotec) y se incubaron por 5 min. Pasado el tiempo se realizó la tinción intracelular por adición de los Ac anti-CT de la siguiente forma:

Tubo 1 y tubo 2 (Cdm, CDp, Mo y LB): anti IFN-α PE, TNF-α PE Cy7, IL-6 Vibrant 450 e IL-10 APC.

Tubo 3 (LT CD4+ y LTCD8+): anti IL-4 PE, IL-6 Vibrant 450, IL-10 APC, IFN-γ FITC y TNF-α PE Cy7.

Como control positivo, tubos con CMSP fueron tratadas con una combinación optimizada de estímulos que tiene como blanco a cada una de las poblaciones en estudio y que han sido previamente caracterizados: LPS (10ug/mL), CpG oligodeoxinucleótidos 2216 (10ug/mL), anticuerpos anti receptor de LB (10ug/mL) y la enterotoxina B del *S. Aureus* (1ug/mL).

Además, el patrón de CT secretada por una subpoblación en especial, los linfocitos B, fue detectado. Dicha subpoblación fue purificada por selección inmunomagnética positiva y cultivadas en medio completo en ausencia de Brefeldina A. Después de 24h de cultivo, los sobrenadantes se recolectaron y se detectó la concentración de 6 CT (que incluyen la IL-4, IL-6, IL-10 y TNF-α) por citometría de flujo usando un estuche comercial como se describe más adelante. Al menos un total de 5 de estos experimentos fueron realizados para comprobar los resultados obtenidos por tinción intracelular de las CMSP sin purificar.

## 6.6 MEDICION DE LAS TC EN PLASMA Y SOBRENADANTES

Los niveles plasmáticos de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ y TNF-α fueron determinados por citometría de flujo (cytometric bead array, CBA, Th1/Th2 kit, BD, San José) en busca de una relación con la frecuencia de CCPC obtenidas en el mismo día. Para esto, una mezcla de diferentes poblaciones de esferas cubiertas con Ac monoclonales anti-CT, fueron incubadas secuencialmente con las muestras de plasma de los pacientes ó una curva estandar y posteriormente con un Ac de detección. Entre cada paso, las muestras fueron incubadas, lavadas y resuspendidas. Finalmente, las muestras fueron adquiridas en un citómetro de

flujo FACSCanto II (BD, San Jose, USA), disponible en el laboratorio de infección e inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana. Esta metodología ya ha sido ampliamente usada y validada (Narvaez, Angel, and Franco, 2005; Narvaez et al., 2010).

## 6.7 SEGUIMIENTO CLINICO Y PARACLINICO DE LOS NIÑOS INCLUIDOS

Todo el diagnóstico, seguimiento, manejo clínico y clasificación de la severidad de la enfermedad causada por VD se realizó de acuerdo a los criterios y recomendaciones dadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue>).

Durante toda la hospitalización, se realizó un estricto seguimiento clínico diario. El examen médico general tuvo énfasis en signos asociados con la aparición de complicaciones por VD (fragilidad capilar, ventilación, dolor abdominal, hipoperfusión entre otros). A niños hospitalizados, se les llevó un formato escrito previamente diseñado y reportado en previas publicaciones (Salgado, 2008; Salgado. 2007), que contiene parámetros clínicos y para clínicos (Ver Anexo A). Este formato fue diligenciado diariamente, durante todo el tiempo de la hospitalización del niño, por miembros entrenados del Departamento de Pediatría de la Universidad Surcolombiana y el Hospital Universitario de Neiva.

## 6.8 ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó una base de datos electrónica en el programa Microsoft Excel 2010 que incluyó variables demográficas, de diagnóstico, paraclínicos, signos clínicos y resultados de los ensayos de ELISA y RT-PCR. Debido al tamaño de la población y a qué resultados estadísticos preliminares mostraron que la población no tenía una distribución normal, todos los resultados fueron analizados con pruebas estadísticas no paramétricas. Los datos son presentados como medianas y rangos. El análisis estadístico se realizó con los software GraphadPrism 5.0 y SPSS versión 18.01 (Chicago, IL). Cuando dos grupos independientes fueron analizados, se aplicó la prueba de Mann-Whitney. Para determinar diferencias estadísticas entre más de dos grupos, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Si la P de Kruskal-Wallis es  $<0.05$ , se usará la prueba de comparación múltiple de Dunn, según cada caso. El grado de correlación entre variables será evaluada por la prueba de Spearman. Para todos los casos se tomará como significativo un valor de  $P < 0.05$ .

## 6.9 ASPECTOS ETICOS

El presente estudio es financiado por Colciencias (Proyecto código 112451929049) 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 B).

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.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS, CLINICAS Y PARACLINICAS

En este estudio se incluyeron 42 y 20 niños con diagnóstico de Dengue y Dengue Severo, respectivamente y se compararon con 25 niños sanos como controles. Las características demográficas y clínicas entre los diferentes grupos son mostradas en la Tabla 1. La mediana de edad en el grupo de niños control y niños con dengue fue de 54 meses, y en el grupo de dengue severo fue 35 meses. En todos los grupos hubo presencia de lactantes menores de 12 meses y niños mayores, sin embargo en el grupo de dengue severo fue un poco superior, llegando al 40% del total de pacientes severos. Todos los niños fueron ingresados en la etapa aguda de la enfermedad, entre el día 3 y el día 6 de inicio de los síntomas.

Los exámenes paraclínicos mostrados en la Tabla 1 fueron tomados a todos los niños incluidos en los grupos durante las primeras 24 horas del ingreso hospitalario. El recuento de leucocitos fue mucho menor en el grupo de paciente no severos comparado con el grupo de pacientes severos y pacientes sanos ( $P=0,001$  prueba de Kruskal-Wallis), sin embargo esta no tuvo relación con la severidad de la enfermedad.

El recuento de plaquetas y los niveles séricos de ALT fueron los datos paraclínicos con mayor significancia estadística ( $P=0,005$  y  $P=0,001$  prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney respectivamente), siendo el recuento plaquetario tres veces menor y la ALT tres veces mayor en paciente con presentación severa de la enfermedad. Dentro de los hallazgos de fuga vascular evaluados, tales como hepatomegalia y derrame pleural, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados.

### 7.2 SEROTIPOS INFECTANTES Y RELACIÓN DE INFECCIONES PRIMARIAS Y SECUNDARIAS

Para determinar si la infección por VD era primaria o secundaria, se realizó medición de inmunoglobulinas VD específicas, tipo IgM e IgG. El 40% de los casos correspondió a infección primaria por VD. Cuando se relacionó el tipo de infección por VD con la severidad de la enfermedad se encontró que en el 80% de los casos de dengue severo correspondía a infección primaria, lo que se relaciona a la temprana edad de niños incluidos en este grupo. Además de este hallazgo, se

busco asociación entre la severidad clínica de la enfermedad con la edad y el tipo de infección, encontrándose que en los casos de dengue severo, el 80% de la población correspondió a menores de 12 meses, y estos en su totalidad presentaban infección primaria. En conclusión la infección primaria por VD se relaciona con la edad de presentación de la enfermedad y esta a su vez con la severidad clínica de la enfermedad. Los resultados mostrados en la Tabla 1, soportan la adecuada clasificación clínica de los pacientes puesto que como se esperaba, casos severos tuvieron significativa diferencia de biomarcadores como plaquetas y enzimas hepáticas previamente asociados con severidad.

### 7.3 ESTRATEGIA DE ANALISIS DE CPCC Y SU RELACION CON LA PRODUCCION DE CITOQUINAS

Para identificar la presencia de CPCC inducidas en pacientes con infección natural por VD, CMSP, incubadas con Brefeldina A, se tiñeron con anticuerpos acoplados a fluorocromos específicos para linaje y para cada uno de las citocinas evaluadas. La Figura 1A, 1B y 1C, muestra a monocitos (CD14+, CD19-), linfocitos B (CD14-, CD19+) y CDp (LIN-, HLA-DR<sup>alto</sup>, CD123+, CD11c-), con tinción intracelular para detectar TNF- $\alpha$  e IL-6 en monocitos y LB e IFN- $\alpha$  para CDp, respectivamente. Como control positivo se usó estimulación con LPS, anti-BCR (que simula la unión al antígeno) y oligodeoxinucleótido de tipo A (CpG 2216) para la estimulación de monocitos, LB y CDp, respectivamente, y comprobar su funcionalidad.

Así la estrategia de análisis aquí usada, permite determinar la frecuencia de monocitos, linfocitos B y células dendríticas tanto mieloides como plasmocitoides totales y productoras de las CT evaluadas. De notar, en todos los casos en que CMSP fueron estimuladas con los LPS, anti-BCR o CpG, una importante respuesta de monocitos, LB y CD fue obtenida, comprobando la funcionalidad de las células. Una baja pero detectable de monocitos y linfocitos B productores de CT fue detectada en los tubos no estimulados (Ver Figura 1), que no fue detectable en LT o CD. Además, una alta frecuencia de CPCC fue detectada en lo tubos tratados con los estímulos (Ver Figura 1).

### 7.4 FRECUENCIA DE LINFOCITOS B Y MONOCITOS PRODUCTORES DE CITOQUINAS EN PACIENTES CON INFECCION POR VD.

Para establecer la frecuencia de CPCC en niños con infección por VD, CMSP frescas de niños con infección por VD en fase aguda de la enfermedad y niños sanos, fueron aisladas y cultivadas por 12 horas en presencia de Brefeldina A, posteriormente se analizó la producción de TNF- $\alpha$ , IL 6 e IL 10 en cada linaje

celular por citometría de flujo. En pacientes con infección por VD se encontró que la frecuencia de monocitos productores de TNF- $\alpha$  e IL 6 era significativamente mayor que la encontrada en niños sanos (Ver Figura 2), con valores de P de 0.04 y 0.03 (Mann-Whitney test), respectivamente. La frecuencia de Linfocitos B productores de TNF- $\alpha$  también fue mayor en pacientes con infección por VD comparado con el grupo de pacientes sanos, valor de P 0.04, sin embargo para la IL-6 no hubo diferencias en los LB de dengue y sanos. Cuando la IL-10 fue analizada, no hubo diferencia significativa en la frecuencia tanto de linfocitos B como de monocitos productores de esta CT (Ver Figura 2), probablemente debido a que hubo un importante ruido de fondo en los voluntarios sanos para esta CT particular (Ver Figura 2). No se detectaron LT ni CD4+ ni CD8+ o CD mieloides o plasmocitoides productoras de alguna de las CT evaluadas en niños con dengue o sanos (Datos no mostrados).

En resumen, una baja pero detectable frecuencia de monocitos productores de TNF- $\alpha$  e IL-6 y Linfocitos B productores de TNF- $\alpha$  circulantes fue detectada por citometría de flujo en los niños infectados con dengue, pero no en los niños sanos.

#### 7.5 DINAMICA DE LAS CPCC EN NIÑOS CON INFECCION POR VD.

Para conocer la dinámica de las CPCC en circulación de niños con infección por VD naturalmente inducida, las CPCC fueron evaluadas en muestras de niños en diferentes días de la etapa aguda de la enfermedad. A partir del cuarto día de enfermedad, hubo un incremento en la frecuencia de monocitos y linfocitos B productores de TNF- $\alpha$ , con posterior descenso al 7 día de iniciados los síntomas, siendo un poco más intensa la elevación de monocitos comparado con LB (Figura 3). Estos resultados muestran que la enfermedad en su etapa aguda, induce la temprana aparición de las CPCC y llamativamente el pico coincide con la cinética de CT innatas previamente reportadas en niños con dengue en la etapa aguda

#### 7.6 FRECUENCIA DE CPCC EN PACIENTE CON INFECCION POR VD LUEGO DE ESTIMULACION CON LPS Y ANTI BCR.

Cómo se mencionó antes, para determinar la capacidad funcional de los CMSP aisladas de niños con dengue, en cada experimento se incluyó un control positivo, que consistió en CMSP tratadas con estímulos para Monocitos, LB y CD que han sido extensamente caracterizados previamente. Para estimular monocitos se usó LPS, para LB una mezcla de LPS + anti-BCR y para células dendríticas mieloides y plasmocitoides una mezcla de LPS + CpG 2216. Posterior al estimular las

células fueron incubadas por 12h en presencia de Brefeldina A y posteriormente teñidas para ser analizadas por citometría de flujo.

En pacientes con infección por VD, se encontró que la respuesta de monocitos a la estimulación por LPS, determinada como frecuencia de células productoras de TNF- $\alpha$ , se encontraba disminuida comparado con pacientes sanos ( $P=0.03$ , Mann-Whitney test). Sin embargo no se encontró diferencias entre los LB productores de TNF- $\alpha$ , ni las CPCC productoras de IL 6 e IL 10 tras estimulación, entre los pacientes con infección por VD comparado con pacientes sanos (Figura 4).

De igual manera se analizaron las poblaciones de CD mieloides y plasmocitoides productoras de citoquinas en niños sanos y en niños con infección por VD luego de la estimulación con LPS y CpG2216. Ya que las células dendríticas plasmocitoides son la principal fuente de IFN- $\alpha$  tras infección viral, esta población tomó un particular interés. Tanto las CD mieloides y plasmocitoides tenían una capacidad disminuida para la producción de TNF- $\alpha$  en pacientes con infección por VD ( $P\leq 0.006$ , Mann-Whitney test). Sin embargo esta diferencia no fue significativa para la IL-6 e IL-10 en los dos tipos de CD analizados (Figura 5).

Cuando la frecuencia de células dendríticas plasmocitoides productoras de IFN- $\alpha$  tras estimulación con un agonista de receptores Toll fue analizada (Figura 5), una profunda disminución fue observada en células aisladas de niños con dengue en comparación con CD de niños sanos ( $P<0.0001$ , Mann-Whitney test). Esta disminución fue mediada por la infección viral puesto que CDp de niños que tuvieron dengue y estaban en fase de convalecencia restauraron su capacidad de producir IFN- $\alpha$  tras estimulación a niveles comparables con los niños sanos (Datos no mostrados). En resumen, la infección con VD modula la capacidad de monocitos y células dendríticas de producir CT y lleva a estas células aun posible estado de “agotamiento” que hace a estas células refractarias a responder ante bien caracterizados estímulos. Por otro lado, mecanismo de subversión, de la respuesta inmune por parte del virus podrían explicar estos resultados.

## 7.7 PATRON DE CITOCINAS PLASMÁTICAS PRODUCIDA POR LOS NIÑOS CON DENGUE Y DIFERENTES ESTADÍOS CLÍNICOS

Para determinar si existe relación de los niveles séricos de CT con la severidad clínica de la enfermedad, niveles plasmáticos de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  fueron evaluados por CBA en pacientes sanos, comparado con pacientes en fase aguda de enfermedad por VD en diferentes estadios clínicos (dengue y

dengue severo). Niveles significativamente altos de IL-6 fueron encontrados en pacientes con dengue y dengue severo comparado con el grupo de pacientes sanos ( $P=0.01$  y  $P=0.0001$  respectivamente, prueba de Kruskal-Wallis) y a su vez niveles mayores de IL-6 en grupo de dengue severo comparado con el grupo de pacientes no severo ( $P=0.03$  prueba de Kruskal-Wallis). La IL 10, mostró niveles aumentados en el grupo de dengue severo y no severo comparado con el grupo de pacientes sanos ( $P=0.0001$  para ambos, prueba de Kruskal-Wallis). La IL-2 mostró ser detectable en 30% de los casos de dengue pero sólo en el 10% de los sanos ( $P=0.07$ , Fisher test), así que hubo una tendencia a mayor producción de IL-2 en la infección por dengue. Interesantemente, para el IFN- $\gamma$  los datos fueron invertidos: fue detectable en el 60% de los casos de dengue y en ningún caso de dengue severo ( $P=0.001$ , Fisher test). Además, niños con formas no severas tuvieron significativos altos niveles de IFN- $\gamma$ , que niños con formas severas lo que apoya el papel protector de esta CT en inmunidad al virus. En el caso de TNF- $\alpha$  e IL-4, no se encontró relación entre sus niveles plasmáticos y los diferentes estadios de la enfermedad. En resumen niveles de IL-10, IL-6 y el IFN- $\gamma$  son inducidos por la infección con VD y estas dos últimas tienen relación con la severidad clínica de la enfermedad.

#### 7.8 CORRELACION ENTRE LA FRECUENCIA DE CPCC Y LOS NIVELES SERICOS DE CITOQUINAS.

Las CPCC podrían cumplir un papel relevante en el aumento de los niveles plasmáticos de CT circulantes observados en niños con dengue previamente definidos (Salgado DM *et al* 2013). Consistentemente, la cinética de la frecuencia de CPCC detectadas en circulación de niños con dengue es similar a la dinámica de CT encontradas en el plasma (Figura 3 y Figura 6). Para determinar si las CPCC podrían ser responsables de las CT que circulan en plasma en la fase aguda de niños con dengue, se determinó si existe correlación entre estos dos factores en niños con dengue. Como muestra la Figura 7, no hubo correlación entre la frecuencia de monocitos y linfocitos B productores de IL-6 y los niveles de IL-6 plasmáticos ( $Rho= 0.4$  y  $0,37$ ,  $P= 0.12$  y  $0.17$ , respectivamente; Coeficiente de correlación de Spearman). Tampoco existió correlación entre el TNF- $\alpha$  o IL-10 y las respectivas CPCC (datos no mostrados). En resumen, algunas citocinas como la IL-6 e IL-10 plasmáticas significativamente elevadas en formas severas de dengue, sin embargo su concentración no se correlaciona con la frecuencia de CPCC lo que sugiere que otros orígenes, además de éstas células, pueden ser responsables de los niveles plasmáticos de CT en dengue.

## 7.9 FRECUENCIA DE CPCC Y RELACION CON LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD.

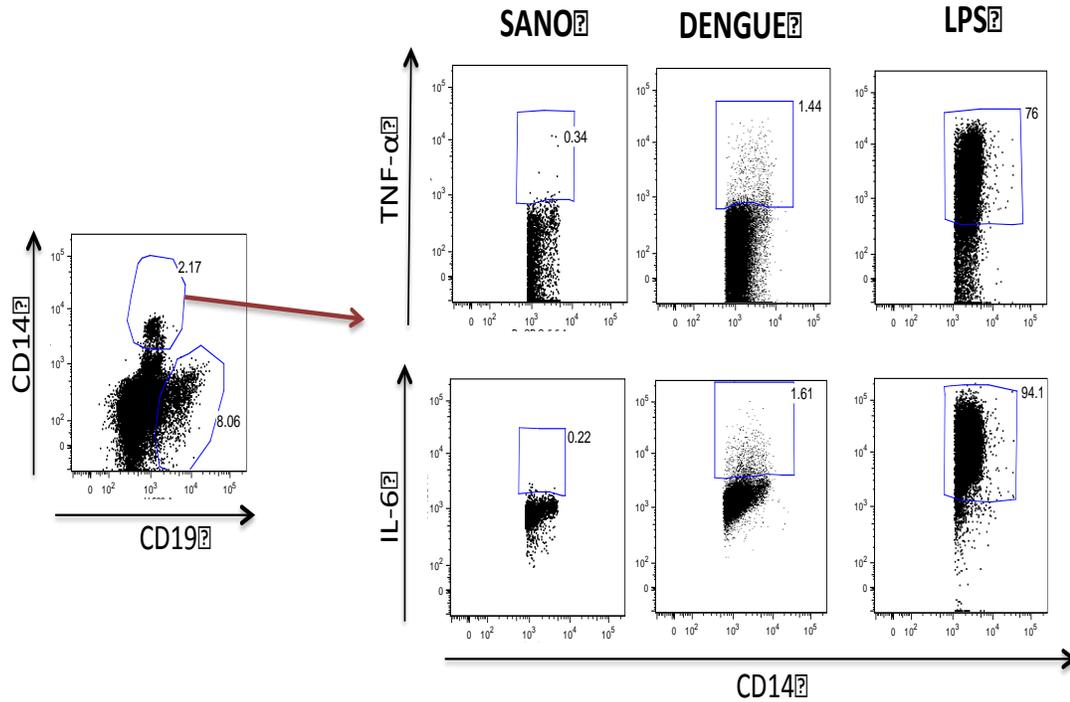
Para determinar si existe asociación entre la severidad clínica de la enfermedad y la frecuencia de CPCC en sangre de pacientes con infección natural VD, se evaluó la frecuencia de CPCC en los grupos de pacientes, sanos, dengue (que incluyó pacientes con y sin signos de alarma) y dengue severo. Una más alta frecuencia de monocitos y linfocitos B productores de TNF- $\alpha$  en pacientes con dengue severo, comparado con el grupo de pacientes con dengue fue encontrada (Figura 8, P= 0.03 y P=0.02 para LB y monocitos, respectivamente). No se encontró diferencia en la frecuencia de CPCC productoras de IL-6 y las otras CT analizadas entre los diferentes grupos de severidad clínica. Estos datos sugieren que la elevación de la frecuencia de CPCC productoras de TNF- $\alpha$  podría estar relacionada con las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas.

DATOS GENERALES	GRUPO CONTROL (n= 25)	DENGUE (n= 42)	DENGUE SEVERO (n=20)	P
EDAD (meses) M, r	54 (4 -144)	54 (4 - 144)	35 ( 4 - 144)	0,087 <sub>1</sub>
DIA DE ENFERMEDAD	NA	4 (3 - 6)	4 (3-6)	0,15 <sub>1</sub>
INFECCION PRIMARIA (%)	NA	15 (36)	7 (35)	0,55 <sub>1</sub>
PARACLINICOS				
LEUCOCITOS (leu/ul)	8300 (10000 - 12000)	5400 (1000 - 14300)	5000 (5400 - 14300)	0,001 <sub>1</sub>
HEMATOCRITO (%)	36 (30 - 40)	37 (28 - 53)	36 (28 - 40)	0,36 <sub>1</sub>
PLAQUETAS (plt/ul)	200000 (180000 - 240000)	78000 (23000 - 168000)	26000 (5000 - 131000)	0,005 <sub>1</sub>
ALT (MG/DL)	NA	99 (32 - 368)	167 (30 - 498)	0,001 <sub>3</sub>
HALLAZGOS CLINICOS				
HEPATOMEGALIA	NA	3 (0 - 6)	4 ( 0 - 7)	0,36 <sub>1</sub>
DERRAME PLEURAL	NA	4 (5 - 15)	5 (10 - 30)	0,36 <sub>1</sub>

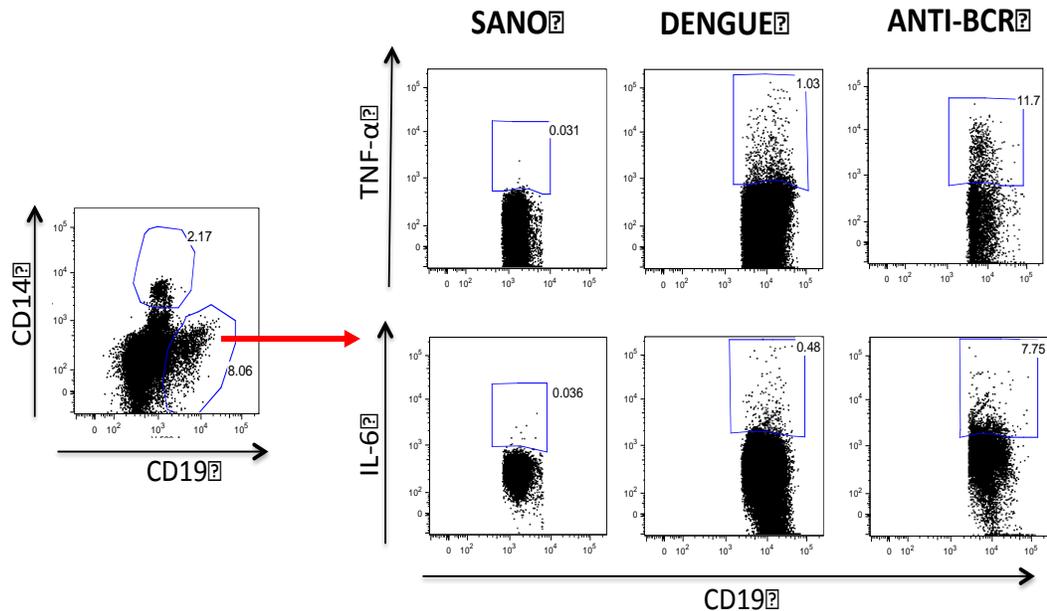
Pruebas estadísticas: <sup>1</sup> Kruskal-Wallis. <sup>2</sup> Fisher. <sup>3</sup> Mann-Whitney. M: Mediana, r: rango ALT: Alanino-amino transferasa NA: No aplica

Figura 1. Estrategia de análisis de monocitos productores de CT. La producción de TNF- $\alpha$  (arriba) e IL-6 (abajo) es mostrada.



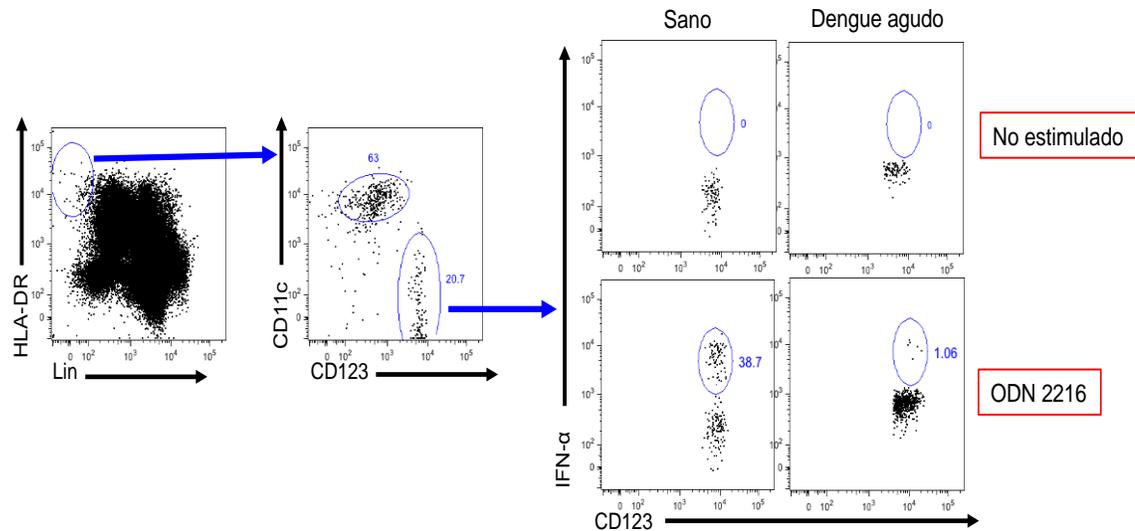
Monocitos (CD14 +, CD19 -) productores de TNF- $\alpha$  e IL 6 fueron evaluados en niños sanos, niños en fase aguda de infección por VD. Como control positivo se utilizó estimulación con LPS. El recuadro azul muestra la cantidad de células productoras de citocinas evaluadas para cada grupo estudiado.

Figura 2. Estrategia de análisis de los linfocitos B productoras de CT. La producción de TNF- $\alpha$  (arriba) e IL-6 (abajo) es mostrada.



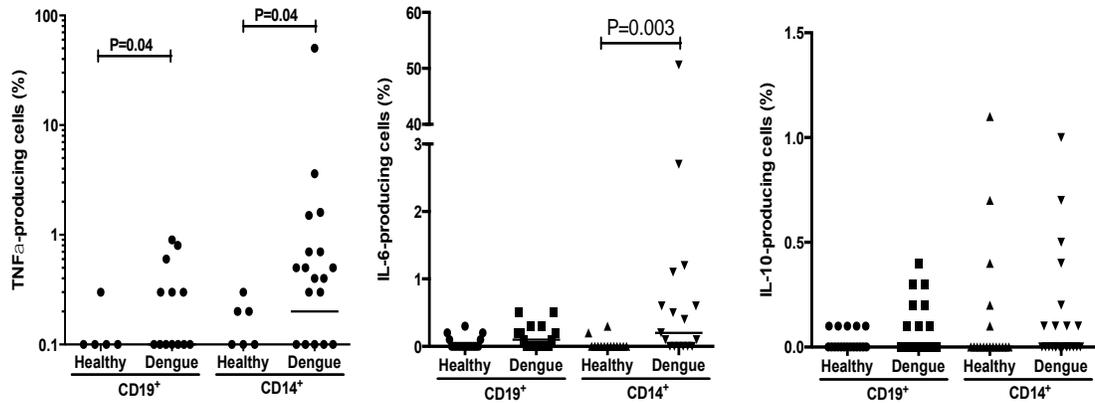
Linfocitos B (CD14 -, CD19 +) productoras de TNF $\alpha$  e IL 6 fueron evaluados en niños sanos, niños en fase aguda de infección por VD. Como control positivo se utilizó estimulación con ANTI-BCR. El recuadro azul muestra la cantidad de células productoras de citocinas evaluadas para cada grupo estudiado.

Figura 3. Estrategia de análisis de las células dendríticas mieloides y plasmocitoides productoras de CT. La producción de IFN- $\alpha$  es mostrada.



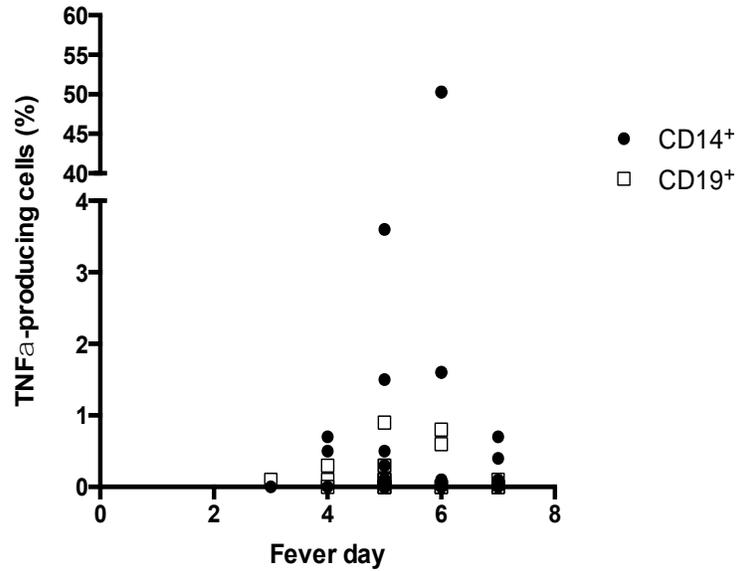
Células Dendríticas plasmocitoides (CD123 + CD11c -) productoras de IFN- $\alpha$  fueron evaluados en niños sanos, niños en fase aguda de infección por VD. Para ninguno de los dos grupos se detectó CDp productoras de IFN- $\alpha$ . Se realizó estimulación de ODN 2216 para evaluar la funcionalidad celular.

Figura 4. Frecuencia de monocitos y linfocitos B productores de TNF- $\alpha$  , IL-6 e IL -10 en niños sanos y niños con infección por VD.



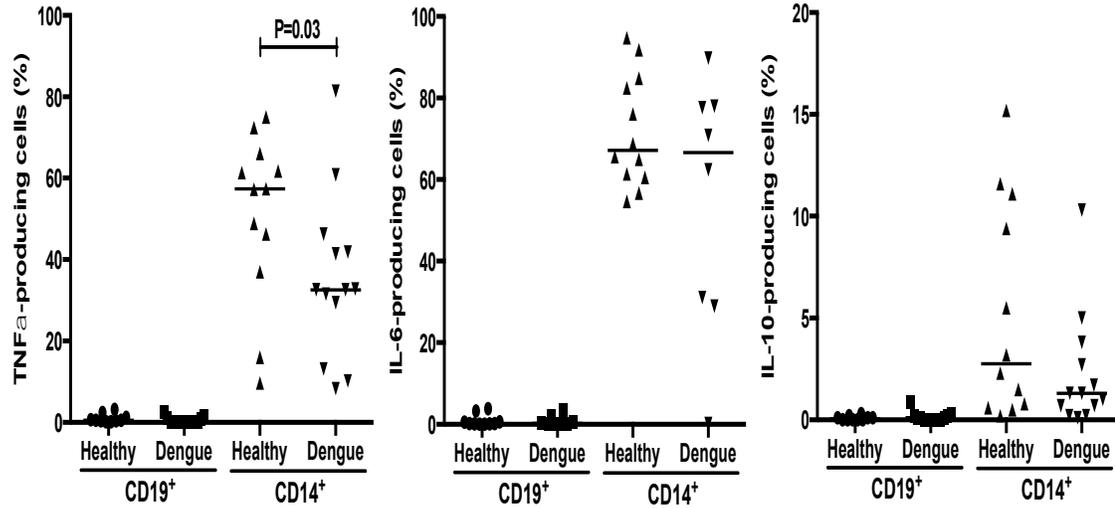
CPCC son detectables en niños con infección por dengue. CMSP frescas de niños sanos o niños con dengue, fueron cultivadas por 12h en presencia de Brefeldina A. Monocitos y LB productores de TNF- $\alpha$  e IL-6 fueron evaluados 12h posterior al final del cultivo. El test de Mann-Whitney fue usado para comparar la frecuencia de CPCC entre sanos y dengue. El valor de P es mostrado.

Figura 5. Cinética de las CPCC en niños con infección por VD.



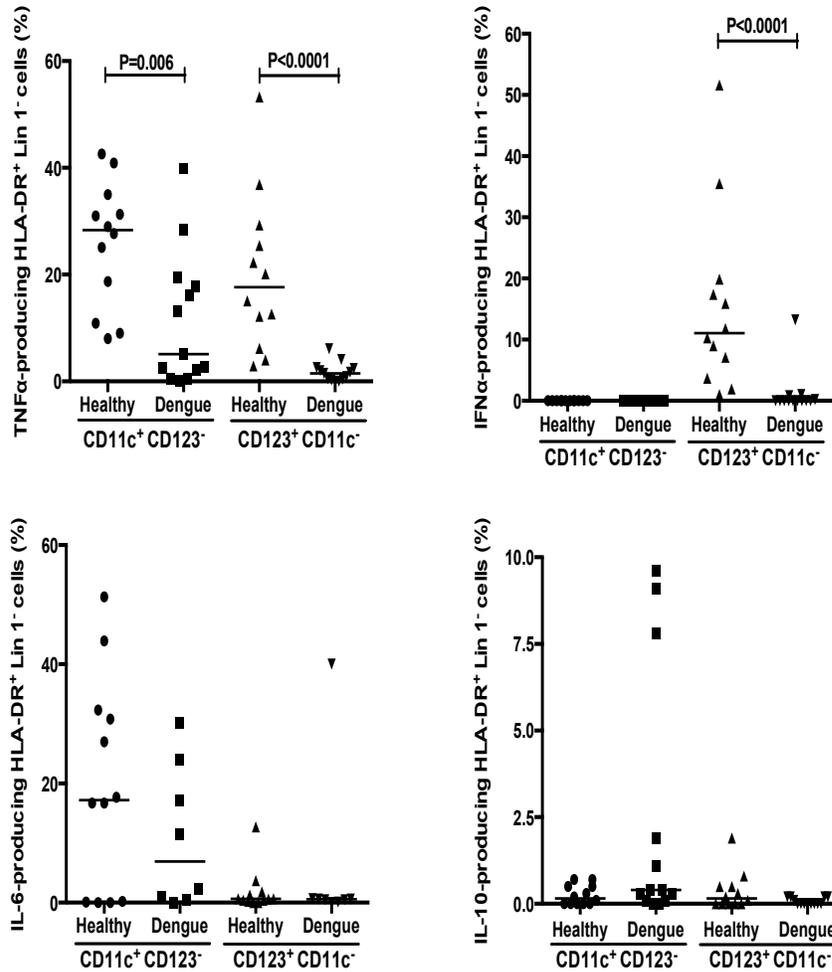
La más alta frecuencia de CPCC es detectada entre el 4 y 6 día de iniciados los síntomas. CPCC fueron evaluadas por citometría en muestras de niños en diferentes días de etapa de infección aguda por dengue. Frecuencia de Monocitos (•) y linfocitos B (□) productoras de TNF-a es mostrada.

Figura 6. Respuesta de monocitos y linfocitos B en niños sanos y niños con infección por VD posterior a estimulación con LPS + anti-BCR.



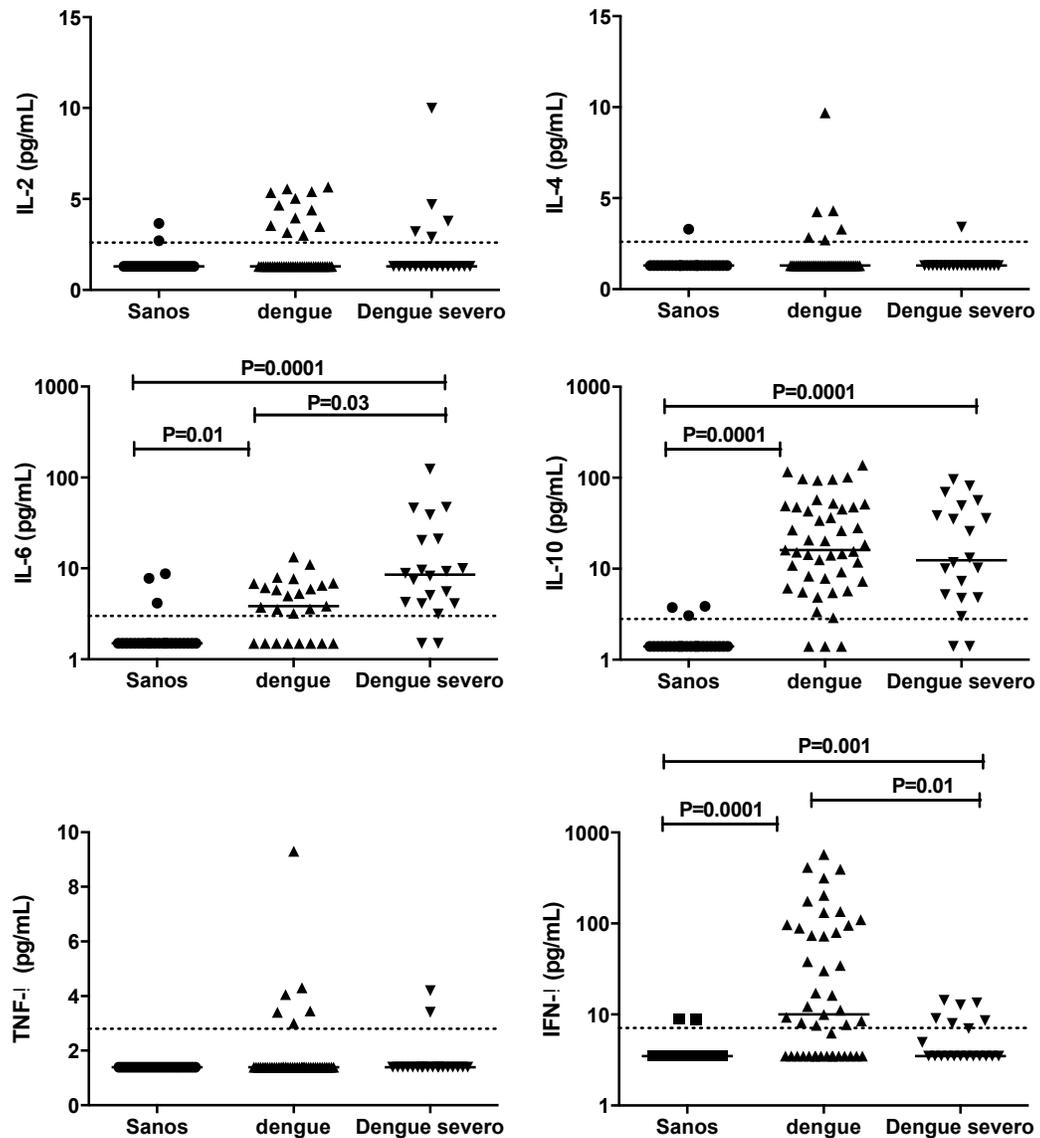
Monocitos de niños con dengue tienen una capacidad disminuida de producir TNF- $\alpha$  pero no IL-6 e IL-10, después de estimulación con Lipopolisacárido (LPS). Células mononucleares de sangre periférica de niños sanos y niños con dengue fueron estimulados con 1ug/mL de LPS por 12h, posteriormente permeabilizadas y teñidas para detectar monocitos y linfocitos B productores de TNF-  $\alpha$ . LB fueron estimulados con anti-receptor de células B (que simula la acción del antígeno). La P de Mann-Whitney test es mostrada..

Figura 7. Respuesta de CDm y CDp en niños sanos y niños con infección por VD posterior a estimulación con LPS o CpG22.



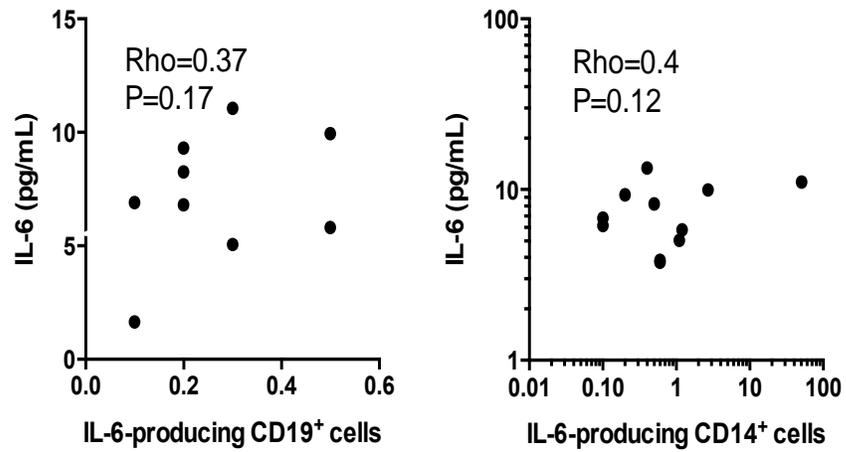
Células dendríticas mieloides y plasmocitoides de niños con dengue tiene disminuida la capacidad de producir citocinas después de estimulación con LPS o CpG2216. El valor de P usando la prueba de Mann-whitney es mostrado.

Figura 8. Patrón de CT plasmáticas en niños con dengue y dengue grave.



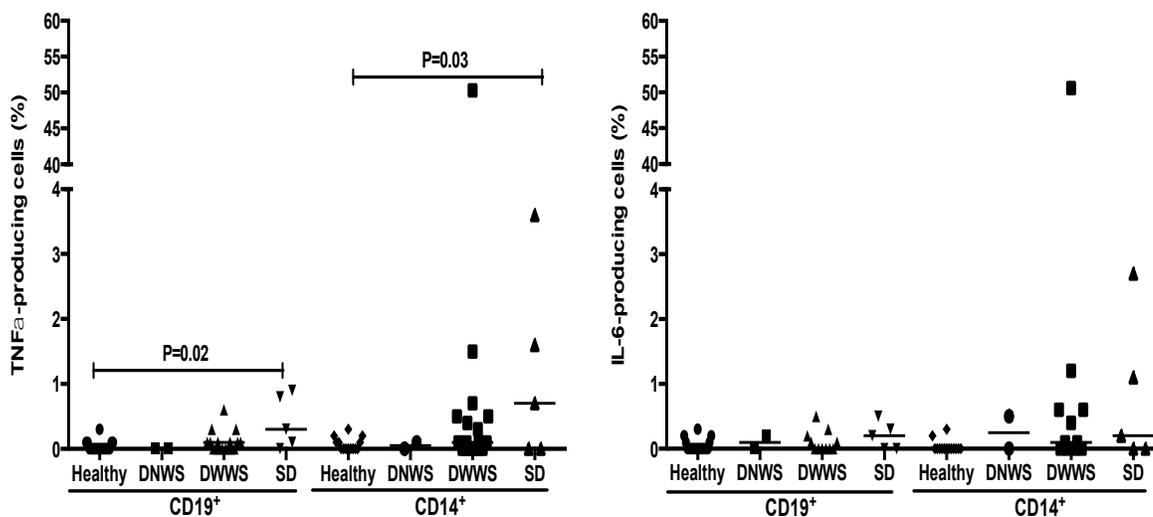
Niveles de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  fueron evaluados por un ensayo basado en esferas en el plasma de niños con dengue y dengue severo. Cada punto representa una muestra individual. La línea horizontal punteada muestra el límite de detección del ensayo para cada CT. El valor de P de la prueba post test es mostrado según corresponde.

Figura 9. Relación entre la frecuencia de CPCC y los niveles de CT.



No existe correlación entre la frecuencia de CPCC (células B, izquierda y Monocitos, derecha) productoras de IL-6 detectada por citometría y los niveles séricos de esta citocina. El valor de correlación de Rho de Spearman P son mostrados.

Figura 10. Frecuencia de CPCC y su relación con la severidad clínica de la enfermedad.



Frecuencia alta de Monocitos y LB productores de TNF-  $\alpha$  pero no de IL-6 están presentes en formas severas de la infección. Análisis realizado con Kruskal-Wallis test y Bonferroni modificado test.

## 8. DISCUSION

Usando citometría de flujo, CPCC fueron identificadas en pacientes con dengue. Estudios previos habían demostrado la presencia de células inmunes productoras de TNF- $\alpha$  en sangre periférica en paciente con infección por VD durante la fase aguda de la enfermedad, sin embargo esto había sido evaluado mediante la detección de copias de RNA de la citocina en CMSP y monocitos purificados y no a nivel de células individuales como los logrados aquí (Srikiatkachorn, A. 2012), o se asumía que la elevación de CT en sangre periférica era secundaria a infección por el VD en CMSP (Arias, J. 2014). En nuestro estudio encontramos que la frecuencia de CPCC se eleva en pacientes que cursaban con etapa aguda de la enfermedad, es decir entre el 4 y el 6 día de inicio de los síntomas, dada principalmente por incremento en monocitos y Linfocitos B. Esta elevación es de carácter transitorio lo que sugiere que probablemente es inducida por la infección viral.

Hallazgos previos habían demostrado que a pesar de que existe elevación de CT plasmáticas y que se documenta además la aparición de CPCC durante la fase aguda de la enfermedad por VD, existía una reducción en los niveles de CT y que esta reducción era mas acentuada en pacientes con dengue severo luego de estimulación con LPS (Chunhakan, S. 2015). En este estudio se decidió evaluar la funcionalidad de las CMSP luego de estímulos extensamente documentados. Se encontró que en pacientes con infección por VD, durante la fase aguda de la enfermedad, la capacidad de respuesta de los monocitos y CD mieloides y plasmocitoides productores de TNF-  $\alpha$  se encuentra disminuida al compararla con estos mismos grupos celulares de pacientes sanos, posterior a la aplicación del mismo estímulo.

Hallazgo similar encontramos en CDp productoras de IFN- $\alpha$ . Esta disminución en la frecuencia de monocitos y CD productores de TNF- $\alpha$  y de CDp productores de IFN- $\alpha$  es transitoria y probablemente inducida por el virus, ya que en pacientes que tuvieron dengue pero que ya han pasado la etapa aguda de la enfermedad, esta capacidad fue restaurada. Estos hallazgos sugieren la presencia de mecanismos modulares de la respuesta que podrían estar dados por elevación de los niveles de citocinas anti-inflamatorias, tipo IL-10, que puede generar regulación de la respuesta de monocitos inclusive luego de estimulación con LPS (Casatekka, M A. 1993; WaalMalefyt, R 1991). Recientemente ha sido mostrado que el VD tiene estrategias para evadir la respuesta inmune. Una de ellas por ejemplo, es el cambio en el patrón de expresión de TLR en CD mieloides, plasmocitoides y en monocitos, aumentando la expresión de TLR 2, 4 y 9, y disminuyendo TLR 3 y moléculas coestimuladoras como el CD80 y CD86, especialmente en presentaciones severas de la enfermedad. Con este mecanismo, disminuye la

producción de CT y limita la capacidad de aclaramiento viral (Torres, S. 2013). Además, el VD es capaz de aumentar replicación y disminuir su aclaramiento mediante la limitación de la capacidad de las CMSP de disminuir el metabolismo lipídico y la capacidad de autofagia celular, disminuyendo la producción de IFN- $\alpha$  por modulación en la señalización intracelular (Green A. M. 2014).

Dentro de la inmunopatogenesis de la enfermedad se ha establecido la elevación de diferentes CT en plasma, tales como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 y ST2, entre otras y se han utilizado estas CT como biomarcadores de severidad clínica de la enfermedad (Arias, J. 2014; Mangione, J. N. 2014). Consistente, con este trabajo al igual que en reportes previos, se encontró que durante la fase aguda de la enfermedad se presenta elevación de niveles de IL 10 e IL 6 en paciente con dengue severo y no severo comparado con el grupo de pacientes sano y a su vez al comparar el grupo de paciente enfermos, existe una mayor elevación de los niveles de estas estas CTs en el grupo de mayor severidad. Para otras CT como el IFN- $\gamma$  se encontró que su nivel plasmático fue significativamente mayor en niños que no hicieron formas severas, sugiriendo un papel protector en la enfermedad. A diferencia de la vía de IFN- $\alpha$ , en donde se ha descrito en varios tipos de líneas celulares o células primarias humanas que la infección por VD inhibe algunos de sus componentes como STING o las STAT, para el IFN- $\gamma$  este efecto no ha sido notado. Sin embargo, estos resultados muestran que el virus está modulando de alguna manera no conocida aún la respuesta de este CT según la condición clínica que se evalúe. Hay elevación de las CPCC y que coincide con la elevación de CT durante la fase aguda de pacientes con infección por VD,. Sin embargo, se encontró que no existe relación entre los niveles de CT y la frecuencia de CPCC. Estudios previos han mostrado que el VD es capaz de activar diferentes grupos celulares diferentes a CMSP.

Se ha demostrado *in vitro* que el VD tiene la capacidad de infectar fibroblastos tisulares y que a su vez induce la expresión de TLR 3 y TNF- $\alpha$  por parte de estos (Bustos-Arriaga, J. 2011). Se ha reportado además que el endotelio no solo cumple un papel en la fuga vascular, además, el VD es capaz de infectar la célula endotelial e inducir la transcripción de genes para la producción de citocinas, además de documentarse la expresión de algunas de ellas como IL-7, TNF- $\alpha$  e Interferones tipo I (Dalrymple, N. A. 2012). Se ha mostrado además, la capacidad que tiene VD-2 de inducir la producción de IL 8, TNF- $\alpha$  y Factor nuclear kB en células humanas epiteliales y células endoteliales (Bosch, I. 2002). Los hallazgos encontrados en este trabajo, sugieren que existen otros orígenes para la producción de CT además de las CPCC y más estudios son necesarios.

Finalmente existió una alta frecuencia de CPCC en pacientes en fase aguda de la enfermedad por VD, dado por elevación de CPCC productoras de IL-6 y TNF- $\alpha$ . A

su vez esta elevación es mucho más marcada en el grupo de pacientes hospitalarios comparado con el grupo de pacientes ambulatorios sugiriendo que puede comportarse como biomarcador de severidad clínica de la enfermedad. Es posible que se comporte como mejor marcador que las CT plasmáticas ya que estas como se describió previamente. Tienen diferentes orígenes lo que puede sesgar su relación con la severidad. Sin embargo, la elevación de la frecuencia de las CPCC sugiere mecanismos propios celulares inducidos por la infección por VD, que conlleva a una relación más exacta entre el biomarcador y la severidad clínica de la enfermedad.

## 9. CONCLUSIONES

El VD induce una elevación de CPCC tipo linfocitos B y Monocitos.

La elevación de las CPCC ocurre principalmente durante la etapa crítica de la enfermedad entre el cuarto y sexto día, con posterior descenso en la fase de convalecencia.

Existe un estado de agotamiento transitorio por parte de las CMSP durante la fase aguda de la enfermedad probablemente inducido por el virus.

Existe elevación de CTs en sangre periférica, y la esta elevación se correlaciona con la severidad clínica de la enfermedad.

No existe una correlación entre los niveles de CTs en sangre con la frecuencia de CPCC, lo que sugiere mecanismos alternos de secreción de CTs.

## BIBLIOGRAFIA

Arias, J. Valero, N. Mosquera, J. Montiel, M. Reyes, E. Larreal, Y. Alvarez-Mon, M. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. (2014). *Virology*. 452 – 253, 42 – 51

Azeredo, E. L., Zagne, S. M., Santiago, M. A., Gouvea, A. S., Santana, A. A., Neves-Souza, P. C., Nogueira, R. M., Miagostovich, M. P., and Kubelka, C. F. (2001). Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* 204(4), 494-507.

Bashyam, H. S., Green, S., and Rothman, A. L. (2006). Dengue virus-reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. *J Immunol* 176(5), 2817-24.

Becerra, A., Warke, R. V., Xhaja, K., Evans, B., Evans, J., Martin, K., de Bosch, N., Rothman, A. L., and Bosch, I. (2009). Increased activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in serum from acutely infected dengue patients linked to gamma interferon antiviral function. *J Gen Virol* 90(Pt 4), 810-7.

Blackley, S., Kou, Z., Chen, H., Quinn, M., Rose, R. C., Schlesinger, J. J., Coppage, M., and Jin, X. (2007). Primary human splenic macrophages, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus infection in vitro. *J Virol* 81(24), 13325-34.

Bosch, I. Xhaja, K. Estevez, L. Raines, G. Melichar, H. Warke, R. V. Fournier, M. V. Ennis, F. A. Rothman, A. L. (2002). Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J Virol*. 76 (11) 5588-97

Braga, E. L., Moura, P., Pinto, L. M., Ignacio, S. R., Oliveira, M. J., Cordeiro, M. T., and Kubelka, C. F. (2001). Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(2), 229-32.

Bustos-Arriaga, J. García-Machorro, J. León-Juárez, M. García Cordero, J. Santos-Argumedo, L. Flores-Romo, L. Méndez-Cruz, A. R. Juárez-Delgado, F. J. Cedillo-Barrón, L. Activation of the innate immune response against DENV in normal non-transformed human fibroblasts. (2011). *PLoS Negl Trop Dis*. 5 (12) e1420.

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

Chen, L. C., Lei, H. Y., Liu, C. C., Shiesh, S. C., Chen, S. H., Liu, H. S., Lin, Y. S., Wang, S. T., Shyu, H. W., and Yeh, T. M. (2006). Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* 74(1), 142-7.

Chunhakan, S. Butthep, P. Yoksan, S. Tangnararatchakit, K. Chuansumrit, A. (2015), Vascular leakage in dengue hemorrhagic Fever is associated with dengue infected monocytes, monocyte activation/exhaustion, and cytokines production. *Int J Vasc Med*, 917143.

Clyde, K., Kyle, J. L., and Harris, E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 80(23), 11418-31.

Dalrymple, N. A. Mackow, E. R. Endothelial cells elicit immune-enhancing responses to dengue virus infection. (2012). *J Virol*. 86(12) 6408-15

Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H. J., and Bar-Or, A. (2007). Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 178(10), 6092-9.

Duddy, M. E., Alter, A., and Bar-Or, A. (2004). Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol* 172(6), 3422-7.

Durbin, A. P., Vargas, M. J., Wanionek, K., Hammond, S. N., Gordon, A., Rocha, C., Balmaseda, A., and Harris, E. (2008). Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and

increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology* 376(2), 429-35.

Endy, T. P., Nisalak, A., Chunsuttitwat, S., Vaughn, D. W., Green, S., Ennis, F. A., Rothman, A. L., and Libraty, D. H. (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.

Fillatreau, S., Gray, D., and Anderton, S. M. (2008). Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol* 8(5), 391-7.

Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W., Zarski, J. P., and Drouet, E. (2002). Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 292(1), 162-8.

Gray, D., Gray, M., and Barr, T. (2007). Innate responses of B cells. *Eur J Immunol* 37(12), 3304-10.

Green, S., and Rothman, A. (2006). Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis* 19(5), 429-36.

Green, A. M. ;Beatty, P. R. ;Hadjilaou, A. ;Harris, E. (2014). Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol* 426 (6), 1148-60

Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11(3), 480-96.

Guzman, M. G., Harris, E. (2015). Dengue. *Lancet*. 385 (1), 453-65.

Halstead, S. B., Porterfield, J. S., and O'Rourke, E. J. (1980). Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. *Am J Trop Med Hyg* 29(4), 638-42.

Ho, L. J., Wang, J. J., Shaio, M. F., Kao, C. L., Chang, D. M., Han, S. W., and Lai, J. H. (2001). Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol* 166(3), 1499-506.

Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(9):2634-9.

Hober, D., Poli, L., Roblin, B., Gestas, P., Chungue, E., Granic, G., Imbert, P., Pecarere, J. L., Vergez-Pascal, R., Wattre, P., and et al. (1993). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg* 48(3), 324-31.

Huang, Y. H., Lei, H. Y., Liu, H. S., Lin, Y. S., Liu, C. C., and Yeh, T. M. (2000). Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg* 63(1-2), 71-5.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. (2010). Boletín Epidemiológico número 20.

Jessie, K., Fong, M. Y., Devi, S., Lam, S. K., and Wong, K. T. (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* 189(8), 1411-8.

King, A. D., Nisalak, A., Kalayanrooj, S., Myint, K. S., Pattanapanyasat, K., Nimmannitya, S., and Innis, B. L. (1999). B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30(4), 718-28.

Kou, Z., Quinn, M., Chen, H., Rodrigo, W. W., Rose, R. C., Schlesinger, J. J., and Jin, X. (2008). Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 80(1), 134-46.

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.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(3):545-51.

Libraty, D. H., Pichyangkul, S., Ajariyakhajorn, C., Endy, T. P., and Ennis, F. A. (2001). Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol* 75(8), 3501-8.

Lin, Y. W., Wang, K. J., Lei, H. Y., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, H. S., Liu, C. C., and Chen, S. H. (2002). Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virol* 76(23), 12242-9.

Mangada, M. M., Endy, T. P., Nisalak, A., Chunsuttiwat, S., Vaughn, D. W., Libraty, D. H., Green, S., Ennis, F. A., and Rothman, A. L. (2002). Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis* 185(12), 1697-703.

Mangada, M. M., and Rothman, A. L. (2005). Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J Immunol* 175(4), 2676-83.

Mangione, J. N. Huy, N. T. Lan, N. T. Mbanefo, E. C. Ha, T. T. Bao, L. Q. Nga, C. T. Tuong, V. V. Dat, T. V. Thuy, T. T. Tuan, H. M. Huong, V. T. Hirayama, K. The association of cytokines with severe dengue in children, (2014). *Trop Med Health*. 42(4), 137-44

Narvaez, C. F., Angel, J., and Franco, M. A. (2005). Interaction of rotavirus with human myeloid dendritic cells. *J Virol* 79(23), 14526-35.

Narvaez, C. F., Franco, M. A., Angel, J., Morton, J. M., and Greenberg, H. B. (2010). Rotavirus differentially infects and polyclonally stimulates human B cells depending on their differentiation state and tissue of origin. *J Virol* 84(9), 4543-55.  
Peña J, Harris E. Early dengue virus protein synthesis induces extensive rearrangement of the endoplasmic reticulum independent of the UPR and SREBP-2 pathway. *PLoS One* 2012; 7: e38202.

Peña J, Harris E. Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner. *J Biol Chem* 2011; 286: 14226–36.

Reis, S. R., Sampaio, A. L., Henriques, M. G., Gandini, M., Azeredo, E. L., and Kubelka, C. F. (2007). An in vitro model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(8), 983-90.

Restrepo, B. N., Ramirez, R. E., Arboleda, M., Alvarez, G., Ospina, M., and Diaz, F. J. (2008). Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 79(5), 673-7.

Reyes-Del Valle, J., Chavez-Salinas, S., Medina, F., and Del Angel, R. M. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* 79(8), 4557-67.

Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., and Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci* 67(16), 2773-86.

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), 946-51.

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., Panqueba, C., Vega, R., Garzón, M., Castro, D., Rodriguez, J. (2008). Mortalidad por dengue hemorrágico en niños en Colombia: más allá del choque. *Infectio* 12(1), 247-253.

Salgado, D. M., Rodriguez, J. A., Garzon, M., Cifuentes, G., Ibarra, M., Vega, M. R., and Guerrero, C.. (2013). [High plasma levels of soluble ST2 but not its ligand IL-33 is associated with severe forms of pediatric dengue]. *Cytokine* ISSN: 1043-4666 ed: v.61 fasc.3 p.766 - 771 ,2013

Salgado, D., Narvaez, C. Bosch, I. Rodriguez, J. A., Rodriguez L. Vega, M. R., and Castro, D. (2007). [Clinical and epidemiological characterisation of dengue haemorrhagic fever in Neiva, Colombia, 2004]. *Rev Salud Publica (Bogota)* 9(1), 53-63.

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.

Salonen, A., Ahola, T., and Kaariainen, L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* 285, 139-73.

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.

Shresta, S., Kyle, J. L., Robert Beatty, P., and Harris, E. (2004). Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology* 319(2), 262-73.

Schmid M, Diamond M, Harris E, (2014) Dendritic cells in dengue virus infection: targets of virus replication and mediators of immunity. *Frontiers in immunology*. Dec 17;5:647.

Srikiatkachorn, A., and Green, S. (2009). Markers of Dengue Disease Severity. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1(2), 68-79.

Srikiatkachorn, A. Wichit, S.;Gibbons, R. V. ;Green, S. ;Libraty, D. H. ;Endy, T. P. ;Ennis, F. A. ;Kalayanarooj, S. ;Rothman, A. L. (2012). Dengue viral RNA levels

in peripheral blood mononuclear cells are associated with disease severity and preexisting dengue immune status. *Plos One*. 7(12), e51335.

Suharti, C., van Gorp, E. C., Dolmans, W. M., Setiati, T. E., Hack, C. E., Djokomoeljanto, R., and van der Meer, J. W. (2003). Cytokine patterns during dengue shock syndrome. *Eur Cytokine Netw* 14(3), 172-7.

Sun, P., Fernandez, S., Marovich, M. A., Palmer, D. R., Celluzzi, C. M., Boonnak, K., Liang, Z., Subramanian, H., Porter, K. R., Sun, W., and Burgess, T. H. (2009). Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. *Virology* 383(2), 207-15.

Tassaneeritthep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D. L.,

Steinman, R. M., Schlesinger, S., and Marovich, M. A. (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 197(7), 823-9.  
World Health Organization. (2009). "Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control : new edition." World Health Organization, Geneva.

Wu, S. J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J. R., Brachtel, E., Putvatana, R., Louder, M. K., Filgueira, L., Marovich, M. A., Wong, H. K., Blauvelt, A., Murphy, G. S., Robb, M. L., Innes, B. L., Birx, D. L., Hayes, C. G., and Frankel, S. S. (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 6(7), 816-20.

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.

# ANEXOS

Anexo A. Formato de recolección de información.

I. DATOS DE IDENTIFICACION

1. Código	<input type="text"/>		
2. Fecha	<input type="text"/>	3. Historia Clínica	<input type="text"/>
4. Nombres	<input type="text"/>	5. Apellidos	<input type="text"/>
6. Edad	<input type="text"/>	7. Procedencia	<input type="text"/>

II. SINTOMAS

8. Día de fiebre	<input type="text"/>	9. Hora de última diuresis	<input type="text"/>	
------------------	----------------------	----------------------------	----------------------	--

SINTOMA	SI	NO
10. Fiebre		
11. Secreción u obstrucción nasal		
12. Tos		
13. Disnea		
14. Dolor o ardor en la garganta espontáneo o al pasar alimentos		
15. Vómito		
16. Dolor abdominal		
17. Distensión abdominal		
18. Diarrea		
19. Alteración del estado de conciencia		
20*. Convulsiones		
21. Exantema		
22. Sangrado		



51. Pulsos distales Normales  Débiles  Ausentes

52. Conciencia Alerta  Irritable  Somnoliento  Coma

53\*. Glasgow

\*Indicación de RMN. En Glasgow si éste es  $\leq 8$

#### IV. LABORATORIOS

CUADRO HEMATICO			
Fecha (día/mes/año)	( / / )	( / / )	( / / )
54. Hemoglobina g/dl			
55. Hematocrito %			
56. Eritrocitos recuento			
57. Leucocitos recuento			
58. Linfocitos %			
59. Polimorfonucleares %			
60. Monocitos %			
61. Eosinófilos %			
62. Basófilos %			
63. Plaquetas recuento			

#### V. DIAGNÓSTICO:

Sepsis

Dengue con signos de alarma

Dengue severo

VI. TRATAMIENTO RECIBIDO

65. Líquidos \_\_\_\_\_

volumen \_\_\_\_\_

66. Antipiréticos \_\_\_\_\_

67. Oxígeno \_\_\_\_\_

68. Inotrópicos \_\_\_\_\_

69. \_\_\_\_\_  
Hemoderivados

70. Antibiótico \_\_\_\_\_

71. Otros \_\_\_\_\_

VII. DESTINO

Observación   
Infectología   
UCI pediátrica

DILIGENCIADO POR

\_\_\_\_\_

FECHA -----

Anexo B. Consentimiento informado.

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
PROGRAMA DE MEDICINA

*CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA UN NIÑO QUE VA A PARTICIPAR EN  
EL 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:

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 alternativo 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 ayudarán 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 está 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.