

ARTICULO

IL-12 como marcador predictivo de severidad del Dengue

Juan Jesús Luis-León^{1,2}, Solybella Flores³, Yordana Hernández⁴, Daria Elena Camacho², Gloria Sierra² y Guillermo Comach²

¹Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua. Departamento de Microbiología. Maracay. Estado Aragua. Venezuela.

²Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Carabobo (LARDIDEV/BIOMED- UC - CORPOSALUD). Facultad de Ciencias de la Salud. Sede Aragua. Maracay. Estado Aragua. Venezuela.

³Laboratorio Central. Hospital Vargas. Distrito Capital. Caracas. Venezuela.

⁴Laboratorio de Emergencia. Hospital "José M. Benítez". La Victoria. Estado Aragua. Venezuela.

Correspondencia: Guillermo Comach

E-mail: lardidev@telcel.net.ve,
gcomach@yahoo.com,
gcomach@gmail.com,

RESUMEN

Investigaciones previas han sugerido que las citocinas T_H1 predominan en casos de fiebre del dengue (FD) y las T_H2 en casos de fiebre hemorrágica del dengue (FHD). La IL-12 es un importante factor de diferenciación de células T_H1. Con base a lo expuesto, se investigó mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) los niveles séricos de IL-12 en pacientes con diferentes presentaciones clínica de dengue [FD (n=8), FHD (n=9)] e individuos controles sanos (n=10) de ambos sexos y edades similares. Los pacientes con dengue tuvieron concentraciones de IL-12 significativamente mayores a las encontradas en los individuos controles (148,9±121,2 pg/mL vs 63,6±22 pg/mL, respectivamente; $p<0,001$). Las concentraciones de IL-12 en los pacientes con FD fueron significativamente mayores a las encontradas en los casos de FHD (226,8±134,9 pg/mL vs 79,6±44,5 pg/mL, respectivamente; $p<0,001$). No hubo diferencias significativas ($p<0,1$) entre las concentraciones de IL-12 encontradas en pacientes con FHD y los individuos controles. La frecuencia de sueros positivos para IL-12 en los pacientes con FD fue mayor que en aquellos con FHD (75% vs 11,1%, respectivamente; valor de corte en ELISA: 129,7 pg/mL). Las concentraciones promedio de IL-12 en los pacientes con FD alcanzaron los niveles más altos 3 - 5 días

después del inicio de la fiebre y disminuyeron en la medida que evolucionó la enfermedad, manteniéndose por encima del valor de corte 6 - 7 días después del inicio de la fiebre. En conclusión, los pacientes con FD demostraron niveles séricos elevados de IL-12 durante la fase aguda de la enfermedad, sugiriendo la posibilidad de ser considerarla como marcador inmunológico de severidad del dengue.

Palabras clave: Interleuquina 12, Dengue, Fiebre del Dengue, Fiebre Hemorrágica del Dengue.

ABSTRACT

IL-12 as a predictive marker of dengue severity

Previous investigations have suggested that T_H1 -type cytokines predominate in cases of dengue fever (DF) and T_H2 -type cytokines in cases of dengue hemorrhagic fever (DHF). The IL-12 is an important differentiation factor for T_H1 cells. Based on that, serum levels of IL-12 were investigated, by means of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in dengue patients with different clinical presentations [DF ($n = 8$), DHF ($n = 9$)] and healthy controls ($n = 10$), of both sexes and similar ages. Dengue patients had significant higher IL-12 concentrations than healthy controls (148.9 ± 121.2 pg/mL vs 63.6 ± 22 pg/mL, respectively; $p < 0,001$). Concentrations of IL-12 in DF patients were significantly higher than to those exhibited in DFH patients (226.8 ± 134.9 pg/mL vs 79.6 ± 44.5 pg/mL, respectively; $p < 0,001$). There were not significant differences ($p < 0,1$) between the concentrations of IL-12 found in DHF patients and healthy controls. The frequency of IL-12 positive sera in DF patients was greater than in those DHF ones (75% vs 11.1%, respectively; ELISA cutoff value: 129.7pg/mL). The average concentrations of IL-12 in DF patients reached the highest levels 3 - 5 days after the onset of fever, and decreased as the disease evolved, remaining over the ELISA cut-off value 6 - 7 days after the onset of fever. The results obtained indicate that DF patients demonstrated high serum levels of IL-12 during the acute phase of disease, suggesting the possibility of considering it as an immunologic marker of dengue severity.

Key words: Interleukin-12, Dengue, Dengue fever, Dengue Hemorrhagic Fever.

INTRODUCCION

El virus del dengue (DENV) es un flavivirus transmitido por artrópodos del cual se han identificado cuatro serotipos antigénicamente relacionados, pero serológicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (1). La infección por cualquiera de estos serotipos puede ser asintomática o producir un espectro de cuadros clínicos que se extiende desde un síndrome febril leve conocido como Fiebre del Dengue (FD), hasta las formas hemorrágicas severas que en ocasiones pueden ser fatales: la Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) y el Síndrome de Choque por Dengue (SCD) (1, 2). En las Américas, el DENV persiste en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión hombre-*Aedes aegypti*-hombre, en las áreas urbanas. Una vez transmitido, la partícula viral se multiplica fundamentalmente en las células del sistema fagocito mononuclear (monocitos y macrófagos) y en otros tipos de células, entre las que figuran, células dendríticas, hepatocitos y células endoteliales (3-10)

Se ha estimado que de los 2.500 millones de personas que viven en áreas endémicas, 50-100 millones se infectan anualmente; de éstas, alrededor de 500.000 contraen las formas hemorrágicas más graves (FHD/SCD). Durante las epidemias, las tasas de ataque pueden llegar a afectar a 80-90% de las personas susceptibles y la letalidad puede ser mayor de 5%, predominantemente en niños menores de 15 años de edad (1, 4, 11-13). Aunque esta enfermedad ocurre principalmente en el continente asiático, la región de las Américas no ha estado exenta de una situación similar. Países

como Brasil, Venezuela, Costa Rica, Honduras, El Salvador, Perú, Guatemala, Bolivia, Colombia, México y Puerto Rico han estado especialmente afectados por epidemias causadas por DENV (12).

A pesar de las graves consecuencias que puede ocasionar las infecciones por DENV, no se conoce con exactitud el mecanismo inmunopatológico que se desarrolla después de la infección por el virus, particularmente por la falta de un modelo animal adecuado que permita reproducir la enfermedad (14). Sin embargo, se han descrito varias hipótesis para tratar de explicar porque algunos pacientes desarrollan las formas hemorrágicas, mientras que otros exhiben presentaciones relativamente benignas (3, 7, 14-22).

Las manifestaciones clínicas de las formas más graves (FHD/SCD) incluyen extravasación de plasma y hemorragias (4, 23). En casos fatales, el examen histológico de los vasos sanguíneos no revela ninguna destrucción del endotelio vascular, lo que sugiere que tal extravasación plasmática podría ser causada por una alteración funcional, más que anatómica (1, 14). Este hecho ha permitido sugerir que las citocinas pudieran tener un importante papel en la inmunopatogénesis de las infecciones por DENV y su progresión hacia las formas severas (14). En este sentido, existen evidencias que demuestran la presencia de un cambio que va desde una respuesta de tipo T_H1 observada en casos de FD hasta la de tipo T_H2 en casos severos de FHD/SCD (7, 18, 24, 25). La respuesta de tipo T_H1 está relacionada con la defensa mediada por los fagocitos y linfocitos T citolíticos $CD8^+$, frente a las infecciones, especialmente las ocasionadas por microorganismos intracelulares (26, 27).

Una característica común de estas infecciones, entre las que figura la causada por DENV, es la producción de interleuquina-12 (IL-12) por parte de los fagocitos mononucleares y las células dendríticas (28, 29). Una de las funciones más importantes de la IL-12 es la inducción de interferón gamma (IFN- γ) en diferentes tipos de células, tales como las células NK, el cual es un mediador en la resistencia antiviral y otros microorganismos (26, 27). Niveles séricos elevados de IL-12 se han detectado en pacientes con FD en contraste con aquellos que exhiben formas hemorrágicas más severas (7, 18, 24, 25, 30, 31). Esta citocina es considerada como el principal factor de diferenciación de las células T $CD4^+$ en células T_H1 y ejerce un marcado efecto regulatorio sobre el nivel de estas células y las citocinas secretadas por esta población linfoide. Asimismo, la ausencia o niveles disminuidos de IL-12 favorece la producción de citocinas del tipo T_H2 (26, 27, 32) y ha sido observado en diferentes modelos experimentales que la producción endógena de IL-12 es requerida para el control de infecciones ocasionadas por virus y otros microorganismos, así como el desarrollo y mantenimiento de un estado de inmunidad dirigida por células T_H1 y mediada a través de la activación macrofágica (32).

Con base a la función que desempeña IL-12 como factor de diferenciación de células T_H1 y su rol en las infecciones por DENV, este trabajo presenta la asociación de la concentración sérica de esta citocina con la presentación clínica de la enfermedad, lo que podría sugerir el uso de IL-12 como uno de los marcadores de progresión hacia la severidad o no de las infecciones por DENV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suero. Se examinaron 17 muestras de pacientes sospechosos de padecer infecciones por DENV captados durante el año 2002 en el marco del sistema de vigilancia proactiva epidemiológica del dengue y que fueron referidas al Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV) para la confirmación de infección por DENV a través de las técnicas de aislamiento e identificación viral y/o Transcriptasa Reversa Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Cada una de las muestras se acompañó de una ficha clínico-epidemiológica que permitió realizar la clasificación de casos según los criterios por la OMS/OPS.

En este estudio ocho de los casos correspondieron a FD y nueve a FHD. Como grupo control de pacientes sanos se incluyeron 10 muestras séricas procedentes de individuos de ambos sexos, de edad promedio $9,7 \pm 0,46$ años (rango: 9-10) que no presentaron antecedentes de fiebre o enfermedad durante los tres meses previos al inicio del presente trabajo. Estos pacientes fueron negativos a los ensayos MAC-ELISA y GAC-ELISA, empleados para la detección de IgM e IgG específica contra DENV.

Determinación de IL-12. Se realizó a través de un inmunoensayo enzimático (EH2IL12T; Pierce, Endogen, USA; sensibilidad <5 pg/mL) basado en el uso de doble anticuerpo modificado y el sistema biotina-streptavidina. Siguiendo las instrucciones del fabricante se emplearon microplacas de poliestireno recubiertas de un anticuerpo monoclonal anti-IL-12 humana. Brevemente, se distribuyeron por duplicado 50 μ L de las muestras de suero (pacientes y controles) y de los patrones de referencia de IL-12 a concentraciones de 1000 pg/mL, 400 pg/mL, 160 pg/mL, 64 pg/mL, 25,6 pg/mL y 0 pg/mL. Luego, se colocaron en cada uno de los pocillos de la placa, 100 μ L de un anticuerpo policlonal anti-IL-12 biotinilado para incubarla a temperatura ambiente (TA) durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con una solución tampón, para luego agregar 100 μ L de una solución de streptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante y se incubó nuevamente durante 30 minutos a TA. Seguidamente, se realizaron tres lavados con la solución tampón para revelar la reacción enzimática con 100 μ L de una solución cromogénica de tetrametil bencidina. Las placas fueron de nuevo incubadas bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura mencionadas, pero colocándolas en oscuridad. La reacción fue detenida con 100 μ L de solución de ácido sulfúrico 0.18 M. La lectura de las densidades ópticas se realizó a 450 nm con el uso del equipo Multiskan Ascent V1-24 (Labsystems, USA) que incluye un programa (Ascent versión 24.2) para la determinación cuantitativa de IL-12. El programa realizó la construcción de una curva de calibración que permitió conocer las concentraciones de IL-12 de cada uno de los pacientes.

Análisis estadístico. El promedio de la concentración sérica de IL-12 obtenido de los sueros controles más tres desviaciones estándar definió el valor de corte para reportar las muestras desconocidas de suero como positivos ó negativos. En la parte analítica o inferencial se utilizó la prueba de hipótesis que permite comparar promedios para muestras pequeñas, a través de la distribución *t*-Student con un α igual a 0.05 (33).

RESULTADOS

Se determinó la concentración sérica promedio de IL-12 en las muestras correspondientes a los pacientes positivos a DENV y los sueros controles. Al calcular el promedio de la concentración de IL-12 para ambos grupos, se obtuvo que los infectados con DENV mostraron una media de $148,9 \pm 121,2$ pg/mL (rango: 457,3-20,2 pg/mL), mientras que los individuos controles presentaron niveles séricos de la citocina de $63,6 \pm 22$ pg/mL (rango: 93,9-34,2 pg/mL). Estos valores hicieron posible estimar una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($t=3,0620$; $p<0,001$), lo que permitió demostrar que IL-12 se encontraba presente en valores superiores en los pacientes infectados con el virus, sugiriendo una activación de la respuesta inmune celular. Una vez calculado el punto de corte (129,7 pg/mL) fueron considerados positivos todos aquellos pacientes cuyas concentraciones de IL-12 sérica estuvieron por encima del valor mencionado. Este hecho permitió determinar que 41,1% (7 de 17) de los pacientes con dengue fueron positivos a IL-12, mientras que en los controles ninguno de los sueros mostró valores por encima del punto de corte, considerando de este modo su negatividad para la citocina IL-12.

La Figura 1 permite observar la distribución de los valores individuales de concentración sérica de IL-12 para ambos grupos, en relación al valor de corte. Al respecto, se evidencia que 58,8% de los pacientes con dengue (10/17) mostraron concentraciones de IL-12 (rango: 114,8-20,2 pg/mL) por debajo del valor de corte, confirmando la negatividad antes referida.

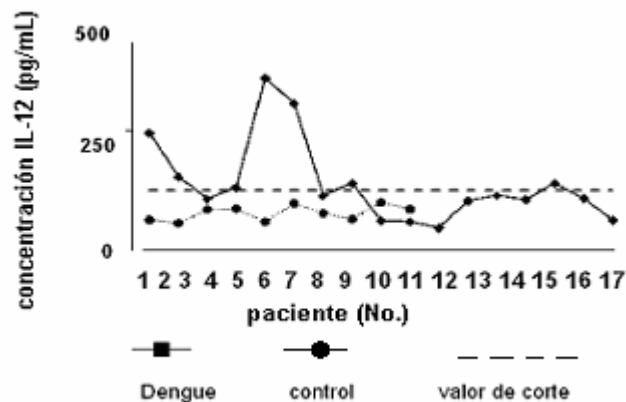


Figura 1. Niveles séricos de IL-12 correspondiente a cada uno de los pacientes con Dengue y grupo control. Punto de corte: 129,7 pg/mL

En la Figura 2 se presenta la concentración sérica promedio de IL-12 en los pacientes con dengue, distribuidos según la presentación clínica de la enfermedad (FD y/o FHD) así como en los individuos correspondientes al grupo control de personas sanas.

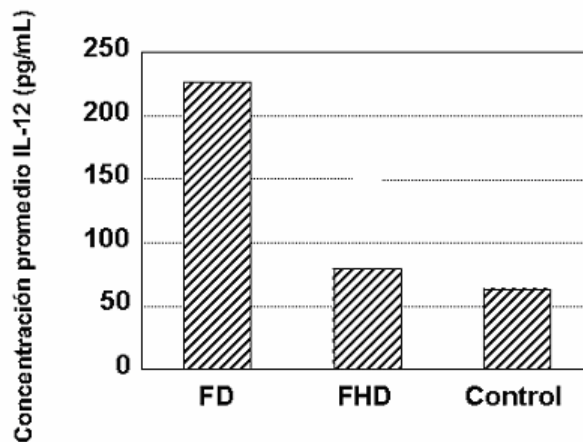


Figura 2. Valores promedio de las concentraciones séricas de IL-12 en pacientes que exhibieron diferentes presentaciones clínicas de la enfermedad. Fiebre del Dengue (FD), Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) e individuos controles

Es interesante destacar las diferencias observadas en los valores de IL-12, ya que los pacientes clasificados clínicamente como FD exhibieron valores promedio superiores de IL-12 ($226,8 \pm 134,9$; rango: 457,3-104,8 pg/mL), mientras que los pacientes con FHD mostraron valores inferiores ($79,6 \pm 44,5$; rango: 150,4-20,2 pg/mL) y cercanos a los correspondientes al grupo control. Al realizar el análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student se observaron diferencias estadísticamente significativas ($t=2,9780$; $p<0,001$) entre los pacientes con FD y FHD, así como las mostradas entre los pacientes con FD y los controles ($t=3,2831$; $p<0,001$). Sin embargo, entre los pacientes con FHD y los controles no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($t=1,2086$; $p<0,1$). El establecimiento de estas diferencias entre los pacientes con FD y FHD, respecto a las concentraciones de IL-12 sugiere la importancia de su determinación lo más precozmente posible a partir del inicio de los síntomas.

Por otra parte, se determinó la frecuencia de positividad para IL-12 de los pacientes que exhibieron FD y FHD. La Figura 3 muestra que 75% de los pacientes con FD fueron positivos, mientras que en solo 11,1% de los pacientes con FHD se detectó IL-12 por encima del punto de corte.

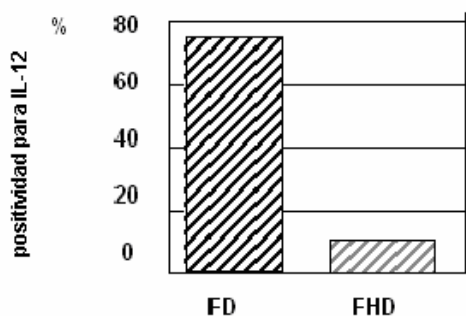


Figura 3. Frecuencia de positividad para IL-12 sérica en pacientes con Fiebre del Dengue (FD) y pacientes con Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD)

La Figura 4 permite evidenciar que solo dos (25%) de los pacientes clasificados como FD presentaron concentraciones (104,7 y 114,6 pg/mL) inferiores al valor de corte, mientras que ocho (88,8%) de los pacientes con FHD mostraron valores (rango: 114,8-20,2 pg/mL) por debajo del valor de corte. Se observa claramente una tendencia de acercamiento en cuanto a los valores de IL-12 entre los pacientes con FHD y los individuos controles.

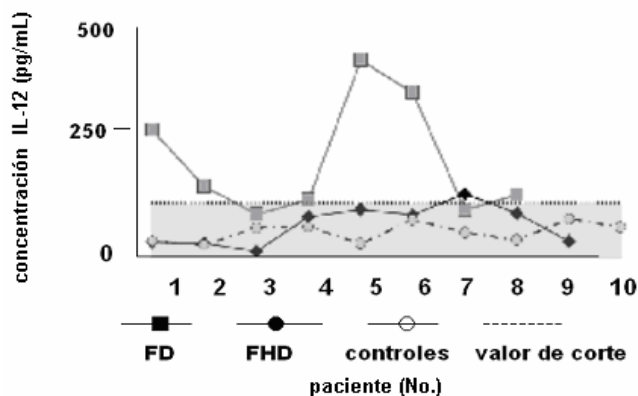


Figura 4. Niveles séricos individuales de IL-12 en pacientes con Fiebre del Dengue (FD), pacientes con Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) e individuos controles.

En relación a este hecho, se procedió a determinar la concentración sérica promedio de IL-12 de acuerdo a los días post-infección en los pacientes con FD con el fin de determinar su posible variación de acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad.

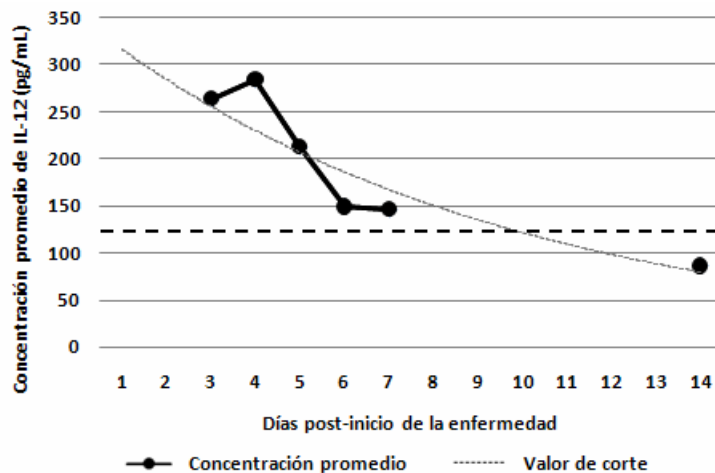


Figura 5. Concentraciones séricas promedio de IL-12 en pacientes con FD distribuidas según el tiempo post-inicio de la enfermedad.

En este sentido, la Figura 5 sugiere que los valores en la concentración de IL-12 muestran una tendencia a la disminución en la medida que ocurre la evolución del cuadro de FD. Así, en el tercer día se encontró una concentración

promedio de IL-12 de $263,7 \pm 111,6$ pg/mL, al cuarto día $284,2 \pm 136,4$ pg/mL, al quinto día $213,1 \pm 70,2$ pg/mL, al sexto día $148,6 \pm 47,8$ pg/mL, al séptimo día $146,6 \pm 51,2$ pg/mL y al décimo cuarto día $86,0 \pm 18,0$ pg/mL. Cabe destacar, que los niveles séricos promedio de IL-12 obtenidos hasta el día 7 fueron superiores al valor de corte y sólo el hallado en el día 14 se encontró por debajo del valor en referencia. Estos resultados demuestran como a medida que los pacientes entran en el proceso de curación va cediendo la respuesta inmune celular y en consecuencia disminuyen los valores de las citocinas, en este caso de IL-12. Los mismos destacan la importancia, no solo de considerar la determinación de IL-12 para la diferenciación de los cuadros clínicos, sino que su detección se realice precozmente luego del inicio de los síntomas.

DISCUSIÓN

Las infecciones por DENV inducen un amplio rango de manifestaciones clínicas, entre las que se incluyen formas severas de FHD/SCD. Los aspectos que determinan el desarrollo hacia FHD han sido parcialmente identificados (3, 7, 14-22). Entre estos, se encuentran la producción de citocinas, las cuales influyen de manera determinante en el desarrollo de la respuesta inmune en los casos de dengue. Con respecto a IL-12, se observó en este estudio que las personas padeciendo de FD presentan concentraciones séricas de esta citocina significativamente superiores a la encontrada en aquellas con FHD y en individuos controles sanos que no presentaron antecedentes de fiebre o de enfermedad durante los tres meses previos al inicio del presente trabajo y fueron seronegativos para la detección de IgM e IgG específica para DENV. Asimismo, el porcentaje de muestras positivas para IL-12 sérica fue superior en las obtenidas de los pacientes con FD que en las procedentes de los pacientes con FHD.

La observación citada, concuerda con los resultados obtenidos en un estudio previo realizado en la India (30), en donde se reportó que los niveles séricos de IL-12 en pacientes con FD ($n=16$; 270 ± 102 pg/mL) fueron significativamente superiores a los hallados en pacientes con FHD Grado I ($p < 0,05$) ($n=10$; 198 ± 86 pg/mL) y con FHD Grado II ($p < 0,001$) ($n=24$; 84 ± 52 pg/mL). Además, el porcentaje de positividad (70%) para las muestras de suero de los pacientes con FD, fue superior al exhibido por las muestras obtenidas de pacientes con FHD Grado I (40%) y Grado II (28%). Cabe destacar, que en el estudio en referencia no se encontraron muestras de suero positivas para IL-12 en personas sufriendo de FHD Grado III y IV. En concordancia con estos hallazgos, este grupo de investigadores detectaron mediante RT-PCR la presencia de ARNm específico de IL-12 en células mononucleares de sangre periférica procedentes de pacientes con FD y en aquellos con FHD Grado I y II, pero no en las células mononucleares derivadas de pacientes padeciendo de FHD Grado III y IV.

Los hallazgos obtenidos en este trabajo entran en concordancia con lo reportado en una investigación desarrollada en Tailandia (34), en la que se determinó el efecto regulatorio de la infección de células monocíticas humanas THP-1 por DENV sobre diferentes citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, encontrándose que la infección viral facilitada a través de la presencia de anticuerpos anti-DENV y la expresión del receptor de membrana

para el fragmento Fc de la IgG en la línea celular mencionada, ocasionó supresión de la transcripción y transducción de IL-12, IFN- γ y el factor de necrosis tumoral (FNT- α) y facilitó la expresión y síntesis de IL-6 e IL-10. Asimismo, se inhibió la síntesis de radicales de óxido nítrico, el cual es un mediador innato de la infección por DENV (35). Los resultados obtenidos permitieron concluir que el mecanismo de infección viral facilitada por la pre-existencia de anticuerpos anti-DENV no solo promueve la infección *per se* sino también modifica mecanismos antivirales innatos y adaptativos que resultan en un incremento de la replicación viral que serían punto desencadenante hacia las formas hemorrágicas de la infección por DENV.

En contraste a lo observado en esta investigación, figura un estudio realizado en Cuba (36) en donde se determinó los niveles séricos de IL-12 en pacientes con FD, clasificados mediante criterios de laboratorio en aquellos con infección primaria (FD1) e infección secundaria (FD2), y pacientes padeciendo FHD. Las muestras fueron extraídas en tres intervalos de tiempo. En este sentido, la primera determinación se realizó 1-3 días post-inicio del estado febril, mientras que la segunda y tercera extracción se realizaron 4-5 y ≥ 6 días después del inicio de la enfermedad respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración promedio de IL-12 fue superior en los pacientes con dengue que en los individuos controles, aunque las diferencias encontradas con respecto a la concentración de esta citocina entre los pacientes con FD o FHD y entre éstos y los controles no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, 28,6% de los pacientes con FD exhibieron las más altas concentraciones de IL-12. Asimismo, únicamente los pacientes con FD2 y específicamente en las muestras extraídas 1-3 días post-inicio del estado febril, presentaron niveles de la citocina en referencia significativamente más elevados que los controles y mayores que aquellos con FHD. Probablemente, la disparidad entre ambos estudios sea consecuencia de diferencias con respecto al tiempo transcurrido post-inicio de la enfermedad y la extracción de la muestra de suero para su posterior análisis, particularmente en aquellos pacientes con FD. Adicionalmente, diferencias en relación al grado de severidad de los pacientes con FHD incluidos en ambas investigaciones, podrían tener influencia en la disparidad antes mencionada.

Los resultados obtenidos en esta investigación parecen insinuar que la concentración de IL-12 en los pacientes con FD, alcanza niveles séricos altos entre los días 3 y 5 post-inicio de la enfermedad y disminuyen en la medida que evoluciona la misma, manteniéndose los niveles de la citocina por encima del valor de corte por un período de la enfermedad que oscila entre 6 a 7 días posteriores al inicio del estado febril.

Lo citado encuentra soporte en los hallazgos de la investigación antes referida (30), ya que en la misma se encontró que los niveles máximos de IL-12 fueron detectados durante los primeros cuatro días después que se inició el estado febril, a partir de los cuáles se observó una declinación de la concentración sérica hasta el día 9, en la que no se detectó ningún suero positivo para IL-12. Cabe destacar, que en la mencionada investigación no se discriminó entre los sueros procedentes de pacientes con FD de aquellos con FHD.

La observación citada podría ser un indicio de que esta citocina posiblemente tendría un efecto protector para el paciente con FD. Si este es el caso, se podría asomar la posibilidad que IL-12 pueda utilizarse como marcador serológico predictivo de la evolución clínica de pacientes infectados con DENV. En caso que esto sea así, la determinación seriada de la concentración sérica de la citocina en referencia, podría ser útil para los pacientes con dengue, ya que se dispondría de un posible indicador serológico cuyos niveles altos en la etapa aguda de la enfermedad orientaría a que el paciente evolucionara hacia un cuadro benigno no hemorrágico. Lo mencionado, en conjunto con los criterios clínicos, de laboratorio y epidemiológicos ayudaría en el manejo de los casos de dengue.

AGRADECIMIENTOS. Los autores desean expresar su agradecimiento a la Prof^a. Mait Velásquez (Instituto BIOMED-UC) por su asesoría en el procesamiento de las muestras a través de la técnica de inmunoensayo enzimático. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), la Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología en el Estado Aragua (FUNDACITE-ARAGUA) y la Cámara Venezolana de Fabricantes de Cerveza (CAVEFACE).

BIBLIOGRAFIA

1. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev 1998; 11(3): 480-496.
2. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, west Nile and dengue viruses. Nat Med 2004; 10: 98-109.
3. Rothman, A. Viral pathogenesis of dengue infections. En: Gubler D, Kuno G, editores. Dengue and dengue hemorrhagic fever, CAB International. New York (USA) 1997; p.245-272.
4. Rigau-Pérez J, Clark G, Gubler D, Reiter P, Sanders E, Vorndam A. Dengue and dengue haemorrhagic fever. The Lancet 1998; 352: 971-977.
5. Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. J Exp Med 2003; 197: 823-829.
6. Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. Arch Virol 2004; 149: 915-927.
7. Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. Macrophage & dengue virus: friend or foe?. Indian J Med Res 2006; 124: 23-40.
8. Luplertlop N, Missé D, Bray D, Deleuze V, González JP, Leardkamolkarn V, Yssel H, Veas F. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. EMBO Rep 2006; 7(11): 1176-1181.
9. Peyrefitte CN, Pastorino B, Grau GE, Lou J, Tolou H, Couissinier-Paris P. Dengue virus infection of human microvascular endothelial cells from different vascular beds promotes both common and specific functional changes. J Med Virol 2006; 78(2): 229-242.
10. Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WWS, Rose RC, Schlesinger JJ, Jin X. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. J Med Virol 2008; 80: 134-146.
11. Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. Lancet Infect Dis 2002; 2: 33-42.
12. Guzmán MG, García G, Kourí G. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. Rev Panam Salud Pública 2006; 19(3): 204-215.

13. Calisher CH, Persistent emergence of dengue. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 738-739.
14. Rothman A, Ennis F. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 1999; 257:1-6.
15. Kurane I, Ennis F. Immunopathogenesis of dengue virus infections. En: Gubler D, Kuno G, editores. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, CAB International. New York (USA) 1997; p.273-290.
16. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulate by different cell types and viral strains. *J Virol* 2000; 74: 7814-7823.
17. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000; 181: 2-9.
18. Chaturvedi U, Agarwal R, Elbishbishi E, Mustafa A. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 28: 183-188.
19. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* 2001; 8(5): 377-388.
20. Pang T, Cardosa MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 43-45.
21. Sierra B, Kouri G, Guzman MG. Race: a risk factor for dengue haemorrhagic fever. *Arch Virol* 2007; 152: 533-542.
22. Noisakran S, Perng G. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med* 2008; 233: 401-408.
23. George R, Lum L. Clinical spectrum of dengue infection. En: Gubler D, Kuno G, editores. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, CAB International. New York (USA) 1997; p. 89-113.
24. Chaturvedi U, Raghupathy R, Pacsa A, Elbishbishi E, Agarwal R, Nagar R, Misra A, Kapoor S, Mathur A, Khan M, Azizeih F. Shift from a th1-type response to th2-type in dengue haemorrhagic fever. *J Curr Sci* 1999; 76: 63-69.
25. Chaturvedi U, Agarwal R, Elbishbishi E, Raghupathy R, Nagar R, Tandon R, Younis O, Azizeih F. Sequential production o f cytokines by dengue virus infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol* 1999; 59: 335-340.
26. Sánchez de la Rosa R, Sánchez de la Rosa E, Rodríguez N. (2001). Interleucina-12 vs. enfermedades infecciosas. *Rev Cubana Med* 2001; 40(2):118-121.
27. Abbas A, Lichtman A y Pillai S. Mecanismos efectores de la Inmunidad celular. En: *Inmunología celular y molecular*. 6ta ed. Editorial Elsevier, Barcelona (España) 2008; p.303-320.
28. Libraty D, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy T, Ennis F. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J. Virol* 2001; 75(8): 3501- 3508.
29. Chen Y, Wang S. 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(19): 9877-9887.
30. Pacsa A, Agarwal R, Elbishbishi E, Chaturvedi U, Nagar R, Mustafa A. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 20: 151-155.
31. Sellahewa KH. Dengue fever—predictors of disease severity and their influence on management. *Ceylon Med J* 2008; 53(3): 75-78.
32. Romani L, Puccetti P, Bistoni F. Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(4): 611-636.
33. Swinscow TDV. The *t* tests. En: *British Medical Association, editores. Statistics at square one*. 3ra. ed. Dawson & Goodall Ltd. Londres (Inglaterra) 1978; p.33-42.

34. 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 cytokines production, in THP-1 cells. *J General Virol* 2007; 88:365-375.
35. Charnsilpa W, Takhampunya R, Endy T, Mammen Jr M, Libraty D, Ubol S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. *J Med Virol* 2005; 77(1): 89-95.
36. Pérez A, García G, Sierra B, Alvarez M, Vázquez S, Cabrera M, Rodríguez R, Rosario D, Martínez E, Denny T, Guzmán M. IL-10 levels in dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J Med Virol* 2004; 73: 230-234.