

# Respuesta inmune e inmunopatogénesis en las infecciones con el virus del dengue

María Eugenia Castro-Mussot<sup>1</sup>, Carlos Machain-Williams<sup>2</sup>, María Alba Loroño-Pino<sup>2</sup>  
y Ma Isabel Salazar<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología Celular e Inmunopatogénesis, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.; <sup>2</sup>Laboratorio de Arbovirología, Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yuc.

## Resumen

La comprensión de los mecanismos, tanto de inducción de la inmunidad protectora como de la inmunopatogénesis en el dengue, es aún insuficiente. El balance entre los efectores de la respuesta inmune es central tanto en la protección como en la patogénesis, e impacta en la gravedad de la enfermedad. Aquí revisamos los elementos de la respuesta inmune que participan en las infecciones con el virus del dengue (DENV) y se contrastan los niveles de algunos de estos efectores en la fiebre por dengue (FD) y en la fiebre hemorrágica por dengue (FHD)/síndrome de choque por dengue (SCD). Está claro que varios componentes de la respuesta inmune se encuentran aumentados o desregulados en los casos graves de dengue y que contribuyen a la inmunopatogénesis. Finalmente, es importante destacar que el mecanismo global por el cual la función protectora de la respuesta inmune se altera y contribuye a la patogénesis en las formas graves de la enfermedad permanece sin dilucidarse completamente.

**PALABRAS CLAVE:** Dengue. Respuesta inmune. Inmunopatogénesis.

## Abstract

We still have an incomplete understanding of both immunoprotection and immunopathogenesis mechanisms in dengue. Proper balance among the components of the immune response plays an important role in protection as well as in pathogenesis because these impact clinical outcomes and severity of dengue cases. In this article, we review the elements of the immune response that participate in DENV infections, and we contrast the levels of immune effectors in both classic dengue fever and the severe dengue fever cases. We also emphasize the components frequently related to the immunopathogenesis in dengue. It is clear that several effectors are increased or dysregulated in the severe cases. Finally, the global mechanism that contributes to the subversion of the immune system in dengue hemorrhagic fever or dengue shock syndrome still requires complete elucidation. (Gac Med Mex. 2013;149:531-40)

**Corresponding autor:** Ma Isabel Salazar, isalazarsan@yahoo.com

**KEY WORDS:** Dengue. Immunity. Immunopathogenesis.

## Introducción

En una infección viral, el sistema inmune innato (interferones, células fagocíticas y células *natural killer* [NK] principalmente) actúa como la primera línea de

defensa e interviene inmediatamente para contrarrestar la replicación viral. Mientras tanto, las células presentadoras de antígeno, células dendríticas y macrófagos, participan en la inducción de la respuesta inmune adaptativa, tanto de tipo celular como humoral, que es altamente específica y requiere de varios días para generarse.

A pesar de los numerosos estudios realizados, en la infección por el DENV aún no se comprenden claramente

### Correspondencia:

\*Ma Isabel Salazar

Prof. Manuel M. Carpio y Plan de Ayala, s/n

Col. Santo Tomás, C.P. 11340, México, D.F.

E-mail: isalazarsan@yahoo.com

Fecha de recepción: 10-12-2012

Fecha de aceptación: 12-09-2013

los mecanismos inmunopatogénicos que tienen lugar y conllevan a una buena parte del daño observado en las formas graves de la enfermedad. En esta revisión se abarcan los principales fenómenos, mecanismos, células y moléculas involucrados en la inmunidad contra el DENV en el humano y se resaltan las consecuencias que la desregulación de la respuesta inmune tiene en el desarrollo de las formas graves de la enfermedad. La infección se inicia cuando un mosquito hembra *Aedes aegypti* infectado deposita partículas virales, las cuales entran en contacto con las células dendríticas de la piel, y la respuesta inmune comienza.

## Células dendríticas

Se ha demostrado que el primer blanco de este virus en humanos son las células dendríticas de la piel, que funcionan como centinelas del sistema inmune. Durante la salivación del artrópodo, las partículas virales son liberadas en la dermis y las células dendríticas de Langerhans las interiorizan. El DENV infecta estas células, se replica en ellas e induce su activación y la producción de citocinas proinflamatorias. La activación y maduración de estas células es crítica en la respuesta antiviral; sin embargo, también contribuye a la diseminación del virus cuando éstas migran a los ganglios linfáticos<sup>1</sup>. Adicionalmente, se conoce bien que el DENV reduce la capacidad de las células dendríticas para producir interferón tipo I (IFN-I), el cual se dispara normalmente en respuesta a diversos inductores como infecciones por otros virus o por la exposición a poli (I:C), ligando de *toll-like receptor 3* (TLR-3). Lo anterior claramente indica que el DENV antagoniza la vía de producción de IFN-I en células dendríticas humanas y constituye en sí un mecanismo de evasión de la respuesta inmune<sup>2</sup>. El efecto inhibitorio del IFN-I hacia DENV es dependiente de dosis, requiere de la replicación viral y se puede observar en las células dendríticas desde las 2 h posteriores a la infección<sup>1</sup>.

## Interferones tipo I

Los IFN-I conducen al establecimiento del estado antiviral que restringe la diseminación del virus en las células del hospedero. Mediante su unión al receptor de interferón  $\alpha/\beta$  (IFN- $\alpha/\beta$ ) en la superficie celular, estas citocinas inducen una respuesta de resistencia a la replicación viral. Este evento se lleva a cabo mediante la activación de la cascada de señalización mediada por *Janus activated kinase-nuclear signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT),

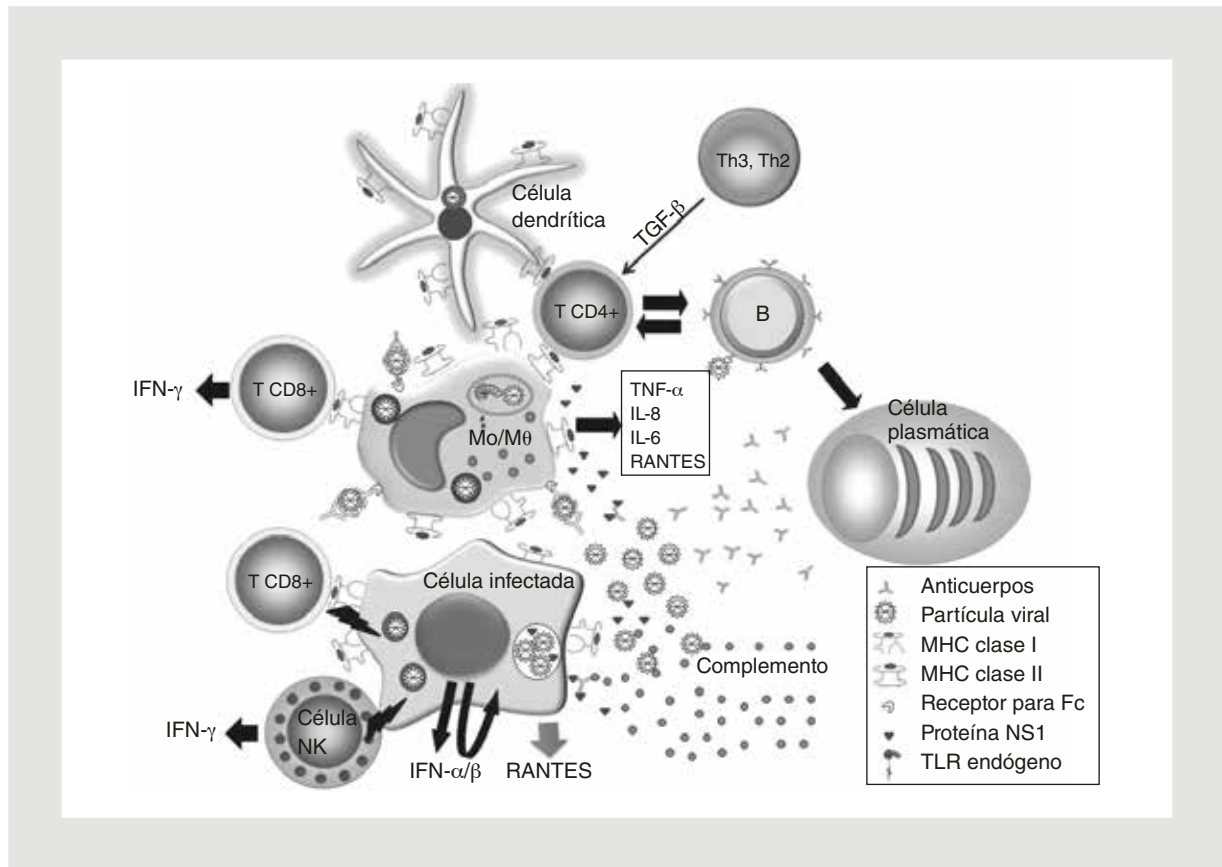
que induce la expresión de los genes *interferon-stimulated genes* (ISG). La unión del IFN-I a su receptor produce la activación de los factores STAT-1 y STAT-2, que forman heterodímeros en su asociación con *interferon regulatory factor 9* (IRF-9), para formar *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF-3). Este factor se une específicamente a los elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE) localizados en los promotores de los genes antivirales. A pesar de los niveles significativos de IFN-I inducidos, en las células dendríticas infectadas se producen partículas de DENV masivamente, debido a la actividad antagónica que tiene el DENV sobre el IFN-I, lo cual resulta de la interferencia con la señalización mediada por STAT<sup>3</sup>.

Al analizar la capacidad de las 10 proteínas virales del DENV para antagonizar la respuesta de IFN-I, se encontró que la expresión en células humanas A549 de las proteínas NS2A, NS4A o NS4B induce un aumento en la replicación de variantes virales sensibles a los IFN. Además, especialmente NS4B produce una intensa disminución de la expresión del gen para IFN- $\beta$ . En células infectadas con DENV o en las que expresan NS4B no se pudo identificar la forma activada de STAT-1, aun en presencia de IFN- $\beta$  o interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), lo que indica que NS4B participa en el bloqueo de la señalización durante la infección por DENV<sup>2</sup>. En células VERO, la expresión de la proteína NS4B del DENV fue suficiente para inhibir la activación de STAT-1 inducida por IFN- $\beta$ , aunque las proteínas NS2A y NS4A también contribuyen a producir este efecto<sup>4</sup>. También se ha demostrado que la NS5 se une a STAT-2 e induce su degradación en los proteasomas<sup>5,6</sup>. STAT-2 es también un componente clave en la protección contra la infección por DENV, ya que no es suficiente inactivar la función de STAT-1 para neutralizar la respuesta antiviral durante la infección<sup>7</sup>.

Finalmente, la evidencia indica que la inhibición de la respuesta de IFN-I mediada por la infección con el DENV en células dendríticas humanas requiere del complejo catalítico NS2B3 activo para antagonizar completamente la producción de IFN-I<sup>1,2</sup>. En la figura 1 se ilustran los aspectos generales y los efectores que participan en la respuesta inmune en contra del DENV.

## Respuesta citotóxica y fagocítica

Las células NK sensan la presencia de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I en la superficie celular. La carencia o una expresión baja de las mismas induce la eliminación de la célula por una de estas dos vías: la vía secretora, que



**Figura 1.** Ilustración de la respuesta inmune global que se produce durante la infección con el DENV. La respuesta del IFN- $\alpha/\beta$  y el complemento se ve profundamente afectada en los casos graves de dengue. Hay un exceso de TNF- $\alpha$ , RANTES, IL-8, IL-6, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  principalmente. Una buena parte de la desregulación de la respuesta inmune durante las infecciones parece deberse a la excesiva activación del monocito/macrófago, que provoca la cascada de citocinas reportada para los casos de FHD/SCD.

es dependiente de granzimas, y la vía no secretora, que depende de Fas (CD95), que son además señales de activación de la apoptosis<sup>9</sup>.

Está claro que diversos flavivirus inducen sobreexpresión de moléculas del MHC de clase I en la superficie celular para evadir la actividad de las células NK<sup>9</sup>. Hershkovitz, et al. demostraron que la transfección celular con un replicón compuesto solo por las proteínas no estructurales del DENV (NS1 a NS5) es suficiente para producir este fenómeno<sup>10</sup>, lo cual indica que alguna de estas proteínas afecta a la producción del MHC de clase I.

Adicionalmente, las células NK tienen receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG) que posibilitan la unión de anticuerpos específicos hacia componentes virales en una infección secundaria. En el dengue se ha reportado una rápida activación de células NK contra células infectadas por el DENV y su eliminación tanto por citólisis directa como por citotoxicidad dependiente de anticuerpos<sup>11,12</sup>. Adicionalmente, al activarse las células NK producen IFN- $\gamma$ , que es también un efector importante de la respuesta antiviral

y que participa en la activación de los macrófagos.

El DENV se replica eficientemente en varios tipos celulares, entre ellos en los monocitos/macrófagos, por lo que la infección de estas células puede afectar a la respuesta proinflamatoria y a la fagocítica. En ratones infectados por DENV, se observa que tanto los macrófagos del bazo como los de la cavidad peritoneal disminuyen su actividad fagocítica<sup>13</sup>. Los macrófagos activados producen óxido nítrico (NO), que es un mediador de la inflamación y un efector importante de la destrucción de las partículas virales fagocitadas<sup>14-16</sup>, así que la afeción de estas actividades favorece la diseminación viral.

### Sistema del complemento

El complemento representa un importante mecanismo efector tanto a nivel de la respuesta inmune innata (vía alternativa y vía de la lectina) como de la respuesta inmune adaptativa (vía clásica). La fijación de complemento media la eliminación de algunos microorganismos a través de la formación del complejo de

ataque a la membrana (*membrane attack complex* [MAC]).

En el suero la proteína viral NS1 se une al componente C4 y este evento induce su degradación mediante la proteasa específica del complemento CR1, evitándose así la acumulación de C4b que contribuye a la formación de C3 convertasa (C4b2a) y a la formación del MAC<sup>17</sup>.

En los pacientes con FHD y SCD se ha reportado un descenso importante en los niveles plasmáticos de C3, C4 y factor B<sup>18</sup>. Sin embargo, estudios recientes indican que en las células endoteliales infectadas por el DENV, la producción del factor B aumenta por lo menos 34 veces<sup>19</sup>. En una infección secundaria el daño al endotelio puede ser producido por la fijación del complemento mediante la vía clásica, debido a la unión de anticuerpos a la NS1 en la superficie de las células endoteliales, o por reacción cruzada con las proteínas de superficie del endotelio<sup>20,21</sup>.

Las concentraciones de los factores H y D en el plasma de pacientes con FHD corresponden a las que favorecen la formación de la C3 convertasa, mientras que en pacientes con FD se han encontrado aquellas que inducen su inhibición<sup>22</sup>. Los componentes H y D contribuyen, en la vía alternativa del complemento, a la regulación de la formación de la C3 convertasa (C3bBb) de manera independiente de anticuerpos.

Avirutnan, et al. reportaron que la lectina de unión a manosa (MBL) puede neutralizar la infección por el DENV<sup>23</sup>. En esta interacción el efecto de neutralización parece ser directo y no requiere de la fijación del complemento<sup>24</sup>. El gen *MBL2* de humanos, que codifica a la MBL, exhibe un notable polimorfismo que impacta tanto sus niveles como su actividad<sup>25</sup>. Estas diferencias genéticas podrían explicar, por lo menos en parte, las diferentes susceptibilidades a las infecciones, entre ellas al dengue.

## Activación de linfocitos T

Los linfocitos T CD4+ activados por los péptidos presentados en moléculas de clase II del MHC proliferan y secretan citocinas que polarizan la respuesta hacia las células efectoras más adecuadas para la eliminación del patógeno, T *helper* 1 (Th1), T *helper* 2 (Th2), T *helper* 17 (Th17) o incluso células T reguladoras (Treg). Como en las células dendríticas humanas infectadas con el DENV no hay inducción de la producción de IFN-I, queda afectada también la capacidad de activación de células T *naive* hacia una respuesta de tipo Th1<sup>1</sup>. Además, se ha reportado que las células dendríticas infectadas con el virus del DENV-2 son incapaces de

inducir la diferenciación de la población de células CD4+ productoras del IFN- $\gamma$ <sup>26</sup>.

En los pacientes con FD se presenta activación celular de linfocitos T CD4+ y CD8+ desde el momento de la manifestación de los síntomas, aunque se ha encontrado que muy pocos linfocitos CD8+ son específicos y que además están programados para apoptosis<sup>27</sup>. Los linfocitos T CD8+ que son específicos para las proteínas del DENV responden a la activación produciendo IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), además de expresar el marcador de desgranulación CD107a en la superficie celular y exhibir actividad citotóxica *in vivo*<sup>28</sup>.

En las infecciones secundarias es clara la activación de los linfocitos T CD8+ de memoria con reactividad cruzada entre los diferentes serotipos<sup>29</sup>. Adicionalmente, se ha documentado que durante el periodo de defervescencia ocurre una apoptosis significativa de las células mononucleares de sangre periférica en los pacientes con FHD<sup>30</sup>.

En *Macacrus rhesus* los péptidos virales capaces de activar tanto a linfocitos T CD4+ como a CD8+ provienen primordialmente de las proteínas NS1, NS3 y NS5<sup>31</sup>, aunque en el modelo de ratón infectado con el DENV-2 cepa D2S10 se identifican células CD8+ que responden a 12 epítomos derivados de seis de las proteínas virales (C, M, E, NS2A, NS4B y NS5). Los epítomos inmunodominantes en este modelo son seis: C<sub>51-59</sub>, E<sub>-2-6</sub>, E<sub>451-458</sub>, NS2A<sub>8-15</sub>, NS4B<sub>99-107</sub> y NS5<sub>237-245</sub><sup>31</sup>.

En la fase aguda de la infección con DENV se ha detectado un incremento significativo de linfocitos Treg, que exhiben el fenotipo CD4+, CD25+, FoxP3+ y tienen la capacidad de suprimir la proliferación de otros linfocitos T, secretan IL-10 y suprimen la producción de citocinas vasoactivas, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6<sup>32</sup>. Así, aunque la población de linfocitos Treg se expande y funciona normalmente en la infección aguda, su frecuencia relativa resulta insuficiente para contrarrestar la inmunopatogénesis observada en las formas graves de la enfermedad.

## Respuesta mediada por anticuerpos

En el 80% de los individuos infectados se ha detectado la presencia de anticuerpos inmunoglobulina M (IgM) específicos entre el día 5 y 10, y en el 99% de los pacientes estos persisten hasta dos o tres meses después de la infección<sup>33</sup>.

La respuesta mediada por IgG hacia la infección por DENV puede perdurar durante décadas<sup>34</sup>. Los anticuerpos generados son específicos, pero en las formas graves se presenta reactividad cruzada con los diferentes serotipos<sup>35</sup>.

Durante la infección por DENV también se estimula la generación de anticuerpos inmunoglobulina A (IgA) específicos, tanto séricos como secretados, los cuales se han convertido en un importante biomarcador para el diagnóstico de la infección<sup>36-38</sup>. La producción de anticuerpos neutralizantes contra DENV resulta efectiva en el control de la infección, pero si se produce una infección secundaria con algún serotipo distinto, entonces se puede presentar el fenómeno denominado potenciación mediada por anticuerpos (*antibody dependent enhancement* [ADE]). Este fenómeno favorece el incremento en la interiorización de partículas virales opsonizadas por el receptor II para el Fc de la IgG (Fc $\gamma$ RII) en macrófagos y células dendríticas. Interesantemente, la evidencia experimental indica que la infección por DENV de las células monocíticas humanas vía el receptor de Fc suprime la transcripción/traducción de los genes para IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , y promueve la expresión/síntesis de aquellos para IL-6 e IL-10. Asimismo, este tipo de infección también suprime la liberación de NO al bloquear la activación de STAT-1 y afectar al *interferon regulatory factor 1* (IRF-1) que interviene en la producción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)<sup>39</sup>.

Adicionalmente, para explicar la patogénesis en el dengue se utiliza la teoría del «pecado antigénico original», que postula que en un individuo previamente infectado por un serotipo viral, en una infección subsecuente con una variante heterotípica, hay una proliferación y activación de linfocitos T CD8+ de memoria específicos para la cepa primoinfectante, que presentan una respuesta cruzada con la nueva variante viral y contribuyen al daño en las infecciones secundarias<sup>40-42</sup>. En pacientes con FHD se ha encontrado una alta concentración de anticuerpos contra las proteínas E, NS1 dimerica y M<sup>43</sup>. La formación de complejos inmunes circulantes pudiera tener un papel importante en la inmunopatogénesis viral<sup>44</sup> por un mecanismo de hipersensibilidad tipo III.

Por otro lado, el fenómeno de ADE contribuye a explicar la patogénesis de la infección en recién nacidos de madres infectadas. Así, debido a la transferencia transplacentaria de anticuerpos IgG específicos contra el serotipo viral infectante de la madre, el recién nacido está expuesto al desarrollo de cuadros graves al ser infectado por otra variante viral<sup>45</sup>.

## Inmunopatogénesis en el dengue

La FHD y el SCD son las manifestaciones más graves de las infecciones causadas por el DENV. En estas

se produce fiebre muy alta, aumento importante en la permeabilidad vascular, hemoconcentración, trombocitopenia, hemorragias y hepatomegalia. En los casos de FHD los niveles *in vivo* de varias citocinas, especialmente IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , aumentan desproporcionadamente<sup>46-51</sup>. En la tabla 1 se mencionan las citocinas que consistentemente se han encontrado alteradas en la FHD.

En la FHD se observan algunos efectos sistémicos relacionados con los altos niveles de TNF- $\alpha$ ; tal es el caso de la fiebre y un aumento en la permeabilidad vascular con salida de albúmina<sup>55</sup>. Además, se ha sugerido que la elevada concentración de TNF- $\alpha$  pudiera participar en la inducción de apoptosis de células endoteliales y mediar así la pérdida de la integridad estructural del endotelio observada en los casos graves<sup>39,56,57</sup> (Fig. 2). Adicionalmente, el TNF- $\alpha$  actúa sobre el endotelio e induce la expresión de iNOS y la producción del NO que provoca vasodilatación<sup>58</sup>. El NO también parece participar en el daño endotelial observado en presencia de anticuerpos; esto ocurre por la reacción cruzada de los anticuerpos anti-NS1 que se unen a las células endoteliales y conduce a la producción de NO y apoptosis<sup>21,59,60</sup>. Estudios en ratones confirman que el TNF- $\alpha$  juega un papel central en el desarrollo de las hemorragias<sup>56</sup>.

Los altos niveles de TNF- $\alpha$  se han relacionado consistentemente con la gravedad de la enfermedad, constituyendo tal vez uno de los principales elementos inmunopatogénicos del dengue<sup>61</sup>. Producen aumento de la permeabilidad vascular y pueden inducir la apoptosis de las células endoteliales<sup>39,56,57</sup>. Más aún, se sabe bien que uno de los polimorfismos en el promotor de TNF (-308A), que afecta a los niveles de expresión de TNF- $\alpha$ , está asociado con la susceptibilidad a desarrollar FHD<sup>62</sup>. Sin embargo, el notable aumento en esta citocina no es suficiente para explicar integralmente la enfermedad en los casos graves de dengue.

No hay duda de que la activación celular mediada por ciertas citocinas favorece la infección o incluso participa en la patogénesis<sup>63-64</sup>. Una respuesta inmune proinflamatoria intensa facilita la progresión de la enfermedad; los monocitos y macrófagos de pacientes infectados con DENV producen altos niveles de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, IFN- $\gamma$  y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)<sup>39,63,65</sup>. Algunos grupos reportan que los niveles de IL-1 $\beta$  correlacionan inversamente con la gravedad de la enfermedad<sup>47,66</sup>.

En las infecciones graves por el DENV se ha encontrado un aumento significativo de la IL-8<sup>48</sup>. La

Tabla 1. Comparación cuantitativa de diferentes citocinas de la respuesta inmune en FD y FHD

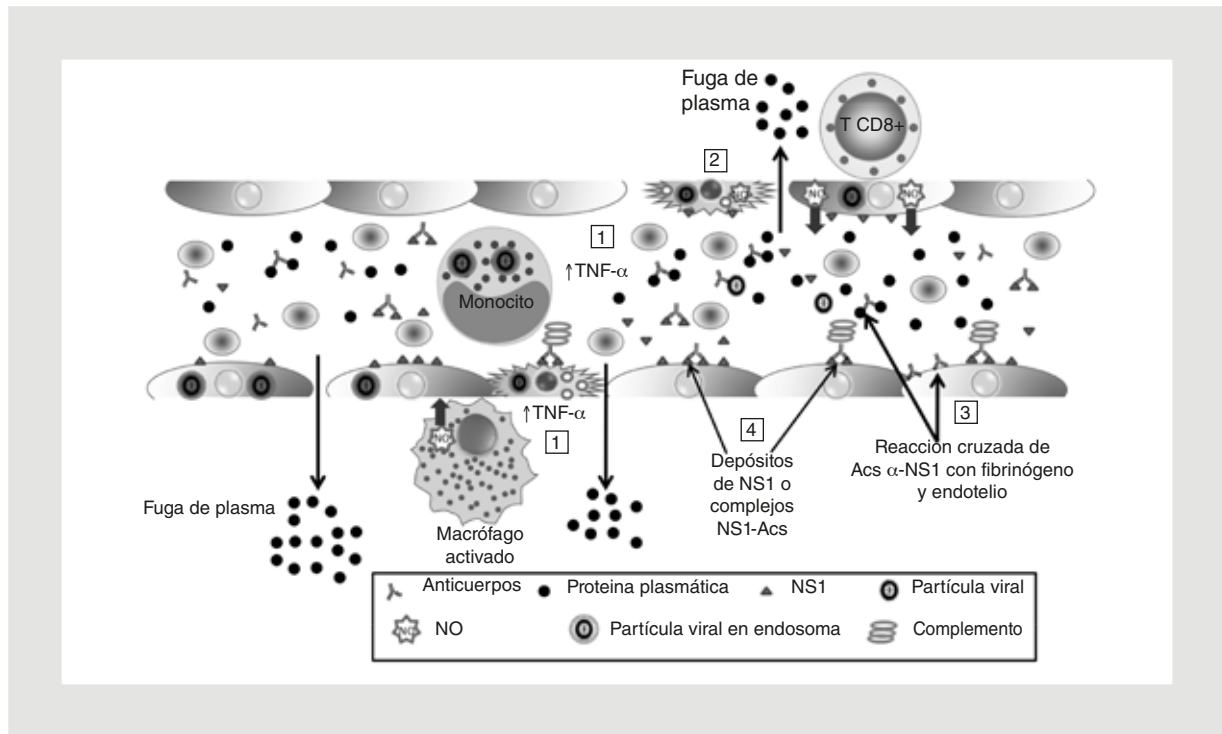
	Origen y función	Individuos normales	Pacientes con FD	Pacientes con FHD	Referencia
<b>Proinflamatorias</b>					
IL-6	Participa en la diferenciación de plaquetas, hepatocitos y linfocitos T	5-15 pg/ml	60-1100 pg/ml	> 50-8,000 pg/ml	Priyadarshini, et al. <sup>52</sup>
IL-8	Producida por monocitos, linfocitos, hepatocitos y células endoteliales, entre otros. Quimioattractante de neutrófilos, basófilos y células T	0 pg/ml	1-20 pg/ml	200-5,668 pg/ml	Raghupathy, et al. <sup>48</sup>
TNF- $\alpha$	Producida principalmente por monocitos/macrófagos. Pirógeno endógeno. Citocina con efecto vasodilatador y apoptótico	< 4.0 pg/ml	3.49 $\pm$ 0.36 pg/ml	36.57 $\pm$ 19.47 pg/ml	Wang, et al. <sup>53</sup>
<b>Regulación Th1/Th2</b>					
IL-13	Actividad similar a IL-4	4 $\pm$ 3 pg/ml	22 $\pm$ 12 pg/ml	De 29 $\pm$ 76 a 205 $\pm$ 103 pg/ml	Mustafa, et al. <sup>54</sup>
IL-18	Induce inmunidad mediada por células Th1	15 $\pm$ 4 pg/ml	76 $\pm$ 50 pg/ml	De 300 $\pm$ 110 pg/ml	Mustafa, et al. <sup>54</sup>

sobreexpresión de esta citocina se ha observado *in vitro* en líneas celulares de monocitos/macrófagos, en monocitos humanos primarios y en células endoteliales, entre otros<sup>63,67,68</sup>. Sin embargo, la IL-8 y otras citocinas relevantes en los casos graves de dengue (IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$ ) aumentan también en numerosas enfermedades. Por ello el valor pronóstico de las mismas en el dengue está en función de establecer tempranamente la infección con el DENV.

En la infección con DENV se altera significativamente la quimiocina *regulated and normal T-cell expressed and secreted* (RANTES), aunque no se ha reportado que existan diferencias consistentes entre los niveles observados en FD y en FHD/SCD. La quimiocina RANTES es producida por diversas estirpes celulares y es un quimioattractante de células T, NK, neutrófilos y basófilos. Numerosos estudios *in vitro* documentan que en la infección con DENV aumenta la producción de RANTES en monocitos/macrófagos<sup>69</sup>, células endoteliales<sup>19,20</sup>, células dendríticas primarias<sup>70</sup>, células cebadas<sup>71</sup>, hepatocitos<sup>70,72,73</sup> e incluso linfocitos T CD4+ de memoria<sup>74</sup>. Aunque existen estudios que confirman el aumento sistémico de RANTES en pacientes con dengue<sup>75,76</sup>, el grupo de Guzmán reporta la disminución del mismo<sup>77</sup>. También los niveles de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  aumentan significativamente en las infecciones por el DENV<sup>78</sup>.

Respecto a la respuesta adaptativa celular, durante la fase aguda de una FHD se han encontrado también niveles elevados de IL-2R, CD4 y CD8 solubles en pacientes que desarrollan formas graves más tarde<sup>79</sup>. Adicionalmente, se han reportado diferencias notorias en la activación y función de las células CD4+, CD8+ y NK entre la FD y la FHD<sup>12,80,81</sup>. En el dengue la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+ contribuye al daño de células no infectadas por el virus, tales como hepatocitos<sup>45</sup>. Es posible que una activación celular temprana e inadecuada de los linfocitos T CD8+ se relacione directamente con la gravedad de la enfermedad<sup>61,81</sup>.

El fondo genético de los individuos es otro elemento importante en la patogénesis del dengue. A este respecto, el MHC es un componente central en la resistencia o susceptibilidad a desarrollar las formas graves de la enfermedad: FHD/SCD. Se han encontrado algunas variantes de las moléculas de histocompatibilidad de clase I (HLA-A, B y C) y clase II (HLA-DR y DQ) asociadas con estas condiciones en numerosas poblaciones alrededor del mundo (Tabla 2). También se ha demostrado un aumento en la expresión de moléculas MHC de clase I en los casos más graves de la enfermedad<sup>83,92,93</sup>. Es probable que la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ participe en el daño, pero quedan aún por establecerse los mecanismos moleculares operantes en este fenómeno. A nivel clínico, en los pacientes con



**Figura 2.** Esquema de los principales procesos que participan en el daño al endotelio en la FHD. Los procesos que pueden intervenir en el daño al endotelio en infecciones por el DENV son varios y los principales son cuatro. 1) El TNF- $\alpha$  excesivo, tanto el circulante como el producido por macrófagos activados, puede conducir a un aumento en la permeabilidad vascular y a la apoptosis de células endoteliales. 2) La iNOs y su actividad para producir NO se incrementan en las células endoteliales que sufren apoptosis. 3) El mimetismo molecular que existe entre las proteínas virales y propias produce anticuerpos de reacción cruzada que activan al complemento y dañan el endotelio. 4) Los complejos solubles NS1-anticuerpo se forman o depositan sobre las células endoteliales y producen daño adicional por fijación del complemento. La vasodilatación, la apoptosis y el daño al endotelio conllevan a la característica fuga de plasma y posiblemente a las hemorragias observadas en FHD/SCD.

FHD es frecuente encontrar tanto trombocitopenia ( $\leq 150,000$  plaquetas/mm<sup>3</sup>) como leucopenia<sup>94,95</sup>.

En cuanto a la respuesta mediada por anticuerpos, la reactividad cruzada por mimetismo molecular contra componentes del endotelio y de la cascada de coagulación pudiera conformar un proceso importante en la inmunopatogénesis del dengue<sup>62</sup>. Se sabe que los anticuerpos antiproteína E del DENV reconocen tanto a la trombina como al plasminógeno; este es el precursor de la plasmina responsable de la disgregación de los coágulos<sup>96,97</sup>. Así mismo, en células endoteliales se han identificado varias moléculas que son reconocidas por los anticuerpos anti-NS1<sup>21,61,98</sup>. Adicionalmente, existe evidencia de que los anticuerpos generados contra la proteína NS1 se unen a la superficie de las células endoteliales, y la fijación de complemento por vía clásica produce el daño al endotelio<sup>65</sup>.

Respecto a la secuencialidad de las infecciones, existen reportes de que una infección primaria con DENV-1 seguida por una secundaria con DENV-2

condiciona a que en la segunda las manifestaciones clínicas de la enfermedad sean en general más graves<sup>99</sup>. Finalmente, el serotipo viral DENV-2 se asocia más frecuentemente a los casos graves de la enfermedad en comparación con el DENV-1<sup>100</sup>. La inmunidad preexistente contra alguno de los cuatro serotipos virales constituye un factor de riesgo muy importante para desarrollar las formas graves de la enfermedad (FHD/SCD).

## Conclusión

Aunque la desregulación de varios de los efectores de la respuesta inmune los perfila como participantes en el daño observado en los casos graves de dengue, el mecanismo global que contribuye a que el sistema inmune participe en la patogénesis de la FHD permanece sin ser elucidado en su totalidad. Las diferencias en niveles tanto de citocinas como de complemento, así como en la activación celular, observadas en pacientes con FD y FHD, claramente indican procesos

Tabla 2. Alelos del MHC de clase I y II asociados tanto a susceptibilidad como a protección en dengue

Alelo	Efecto	Tipo	Población	Referencia
<b>MHC clase I</b>				
HLA-A*01	S	FHD	Brasileña	Monteiro, et al. <sup>82</sup>
HLA-A*02	S	FHD/SCD	Tailandesa	Chiewsilp, et al. <sup>83</sup>
HLA-A*23	P	DF	Jamaiquina	Brown, et al. <sup>84</sup>
HLA-A*24	S	FHD/SCD	Vietnamita	Loke, et al. <sup>85</sup> , Nguyen, et al. <sup>86</sup>
	S	FD	Jamaiquina	Brown, et al. <sup>84</sup>
HLA-A*29	S	FHD/SCD	Cubana	Paradoa Pérez, et al. <sup>87</sup>
	S	FHD-serotipo 2	Cubana	Sierra, et al. <sup>88</sup>
HLA-A*31	S	SCD	Cingalesa	Malavige, et al. <sup>89</sup>
HLA-A*0203	P	FHD-2da	Tailandesa	Stephens, et al. <sup>90</sup>
HLA-A*0207	S	FHD-2da	Tailandesa	Stephens, et al. <sup>90</sup>
HLA-B*13	P	FHD/SCD	Tailandesa	Chiewsilp, et al. <sup>83</sup>
HLA-B*15	S	FHD-2da	Cubana	Sierra, et al. <sup>88</sup>
HLA-B*44	P	FD-2da	Tailandesa	Stephens, et al. <sup>90</sup>
HLA-B*46	P	FD-2da	Tailandesa	Stephens, et al. <sup>90</sup>
HLA-B*51	S	FHD-2da con D1 o D2	Tailandesa	Stephens, et al. <sup>90</sup>
HLA-B*52	S	FD-2da con D1 o D2	Tailandesa	Stephens, et al. <sup>90</sup>
HLA-B*62	P	FD-después 2da	Tailandesa	Stephens, et al. <sup>90</sup>
HLA-CW*01	S	FHD	Cubana	Paradoa Pérez, et al. <sup>87</sup>
HLA-CW*04	S	FD	Jamaiquina	Brown, et al. <sup>84</sup>
<b>MHC clase II</b>				
HLA-DRB1*04	P	FHD	Mexicana	LaFleur, et al. <sup>91</sup>
HLA-DRB1*08	S	SCD	Cingalesa	Malavige, et al. <sup>89</sup>
HLA-DRB1*0901	P	SCD	Vietnamita	Nguyen, et al. <sup>86</sup>
HLA-DRB5*01/02	S	FD	Jamaiquina	Brown, et al. <sup>84</sup>
HLA-DRB1*07	P	FD	Cubana	Sierra, et al. <sup>88</sup>
HLA-DQB*02	P	FD	Jamaiquina	Brown, et al. <sup>84</sup>
HLA-DQB*03	P	FD	Jamaiquina	Brown, et al. <sup>84</sup>
HLA-DQB*06	P	FD	Jamaiquina	Brown, et al. <sup>84</sup>

P: alelo relacionado con protección; S: alelo relacionado con susceptibilidad.

inmunopatogénicos en la FHD. Sin embargo, aún queda por establecer cuáles son los elementos iniciales y los más determinantes en la inmunopatogénesis del dengue. La mejor comprensión de estos eventos permitirá ulteriormente desarrollar medidas terapéuticas efectivas para intervenir en el curso de la infección y evitar así las formas graves de esta enfermedad.

Es importante para el futuro considerar en cada estudio realizado el componente temporal/espacial en la evolución de los casos clínicos, pues esta información mejorará nuestro entendimiento de la verdadera relevancia que cada uno de los efectores de la respuesta inmune tiene en las infecciones por el DENV y en la inmunopatogénesis de la FHD/SCD.



## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y al Centro de Investigaciones Regionales Hideyo Noguchi de la UADY el apoyo a las actividades académicas y de investigación. Un especial agradecimiento a la M. en C. Antonina Oltra Ramírez, del Laboratorio de Inmunología Celular e Inmunopatogénesis, por sus sugerencias durante la revisión de este manuscrito.

## Bibliografía

- Rodríguez-Madoz J, Belicha-Villanueva A, Bernal-Rubio D, Ashour J, Ayllon J, Fernandez-Sesma A. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. *J Virol.* 2010;84:9760-74.
- Morrison J, Aguirre S, Fernandez Sesma A. Innate immunity evasion by dengue virus. *Viruses.* 2012;4:397.
- Ho LJ, Hung LF, Weng CY, et al. Dengue virus type 2 antagonizes IFN- $\alpha$  but not IFN- $\gamma$  antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol.* 2005;174:8163-72.
- Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol.* 2005;79:8004-13.
- Mazzon M, Jones M, Davidson A, Chain B, Jacobs M. Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *J Infect Dis.* 2009;200:1261-70.
- Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, García-Sastre A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol.* 2009;83:5408-18.
- Perry ST, Buck MD, Lada SM, Schindler C, Shresta S. STAT2 mediates innate immunity to dengue virus in the absence of STAT1 via the type I interferon receptor. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001297.
- Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. *Immunology.* 6.ª ed. Nueva York: WH Freeman and Co.; 2007.
- Lobgis M, Müllbacher A, Lee E. Evidence that a mechanism for efficient flavivirus budding upregulates MHC class I. *Immunol Cell Biol.* 2004;82:184-8.
- Hershkovitz O, Zilka A, Bar-Ilan A, et al. Dengue virus replicon expressing the nonstructural proteins suffices to enhance membrane expression of HLA class I and inhibit lysis by human NK cells. *J Virol.* 2008;82:7666-76.
- Kurane I, Hebblewaite D, Ennis F. Characterization with monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. *Immunology.* 1986;58:429-36.
- Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DIS, Nogueira RMR, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol.* 2006;143:345-56.
- Chaturvedi UC, Nagar R, Mathur A. Effect of dengue virus infection on Fc-receptor functions of mouse macrophages. *J Gen Virol.* 1983;64:2399-407.
- Charnsilpa W, Takhampunya R, Endy TP, Mammen MP, Libraty DH, Ubol S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. *J Med Virol.* 2005;77:89-95.
- Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *J Gen Virol.* 2006;87:3003-11.
- Chaturvedi U, Nagar R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56:9-24.
- Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med.* 2010;20:793-806.
- Bokisch VA, Muller-Eberhard HJ, Dixon FJ. The role of complement in hemorrhagic shock syndrome (dengue). *Trans Assoc Am Physicians.* 1973;86:102-10.
- Dalrymple NA, MacKow ER. Endothelial cells elicit immune-enhancing responses to dengue virus infection. *J Virol.* 2012;86:6408-15.
- Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infection a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 2006;193:1078-88.
- Cheng HJ, Lin CF, Lei HY, et al. Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. *Exp Biol Med.* 2009;234:63-73.
- Nascimento EJ, Silva AM, Cordeiro MT, et al. Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. *PLoS One.* 2009;4(8):e6782.
- Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol.* 2011;187:424-33.
- Shresta S. Role of complement in dengue virus infection: protection or pathogenesis? *MBio.* 2012;3:e00003-12.
- Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency revisited. *Mol Immunol.* 2003;40:73-84.
- Chase AJ, Medina FA, Muñoz-Jordán JL. Impairment of CD4+ T cell polarization by dengue virus-infected dendritic cells. *J Infect Dis.* 2011;203:1763-74.
- Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol.* 2006;176:3821-9.
- Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, et al. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol.* 2009;182:4865-73.
- Friberg H, Burns L, Woda M, et al. Memory CD8+ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive. *Immunol Cell Biol.* 2011;89:122-9.
- Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, et al. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *J Infect Dis.* 2006;194:600-7.
- Mladinich KM, Piaskowski SM, Rudersdorf R, et al. Dengue virus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes target NS1, NS3 and NS5 in infected Indian rhesus macaques. *Immunogenetics.* 2012;64:111-21.
- Lühn K, Simmons C, Moram E, et al. Increased frequencies of CD4+, CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in acute dengue infection. *J Exp Med.* 2007;204:979-85.
- McBride W. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. *Diagn Microb Infect Dis.* 2009;64:31-6.
- Smith SA, Zhou Y, Olivarez NP, Broadwater AH, Da Silva AM, Crowe JE Jr. Persistence of circulating memory B cells clones with potential for dengue virus disease enhancement for decades following the infection. *J Virol.* 2012;86:2665-72.
- Scott RM, Nimmannitya S, Bancroft WH, Mansuwan P. Shock syndrome in primary dengue infections. *Am J Trop Med Hyg.* 1976;25:866-74.
- Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1189-92.
- Balmaseda A, Guzmán MG, Hammond S, et al. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10:317-22.
- Nawa M, Takasaki T, Ito M, Inoue S, Morita K, Kurane I. Immunoglobulin A antibody responses in dengue patients: a useful marker for serodiagnosis of dengue virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12:1235-7.
- Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production in THP-1 cells. *J Gen Virol.* 2007;88:365-75.
- Halstead S, Rojanasuphot R, Sangkawibha N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32:154-6.
- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003;9:912-7.
- Midgley CM, Bajwa-Joseph M, Vasanawathana S, et al. An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. *J Virol.* 2011;85:410-21.
- Lazaro-Olán L, Mellado-Sánchez G, García-Cordero J, et al. Analysis of antibody response in human dengue patients from the Mexican coast using recombinant antigens. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008;8:69-79.
- Malavige G, Fernando S, Seneviratne S. Dengue viral infections. *Postgrad Med J.* 2004;80:588-601.
- Mathew A, Rothman A. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2008;225:300-13.
- Hober D, Poli L, Roblin B, et al. 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.* 1993;48:324-31.
- Kuno G, Bailey RE. Cytokine responses to dengue infection among Puerto Rican patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89:179-82.
- Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol.* 1998;56:280-5.
- Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. Macrophage & dengue virus: friend or foe? *Indian J Med Res.* 2006;124:23-40.
- Braga EL, Moura P, Pinto LM, et al. Detection of circulating 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.* 2001;96:229-32.

51. Juffrie M, van Der Meer GM, Hack CE, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infect Immun*. 2000;68:702-7.
52. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, et al. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS One*. 2010;5(1):e8709.
53. Wang L, Chen R, Liu J, Yu H, Kuo H, Yang K. Implications of dynamic changes among tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), membrane TNF receptor, and soluble TNF receptor levels in regard to the severity of dengue infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:297-302.
54. Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001;30(3):229-33.
55. Worrall NK, Chang K, Lejeune WS, et al. TNF- $\alpha$  causes reversible in vivo systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and independent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1997;273:H2565-74.
56. Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, Wu-Hsieh BA. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol*. 2007;81:5518-26.
57. Wati S, Li P, Burrell C, Carr J. Dengue virus (DV) replication in monocyte-derived macrophages is not affected by tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and DV infection induces altered responsiveness to TNF- $\alpha$  stimulation. *J Virol*. 2007;81:10161-71.
58. Yen YT, Chen HC, Lin YD, Shieh CC, Wu-Hsieh BA. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol*. 2008;82:12312-24.
59. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol*. 2002;169:657-64.
60. Lin YS, Yeh TM, Lin CF, et al. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Exp Biol Med*. 2011;236:515-23.
61. Green S, Vaughn DW, Kalanarooj S, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis*. 1999;179:755-62.
62. Fernández-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens*. 2004;64(4):469-72.
63. Lin C, Chiu S, Hsiao Y, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol*. 2005;174:395-403.
64. Restrepo B, Ramirez R, Arboleda M, Alvarez G, Ospina M, Diaz F. Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:673-7.
65. Ubol S, Masrinoul P, Chaijaruwanch J, Kalayanarooj S, Charoensirisuthikul T, Kasisith J. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2008;197:1459-67.
66. Soemanto BE, Hasebe F, Igarashi A. Infection of dengue 2 virus strains isolated from patients exhibiting different disease severities to human peripheral blood leukocytes and production of cytokines in the infected culture supernatant. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999;30:729-34.
67. Bosch I, Xhaja K, Estevez L, et al. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J Virol*. 2002;76:5588-97.
68. Medin C, Rothman A. Cell type-specific mechanisms of interleukin-8 induction by dengue virus and differential response to drug treatment. *J Infect Dis*. 2006;193:1070-77.
69. Chen YC, Wang SY. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J Virol*. 2002;76:9877-87.
70. Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol*. 2005;79:11053-061.
71. King CA, Anderson R, Marshall JS. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. *J Virol*. 2002;76(16):8408-19.
72. Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR. Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. *J Med Virol*. 2007;79:300-7.
73. Conceição TM, El-Bacha T, Villas-Bôas CS, et al. Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. *J Infect*. 2010;60:65-75.
74. Swanson BJ, Murakami M, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. RANTES production by memory phenotype T cells is controlled by a posttranscriptional, TCR-dependent process. *Immunity*. 2002;17:605-15.
75. Lin YL, Liu CC, Chuang JI, et al. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6 and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology*. 2000;276:114-26.
76. Becquart P, Wauquiez N, Nkoghe D, et al. Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. *BMC Infect Dis*. 2010;10:356.
77. Pérez AB, García G, Sierra B, et al. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J Med Virol*. 2004;73(2):230-4.
78. Spain-Santana TA, Marglin S, Ennis FA, Rothman AL. MIP-1 alpha and MIP-1 beta induction by dengue virus. *J Med Virol*. 2001;65:324-30.
79. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest*. 1991;88:1473-80.
80. Fadilah SA, Sahir S, Raymond A, Cheong SK, Aziz JA, Sivagengei K. Quantitation of T lymphocyte subsets helps to distinguish dengue hemorrhagic fever from classic dengue fever during the acute febrile stage. *Southeast Asian J Med Public Health*. 1999;4:710-7.
81. Kurane I, Matsutani T, Suzuki R, et al. T-cells responses to dengue virus in humans. *Trop Med Health*. 2011;39:45-51.
82. Monteiro SP, do Brasil PE, Cabello GM, et al. HLA-A\*01 allele: a risk factor for dengue haemorrhagic fever in Brazil's population. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:224-30.
83. Chiewsilp P, Scott RM, Bhamarapavati N. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1981;30:1100-5.
84. Brown MG, Salas RA, Vickers IE, Heslop OD, Smikle MF. Dengue HLA associations in Jamaicans. *West Indian Med J*. 2011;60:126-31.
85. Loke H, Bethell DB, Phuonng CX, et al. Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis*. 2001;184:1369-73.
86. Nguyen TP, Kikuchi M, Vu TQ, et al. Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1\*0901 and HLA-A\*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(10):e304.
87. Paradao Pérez ML, Trujillo Y, Basanta P. Association of dengue hemorrhagic fever with the HLA system. *Hematologia (Budap)*. 1987;20:83-7.
88. Sierra B, Alegre R, Perez A, et al. HLA-A, -B, -C, and DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol*. 2007;68:531-40.
89. Malavige GN, Rostron T, Rohanachandra LT, et al. HLA class I and class II associations in dengue viral infections in a Sri Lankan population. *PLoS ONE*. 2011;6(6):e20581.
90. Stephens H, Klaythong R, Sirikong M, et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic thais. *Tissue Antigens*. 2002;60:309-18.
91. LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, et al. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol*. 2002;63:1039-44.
92. Appana R, Huat T, Lum L, Lay P, Vadivelu J, Devi S. Cross-reactive T-cell responses to the nonstructural regions of dengue viruses among dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Malaysia. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14:969-77.
93. Othman S, Rahman NA, Yusof R. Induction of MHC Class I HLA-A2 promoter by dengue virus occurs at the NF $\kappa$ B binding domains of the Class I regulatory complex. *Virus Res*. 2012;163:238-45.
94. Oliveira EVL, Curry-Pontes ERJ, Cunha RV, Bucker-Frôes I, Nascimento D. Hematological abnormalities in patients with dengue. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42:682-5.
95. Biswas HH, Ortega O, Gordon A, et al. Early clinical features of dengue virus infection in Nicaraguan children: a longitudinal analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(3):e1562.
96. Huang YH, Chang BI, Lei HY, et al. Antibodies against dengue virus E protein peptide bind to human plasminogen and inhibit plasmin activity. *Clin Exp Immunol*. 1997;110:35-40.
97. Chuang YC, Lei HY, Lin YS, Liu HS, Wu HL, Yeh TM. Dengue virus-induced autoantibodies bind to plasminogen and enhance its activation. *J Immunol*. 2011;187:6483-90.
98. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol*. 2003;69:82-90.
99. Guzmán MG, Kourí G, Valdés L, Bravo J, Vázquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica*. 2002;11:223-7.
100. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, et al. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e617.