

RESPUESTA DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS CIRCULANTES EN
INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE Y SU RELACIÓN CON LA SEVERIDAD DE LA
ENFERMEDAD

FEDERICO DE AMÉRICA PERDOMO CELIS

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA

NEIVA - HUILA
2014

RESPUESTA DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS CIRCULANTES EN
INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE Y SU ASOCIACIÓN CON LA SEVERIDAD DE LA
ENFERMEDAD

FEDERICO DE AMÉRICA PERDOMO CELIS

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Médico.

Asesor

CARLOS FERNANDO NARVAEZ ROJAS

MD, MSc., PhD.

Médico (Universidad Surcolombiana);

Maestría en Microbiología con énfasis en Inmunología (Universidad Javeriana);

Doctorado en Ciencias Biológicas (Universidad Javeriana)

GILBERTO MAURICIO ASTAIZA ARIAS

MD, MSc., PhD. Médico (Universidad Nacional de Colombia);

Especialista en Epidemiología (Universidad de Antioquia);

Maestría en Educación y Desarrollo Comunitario (Universidad Surcolombiana);

Doctorado en Salud Pública (Universidad Nacional).

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

FACULTAD DE SALUD

PROGRAMA DE MEDICINA

NEIVA - HUILA

2014

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Neiva, Mayo del 2014.

DEDICATORIA

A Dios por la salud y sabiduría,

A mis padres por el apoyo constante,

A mi familia por hacerme quien soy,

*A mis profesores Manuel, Carlos y Diana por enseñarme a hacer mis
primeros experimentos*

*A mi universidad y compañeros de estudio por tan gratos momentos a lo largo
de estos años.*

Federico.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

A los pacientes del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva que participaron voluntariamente en este estudio.

A los profesores, médicos residentes y médicos internos del servicio de pediatría del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva por el apoyo en el estudio.

Al semillero de investigación SINEDIR por su crítica constructiva y formación académica.

A COLCIENCIAS por la financiación de esta idea.

A todos los participantes, Mil Gracias...

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	15
2. DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	17
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GENERAL	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. MARCO TEÓRICO	22
5.1 VIRUS DENGUE Y SU PATOGÉNESIS	22
5.2 INMUNOPATOGENESIS DEL DENGUE	23
5.3 PAPEL DE LOS ANTICUERPOS Y CSA EN LA INFECCIÓN POR VD	24

5.4	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE LAS CSA	25
5.5	PAPEL DE LAS CSA EN EL DENGUE	25
6.	HIPÓTESIS	26
7.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	27
8.	DISEÑO METODOLÓGICO	30
8.1	TIPO DE ESTUDIO	30
8.2	UBICACIÓN DEL ESTUDIO	30
8.3	POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO	30
8.3.1	Población	30
8.3.2	Muestra y muestreo	30
8.4	TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	31
8.5	PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	31
8.6	PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS	34
8.7	CONSIDERACIONES ÉTICAS	34
9.	RESULTADOS	36
9.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, PARACLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS	36
9.2	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE	37

	LAS CSA	
9.2.1	Cinética de las CSA inducidas por VD e isotipo predominante	37
9.2.2	Frecuencia de las CSA específicas para VD	38
9.3	CSA Y SU ASOCIACIÓN CON LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD	40
10.	DISCUSIÓN	43
11.	CONCLUSIONES	45
12.	RECOMENDACIONES	46
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47
	ANEXOS	51

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1	Caracterización clínica, paraclínica y demográfica	36
----------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Cinética de las CSA totales en la infección por VD e isotipo predominante	37
Figura 2	Frecuencia de CSA específicas para VD	39
Figura 3	Serotipo-especificidad de las CSA	40
Figura 4	CSA y su asociación con la severidad	41

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A	
Instrumento de recolección de datos	52
Anexo B	
Formato de consentimiento informado	53

RESUMEN

El dengue es una enfermedad viral de alto impacto económico y social. A pesar de que el papel de los anticuerpos séricos en su patogénesis se ha estudiado ampliamente, poco se sabe acerca de las células productoras de éstos. Recientemente se ha analizado el papel de las células secretoras de anticuerpos en infecciones virales y específicamente en dengue, donde podrían ser críticas en la inmuno patogénesis de ésta enfermedad.

Por lo tanto, aquí se propuso caracterizar la respuesta de las células secretoras de anticuerpos en niños infectados por virus dengue del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, Huila. Para ello, a través de citometría de flujo y ELISPOT, determinamos la cinética, el isotipo y la especificidad de las células secretoras de anticuerpos circulantes totales y específicas de virus dengue, y se estableció la asociación con las severidad clínica. Hallamos una masiva frecuencia de células secretoras de anticuerpos durante la fase aguda de la enfermedad, siendo predominante el isotipo G.

Éstas células fueron dengue-específicas pero no serotipo-específicas, y no hubo asociación entre su frecuencia y la severidad clínica de la enfermedad.

Palabras Claves. Dengue, células productoras de anticuerpos, severidad clínica.

ABSTRACT

Dengue is a viral disease of high economic and social impact. Although the role of serum antibodies in their pathogenesis has been widely studied, little is known about the cells producing them. Recently it has been analyzed the role of antibody-secreting cells in viral infections, and specifically in dengue, where could be critical in the immuno pathogenesis of this disease. Therefore, here we proposed to characterize the response of antibody-secreting cells in children infected with dengue in the Hospital Universitario "Hernando Moncaleano Perdomo" from Neiva, Huila.

For this, by flow cytometry and ELISPOT, we determined the kinetics, isotype and specificity of total and dengue-specific circulating antibody-secreting cells, and established the association with clinical severity. We found a massive frequency of antibody-secreting cells during the acute phase of the disease, being predominant the isotype G. These cells were dengue-specific but no serotype-specific, and there was no association between its frequency and clinical severity of the disease.

Key words. Dengue, antibody-secreting cells, clinical severity.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad viral, endemo-epidémica, producida por el virus dengue (VD) que constituye un evento de salud pública con gran impacto económico y social. 2.500 millones de personas en el mundo que habitan en áreas tropicales y subtropicales están en riesgo de contraer la enfermedad y 50 millones de personas en el mundo sufren la infección, 500,000 de ellos afectados por formas severas de la enfermedad. A pesar del avance en el entendimiento de la enfermedad, no existe actualmente un tratamiento farmacológico específico para el dengue, siendo sólo la corrección de líquidos y la prevención de la hipovolemia el manejo que ha disminuido la mortalidad.

No es claro lo que se conoce acerca de los mecanismos inmunopatológicos que llevan al desarrollo de la enfermedad. Los anticuerpos (Ac) séricos han sido caracterizados y juegan un importante papel dual en la respuesta inmune frente al dengue. Los Ac homotípicos son capaces de neutralizar la infección, pero los Ac heterotípicos incrementan la captación e infección de células inmunes por el virus (Amplificación dependiente de anticuerpos [ADA]), llevando a formas más graves de la enfermedad luego de infecciones secundarias (por un serotipo diferente).

En la producción de esos anticuerpos juegan un papel crítico las células secretoras de anticuerpos (CSA) o plasmablastos, encontrándose elevados en pacientes infectados con virus dengue, siendo las dengue-específicas hasta cerca del 80% del total de CSA circulantes. De igual manera, las mayores frecuencias de plasmablastos se correlacionan con las formas graves de la enfermedad. Debido a que la función primaria de las CSA es la producción de inmunoglobulinas (Igs) y a que éstas son un factor importante en la respuesta inmune contra VD, la búsqueda de una relación entre estos dos factores se vuelve crítico para el análisis general de la respuesta inmune.

Por lo tanto, a través de citometría de flujo y ELISPOT, se caracterizó fenotípica y funcionalmente a las células secretoras de anticuerpos circulantes totales y específicas de virus dengue inducidas por la infección natural y se estableció la asociación con las manifestaciones clínicas en niños del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, Huila. Se encontró una masiva frecuencia de CSA durante la fase aguda de la enfermedad, siendo el isotipo de Ig predominante el G. Éstas células fueron dengue-específicas y no serotipo-específicas, y no se encontró una asociación entre su frecuencia y la severidad clínica de la enfermedad. Probablemente la calidad de los anticuerpos más que el número de células productoras de éstos son determinantes en la patogénesis de

la infección por dengue, lo cual puede ser crítico en el desarrollo de vacunas contra este virus.

Este trabajo está compuesto de doce capítulos, comenzando desde la recopilación de antecedentes bibliográficos que permitieron la descripción, formulación del problema y su justificación, seguidos de los objetivos y el marco teórico, éste último conteniendo las definiciones y conceptos que se utilizaron en nuestra investigación; además, se presenta la hipótesis planteada.

Más adelante se eligieron las variables del estudio y se procedió a la operacionalización de éstas, planteándose posteriormente el diseño metodológico, el cual describe el tipo y ubicación del estudio, la población, muestra y muestreo, y las técnicas y procedimientos de recolección, tabulación y análisis de datos que se utilizaron; finalmente se detallan las consideraciones éticas que se tuvieron en cuenta para realizar nuestro estudio.

En el capítulo nueve se presentan los resultados de la investigación, enfocándose en las características clínicas, paraclínicas y demográficas de los individuos, la caracterización de las CSA, y su asociación con la severidad de la enfermedad. Finalmente se presentan la discusión, conclusiones y recomendaciones que fueron fruto de la investigación, así como la bibliografía consultada y algunos anexos que se consideraron de vital importancia.

1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Paradójicamente, aunque son muchos los estudios que han analizado el papel de los Ac séricos en la infección por VD, no se conoce con exactitud el papel de la célula encargada de producirlos, la cual es inducida naturalmente por la infección. Para otros virus como el rotavirus y el virus de la influenza, el análisis de las CSA ha proporcionado invaluable información que permiten el mejor entendimiento de aspectos inmunes como los patrones de migración celular a través del análisis de la expresión de marcadores de tráfico y el análisis de la reactividad de dichas células^{1,2}. Además, para el caso del virus de la influenza, el análisis de la cinética de la respuesta de CSA específicas para el virus en adultos vacunados permitió usarlas como punto de partida para la generación de Ac monoclonales humanos virus específicos, muchos de ellos con una importante actividad neutralizante¹. Creemos que, como para el caso del virus de la influenza, el análisis de la respuesta de CSA puede brindar información que no puede ser obtenida con la clásica medición de los Ac séricos.

Datos previos muestran que en adultos vacunados la relación entre IgA/IgG específica del virus de la influenza era mucho más alta cuando se midieron estas Igs en los sobrenadantes de cultivo de CSA obtenidas 7 días después de la vacunación que en el plasma de los mismos individuos medidas en el día 28 (He XS, Sasaki S, Narváez CF *et al*, 2010, JIM, submitted). Esta conclusión podría proveer de nuevas alternativas para la medición de una respuesta inducida por patógenos mucosos, que es dominada en especial por la IgA, y que clásicamente ha usado la medición de esta Ig en suero, sin resultados completamente concluyentes (He XS, Sasaki S, Narváez CF *et al*, 2010, JIM, submitted). Además, la medición de la respuesta de CSA en la fase aguda de la infección podría ser inducida por el virus actualmente infectante, a diferencia de la medición de los Ac séricos cuya medición muestra la acumulación de la respuesta inmune humoral generada ante infecciones previas. Este hecho podría ser de gran importancia para un posible diagnóstico y tipificación del VD en fases tempranas de la infección.

El papel de los Ac séricos en la infección con VD ha sido estudiado previamente (3,4). Se sabe que en la primera infección hay una respuesta homotípicamente protectora y de larga vida, principalmente mediada por Ac dirigidos contra las proteínas E, prM y NS15. Incluso, esta respuesta es capaz de conferir alguna protección contra otros serotipos en un período cercano a la primera infección. Sin embargo, tiempo después de la infección primaria, los Ac generados durante ella empiezan a hacer reacción cruzada no protectora con otros serotipos⁶. Actualmente, no se conoce exactamente el papel protector de los Ac séricos contra VD, siendo demostrado más claramente para el serotipo 3⁷.

De igual manera, los niveles de Acs contra VD previos a la infección secundaria por otro serotipo se asocian con formas clínicas severas (6,8). Otros estudios in vitro, usando monocitos y células dendríticas, mostraron que la presencia de estos Ac aumenta la captación e infección viral de la célula y que este incremento en la infección es dependiente de la interacción entre el complejo Antígeno-Ac IgG y receptores para la fracción constante de las Igs (Fc receptors), expresados por estos tipos celulares (8) (ADA). Recientemente se demostró mediante un panel de Ac monoclonales aislados de LB de memoria de sujetos con infección secundaria por VD que la gran mayoría de éstos eran reactivos contra la proteína de preMembrana (una proteína altamente expresada sobre la superficie de partículas virales inmaduras sin capacidad infecciosa), pero no sólo no eran neutralizantes, sino que además potenciaron la infección celular por parte de partículas inmaduras sin capacidad infecciosa⁹.

En cuanto al papel de las CSA, se sabe que in vitro las células B son activadas y secretan Acs contra VD, siendo específicas en infecciones primarias, pero con reactividad cruzada en las secundarias⁽¹⁰⁾. Durante la infección aguda, se produce una rápida y potente respuesta de células B dominada por plasmablastos (principalmente entre los días 4 y 6 de fiebre), alcanzando cerca del 30% del total de linfocitos circulantes. En concordancia a estos hallazgos, se encontró que en infecciones secundarias cerca del 50% de los plasmablastos son cros-reactivos, con tan solo un 10% que son específicos contra el virus infectante; esto se reflejó también en la capacidad de neutralización de los anticuerpos, los cuales fueron altamente cros-reactivos contra los cuatro serotipos tanto en la fase aguda como 3 meses después de la infección¹¹. Además, cerca del 80% del total de células secretoras de IgG son dengue-específicas, correlacionándose con los niveles de anticuerpos circulantes virus específicos¹². Igualmente, la frecuencia de plasmablastos se asocia con la severidad de la enfermedad y el tipo de infección (primaria o secundaria), siendo del 50% en pacientes con infección secundaria y dengue severo y tan solo del 10% en individuos con primo-infección y formas leves de la enfermedad¹³.

En otro estudio donde se empleó el análisis de secuencias de Ig para la expresión de Ac recombinantes, se encontró que la mayoría (más del 85%) de los Ac producidos por los plasmablastos activados durante la fase aguda de la infección por dengue se unieron a la proteína E viral, confiriendo protección parcial serotipo-específica al evaluarse en un modelo animal, aunque manteniendo cros-reactividad ante serotipos previos⁽¹⁴⁾. Éstos hallazgos contrastan con los encontrados por Dejnirattisai y⁽²⁾ colaboradores en la respuesta B de memoria, donde los Acs⁽³⁾ producidos se⁽⁴⁾ unen a la proteína prM y a proteínas no estructurales, indicando que las partículas virales maduras (las cuales no contienen proteína prM) son las⁽⁵⁾ principales activadoras de linfocitos B durante la infección aguda¹⁴.

2. DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El dengue es una enfermedad viral, endemo-epidémica, producida por el virus dengue, y representa la arbovirosis con mayor impacto en morbilidad, mortalidad y gastos económicos a nivel mundial (Ministerio de la Protección Social, 2010). Debido a la presencia del vector (mosquito *Aedes aegypti*) y de la circulación de la mayoría de los serotipos en cada país, 2.500 millones de personas en el mundo que habitan en áreas tropicales y subtropicales están en riesgo de contraer la enfermedad. 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), siendo los países en vía de desarrollo los que aportan el mayor número de casos.

En el año 2011 se notificaron en las Américas 19.455 casos de dengue severo y 763 muertes por dengue, con una incidencia general de 201 casos por 100.000 habitantes y un índice de fatalidad de 0,07. Los países de Centroamérica y las islas del Caribe son los de mayores tasas de incidencia, y en Suramérica, Brasil es el más afectado (Pan American Health Organization, 2011).

En nuestro país el dengue constituye un serio problema de salud pública. La reemergencia e intensa transmisión del virus con una magnitud creciente hacen de ésta enfermedad un problema prioritario para nuestro sistema de salud. Los ciclos epidémicos cada vez son más cortos, han aumentado el número de casos de formas graves de la enfermedad, actualmente los cuatro serotipos circulan en el país, existe una infestación por *Aedes aegypti* en más del 90% del territorio nacional situado por debajo de los 2.200 m.s.n.m., y hay mayor urbanización de la población por problemas de violencia. Todos estos factores ponen en riesgo a cerca de 25 millones de personas que habitan en zonas urbanas con transmisión del dengue (Ministerio de la Protección Social, 2010).

En el lapso comprendido entre 1978 a 2008, se estima que ocurrieron anualmente un promedio de 25.177 casos, lo que corresponde a 119.8 casos por 100.000 habitantes en riesgo. Además, en los últimos 10 años la letalidad por dengue ha sobrepasado la cifra aceptada (2%). Entre enero y diciembre de 2011, se presentaron 13.326 casos de dengue, y 777 casos de dengue severo, además de 173 muertes probadas debido a la infección en el 2010 (Instituto Nacional de Salud, 2010 y 2011). Los departamentos que han tenido mayor transmisión de dengue en el país son Atlántico, Santander, Norte de Santander, Valle del Cauca, Antioquia, Tolima, Huila, Casanare y Cundinamarca, entre los que se distribuye más del 60% de los casos notificados anualmente. En el departamento del Huila se registraron durante el 2011 un total de 968 casos de dengue,

105 correspondiendo a dengue severo, representando el 7% del total de casos del país. Lo más preocupante de estas cifras es que la mortalidad por dengue es evitable en el 98% de los casos, influyendo factores como el diagnóstico temprano e identificación de los signos de alarma y manifestaciones graves, la instauración rápida de un tratamiento adecuado y el seguimiento y notificación de los eventos (Instituto Nacional de Salud, 2011).

Actualmente no existe un manejo farmacológico específico para el dengue. Sólo la corrección de líquidos y la prevención de la hipovolemia ha sido exitosa en la reducción de la mortalidad, pero el difícil acceso a los servicios de salud y el poco control vectorial siguen siendo la principal problemática en los países en desarrollo¹⁵.

No es suficiente lo que se sabe acerca de los mecanismos específicos con los que el sistema inmune actúa en la infección por VD. Dos factores inmunes se han asociado con la severidad de la enfermedad: i) Un rápido incremento de los niveles de citoquinas séricas. ii). La preexistencia de Ac con una especificidad diferente a la del virus infectante⁵. Los Ac juegan un importante papel dual en la respuesta inmune al VD. Por una lado, Ac homotípicos son capaces de neutralizar la infección. Por otro lado, Ac heterotípicos incrementan la captación e infección de células inmunes por el virus. En el 90% de casos de personas con enfermedad severa hay evidencia de la preexistencia de este tipo de Ac. La respuesta sérica de Ac ha sido previamente estudiada en niños con infección por VD⁴. Producto de ellos se sabe que la mayoría de Ac contra VD van dirigidos en especial contra la proteína de envoltura (proteína E), la de premembrana (Proteína preM) y contra la proteína no estructural NS1¹⁵. Aunque la respuesta sérica de Ac ha sido extensamente caracterizada, poco se sabe acerca de las células CSA circulantes que son inducidas naturalmente por la infección con VD¹³. A diferencia de la clásica medición de los Ac séricos, cuyo análisis incluye la acumulación de Ac generados por infecciones previas, la mayor parte de las CSA específica de VD que circulan en fase aguda de la infección podría ser inducida por el serotipo infectante y no sería afectada por la historia de previas infecciones.

Debido a que la función primaria de las CSA es la producción de inmunoglobulinas (Igs) y que los Ac séricos son un factor importante en la respuesta inmune anti VD, es necesaria la búsqueda de una relación entre estos dos factores, ya que es crítico para el análisis general de la respuesta inmune, no sólo en la infección natural sino también en el desarrollo de las nuevas vacunas contra el dengue.

De todo lo anterior surge la pregunta de investigación

¿Cuáles son las características fenotípicas y funcionales de las células secretoras de anticuerpos circulantes contra virus dengue y su asociación con las manifestaciones clínicas en niños del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, Huila?⁽⁶⁾

3. JUSTIFICACIÓN

El dengue es un evento de salud pública con una alta prevalencia en nuestra región y que posee un gran impacto económico y social. Aunque se han descubierto sus mecanismos inmunopatológicos¹⁵, es poco lo que se sabe acerca de las características fenotípicas y funcionales CSA, su relación con los niveles de anticuerpos ni su asociación con las formas clínicas de la enfermedad. Ya que podrían proporcionar importantes datos de la inmunidad humoral, como el isotipo de anticuerpos producidos o el nivel de protección de éstos, es crítico analizar la frecuencia, características fenotípicas y reactividad de las CSA generadas en la infección aguda por VD, puesto que estos datos no pueden ser obtenidos sólo a partir de la medición de los Ac solubles, además de que éstas características podrían correlacionarse con la severidad de la enfermedad.

La búsqueda de estos factores inmunes nos permitirá identificar tempranamente a los pacientes que sufrirán formas severas (analizando por ejemplo la frecuencia de CSA) y por tanto modificará directamente su pronóstico de vida. Por otro lado, éste estudio puede ayudar a el esclarecimiento de la inmunidad mediada por anticuerpos, lo que podría influenciar de manera notoria en el desarrollo y mejoramiento de vacunas contra el dengue, disminuyendo marcadamente las tasas de infección y mortalidad.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípica y funcionalmente a las células secretoras de anticuerpos circulantes totales y específicas de virus dengue inducidas por la infección natural y determinar su relación con las manifestaciones clínicas en niños del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, Huila.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Describir las características clínicas de los niños infectados naturalmente por virus dengue.

Determinar las características fenotípicas y funcionales de las células secretoras de anticuerpos circulantes totales y específicas de virus dengue durante las infecciones agudas primarias y secundarias en niños.

Establecer si la frecuencia de células secretoras de anticuerpos totales y específicas de virus dengue se asocia con la severidad clínica de la enfermedad.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 VIRUS DENGUE Y SU PATOGÉNESIS

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. La envoltura viral está compuesta de fosfolípidos y contiene las proteínas de membrana E y M. La proteína E tiene un papel crítico en la unión a receptores celulares y media la fusión con la membrana de la célula huésped. El ciclo viral inicia con la entrada del virus a la célula blanco.

Se ha demostrado que la endocitosis mediada por receptor es el principal mecanismo por el que el virus ingresa a la célula. Varios receptores han sido implicados en la entrada del virus, entre ellos el DC-SIGN parece ser uno de los más relevantes, aunque moléculas como proteínas de choque térmico, heparán sulfato, ICAM-3 y otras, son importantes para la entrada y esto depende del tipo celular analizado¹⁶⁻¹⁸. Luego de la entrada a la célula, el ARN viral es traducido a una poliproteína que es trasladada al retículo endoplásmico y aparato de Golgi, donde sufre modificaciones co y postraduccionales, originando 3 proteínas estructurales (C, M y E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5), varias de ellas con capacidad poli funcional. Inicialmente, el virus inmaduro está cubierto por heterodímeros de proteína preM-E, y la conformación molecular de cada proteína madura se facilita por el ambiente ácido endosomal y el clivaje por furina en la red trans-Golgi, siendo finalmente procesadas y ancladas a las partículas virales maduras¹⁹.

Posteriormente se ensambla el core viral formado por la proteína C, se empaqueta el ARN viral y se libera el virión, luego de la fusión con la membrana celular huésped. Como para la mayor parte de virus, la replicación no es completamente eficiente y se da lugar a la liberación de partículas virales infectantes inmaduras no infecciosas que también pueden ser inductoras de una respuesta de Ac²¹.

La patogenia del dengue está en estrecha relación con el cuadro clínico que se observa en ésta enfermedad. La infección tiene un espectro de manifestaciones clínicas que va desde formas asintomáticas, 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 clasificar 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)⁷.

El cuadro más leve es el dengue sin signos de alarma, abarcando manifestaciones como fiebre menor de siete días, mialgias, artralgias, dolor retroocular, cefalea, postración y exantemas. El dengue con signos de alarma incluye las manifestaciones mencionadas anteriormente, acompañadas de uno o más de los siguientes signos: dolor abdominal intenso y continuo, vómitos persistentes, hepatomegalia dolorosa mayor a 2 cm, hipotermia, oliguria, hipotensión postural, somnolencia y/o irritabilidad, acumulación de líquidos (ascitis, derrames pleurales, edema), manifestaciones hemorrágicas (como hematemesis o melenas) y caída abrupta de las plaquetas con aumento del hematocrito. Finalmente, el cuadro puede evolucionar a dengue grave, con extravasación severa de plasma, hemorragias graves o daño de órganos (miocarditis, encefalitis, hepatitis, colecistitis alitiásica, insuficiencia renal aguda y afección de otros órganos) (World Health Organization., 2009).

5.2 INMUNOPATOGENESIS DEL DENGUE

En la inmunopatogénesis del dengue actúan diversos factores, muchos de ellos no aclarados totalmente. La amplificación dependiente de anticuerpos es el mecanismo tal vez más importante involucrado en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. Éste se encuentra ligado a la presencia de anticuerpos circulantes producidos en infecciones previas o transferidos pasivamente de la madre al feto, los cuales no son neutralizantes en infecciones secundarias. El resultado es la infección de un mayor número de células, la producción elevada de proteínas de fase aguda, citocinas y factores quimiotácticos, formación de complejos inmunes y activación del complemento; todo esto crea un ambiente inflamatorio que finalmente lleva al aumento de la permeabilidad capilar, característica fundamental del dengue severo. Otros mecanismos implicados son la interacción entre la proteína NS1 y el heparán sulfato del glicocálix endotelial, que causa una alteración en la filtración del líquido vascular y la consecuente fuga plasmática²¹

Se tiene evidencia del papel de algunos factores inmunes mencionados anteriormente, implicados en la fisiopatología del dengue. Recientemente, fue mostrado que NS5 induce la secreción de IL-8, un conocido quimioatrayente de neutrófilos, en varias líneas celulares humanas y en cultivos primarios de células dendríticas²². Igualmente, el VD puede afectar células endoteliales e inducir la producción de mediadores inflamatorios²³. Factores inmunes también se han implicado en el incremento rápido y autolimitado de productos inflamatorios, siendo

uno de los mecanismos fisiopatológicos más aceptados que explican las manifestaciones graves presentes en pacientes con dengue³.

5.3 PAPEL DE LOS ANTICUERPOS Y CSA EN LA INFECCIÓN POR VD

El papel de los Ac séricos en dengue ha sido previamente estudiado^{3, 4}, y se sabe que juegan un papel dual en la respuesta inmune al VD. Producto de ello se sabe que la primo infección genera una respuesta de Ac que es homotípicamente protectora y de larga vida. Esta protección es conferida por Ac dirigidos especialmente contra las proteínas E,preM y NS1⁵. Incluso, esta respuesta es capaz de conferir alguna protección heteróloga en un período próximo a la primo infección. Sin embargo, tiempo después, los Ac generados durante la infección primaria comienzan a hacer reacción cruzada no protectora con otros serotipos⁶.

Actualmente, es controversial el papel protector de los Ac neutralizantes in vivo presentes antes de la infección en la disminución de la viremia o intensidad de las manifestaciones clínicas, y un papel protector de estos ha sido demostrado más claramente para el serotipo 3⁷. Por otro lado, la existencia de Ac, generados previamente contra un serotipo, se asocia con la aparición de formas clínicas severas durante una segunda infección por un serotipo diferente^{6,8}. Posteriores estudios in vitro, usando monocitos y células dendríticas, determinaron que la existencia de estos Ac incrementa la captación e infección viral de la célula y que este incremento en la infección es dependiente de la interacción entre el complejo Antígeno-Ac IgG y receptores para la fracción constante de las Igs, expresados especialmente sobre la superficie de estos tipos celulares⁸. Recientemente fue probada la reactividad de un panel de Ac monoclonales aislados de LB de memoria de sujetos con una infección secundaria por VD.

La gran mayoría de estos Ac mostró ser reactivo contra la proteína precursora de membrana (preM) (una proteína altamente expresada sobre la superficie de partículas virales inmaduras sin capacidad infecciosa) seguido de la proteína E. Ac dirigidos contra la proteína E neutralizaron la infección, mientras que los Ac dirigidos contra la proteína preM, no sólo no eran neutralizantes, sino que potenciaron la entrada de partículas virales inmaduras originalmente sin capacidad infecciosa al interior, facilitando de esta forma la infección celular⁹. Igualmente, el aumento de la infección viral mediada por la ADA es uno de los factores detonantes de la producción de gran cantidad de mediadores solubles inflamatorios como TNF α , IL-6, Factor Activador plaquetario, entre muchos otros.

5.4 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE LAS CSA

Luego de un reto antigénico, las células B se activan, proliferan y se diferencian en células productoras de anticuerpos, células plasmáticas o células B de memoria, siendo las dos primeras las responsables de los elevados niveles de anticuerpos durante las fases agudas de las infecciones, y en menor medida, de los niveles basales (en conjunto con las células B de memoria). Desde el punto de vista fenotípico las células productoras de anticuerpos expresan marcadores de superficie como CD19, CD20, CD27 y CD38, diferenciándose de otros subtipos celulares como las células plasmáticas por la menor expresión de CD138. Igualmente, hay una intensa expresión de la proteína Ki-67, marcadora de división celular^{24,8}

Por otro lado, desde el punto de vista funcional, se ha encontrado que el pico de CSA se presenta durante los días 6 y 7 luego del estimulación antigénica (por ejemplo en sujetos post-vacunados contra influenza o tétanos, y en infecciones por virus sincitial respiratorio y virus dengue), cayendo a niveles casi indetectables luego de 2 a 3 semanas después del reto. Probablemente, en infecciones primarias el origen de las CSA sean células B derivadas de mucosas o tejidos linfoides secundarios, mientras que en infecciones secundarias, las células B de memoria serían las precursoras. Finalmente, se sabe que durante infecciones primarias el isotipo predominante de los Acs producidos por las CSA es el A y M, y en infecciones secundarias es el G²⁴.

5.5 PAPEL DE LAS CSA EN EL DENGUE

Se ha estudiado la actividad de las CSA en la infección con VD¹⁰. In vitro, las células B son activadas y secretan Acs, tanto en infecciones primarias como en secundarias. Durante la primoinfección se encuentran mayores frecuencias de células virus-específicas que confieren inmunidad protectora, y ésta se mantiene durante un periodo de 6 meses. Sin embargo, luego de una infección secundaria, hay un aumento en la reactividad cruzada de éstas células: en cerca del 50% de los plasmablastos son cros-reactivos, con tan solo un 10% que son específicos contra el virus infectante; esto se refleja también en la capacidad de neutralización de los anticuerpos, siendo altamente cros-reactivos contra los cuatro serotipos tanto en la fase aguda como 3 meses después de la infección¹¹. Finalmente, sólo un estudio ha demostrado que la frecuencia de plasmablastos se asocia con la severidad de la enfermedad y el tipo de infección (primaria o secundaria), siendo del 50% en pacientes con infección secundaria y dengue severo y tan solo del 10% en individuos con primo-infección y formas leves de la enfermedad¹³.

6. HIPÓTESIS

El número de CSA totales y específicas en niños infectados con VD será mayor que en niños sanos, las CSA totales y específicas de VD en fase aguda serán de isotipo IgM mientras que en la de convalecencia la IgG será predominante, aunque esta relación será diferente entre niños con una primera y una segunda infección.

Además habrá una relación positiva entre la frecuencia de CSA circulantes totales y específicas para VD y la severidad clínica.

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

		- 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. - Extravasación severa de plasma, Hemorragias severas, miocarditis, encefalitis, hepatitis (transaminasas>1.000), colecistitis alitiásica, insuficiencia renal aguda y afección de otros órganos.		
		Dengue sin signos de		

Severidad Clínica	Grado de compromiso clínico de los pacientes infectados por VD.	alarma Dengue con signos de alarma Dengue grave	Si/No	Nominal
-------------------	---	---	-------	---------

8. DISEÑO METODOLÓGICO

8.1 TIPO DE ESTUDIO

Este es un estudio observacional (ya que no se manipularon las variables), longitudinal (que se desarrolló a lo largo de un periodo de tiempo definido), prospectivo (se tomaron casos que ingresaron en el periodo especificado [enero a septiembre de 2013], con análisis de casos y controles (los sujetos fueron seleccionados en función de que tuvieran [casos] o no [controles] la enfermedad).

8.2 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Infección e Inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana, en conjunto con el servicio de pediatría del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, Huila, centro de tercer nivel de atención y referencia para la zona sur de Colombia.

8.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

8.3.1 Población. Muestras de sangre de niños entre 1 y 14 años con diagnóstico clínico de dengue y una evolución de 3 a 7 días desde el inicio de la fiebre que acudieron al Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, Huila en el periodo de enero a septiembre de 2013 (100 pacientes).

8.3.2 Muestra y muestreo. Se seleccionó una muestra no representativa usando los criterios clínicos revisados de la OMS 2010:

- Caso probable de dengue: Todo paciente que presente una enfermedad febril aguda de hasta siete días, de origen no aparente, acompañada de 2 o más de los siguientes síntomas: cefalea, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias, postración, exantema, y que además tenga antecedente de desplazamiento (hasta 15 días antes del inicio de síntomas) o que resida en un área endémica de dengue.

- Caso probable de Dengue con Signos de alarma: Paciente que cumple con la anterior definición y además presenta cualquiera de los siguientes signos de alarma: Dolor abdominal intenso y continuo, vómitos persistentes, diarrea, somnolencia y/o irritabilidad, hipotensión postural, hepatomegalia dolorosa >2cms, disminución de la diuresis, caída de la temperatura, hemorragias en mucosas, caída abrupta de plaquetas (<100.000) asociada a hemoconcentración.
- Caso probable de Dengue grave: Cumple con cualquiera de las manifestaciones graves de dengue que se mencionan a continuación: 1) Extravasación severa de plasma que conduce a síndrome de choque por dengue o acumulo de líquidos con dificultad respiratoria. 2) Hemorragias severas 3) Daño grave de órganos como miocarditis, encefalitis, hepatitis (transaminasas >1.000), colecistitis alitiásica, insuficiencia renal aguda y afección de otros órganos.
- Caso confirmado de dengue: Caso probable de dengue o dengue grave confirmado por alguno de los criterios de laboratorio para el diagnóstico (pruebas serológicas IgM dengue o pruebas virológicas como aislamiento viral o RT-PCR).
- Los niños fueron distribuidos en los siguientes grupos: 1) niños sanos, 2) niños con dengue sin signos de alarma, 3) niños con dengue y signos de alarma y 4) niños con dengue severo. Cada grupo contó con 25 individuos. Los niños tuvieron una edad de entre 1 a 14 años y una evolución de 3 a 7 días desde el inicio de la fiebre (fase aguda).

8.4 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se utilizaron técnicas de investigación de campo y laboratorio, realizando mediciones biofisiológicas in vitro de muestras de sangre de los individuos. Además, se emplearon técnicas de investigación documental, mediante la revisión de la historia clínica de cada individuo.

8.5 PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Previo consentimiento informado firmado por los acudientes, a cada niño se le tomaron dos muestras en la fase aguda de la enfermedad (3 a 4 días después del inicio de los síntomas, muestra aguda temprana y 5 a 7 días después, muestra

aguda tardía) y una muestra 14 días después del inicio de los síntomas. Dos a cuatro mililitros (ml) de sangre venosa total fueron recolectados 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 Igs totales y específicas plasmáticas por ELISA. El otro vial se usó para la determinación del serotipo infectante de VD mediante RT-PCR. Es de notar que la toma de dos muestras en la fase aguda de la infección no aumentó las molestias para el niño, ya que para el caso de dengue, un control de cuadro hemático y plaquetas debe ser llevado a cabo diariamente.

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 por citometría de flujo para detección de CSA circulantes.

Diagnóstico de infección por VD y diferencia entre infección primaria o secundaria:

- El diagnóstico de infección por VD y la clasificación de la enfermedad se hizo usando los criterios clínicos revisados de la OMS (World Health Organization, 2009). El diagnóstico clínico 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 hizo basado en la detección por ELISA de Ac de isotipo IgM e isotipo IgG específicos para VD presentes en el plasma de los niños. Para esto usamos empaques comerciales (Panbio) y seguimos las recomendaciones del fabricante. Estos productos han sido extensamente usados para el diagnóstico de VD^{9,25, 26}

- Fenotipo de los subtipos de células B: Para la cuantificación de células productoras de anticuerpos, las células mononucleares de sangre periférica obtenidas fueron lavadas dos veces con FACS buffer (PBS 1X, BSA 1%, azida de sodio 0.1%) y marcadas con anti-CD19-APC-Cy7 (clon SJ25Cl; BD), anti-CD20-PE-Cy7 (clon L27, BD), anti-CD27-PE (clon MT271; BD), anti-CD38-PerCP-Cy5.5 (clon HIT2; BD), anti-IgD conjugada con fluoresceína isotiocianato (FITC; clon IA6-2; BD), y anti-IgM-APC de cabra (Jackson ImmunoResearch), e incubadas a 4°C por 30 minutos. Las células luego fueron lavadas, fijadas y analizadas por citometría de flujo.

- **Detección de CSA Totales y específicas:** La detección y cuantificación de las CSA circulantes totales y específicas se realizó por ELISPOT de dos colores como ha sido previamente reportado para otros virus^{2, 27}. Placas de 96 pozos (Immobilon P membrane, MAIPN4510, Milipore), fueron incubadas toda la noche con Anti IgA/IgG/IgM humana o con una mezcla de la proteína E recombinante expresado en un sistema eucariótico de cada uno de los 4 serotipos de VD (obtenida de Hawaii Biotec, Hawaii, HB Greenberg y AL Rothman). Pozos cubiertos con PBS sirvieron como control negativo. Antes de ser usadas, las placas se bloquearon durante 2 horas con medio completo (RPMI, SBF 10%, y antibióticos). CMSP se resuspendieron en medio que contenía Anti IgM/IgG humanas conjugados a peroxidasa o fosfatasa alcalina respectivamente, y fueron colocados en cada uno de los pozos usando diluciones seriadas. Después de 4 horas de incubación a 37°C, CO₂ 5%, las placas fueron lavadas y reveladas con AEC sustrato para peroxidasa y Blue substrate kit para fosfatasa alcalina (ambos de Vector).

El número de "spots", fue determinado por 2 observadores independientes usando un microscopio de disección. Para comparar la respuesta obtenida con mezcla de la proteína E recombinante de los 4 serotipos, en 5 experimentos se comparó la respuesta de CSA específicas para VD obtenida con placas cubiertas con la mezcla de los 4 serotipos completos. Nosotros usamos virus vivo completo que amplificamos en nuestro laboratorio. Cuando fue necesario, este virus se concentró por ultra centrifugación (en colaboración los Drs. Manuel A. Franco, y Juanita Angel, Pontificia Universidad Javeriana). Para determinar la frecuencia de CSA del isotipo IgA total y específica, pozos extra fueron habilitados. A diferencia de lo anterior, las células fueron incubadas con anti IgA humana (Sigma-Aldrich) acoplado a peroxidasa, para finalmente seguir el procedimiento anteriormente descrito.

En 10 experimentos que incluyeron niños con dengue con signos de alarma-severo, para determinar la reactividad homotípica y heterotípica de las CSA, la placa fue cubierta individualmente con cada una de las proteínas E de los 4 serotipos. La frecuencia de CSA reactivas para cada una de las proteínas fue evaluada y comparada con el resultado del serotipo actualmente infectante obtenido con la RT-PCR. Como control de reactividad se usó virus vacunal de la fiebre amarilla.

- **Seguimiento clínico y paraclínico de los niños incluidos:** Para la recolección de datos se emplearon las historias clínicas de los pacientes. Todo el diagnóstico, seguimiento, manejo clínico y clasificación de la severidad de la enfermedad causada por la infección con virus dengue se hizo de acuerdo a los criterios y

recomendaciones dadas por la OMS
(<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue>).

Durante toda la hospitalización se llevó 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 entre otros). Niños con diagnóstico de dengue sin signos de alarma fueron captados y manejados en el primer nivel de atención en la zona urbana de Neiva. A estos niños se les realizó un seguimiento clínico y paraclínico diario en busca de signos de alarma. A niños hospitalizados que presentaron formas severas de la enfermedad, se les llevó un formato escrito previamente diseñado y reportado por nuestro grupo en previas publicaciones^{24,28,29}, el cual contiene parámetros clínicos y paraclínicos. Este formato fue diligenciado diariamente, durante todo el tiempo de la hospitalización del niño, por miembros del Departamento de Pediatría de la Universidad Surcolombiana y el Hospital Universitario de Neiva. De igual manera, todos los datos fueron registrados en el instrumento de recolección de datos (ver anexos).

8.6 PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó una base de datos electrónica en el programa Microsoft Excel 2010, que contenía las variables del estudio organizadas en tablas y gráficas. Los resultados fueron analizados con pruebas estadísticas no paramétricas y mostrados como medianas y rangos. El análisis estadístico se hizo con los software GraphPadPrism 5.0 y SPSS versión 18.01 (Chicago, IL).(10) Cuando dos grupos independientes fueron analizados se aplicó la prueba de Mann-Whitney. Para determinar diferencias estadísticas entre más de dos grupos, la prueba de Kruskal-Wallis se eligió. Si la P de Kruskal-Wallis es <0.05 , se usó la prueba de comparación múltiple de Dunn, según cada caso. El grado de correlación entre variables fue evaluada por la prueba de Spearman. Para todos los casos se tomó como significativo un valor de $P < 0.05$.

8.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta investigación se realizó considerando las disposiciones de la resolución 8430 de 1993, la cual establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Según el artículo 11 de la misma ésta investigación fue clasificada como de riesgo mínimo. Todos los voluntarios y/o sus acudientes firmaron el consentimiento informado. Se mantuvo la confidencialidad y anonimato de cada individuo.

Este trabajo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de salud de la Universidad Surcolombiana (Acta Número 10 del 12 de Octubre de 2010).

9. RESULTADOS

9.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, PARACLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS

En total fueron ingresados en el estudio 94 pacientes, siendo 25 clasificados como dengue sin signos de alarma (DSSA), 49 como dengue con signos de alarma (DCSA) y 20 como dengue grave (DG). Las características demográficas, clínicas y paraclínicas del segundo día de hospitalización son mostradas en la tabla 1. De notar que hubo una diferencia estadísticamente significativa en los valores de plaquetas, siendo menores en el grupo de DG en comparación con DCSA y DSSA ($p=0.0001$), y de transaminasas, con una mayor elevación en los pacientes con DG ($p=0.0001$).

Tabla 1. Caracterización clínica, paraclínica y demográfica.

Características*	DSSA n=24	DCSA n=48	DG n=20	P
Hombres (%)	13 (52)	29 (59)	14 (70)	
Edad en meses	30 (6-168)	58 (4-168)	31 (4-139)	
Días de enfermedad	4 (2-5)	4 (2-6)	4 (3-6)	
Infección primaria (%)	17 (70)	23 (47)	10 (50)	
Infección secundaria (%)	7 (30)	25 (53)	10 (50)	
Leucocitos	5100	7650	8900	0.0023**
Hematocrito	36 (28-41)	35.9 (26-51)	32.9 (22-46)	0.0011**
Plaquetas	154000	70500	38000	0.0001**
ALT	NA	92	210	0.0001***
AST	NA	40.7	76	0.0096***

*Medianas (Rangos)

**Prueba de Kruskal-Wallis

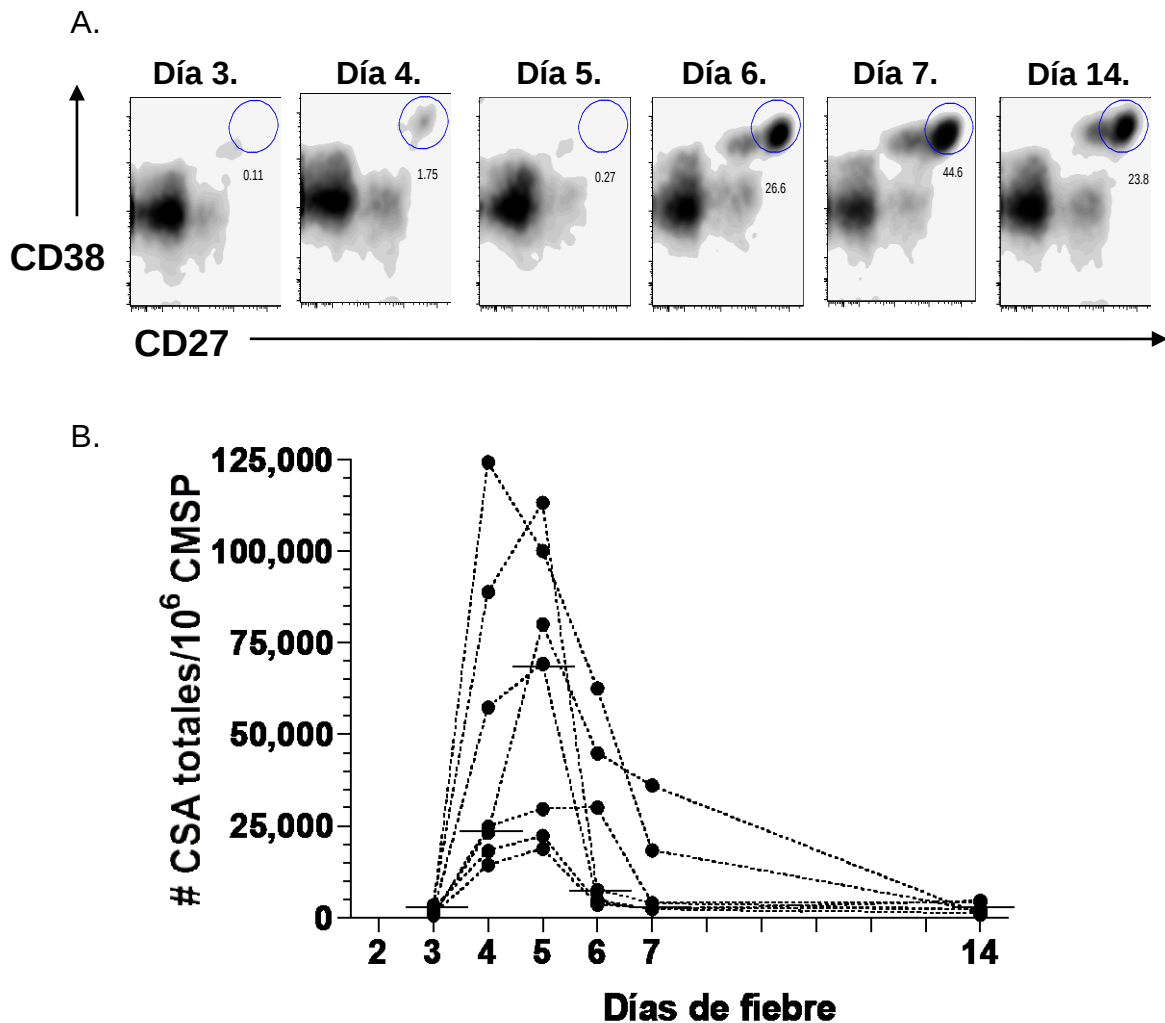
***Prueba de Mann Whitney

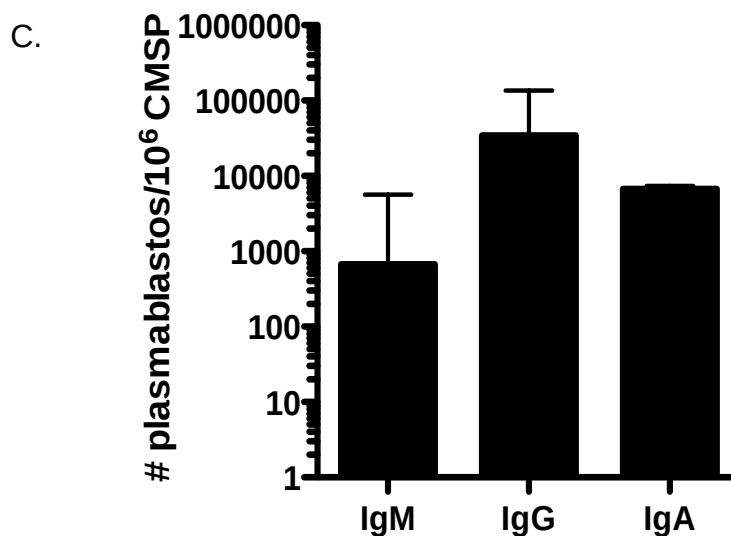
ALT: Alanino-amino transferasa; AST: Aspartato-amino transferasa

9.2 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE LAS CSA

9.2.1 Cinética de las CSA inducidas por VD e isotipo predominante. A través de citometría de flujo y ELISPOT se determinó la frecuencia de CSA totales durante la fase aguda y de convalecencia de la infección por dengue. A partir del 4 día de la enfermedad hubo un masivo incremento en la frecuencia de CSA, alcanzando valores mayores al 50% del total de linfocitos B, y volviendo a niveles cercanos al 0% en la fase de convalecencia (día 14) (figura 1a). Igualmente, el pico de CSA se presentó entre los días 5 y 7 de enfermedad (figura 1b). Por otro lado, el isotipo de CSA dominante fue el G (figura 2).

Figura 1. Cinética de las CSA totales en la infección por VD e isotipo predominante.

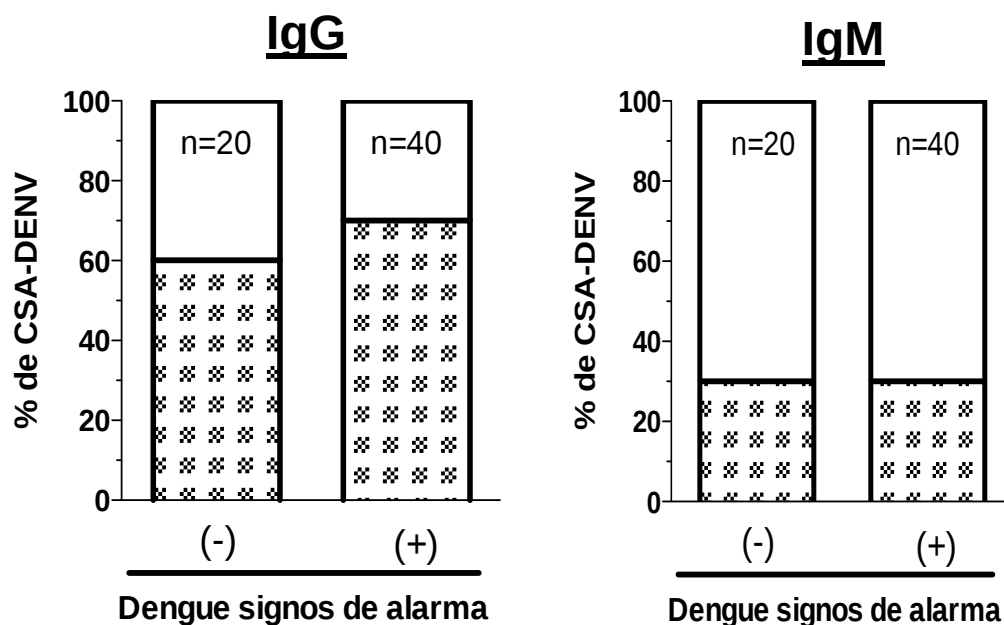




Cinética de las CSA totales durante las fases aguda y de convalecencia de la infección por VD. (A) Análisis de citometría de flujo que muestra la frecuencia de CSA en un paciente durante los días 3 a 7 (fase aguda) y 14 (fase de convalecencia) de la enfermedad. Las CSA son definidas como CD19⁺ CD20^{low} CD38^{high} CD27^{high} (mostradas dentro del círculo). Todos los análisis se realizaron sobre la población CD19⁺ CD20^{low}. El número indica el porcentaje de CSA dentro del total de linfocitos B. (B) Cinética de las CSA totales de pacientes con dengue determinada a través de ELISPOT, en muestras tomadas durante los días 3 a 7 y día 14. (C). Frecuencia de plasmablastos de isotipo M, G y A. El isotipo predominante fue el G ($p < 0.001$).

9.2.2 Frecuencia de las CSA específicas para VD. Comparando el porcentaje de CSA totales y dengue-específicas, encontramos que para el isotipo G la mayoría de la respuesta (hasta un 70%) es virus-específica; sin embargo, esto no fue similar para el isotipo M, ya que solo un 30% de las CSA inducidas fueron dengue-específicas (Figura 2).

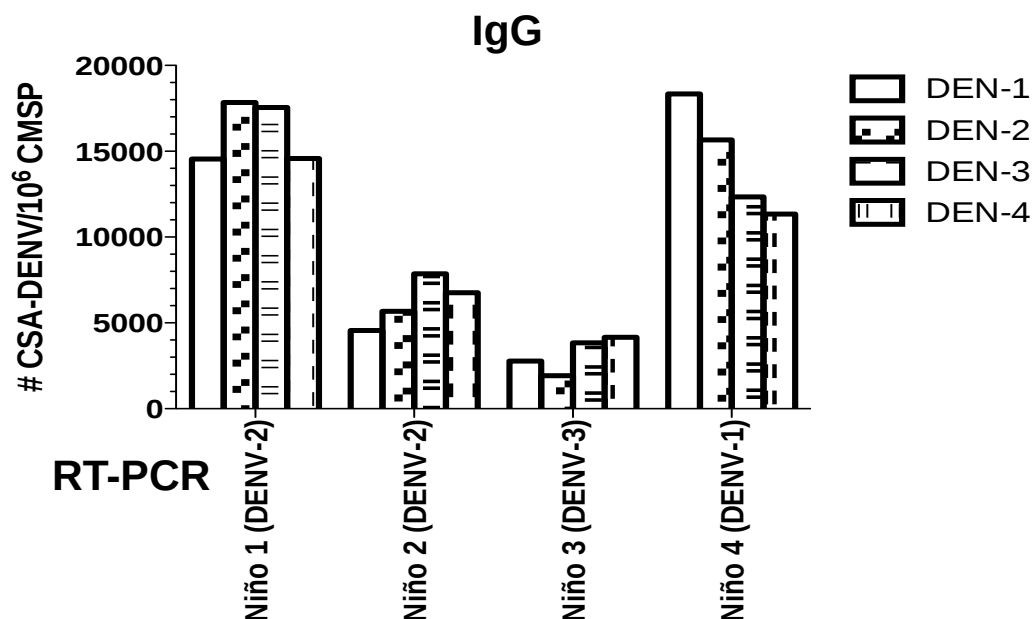
Figura 2. Frecuencia de CSA específicas para VD.



Porcentaje de CSA específicas para VD en relación al total de CSA durante la fase aguda de la enfermedad, tanto de isotipo M como G. La barra completa representa el total de CSA, mientras que la barra sombreada indica el porcentaje de CSA dengue-específicas.

Igualmente se determinó la reactividad de las CSA a los cuatro serotipos virales a través de ELISPOT, y se comparó con la reactividad hacia el virus infectante actual, aislado por RT-PCR (Figura 3). En general se observó que las CSA tuvieron reactividad cruzada a dos o más serotipos de dengue, siendo en algunos casos mayor el número de células específicas para serotipos diferentes al infectante.

Figura 3. Serotipo-especificidad de las CSA.

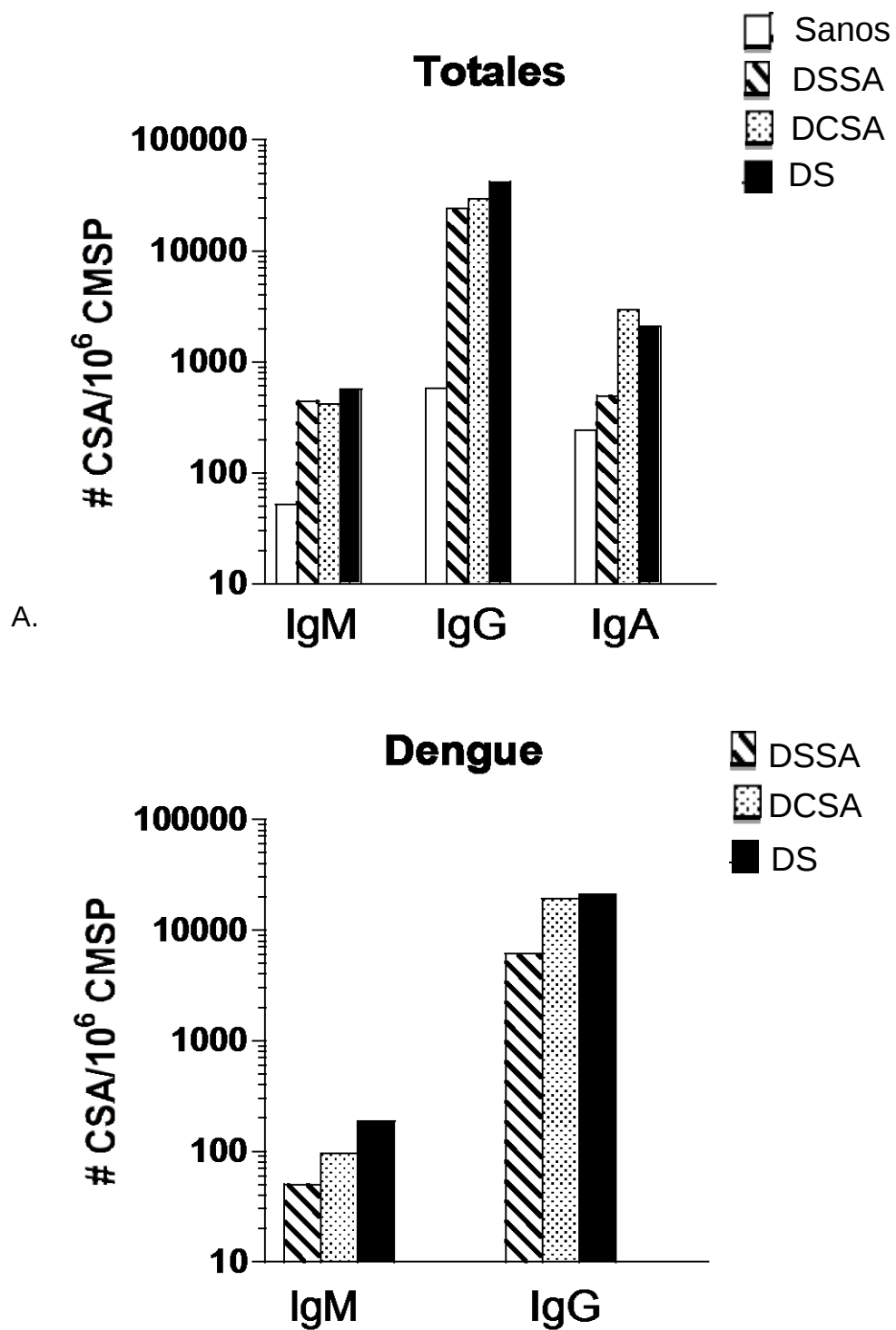


Frecuencia de CSA de isotipo IgG reactivas ante los cuatro serotipos de VD. El número de CSA específicas para cada serotipo se comparó con la reactividad hacia el virus infectante actual aislado por RT-PCR en ocho pacientes (5 con infección secundaria y 3 con infección primaria) para analizar la reactividad cruzada.

9.3 CSA Y SU ASOCIACIÓN CON LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD

Finalmente, se estableció si la frecuencia de CSA tenía alguna relación con la severidad clínica de los pacientes. Para ello, se compararon el número de CSA totales y específicas para VD productoras de IgM, IgG e IgA en los cuatro grupos de estudio. Como se observa en la figura 4, no hubo una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de CSA entre ninguno de los grupos evaluados, tanto totales (figura 4A) como específicas para VD (figura 4B), y entre ninguno de los isotipos.

Figura 4. CSA y su asociación con la severidad.



Se comparó la frecuencia de CSA totales (A) y dengue-específicas (B) con la severidad clínica de los pacientes, analizando los isotipos M, G y A. No se

encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio, tanto para CSA totales como específicas, y entre ninguno de los isotipos ($p>0.05$).

10. DISCUSIÓN

En nuestro estudio se encontró que durante la infección natural por virus dengue hay una fuerte respuesta de CSA de predominio IgG, siendo la mayoría de éstas virus-específicas pero con reactividad cruzada a los cuatro serotipos; además, no hubo una asociación entre la frecuencia de CSA y la severidad clínica.

En la fase aguda de la enfermedad hubo un incremento masivo de las CSA, constituyendo en algunos casos la mitad de la población de linfocitos B circulantes, y retornando a niveles casi indetectables en la fase de convalecencia. Esto coincide con reportes previos donde se observaron niveles de CSA incluso del 80% del total de células B, y hasta el 30% del total de linfocitos circulantes¹². De igual manera, conforme transcurrieron los días de la enfermedad el número de CSA se fue incrementando, y en algunos casos hubo elevaciones mayores al 20% entre un día y otro; esto fue más notoriamente visible entre los días 5-6 y 6-7, días en los que se alcanzaron los picos de CSA. Estos hallazgos son similares a los encontrados en pacientes adultos y niños de Brasil, Singapur, Nicaragua y Tailandia, donde también se observaron los picos de CSA durante estos días^{11,13,30}.

La mayoría de los pacientes en nuestro estudio presentaban infección secundaria. Se sabe que en este tipo de infección el isotipo predominante de las CSA es el G¹², indicando una activación de células B de memoria conmutada, en este caso específicas para el dengue³⁰. Esto se ve reflejado en nuestros hallazgos, donde el isotipo predominante de CSA fue el G y dos tercios de ellas fueron dengue-específicas. Adicionalmente, en concordancia con estudios previos^{11,13}, las CSA tuvieron reactividad cruzada a dos o más serotipos de dengue, siendo en algunos casos mayor el número de células específicas para serotipos diferentes al infectante.

Esto fue evidenciado principalmente en infecciones secundarias, en donde se ha visto que las CSA presentan reactividad heterotípica y promueven la amplificación dependiente de anticuerpos, mientras que en infecciones primarias la respuesta es homotípica y protectora¹⁰. Por otro lado, Xu y colaboradores analizaron la especificidad de los anticuerpos producidos por las CSA, encontrando que la proteína E es el antígeno inmunodominante en la respuesta humoral contra el dengue¹⁴. Este hallazgo soporta nuestros resultados, ya que usando proteína E recombinante de virus dengue como antígeno en nuestros ensayos, observamos la misma reactividad cruzada a la que se obtiene al utilizar virus completo (utilizado en otros estudios¹¹), lo que confirma la importancia de esta proteína como determinante antigénico en la respuesta humoral contra el dengue¹¹.

Finalmente, no encontramos una asociación entre las frecuencias de CSA, tanto totales como dengue-específicas, y la severidad clínica de los pacientes. Hasta el momento sólo un estudio ha encontrado una correlación positiva entre ambas¹³, pero podría deberse a que los grupos de pacientes en éste estudio eran muy heterogéneos, siendo el de severidad conformado mayormente por adultos, mientras que el de dengue no complicado principalmente por niños; la respuesta podría por lo tanto variar según la edad.

Además, la diferencia entre ambos grupos también puede deberse al tipo de infección, ya que la mayoría de los individuos con enfermedad severa presentaban infección secundaria, a diferencia de los no severos, que cursaban con primoinfecciones. Por otro lado, la severidad de la enfermedad podría estar determinada por la calidad de los anticuerpos más que por el número de células productoras de éstos: si hay mayor reactividad cruzada (lo cual se evidenció en nuestro estudio) y menor actividad neutralizante de los anticuerpos, principalmente en las infecciones secundarias, habrá una mayor severidad (a través de la amplificación dependiente de anticuerpos), y el número de CSA no jugará un papel tan importante en éste caso.

En resumen, nuestro estudio evidencia la magnitud de la respuesta de CSA ante la infección por virus dengue, siendo la IgG el isotipo dominante. Además, estas células son dengue-específicas, pero presentan reactividad cruzada a los otros serotipos virales. Finalmente, no se demostró una asociación entre la frecuencia de CSA y la severidad clínica.

11. CONCLUSIONES

Durante la fase aguda de la infección por dengue hubo un incremento masivo de las CSA, retornando a niveles casi indetectables en la fase de convalecencia.

El isotipo de anticuerpos predominante de las CSA fue el G, seguido del A y el M.

Las CSA tuvieron reactividad cruzada a dos o más serotipos de dengue.

No hubo una asociación entre la frecuencia de CSA y la severidad de la enfermedad, probablemente debido a que ésta última es determinada por la calidad de los anticuerpos más que por el número de células productoras de éstos.

12. RECOMENDACIONES

Continuar con el estudio de ésta enfermedad, el registro continuo de los datos clínicos y paraclínicos de todos los pacientes y el fortalecimiento del departamento de infectología pediátrica, especialmente la unidad para el tratamiento de los niños con dengue.

Realizar estudios que analicen las diferencias en las características de CSA de adultos y niños, ya que podría variar la magnitud y calidad de la respuesta inmunológica entre ambos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, *et al.* Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*. 2008;453(7195):667-71.
2. Gonzalez AM, Jaimes MC, Cajiao I, Rojas OL, Cohen J, Pothier P, *et al.* Rotavirus-specific B cells induced by recent infection in adults and children predominantly express the intestinal homing receptor alpha4beta7. *Virology*. 2003;305(1):93-105.
3. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(3):480-96.
4. Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007;370(9599):1644-52.
5. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Current opinion in infectious diseases*. 2006;19(5):429-36.
6. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1952;1(1):30-50.
7. Endy TP, Nisalak A, Chunsuttitwat S, Vaughn DW, Green S, Ennis FA, *et al.* 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. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(6):990-1000.
8. Halstead SB, Porterfield JS, O'Rourke EJ. Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1980;29(4):638-42.
9. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, *et al.* Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*. 2010;328(5979):745-8.

10. Mathew A, West K, Kalayanarooj S, Gibbons RV, Srikiatkachorn A, Green S, et al. B-cell responses during primary and secondary dengue virus infections in humans. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(10):1514-22.
11. Zompi S, Montoya M, Pohl MO, Balmaseda A, Harris E. Dominant cross-reactive B cell response during secondary acute dengue virus infection in humans. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(3):e1568.
12. Wrammert J, Onlamoon N, Akondy RS, Perng GC, Polsrila K, Chandele A, et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. *Journal of virology*. 2012;86(6):2911-8.
13. Garcia-Bates TM, Cordeiro MT, Nascimento EJ, Smith AP, Soares de Melo KM, McBurney SP, et al. Association between magnitude of the virus-specific plasmablast response and disease severity in dengue patients. *Journal of immunology*. 2013;190(1):80-7.
14. Xu M, Hadinoto V, Appanna R, Joensson K, Toh YX, Balakrishnan T, et al. Plasmablasts generated during repeated dengue infection are virus glycoprotein-specific and bind to multiple virus serotypes. *Journal of immunology*. 2012;189(12):5877-85.
15. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(7):946-51.
16. Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *Journal of virology*. 2005;79(8):4557-67.
17. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2010;67(16):2773-86.
18. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*. 2006;80(23):11418-31.

19. Murphy BR, Whitehead SS. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annual review of immunology*. 2011;29:587-619.
20. Schmidt AC. Response to dengue fever--the good, the bad, and the ugly? *The New England journal of medicine*. 2010;363(5):484-7.
21. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. *The New England journal of medicine*. 2012;366(15):1423-32.
22. Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *Journal of virology*. 2005;79(17):11053-61.
23. Warke RV, Xhaja K, Martin KJ, Fournier MF, Shaw SK, Brizuela N, et al. Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. *Journal of virology*. 2003;77(21):11822-32.
24. Fink K. Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Frontiers in immunology*. 2012;3:78.
25. Salgado DM, Rodriguez JA, Garzon M, Cifuentes G, Ibarra M, Vega MR, et al. [Clinical and epidemiological characterisation of dengue haemorrhagic fever in Neiva, Colombia, 2004]. *Revista de salud publica*. 2007;9(1):53-63.
26. Salgado DM, Panqueba CA, Vega MR, Garzón M, Castro D, Rodríguez JA. Mortalidad por dengue hemorrágico en niños en Colombia: más allá del choque. *Infectio*. 2008;12:21-7.
27. Sasaki S, Jaimes MC, Holmes TH, Dekker CL, Mahmood K, Kemble GW, et al. Comparison of the influenza virus-specific effector and memory B-cell responses to immunization of children and adults with live attenuated or inactivated influenza virus vaccines. *Journal of virology*. 2007;81(1):215-28.
28. Salgado DM, Panqueba CA, Castro D, M RV, Rodriguez JA. [Myocarditis in children affected by dengue hemorrhagic fever in a teaching hospital in Colombia]. *Revista de salud publica*. 2009;11(4):591-600.

29. Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, *et al.* Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *The Pediatric infectious disease journal*. 2010;29(3):238-42.

30. Balakrishnan T, Bela-Ong DB, Toh YX, Flamand M, Devi S, Koh MB, *et al.* Dengue virus activates polyreactive, natural IgG B cells after primary and secondary infection. *PloS one*. 2011;6(12):e29430.

ANEXOS

Anexo A. Instrumento de recolección de datos.

CÓDIGO INDIVIDUO	GÉNERO	EDAD	SEVERIDAD CLÍNICA				FRECUENCIA DE PLASMABLASTOS (%)	ISOTIPO DE PLASMABLASTOS (%)		DENGUE-ESPECIFICIDAD	
			SANOS	DENGUE SIN SIGNOS DE ALARMA	DENGUE CON SIGNOS DE ALARMA	DENGUE GRAVE		IgG	IgM	SI	NO

Anexo B. Formato de consentimiento informado.

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS SECRETORAS DE
ANTICUERPOS CIRCULANTES EN INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE Y SU
RELACIÓN CON LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD

Su hijo está invitado a participar en este estudio de investigación debido a los problemas de salud que él está sintiendo actualmente, los cuales indican que puede estar afectado de Dengue y esta puede afectar a muchos sistemas como son : el sistema nervioso central, hepático, renal, hematológico. El virus del dengue es endémico en Colombia, afectando a muchas personas, algunas de ellas se ponen aún más enfermas y desarrollan complicaciones graves por compromiso de algunos órganos como el corazón, el hígado, el Sistema Nervioso Central y/o pueden hacer choque o sangrados que pueden obligar a su hospitalización, e incluso pueden provocar la muerte, aunque afortunadamente no se presentan en todos los casos. El objetivo de este estudio es analizar células del sistema inmune y determinar su relación con las formas severas de la dengue, lo que ayudará al mejoramiento en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad y contribuirá a reducir su morbilidad.

En el estudio se incluirán todos los niños con casos sospechosos y/o confirmados como dengue con y sin signos de alarma y dengue grave y una vez su hijo sea seleccionado para este estudio, se le tomará una muestra de sangre. Usted debe tener en cuenta que el único riesgo que su hijo correrá en este estudio es el dolor (transitorio) y en algunos casos equimosis (morado) en la extremidad puncionada, hechos que de todas formas se pueden presentar en el caso de no aceptar su ingreso a esta investigación, debido a que en el estudio del síndrome febril es necesario tomar muestras de sangre para realizar diversos análisis. La sangre recolectada será usada para analizar si su hijo tiene infección por los virus dengue y las posibles complicaciones que pueden afectar hígado, riñones, corazón, sistema hematológico. Las pruebas requeridas para el estudio serán gratuitas para usted.

Además, la información obtenida en este estudio podrá beneficiar a su hijo, a usted mismo y a otros en el futuro, ayudando a los médicos a encontrar formas mejores de diagnosticar en forma temprana y tratar oportunamente a pacientes dengue. En todos los registros del estudio su hijo será identificado por un número de código y su nombre será conocido solamente por los investigadores.

Si tiene alguna pregunta o si desea alguna aclaración por favor comunicarse con el Dr. Carlos Fernando Narváez (médico investigador) al teléfono 8718311, Ext. 3124.

Por lo anteriormente escrito y las explicaciones dadas por el investigador que me entrevistó;

Yo, _____, con CC N° _____ de _____ deseo que mi hijo _____ participe en el proyecto de investigación.

FIRMA DEL ACUDIENTE

FIRMA DEL INVESTIGADOR

NOMBRE DEL TESTIGO

FIRMA DEL TESTIGO

FECHA

