

**Sistema General de Regalías
Regalías para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación**

**Proyecto 5
“Caracterización inmunopatológica de los órganos blanco en pacientes con
dengue grave fatal.”**

**Programa
“AEDES - Abordando áreas endémicas de dengue para la disminución de su
impacto en la sociedad”**

Investigador principal: ANILZA BONELO¹

**Coinvestigadores: BEATRIZ PARRA¹
LYDA ELENA OSORIO¹
JULIO CESAR MANTILLA²
EDGAR PARRA³**

Consultor Internacional: CARLOS ALBERTO PARDO VILLAMIZAR⁴

¹ Universidad del Valle

² Universidad Industrial de Santander.

³ Instituto Nacional de Salud

⁴ Universidad de Johns Hopkins

TABLA DE CONTENIDO

1. TITULO	3
2. RESUMEN EJECUTIVO.....	3
3. PALABRAS CLAVE.....	5
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O NECESIDAD	6
5. JUSTIFICACION	7
6. OBJETIVOS	8
7. MARCOS DE REFERENCIA.....	9
8. ANALISIS SITUACIONAL DE LA TEMATICA DEL PROGRAMA.....	13
9. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y/O AREA TERRITORIAL BENEFICIADA	15
10. METODOLOGIA.....	15
11. PRODUCTOS.....	19
12. RESULTADOS	19
13. IMPACTOS.....	21
14. COBERTURA / LUGARES DE EJECUCIÓN	21
15. CRONOGRAMA POR FASES	21
16. POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES	22
17. BIBLIOGRAFIA.....	22

1. TITULO

Programa: "AEDES - Abordando Áreas Endémicas de Dengue para la disminución de su impacto en la Sociedad"

Proyecto: "Caracterización inmunopatológica de los órganos blanco en pacientes con dengue grave fatal"

2. RESUMEN EJECUTIVO

La enfermedad por virus dengue es un problema importante de salud pública a nivel mundial. En el 2010 Colombia experimentó una epidemia que se extendió a varias regiones del país y a la semana epidemiológica 52 se notificaron 157.152 casos totales de dengue 147.670 (94%) casos de dengue y 9.482 (6%) de dengue grave. Se confirmaron 217 muertes para una letalidad del 2,28 %. Hasta la semana 52 de 2011 se notificaron 32755 casos de dengue, de los cuales 1383 correspondieron a dengue grave y 31372 a dengue. Se notificaron, 203 muertes por dengue, 42 de ellas confirmadas, para una letalidad de 3,04%. Los departamentos que mostraron mayor número de casos (66% del total del país) fueron: Norte de Santander, Meta, Valle del Cauca, Santander, Tolima, Antioquia, Huila, Cesar, Sucre y Quindío

Hasta la semana 9 de 2012 se han notificado 8495 casos de dengue, de los cuales 322 corresponden a dengue grave y 8173 a dengue. Se han notificado 51 muertes probables por dengue, de las cuales ocho han sido confirmadas. La letalidad por dengue grave para Colombia esta semana es de 2,48 %, este indicador se calcula con las muertes confirmadas por laboratorio. Los departamentos que muestran mayor número de casos (70 % del total del país) hasta la semana 9 de 2012 son: Huila (15%), Meta (11%), Valle del Cauca (8%), Caquetá (8%), Tolima (7%), Norte de Santander (6%), Santander (5%), Antioquia (4%), Casanare (4%) y Córdoba (4%) La tendencia durante el presente año ha sido hacia el aumento de casos desde la zona de alerta a la de epidemia (Sivigila, INS 2010, 2011,2012). La letalidad por dengue en el país en los últimos 3 años ha sobrepasado el máximo tolerado para esta patología que es del 2%, lo que podría estar reflejando problemas de calidad de atención en el paciente con dengue o al desconocimiento de las causas de la muerte en estos pacientes. En los departamentos donde se va a realizar el estudio está concentrado el mayor índice de letalidad.

Es llamativa la creciente incidencia de manifestaciones clínicas atípicas como miocarditis, disfunción hepática y alteraciones del sistema nervioso central. La gravedad del dengue ha sido atribuida a varios factores incluidos la virulencia del serotipo viral, la influencia del ambiente en el vector, la hiperendemicidad de la enfermedad y la magnitud de la respuesta inmunopatológica. Sin embargo, se requiere mayor evidencia para comprender los determinantes de estas complicaciones del dengue severo, que se acompañan de alta letalidad. El presente estudio busca caracterizar los procesos inmunopatogénicos presentes en los órganos comprometidos, el tropismo viral, así como también la potencial

asociación de la coinfección microbiana en casos fatales por dengue. La coinfección del virus dengue con microorganismos como *Leptospira*, hantavirus y malaria entre otros se ha descrito en la literatura particularmente en momentos de brotes epidémicos asociados a una mayor gravedad de la enfermedad.

Consecuentemente, el propósito de este estudio será aportar al conocimiento de la fisiopatología e inmunopatología del dengue grave y los factores y/o mecanismos patogénicos que impactan su morbi-mortalidad. Para ello, se utilizarán muestras de tejidos de hígado, corazón, cerebro, riñón, pulmón, bazo y nódulos linfáticos, fijados previamente en formalina y preservados en bloques de parafina provenientes de necropsias obtenidas en 30 pacientes del Valle del Cauca y Santander que fallecieron con diagnóstico confirmado de dengue grave y sin comorbilidad clínica aparente. Para evaluar las características de los procesos inmunopatológicos se usarán métodos de inmunocitoquímica y microscopia confocal-laser que permitirá caracterizar la respuesta inmune celular y determinar la magnitud de la infiltración por linfocitos, NK, NKT y monocitos. La caracterización de la respuesta por inmunoglobulinas y complemento en los tejidos se realizará también por inmunocitoquímica. Para la detección de los antígenos microbianos se utilizarán anticuerpos primarios anti-dengue, anti-leptospira, anti-influenza y anti-hantavirus o tinciones específicas para microscopia de luz que permitan visualizar los microorganismos.

Se utilizarán estudios morfológicos y de inmunocitoquímica para cuantificar y determinar la relación de los antígenos virales con otros microorganismos, la asociación con diferentes poblaciones celulares y reacciones inmunopatológicas en los diferentes órganos blanco. Un análisis cuantitativo del infiltrado celular inmune en áreas de daño tisular se hará con técnicas estereológicas cuantitativas no sesgadas, que permitirá la evaluación de la magnitud de las reacciones inmunopatológicas y su correlación con los estadios del daño tisular.

Con los resultados del presente estudio se propone generar nuevo conocimiento al: a) caracterizar el tropismo del virus dengue y la influencia de la respuesta inmunopatogénica en el dengue fatal, b) determinar si los LTCD8⁺LTCD4⁺ dobles positivos, encontrados recientemente por nuestro grupo en la sangre de enfermos por dengue forman parte de los mecanismos patogénicos tisulares del dengue grave, y; c) obtener evidencia sobre la co-infección entre el virus dengue y *Leptospira* y/o Hantavirus y/o malaria y/o influenza, microorganismos con los cuales se debe hacer diagnóstico clínico diferencial. Esto permitirá generar hipótesis sobre si la co-infección contribuye a un incremento en morbi-mortalidad en pacientes con dengue.

ABSTRACT

Dengue, a viral infectious disorder transmitted by the mosquitoes of the genus *Aedes*, is currently one of the major public health problems around the world. Currently, Colombia undergoes one of the major epidemics of dengue in the Americas and approximately 138,951 new cases had been recorded in the first 38 epidemiological weeks of 2010. Among these patients, 8925 (6.4%) suffered severe forms of the disease in which 174 died. The growing epidemic of dengue and the estimated mortality of 1.25 x 1000 patients affected during such period reflect the seriousness of the public health problem generated by dengue in Colombia. The increasing incidence of atypical forms of dengue and

evidence of multi-system complications such as myocarditis, liver dysfunction and abnormalities in the central nervous system has magnified the burden of the epidemic. The severity of dengue has been associated with several factors that include virulence of the virus serotype, environmental influences on vector expansion, hyperendemicity of the disease and the magnitude of the host immunological response. However, the factors that determine the magnitude of the clinical complications and mortality in cases of severe dengue remain unknown. Recent studies have suggested that co-infection of dengue with other microorganisms such as *Leptospira*, hantavirus and malaria may contribute to a greater severity during epidemic outbreaks. The overall goal of this proposal is to characterize the immunopathogenic mechanisms that influence the clinical phenotype and severity of dengue and the role dengue virus tropism and potential association with co-infections with other infectious agents may play in fatal cases of dengue. The central hypothesis of our proposal is that host immunological responses along with specific tissue viral tropism and co-infection with other infectious agents determine the severity and mortality in dengue. The specific aims of our proposal are:

To characterize the cellular tropism of dengue virus and determine its influence on immunopathogenic responses in the specificity of tissue damage,

To study whether LTCD8⁺LTCD4⁺ double positive cells, recently described by our group in blood of patients with dengue, play a role on the immunopathogenic mechanisms in severe dengue,

To determine whether co-infection with other infectious agents such as *Leptospira*, Hantavirus, malaria or influenza is associated with increased mortality in dengue.

To achieve our research goal and aims we designed an immunopathological study of tissues obtained at autopsy from 30 patients with dengue severe who died in the states of Valle and Santander. Tissues from liver, heart, kidney, lungs, spleen and lymph nodes will be used for immunopathological studies that will include histological, immunocytochemical and confocal laser microscopy studies to determine the profile of cellular and humoral immune responses. We will focus on characterization of the patterns of tissue infiltration by T and B lymphocytes, NK, NKT and monocyte cell responses along with immunoglobulin and complement deposition to investigate the role of host immune response in the pathogenic mechanisms that influence the clinical phenotype and disease severity. Immunopathology studies will also establish the profile of infection by dengue virus of specific cell populations within target organs and determine the possible co-localization with other infections such as *Leptospira*, influenza or Hantavirus. Unbiased morphological stereology quantitative techniques combined with immunocytochemistry will be used to assess the magnitude of immune responses and their association with dengue or other co-infective micro-organisms on the severity of tissue damage and organ pathology. The results of these studies will facilitate a better understanding of the immunopathogenic mechanisms associated with severe dengue and its complication. By clarifying the pathogenic mechanisms associated with severe dengue, we will provide knowledge that will make possible the design of therapeutic strategies in the management of complicated forms and the decrease of the burden of clinical problems that impact the society and quality of life in endemic areas.

3. PALABRAS CLAVE

Dengue, Inmunopatología, marcadores inmunológicos, tropismo

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O NECESIDAD

El dengue representa un problema importante de salud pública en los países tropicales y subtropicales del mundo. La enfermedad incluye un espectro amplio de manifestaciones clínicas agrupadas en tres categorías: fiebre dengue, dengue con signos de alarma y las formas severas que causan un incremento en la mortalidad especialmente durante los picos epidémicos. La fisiopatología del dengue grave, que incluye el síndrome de choque y el compromiso orgánico o multi-orgánico, no está definida con claridad. Reacciones inmunopatológicas a la infección viral, tropismo viral, virulencia de cepa o daño vascular son explicaciones posibles que son investigadas. Entender la patogénesis del dengue grave es crucial para el desarrollo de estrategias para un mejor manejo y tratamiento que eviten el riesgo de complicaciones y mortalidad.

Entre las preguntas más difíciles de responder en la patología del dengue grave están: cuales son los determinantes de susceptibilidad de los diferentes órganos afectados? y, como la magnitud de la respuesta inmunológica o el tropismo viral determinan el daño de los órganos blancos? Estas limitaciones de conocimiento son en parte debidas a la ausencia de un modelo animal de la enfermedad pero principalmente por la dificultad y limitaciones técnicas para realizar el análisis histopatológico de los casos fatales en la mayoría de países endémicos para dengue. Igualmente las dificultades en el diagnóstico confirmatorio, el acceso restringido a tecnologías (imagenología) que permita una mejor evaluación clínica ha dificultado la correlación clínico-patológica en los casos graves de dengue.

La información sobre los mecanismos patogénicos e inmunopatología del dengue fatal es muy limitada. La mayoría de la literatura publicada se limita a reporte de casos y los pocos estudios retrospectivos o de series de casos se han enfocado en la descripción histopatológica convencional de los órganos clínicamente comprometidos. Sin embargo, existe una evidencia creciente que las reacciones inmunopatológicas y el tropismo viral podrían explicar en parte la mortalidad asociada al dengue severo. Se ha demostrado por ejemplo, positividad a antígeno o genoma viral en el endotelio y tejidos del hígado, corazón y cerebro de casos fatales. Estos hallazgos sugieren que en un buen número de casos la infección directa de los tejidos podría explicar la fisiopatología de las alteraciones vasculares y el compromiso hepático tan frecuentes en dengue grave, o la patología de otras complicaciones menos comunes pero frecuentemente fatales como miocarditis y encefalitis por dengue.

Una de las observaciones interesantes por ejemplo, es que a pesar del compromiso hepático frecuente que se encuentra en dengue grave, hay un infiltrado inflamatorio mínimo, contrario a lo que se observa en otras hepatitis virales. Sin embargo hasta el presente, no se ha examinado la correlación entre inflamación vs la magnitud del daño tisular. Por el contrario, la falla renal aguda y la glomerulonefritis en dengue se han asociado con depósito de complejos inmunes y complemento en mesangio, además del daño glomerular secundario al choque, rabdomiolisis o sepsis. La encefalopatía en dengue, la complicación neurológica más frecuente, está asociada principalmente con edema cerebral y convulsiones. Al presente, no hay claridad si esta complicación es producida por un efecto neurotrópico directo del virus o es el resultado de desarreglos metabólicos, daño de la barrera hematoencefalica (BHE) o respuestas neuroinflamatorias que desencadenan la cascada de eventos que conducen a agravar la encefalopatía. A favor del efecto neurotrópico viral directa esta el hallazgo de la presencia de virus así como de IgM en el LCR. La presencia de pleiocitosis también sugiere que reacciones

inmunopatológicas o daño de la BHE están involucradas en la patogénesis de las complicaciones neurológicas. Sin embargo hasta el momento, no existe una descripción detallada y sistemática de la neuropatología del dengue. Uno de los retos de esta investigación es identificar en los órganos blanco los procesos inmunopatogenicos que en sangre se han asociado con rompimiento vascular y choque por dengue (Linfocitos T activados, citoquinas, complemento), así como establecer su asociación con el perfil clínico de los casos fatales.

Una explicación alterna a la mortalidad asociada al dengue severo y al compromiso multiorgánico cada vez más frecuente es la posible asociación con otros patógenos prevalentes en áreas endémicas para dengue. Por ejemplo, caso fatales o con alta morbilidad que evidencian infección dual con *Leptospira* o hantavirus se han descrito en la literatura. Sin embargo, también resulta probable que la sobre-infección con influenza en un paciente con dengue o la infección con dengue en un portador sano de hepatitis B o C aumente la gravedad o contribuya en parte a las manifestaciones inusuales pero frecuentemente fatales en dengue.

5. JUSTIFICACION

La patogénesis de las formas severas del dengue es compleja y aun no se ha identificado que tipo de alteraciones de tipo químico, hematológico e inmunológico contribuyen al sangrado excesivo y el aumento de la permeabilidad vascular. Se cree que estos cambios son el producto de la combinación de varios factores como: la replicación incrementada de virus; el aumento de la muerte celular por infección (apoptosis) o por efectos citotóxicos en células infectadas por parte de las células del sistema inmune; por la infección aumentada dependiente de anticuerpos (ADE), activación del complemento, activación de subgrupos de células T de memoria que fallan en su efecto citotóxico sobre células infectadas y por ultimo liberación incrementada de mediadores inflamatorios por las células infectadas o por células de la respuesta inmune (34).

En las infecciones secundarias hay mayor riesgo de desarrollar las formas severas del Dengue debido a que los anticuerpos no neutralizantes con reactividad cruzada, generados en una infección primaria, se unen al virus confiriéndole un mayor potencial para unirse al receptor Fc de las células blanco. Este fenómeno se conoce como aumento de la infección dependiente de anticuerpos (ADE) y potencialmente incrementa el número de células infectadas con el virus, induciendo una mayor carga viral, lo cual hace temer que una vacuna podría contribuir a incrementar la presentación de las formas severas de la enfermedad debido a la protección incompleta a uno o más serotipos y agravar la epidemiología del Dengue en zonas endémicas.

La respuesta celular inmune hace parte de los mecanismos de eliminación viral y potencialmente induce el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. Los LT de memoria activados reconocen tanto los epitopes conservados como los alterados y esto está implicado en el aumento de la permeabilidad vascular (23). La expresión de epitopes virales en la superficie de las células infectadas induce la proliferación de LT de memoria y la producción de citoquinas pro-inflamatorias que tienen un efecto indirecto en las células endoteliales resultando en la fuga del plasma. El nivel de respuesta de los LT se correlaciona con la severidad de la enfermedad. En las formas severas de la enfermedad

los LT que proliferan tienen una baja afinidad al serotipo actual y una mayor afinidad por los serotipos de infecciones pasadas, lo que se conoce como el pecado antigénico original.

El papel de las células reguladoras no está claro en Dengue, su papel se ha estudiado en las enfermedades infecciosas crónicas pero no en infecciones virales agudas. Sin embargo se ha podido demostrar que son funcionales y se expanden en las infecciones agudas por Dengue. Estas células podrían suprimir la producción de citoquinas vasoactivas involucradas en la severidad de la enfermedad, por lo tanto en las formas severas, la proliferación o función de estas células podría estar alterada.

En algunos individuos con infecciones secundarias, las cargas virales altas disparan la secreción de citoquinas y otras moléculas inflamatorias por los LT activados con reactividad cruzada. Este ambiente inflamatorio favorece la fuga capilar llevando a las formas severas de la enfermedad. Se ha demostrado también que niveles aumentados de IL-10 se correlaciona con trombocitopenia y disminución de la función plaquetaria. Esta condición aumentaría el riesgo de sangrado.

Los pacientes con Dengue severo presentan una disminución en los factores del complemento. Se ha descrito que la excesiva activación del complemento en las superficies endoteliales ayuda en la pérdida de plasma en las formas severas de la enfermedad. Además se cree que la proteína no estructural NS1 podría ser moduladora de la vía del complemento

En resumen, la fisiopatología del dengue grave, incluyendo el síndrome de choque y el compromiso orgánico o multiorgánico, no se ha definido claramente lo cual ha dificultado el desarrollo de agentes terapéuticos y vacunas para disminuir la morbi-mortalidad, por lo cual estudios conducentes a dilucidar las características de la patogénesis y fisiopatología constituyen uno de los retos actuales en la investigación del dengue.

Basado en lo anterior, el objetivo general de esta investigación es determinar los mecanismos inmunopatogenicos y características del tropismo viral en los órganos blanco afectados en los casos fatales y determinar si hay una correlación entre el perfil clínico y la magnitud y el fenotipo inflamatorio en los tejidos afectados. El estudio propuesto planea utilizar técnicas convencionales de inmunohistoquímica y microscopia confocal para generar evidencia que contribuya a esclarecer la inmunopatología del dengue grave con el propósito de impactar en un futuro el manejo y el diagnóstico oportuno del dengue grave.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar los mecanismos inmunopatológicos y el tropismo viral en los órganos afectados de pacientes fallecidos por infección grave con el virus dengue.

Objetivos Específicos

- Describir las características morfológicas e inmunopatológicas del daño tisular en los órganos asociados al dengue grave (hígado, corazón, cerebro, riñón y pulmón) en casos fatales de la enfermedad.

- Determinar el tropismo del virus dengue por órganos blanco y su correlación con la magnitud del daño tisular en tejidos de pacientes fallecidos por dengue grave.
- Examinar si existe la co-existencia del virus dengue con otras infecciones de alta incidencia en zonas epidémicas como *Leptospira*, malaria o hantavirus o influenza en tejidos de casos de dengue grave y factores de riesgo asociado a la doble infección

7. MARCOS DE REFERENCIA

El dengue como problema de salud pública:

El dengue es una enfermedad viral, de carácter endémo-epidémico, transmitida por mosquitos del género *Aedes* y la arbovirosis más importante a nivel mundial en términos de morbilidad, mortalidad e impacto económico (1). Unos 2,5 mil millones de personas (dos quintos de la población mundial) están a riesgo de contraer la enfermedad. La OMS calcula que cada año puede haber 50 millones de casos de dengue en todo el mundo. La incidencia mundial y extensión geográfica del dengue ha aumentado en forma dramática en las últimas décadas y en las Américas existe un incremento del dengue grave. A Diciembre de 2009, 36 países de las Américas habían reportado a la OPS/OMS los 4 serotipos del virus circulando, incluyendo 26 casos autóctonos de dengue en la Florida, 25 de los cuales fueron DEN-3.

En Colombia, aproximadamente 25 millones de personas habitan en zonas urbanas o periurbanas con transmisión de la enfermedad. En el 2010 Colombia experimentó una epidemia que se extendió a varias regiones del país y a la semana epidemiológica 52 se notificaron 157.152 casos totales de dengue 147.670 (94%) casos de dengue y 9.482 (6%) de dengue grave. Se confirmaron 217 muertes para una letalidad del 2,28 %. Hasta la semana 52 de 2011 se notificaron 32755 casos de dengue, de los cuales 1383 correspondieron a dengue grave y 31372 a dengue. Se notificaron, 203 muertes por dengue, 42 de ellas confirmadas, para una letalidad de 3,04%. Los departamentos que mostraron mayor número de casos (66% del total del país) fueron: Norte de Santander, Meta, Valle del Cauca, Santander, Tolima, Antioquia, Huila, Cesar, Sucre y Quindío. Hasta la semana 9 de 2012 se han notificado 8495 casos de dengue, de los cuales 322 corresponden a dengue grave y 8173 a dengue. Se han notificado 51 muertes probables por dengue, de las cuales ocho han sido confirmadas. La letalidad por dengue grave para Colombia esta semana es de 2,48 %. Los departamentos que muestran mayor número de casos (70 % del total del país) hasta la semana 9 de 2012 son: Huila (15%), Meta (11%), Valle del Cauca (8%), Caquetá (8%), Tolima (7%), Norte de Santander (6%), Santander (5%), Antioquia (4%), Casanare (4%) y Córdoba (4%) La tendencia durante el presente año ha sido hacia el aumento de casos desde la zona de alerta a la de epidemia (Sivigila, INS 2010, 2011,2012)

Patogénesis del dengue:

El virus dengue (VD) posee cuatro serotipos y la enfermedad es causada por cualquiera de los cuatro. Su periodo de incubación es alrededor de 7 días y la infección que causa el virus resulta en un espectro amplio de presentaciones clínicas que van desde las formas asintomáticas y subclínicas hasta cuadros muy graves con compromiso vascular, afección de diferentes órganos y sistemas que se asocian a mortalidad (3). La sintomatología clínica en dengue es variada, sin embargo entre los síntomas más frecuentes esta la

aparición súbita de fiebre con un patrón bifásico, cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgias, postración y erupción cutánea. Entre las formas graves se destacan las asociadas a daño vascular que conducen a choque hipovolémico, o hemorragias severas, y las que comprometen órganos blanco específicos tales como hepatitis, insuficiencia hepática, miocarditis o encefalopatía. (4). La disfunción hepática (de moderada a severa) se caracteriza por dolor en el hipocondrio derecho, astenia, adinamia e hiporexia, acompañada en ocasiones de ictericia y elevación de las enzimas hepáticas como la transaminasas, bilirrubinas y fosfatasa alcalina, cambios que pueden llegar tan altos como los encontrados en las hepatitis virales. Los cambios en las serosas se producen por aumento de la permeabilidad capilar y se caracteriza se evidencia por la presencia de derrames pleurales, pericardico y/o ascitis que pueden llevar a compromiso cardio-pulmonar de tipo restrictivo. El compromiso miocárdico puede producir trastornos de la conducción cardíaca y síntomas de falla cardíaca acompañados de elevación de enzimas cardíacas. A nivel pulmonar se puede presentar dificultad respiratoria secundaria a hemorragias pulmonares o síndrome de dificultad respiratoria agudo (SDRA). También se han reportado alteraciones neurológicas, principalmente del estado de conciencia que se atribuyen tanto a la descompensación hemodinámica sistémica, cambios metabólicos así como a un efecto directo del virus en el sistema nervioso central (4,5,6,7)

Estudios diferentes han abordado el tema de la fisiopatología del dengue grave incluyendo el síndrome de choque y el compromiso orgánico o multiorgánico, teniendo en cuenta las características epidemiológicas, clínicas, patológicas e inmunológicas de la infección. La mayoría de los estudios han llevado a plantear que en la patogénesis del dengue son importantes el tropismo viral, la virulencia de la cepa del virus, la activación del sistema del complemento, los fenómenos de hiperactividad del sistema inmune, el aumento de la infección dependiente de anticuerpos (ADE), la reactividad cruzada de los linfocitos T, la producción de factores solubles y los factores genéticos del hospedero (8). La evidencia científica y epidemiológica obtenida en niños del Sudeste asiático sugiere que el dengue grave resulta de reacciones inmunopatológicas inducidas por infecciones secundarias (9-13). La frecuencia de las complicaciones es más alta en infecciones secundarias que en infecciones primarias por VD, con un riesgo relativo de 15 para dengue grave y de 50-100 para choque por dengue durante infecciones secundarias (14-16). Un aumento de mediadores inmunológicos solubles en el plasma, tales como citoquinas o anafilotoxinas (11,17), o de marcadores de activación inmunológica en linfocitos T, asociado al daño vascular o el choque hipovolémico (13,17,18,19), sugiere que una activación inmunológica anormal o hiperactividad de células T de memoria contribuye a la patología del dengue severo (12,14). El modelo propuesto sugiere que durante una infección secundaria por VD el fenómeno de ADE o aumento de la infección de monocitos mediado por anticuerpos específicos (9,20), incrementa muy tempranamente el número de células presentadoras de antígeno infectadas, las cuales activan LT de memoria con reactividad cruzada (21-23). La activación rápida y aumentada de monocitos y LT induce la liberación de citoquinas inflamatorias y mediadores inmunológicos solubles algunos de ellos mediadores vasoactivos (IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-2R, sCD4, sCD8, hCF, IL-10, IL-8 e IL-13) que potencialmente causarían un incremento masivo en la permeabilidad capilar con extravasación del plasma y choque hipovolémico (11,13,23). Otro factor que parece contribuir a la patogénesis del dengue es la activación del sistema del complemento. Entre los componentes virales la proteína NS1 ha sido propuesta como un iniciador de la activación del complemento, ya sea en forma soluble o formando complejos con anticuerpos. Diferentes estudios han demostrado que

las subclases de IgG presentes en la respuesta inmune a dengue son las subclases IgG1 e IgG3, las cuales son excelentes activando la vía clásica del sistema del complemento. Esta activación conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-C9) que induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias u otros factores asociados con manifestaciones graves como el choque o la coagulación intravascular como también a la producción de anafilotoxinas (C3a, C5a). Estas anafilotoxinas se han encontrado aumentadas en el plasma de pacientes con dengue grave indicando niveles altos de activación del sistema del complemento (8, 24, 25), Sin embargo, el papel de este sistema en la patogénesis del dengue no es claro y debe ser investigado.

Adicionalmente, la proteína NS1 parece estar involucrado en la formación de complejos inmunes que se depositan en células del hígado, del endotelio y en plaquetas. El depósito de estos complejos en el endotelio puede inducir sobre producción de óxido nítrico que media daño celular e incremento de la permeabilidad característica del choque por dengue. También, se ha observado que los anticuerpos anti-NS1 reaccionan en forma cruzada con las plaquetas causando trombocitopenia transitoria y hemorragias en ratones indicando que estos anticuerpos están involucrados en la patogénesis del dengue (8, 26, 27). Sin embargo, no se conoce cuales son los antígenos propios blanco de los anticuerpos anti-dengue y su papel en la patogénesis. Conocer esta información es fundamental para el desarrollo de vacunas seguras.

La ausencia de un modelo animal de la enfermedad ha sido una limitante importante para entender el papel del tropismo en la patogénesis del dengue. Se ha identificado la presencia de antígeno o genoma viral en una variedad de tejidos como el endotelio, hígado, corazón, riñón, bazo y cerebro de casos fatales, pero los hallazgos en autopsias y estudios *in vitro* sugieren que el hígado, el endotelio y el sistema inmune son los órganos blanco que podrían tener importancia en la patogénesis del dengue grave. La presencia del virus ha sido demostrada en los hepatocitos y células de Kupffer, donde se observa apoptosis y necrosis pero poca inflamación sugiriendo que estas alteraciones son producidas por efectos citopáticos inducidos por el virus. Igualmente, se ha detectado aumento en los niveles de las enzimas hepáticas, sin embargo, el papel del daño hepático en la coagulopatía y severidad de la enfermedad no ha sido establecido. Además del compromiso vascular y hepático, un gran número de células del sistema inmune (células de Langerhans, monocitos, macrófagos) son infectadas por el virus, infección que está asociada a un incremento en la producción de mediadores que afectan la respuesta inflamatoria y hemostática del hospedero, cambios que contribuyen a las alteraciones descritas en la enfermedad por dengue. Se ha demostrado que la proteína NS1 se une a los endotelios de pulmón e hígado y que los anticuerpos anti-NS1 podrían contribuir a la fuga capilar pulmonar (8, 28, 29).

Además de las anomalías tisulares, la predisposición genética a desarrollar formas severas de la enfermedad por dengue se ha demostrado por la presencia de polimorfismos en diferentes genes como JAK1, TNF- α , receptor Fc- γ , TGF- β , CTLA-4, y MBL en poblaciones afectadas (30-33).

En este modelo de inmunopatogénesis de dengue grave no está aun claramente definido el papel protector y/o patológico de la respuesta inmune al virus (34-36), ni tampoco la contribución de estos factores inmunológicos o virales en las complicaciones asociadas al compromiso de ciertos órganos que resultan frecuentemente en mortalidad. La contribución de los componentes inmunológicos asociados a la fisiopatología del dengue grave necesita ser estudiado y confirmado mediante estudios clínicos en diferentes áreas endémicas y etnicidades y mediante el estudio cuidadoso de la inmunohistopatología de los casos fatales. El esclarecimiento de estos interrogantes es importante en el diseño de

estrategias de tratamiento y además brindaría información crucial para los estudios de vacunas en desarrollo, los cuales deberán evitar la estimulación de mecanismos inmunológicos que conduzcan a inmunopatología.

Estado del arte en la investigación

Las características histopatológicas del dengue grave no han sido estudiadas en detalle y se conoce muy poco acerca de la correlación clínico-patológica del dengue grave asociado a complicaciones en órganos. Sin embargo, varios de los estudios de la patología de dengue fatal asociado a síndrome de choque muestran la participación de respuestas inmunes y la infección viral en varios de los tejidos involucrados en los procesos fisiopatológicos. Por ejemplo, existe evidencia que el hígado es el órgano más frecuentemente afectado en dengue. Tanto la hepatomegalia como la disfunción hepática (hiperbilirrubinemia, ALS, AST y ALP) se asocian con la severidad de la enfermedad y la magnitud de sangrado en pacientes con dengue hemorrágico y choque (DHF/DSS), observaciones que sugieren que el daño hepatocelular es mediado por reacciones inmunológicas (37, 38). La histopatología del hígado en dengue fatal asociado a rompimiento vascular y choque, muestra necrosis centrilobular, esteatosis, hiperplasia de las células de Kupffer, cuerpos acidófilos e infiltrado monocitario abundante en el sistema portal (39,40).

El compromiso del SNC en dengue varía entre el 1 al 22% y las principales manifestaciones neurológicas son confusión mental y convulsiones (41,42). La encefalopatía es una complicación neurológica en el 0,5% de los casos, con mortalidad importante (aprox 20%), pero no hay claridad si esta complicación ocurre secundaria al compromiso multisistémico, desbalance metabólico o por infección viral directa del SNC y subsecuente desarrollo de encefalitis. Estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) en pacientes con encefalopatías muestran edema cerebral, cambios en sustancia blanca, necrosis y en ocasiones hemorragia (43). Los hallazgos neuropatológicos en casos de dengue hemorrágico muestran un infiltrado inflamatorio focal (linfocitos activados y monocitos), y una inmunoreactividad para antígeno de virus dengue en neuronas, astrocitos, microglia y endotelio capilar en estructuras del SNC que incluyen la médula y el cerebelo (44). En casos fatales de choque por dengue se encontró apoptosis sin infección de neuronas en la corteza cerebral, lo cual fue atribuido a la hipoxia e isquemia cerebral (45).

Las miocarditis y una disfunción cardíaca reversible hacen también parte de las complicaciones cardíacas del dengue principalmente en niños. Los hallazgos histopatológicos en casos fatales con miocarditis incluyen un infiltrado mononuclear mínimo con antígeno de VD en cardiomiocitos, células intersticiales y endoteliales cardíacas, hallazgos que sugieren un efecto directo de la infección viral en la patogénesis del daño cardíaco asociado a dengue severo (46,47,48,49).

El compromiso renal en dengue es poco frecuente y parece ser secundario a hipotensión u otras complicaciones como sepsis. Sin embargo, existen reportes de caso de falla renal aguda y glomerulonefritis con depósito de complejos inmunes, algunos de tipo IgA, con proliferación mesangial y necrosis tubular. Estos hallazgos sugieren que el daño renal asociado a dengue severo también puede tener un origen en reacciones inmunopatogénicas (50).

Alternativamente el compromiso de ciertos órganos y el daño endotelial en dengue también podría ser explicado por tropismo viral y virulencia de cepa, tal como se ha sugerido con los serotipos DEN 2 y DEN 3 en el SNC (51). Sin embargo existen muy pocos estudios que han examinado la presencia de antígeno viral en tejidos blanco. En casos fatales se ha detectado antígeno de dengue en hepatocitos de zonas necróticas, en

bazo, tejido linfoide, piel, corazón, cerebro, pulmón y riñón (49). Sin embargo todavía es controvertido si la positividad para antígeno en estos tejidos representa una replicación viral real dado que la detección del genoma de VD solo ha sido posible en las células del infiltrado inflamatorio o muy escasamente en las células del tejido blanco que exhibe necrosis o apoptosis (52,53). Por lo tanto se requieren estudios más detallados que permitan determinar el tropismo del virus dengue por los órganos afectados y su correlación con el perfil clínico de severidad.

En áreas endémicas para dengue, el virus usualmente co-circula con otros patógenos que causan síndromes febriles muy similares. También se han descrito en individuos inmunocompetentes, infecciones mixtas de dengue con *Leptospira* o con influenza o con hantavirus y que tienen una alta morbi-mortalidad (54,55,56). La similitud de las características clínicas de estos síndromes febriles dificulta la sospecha clínica y el diagnóstico de una infección dual. Además las coinfecciones podrían modificar el curso clínico y resultar en las formas clínicas graves inusuales (con disfunción a nivel de órganos) pero frecuentemente fatales del dengue. Examinar esta posibilidad en casos fatales permitiría formular nuevas hipótesis en la fisiopatología del dengue grave y justificaría estudios epidemiológicos y clínicos para medir el impacto de estas asociaciones microbianas en la morbi-mortalidad por dengue.

En el contexto de una nueva definición clínica del dengue en el 2010 y la actual evaluación de su aplicabilidad, la caracterización de las reacciones inmunopatológicas de dengue severo propuesta en este proyecto produciría nuevos conocimientos de los procesos inmunopatogénicos del dengue grave y permitiría examinar correlaciones de estos hallazgos con los nuevos marcadores clínicos de severidad.

8. ANALISIS SITUACIONAL DE LA TEMATICA DEL PROGRAMA

Prevención de la transmisión:

En Colombia existe una amplia distribución del vector en las áreas urbanas. Alrededor de 23 millones de colombianos residimos en uno de los 620 municipios colombianos situados por debajo de los 2.200 metros, donde el virus se transmite activamente. Adicionalmente, los métodos convencionales para el control del vector, han tenido un impacto bajo, lo que se ha visto reflejado en incremento de los casos de dengue en los últimos años y lo más preocupante en un aumento de la letalidad en el país, que entre el 2010 y el 2012 ha variado entre el 2,28% y 2,48%, sobrepasando el máximo tolerado para esta patología que es del 2%; De las 27 entidades territoriales con muertes por dengue el 77% (21) tienen letalidades muy superiores al 2% (2).

Junto al control del vector, el posible desarrollo de una vacuna efectiva y segura sería estratégica para la prevención de la enfermedad. Actualmente, se están desarrollando estudios para evaluar la eficacia y seguridad de diferentes candidatos a vacuna cuyos resultados podrían estar disponibles en los próximos 5 años. Sin embargo, no se ha definido claramente la fisiopatología del dengue grave, lo cual dificulta predecir si la respuesta inmune inducida por estas vacunas pueda contribuir a la inmunopatología del dengue grave.

- **Comprensión de la relación agente – huésped y patogenia del dengue**

Se requiere una mayor comprensión de la relación agente – huésped y la patogenia de la enfermedad para el desarrollo de todas las potenciales alternativas de intervención (control, diagnóstico, predicción de severidad y evaluación de nuevos tratamientos).

La información sobre los mecanismos patogénicos e inmunopatología del dengue fatal es muy limitada. Sin embargo, la evidencia de que las reacciones inmunopatológicas y el tropismo viral podrían explicar en parte la mortalidad asociada al dengue severo ha ido en aumento. Entre estas evidencias se destaca la presencia de antígeno o genoma viral en el endotelio y tejidos del hígado, corazón y cerebro de casos fatales. Estos hallazgos sugieren que la infección directa de los tejidos podría explicar la fisiopatología de las alteraciones vasculares y el compromiso hepático tan frecuentes en dengue grave, o la patología de otras complicaciones menos comunes pero frecuentemente fatales como miocarditis y encefalitis por dengue. Así, este proyecto pretende generar evidencia que contribuya a esclarecer la inmunopatología del dengue grave con el propósito de impactar en un futuro el manejo y el diagnóstico oportuno del dengue grave.

Una explicación alterna a la mortalidad asociada al dengue severo y al compromiso multiorgánico cada vez más frecuente en los pacientes con dengue es la posible asociación con otros patógenos prevalentes en áreas endémicas para el virus. Se han encontrado casos fatales o con alta morbilidad que evidencian infección dual con *Leptospira* o hantavirus. Basado en lo anterior, es importante obtener evidencia sobre la co-infección entre el virus dengue y *Leptospira* y/o Hantavirus y/o malaria y/o influenza, microorganismos con los cuales se debe hacer diagnóstico clínico diferencial. Esto permitirá generar hipótesis sobre si la co-infección contribuye a un incremento en morbi-mortalidad en pacientes con dengue.

En resumen, el propósito de este estudio será aportar al conocimiento de la fisiopatología e inmunopatología del dengue grave y los factores y/o mecanismos patogénicos que impactan su morbi-mortalidad.

- **Cuidado de la salud.**

El cuidado de la salud de un paciente con dengue requiere de un diagnóstico rápido, la predicción oportuna de la severidad de la enfermedad en la población afectada que permita un manejo diferencial por parte de los servicios de salud, incluyendo la administración de un tratamiento y el seguimiento adecuado que disminuya el riesgo de complicaciones y discapacidad. Atender estas necesidades requiere de nuevo conocimiento en la fisiopatología del dengue grave que supere limitaciones que hoy existen para un adecuado pronóstico de la enfermedad y manejo del paciente con dengue por parte de los servicios de salud.

La mayoría de los casos de dengue cursan como un cuadro febril con manifestaciones sistémicas que sin ser graves, afectan sensiblemente e incapacitan al paciente. El dengue no complicado genera al menos la mitad de AVPD asociados a la enfermedad. En este programa se propone una evaluación confiable de nuevos tratamientos a nivel ambulatorio con potencial para modificar la historia natural de la enfermedad y reducir la discapacidad y el riesgo de severidad del dengue.

9. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y/O AREA TERRITORIAL BENEFICIADA

La enfermedad por virus Dengue es una de las enfermedades virales transmitidas por artrópodos más importantes a nivel mundial en términos de morbilidad y mortalidad. En Colombia, es una de las enfermedades infecciosas con mayor impacto. Hasta la semana 9 del presente año Hasta la semana 9 de 2012 se han notificado 8495 casos de dengue. Se han notificado 51 muertes probables por dengue, de las cuales ocho han sido confirmadas. La letalidad por dengue grave para Colombia esta semana es de 2,48 %, este indicador se calcula con las muertes confirmadas por laboratorio. La letalidad por dengue en el país en los últimos 3 años ha sobrepasando el máximo tolerado para esta patología que es del 2%, lo que podría estar reflejando problemas de calidad de atención en el paciente con dengue o al desconocimiento de las causas de la muerte en estos pacientes. En los municipios donde se va a realizar el estudio se reporta un alto índice de letalidad (Bucaramanga, Cali y Neiva.)

10. METODOLOGIA

Diseño del estudio:

Este es un estudio descriptivo retrospectivo que busca caracterizar los hallazgos inmunopatológicos más frecuentes en los tejidos de pacientes fallecidos por dengue severo en los departamentos de Valle del Cauca y Santander en los últimos 5 años.

Población de estudio:

Se analizaran muestras de tejido (hígado, corazón, cerebro, riñón, pulmón, bazo y nódulos linfáticos) fijados en Formol tamponado o formalina, preservados en bloques de parafina que se obtuvieron de 50 autopsias (medico legales o académicas) en personas fallecidas por dengue grave (con diagnostico confirmado por laboratorio) en las cuales no se evidenció otras comorbilidades (57). Estas muestras corresponden a las preservadas en el banco de tejidos del INS, de la UIS y las obtenidas por las Secretarías de Salud de las diferentes secretarías de salud donde han ocurrido las muertes y las que se obtengan en forma prospectiva en los años que dure el proyecto. Se notificaron hasta la semana 52 de 2011, 203 muertes por dengue, 42 de ellas confirmadas, para una letalidad de 3,04%.

Criterios de inclusión y exclusión:

Se incluirán todos los casos de síndrome febril agudo trombocitopenico de curso fatal que cumplan con las siguientes características:

- Defunción secundaria a Dengue Grave (confirmado) en la cual se realizó autopsia
- Disponibilidad de muestras de tejidos adecuadamente preservadas (Fijadas en formalina y preservadas en bloques de parafina).
- Especímenes (bloques de parafina) adecuadamente rotulados y plenamente identificables.
- No presentar deterioro o degradación (necrosis) no explicado por la patología mayor al 10% en la evaluación por H-E (Hematoxilina-Eosina)

- Disponibilidad de la historia clínica completa que incluya la documentación de los problemas clínicos además de la demostración de los criterios de laboratorio establecidos para el diagnóstico de dengue grave..

Se excluirán las muestras que NO cumplan con estos criterios de inclusión.

Selección y cálculo del tamaño de la muestra:

La muestra se escogió por conveniencia, teniendo en cuenta el número de pacientes fallecidos por dengue confirmado en los últimos cinco años en los dos departamentos en cuestión (Valle, Santander, Casanare, Arauca, Meta y Norte de Santander), el acceso a estos tejidos y el carácter descriptivo y exploratorio del análisis.

Procedimientos:

La fase inicial de la evaluación morfológica utilizara métodos comunes de laboratorio como las coloraciones de H&E que permitirán la identificación de áreas de isquemia, hipoxia, inflamación y cambios vasculares que serán clasificadas para estudios posteriores de inmunocitoquímica. La segunda fase de los estudios patológicos incluirán métodos de inmunocitoquímica y microscopia confocal laser para determinar: 1) el fenotipo de las reacciones inmunes en los tejidos afectados, 2) co-localización del virus dengue en las áreas de inflamación, 3) co-localización del virus dengue en células específicas de los órganos blanco (ej., colocalización del VD en endotelio, microglia o astroglija cerebral, células de Kupffer o hepatocitos). La tercera fase del estudio incluirá estudios cuantitativos por estereometría que determinaran la magnitud de las reacciones inmunológicas tisulares. La cuarta fase del estudio establecerá estudios de correlación entre los hallazgos inmunopatológicos, magnitud de las reacciones inmunopatológicas tisulares y el perfil clínico de los pacientes incluidos en el estudio.

Procedimientos de laboratorio

Con el fin de caracterizar las reacciones inmunopatológicas tisulares en pacientes fallecidos por dengue severo, se realizarán estudios morfológicos, de inmunohistoquímica y microscopia confocal-laser. Para la caracterización de las poblaciones celulares infiltrantes se utilizarán anticuerpos específicos para identificar subpoblaciones de linfocitos T, linfocitos B, NK, NKT y monocitos, el estado de activación inmunológica, y la actividad del complemento o el depósito de inmunocomplejos del tipo IgG con antígeno NS1 o antígeno de la cápsida viral. Para la detección de los otros antígenos microbianos y examinar co-infecciones se utilizaran anticuerpos primarios anti-dengue, anti-leptospira, anti-influenza, anti-malaria o anti-hantavirus. Secciones de parafina de 10 µm de grosor serán utilizadas para los estudios de inmunocitoquímica y microscopia confocal basados en técnicas descritas previamente por uno de los co-investigadores de este estudio (58, 59). La tabla 1 resume los diferentes tipos de anticuerpos que serán usados y que ya han sido validados en estudios patológicos de tejidos humanos.

Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).

Todos los bloques de parafina (hígado, corazón, cerebro, riñón y pulmón) serán teñidos para Hematoxilina-Eosina (H-E) con el fin de determinar el estado de preservación de la muestra (para garantizar la calidad de la muestra) y como una aproximación inicial de la presencia o no de infiltrado inflamatorio y/o cambios en los tejidos a evaluar.

Recuperación y desenmascaramiento antigénico de las muestras:

Los bloques de parafina se cortarán en secciones de 10µm de espesor y se montarán en láminas portaobjetos superfrost 100, se procederá a deparafinizar las muestras en un horno a 60°C por 60 minutos y posteriormente se rehidratarán utilizando xileno y alcoholes. Para el desenmascaramiento (reactivación) antigénico se utilizarán tanto medios físicos (microondas, calor, presión) como químicos (EDTA, citrato, tripsina, etc.) de acuerdo a las características propias del antígeno, el anticuerpo y el grado de fijación de la muestra.

Inmunohistoquímica

Se realizará el bloqueo de las muestras con suero normal de burro (acorde al anticuerpo 2río). Las muestras se incubarán con diferentes combinaciones de anticuerpos primarios para realizar el marcaje de las poblaciones celulares de interés, determinar la actividad del complemento, estado inflamatorio o presencia de microorganismos. (Tabla 1)

Microscopia Confocal Laser (MCL):

Tiene como objetivo determinar la colocalización de los marcadores y se utilizará principalmente para hacer triples marcajes. Por ejemplo, la tinción triple de depósito de complejos inmunes y complemento (IgG/C9/NS1 y otro antígeno dengue) o las tinciones de NKT y NK (CD3/CD56/CD16) o linfocitos T dobles positivos (CD3/CD8/CD4). MCL también permitirá escoger los marcadores que se cuantificaran por inmunohistoquímica convencional. Se utilizarán anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos específicos a la especie del anticuerpo primario, descritos en la tabla 2). Para la visualización de las imágenes se utilizará un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510 (Tabla 2)

Microscopia de Luz:

Se utilizarán anticuerpos secundarios biotinilados (Ver Tabla 3). Se realizarán marcajes dobles. El primer antígeno se detectara mediante el anticuerpo primario específico seguido de un anticuerpo secundario biotinilado anti-Mouse y detección con avidina/biotina-ABC Kit (VECTOR / PK-6101 Peroxidasa) y DAB Kit-(VECTOR / SK-4100), se obtendrá un color café. Posteriormente para la detección del segundo antígeno, se incubara con un anticuerpo secundario biotinilado anti-Rabbit, seguido por avidina/biotina-ABC-AP KIT (VECTOR/AK-5000 Fosfatasa Alcalina) y se revelara con Vector® Blue (VECTOR / SK-5300) obteniéndose un color azul oscuro. Para la visualización de las muestras se utilizara un microscopio con cámara digital integrada y un software para análisis de imágenes. (Tabla 3)

Tipificación del virus dengue por RT-PCR en muestras de tejido.

Con el propósito de explorar si existen diferencias de tropismo por tejidos entre los serotipos virales y para confirmar que la detección de antígeno es un reflejo de la replicación activa del virus en los tejidos, se realizará la detección de genoma viral por RT-PCR y tipificación del serotipo infectante en cortes de los tejidos positivos para antígeno. Se utilizará un kit de extracción de RNA viral a partir de tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina (RT FFPE RNA Extraction Kit from SABiosciences – A QIAGEN). Los RNA que resulten positivos para los serotipos de virus dengue serán evaluados para genotipificación en colaboración Javier Díaz (Grupo Inmunovirología)

Plan de análisis:

Todas las muestras serán analizadas por tres observadores independientes, dos de los cuales serán patólogos y uno de ellos con experiencia en inmunopatología. Sólo se tendrán en cuenta para el análisis muestras con una integridad mayor al 90% cuyas observaciones tengan un coeficiente de variabilidad inferior al 25% (entre los 3 observadores). Todas las muestras serán recodificadas para conservar la privacidad de la información, sin embargo los evaluadores tendrán acceso a la información socio-demográfica y clínica relevante para el análisis de las placas.

Se realizará inmunohistoquímica convencional para determinar la localización y cuantificar las subpoblaciones celulares y las otras reacciones inmunopatológicas en los diferentes órganos. Inicialmente se describirá el tipo de población celular infiltrante y los microorganismos presentes en cada órgano (hígado, corazón, cerebro riñón, pulmón, bazo y nódulo linfático) y se comparará el inmunofenotipo entre órganos. El análisis cuantitativo del infiltrado celular en áreas de daño tisular se hará con técnicas estereométricas cuantitativas no sesgadas que permitirá la evaluación de la magnitud de las reacciones inmunopatológicas y su correlación con el daño tisular y severidad de la enfermedad. Para esto último se acudirá a las variables clínicas registradas en el documento fuente (historia clínica) que de acuerdo con la definición de la Organización Mundial de la Salud (5) definen dengue en su fase crítica y grave. Estas son:

1. **Signos de Alarma:** Dolor o signos de rebote abdominal, vomito persistente signos clínicos de acumulación de líquidos, sangrado de mucosas, letargia, fatiga extrema, hígado aumentado de tamaño, y en el laboratorio aumento del hematocrito concurrente con una rápida caída de plaquetas.
2. **Hipotensión:** Presión arterial sistólica < 90 mm Hg o Presión arterial media < 70 mm Hg (adulto) o una disminución de > 40 mm Hg o 2 desviaciones estándar por debajo de lo normal para la edad; disminución de la presión de pulso (diferencia de 20 mm Hg o menos entre la PA sistólica y diastólica).
3. Choque: Ausencia de respuesta a la reanimación con líquidos, frialdad de extremidades, llenado capilar lento.
4. **Acumulación de líquidos:** (derrame pleural ascitis) con o sin distress respiratorio.
5. Sangrado severo: Melenas, hematemesis, púrpura
6. **Daño severo de órgano/s:** Hígado: Aumento de las enzimas hepáticas AST o ALT \geq 1000; Sistema Nervioso Central: Alteración del sensorio; Corazón: Arritmias, Alteraciones de contractilidad cardíaca que impidan responder a la reanimación con líquidos.

Ejemplo, se examinará la correlación entre número de células infiltrantes de cada fenotipo en hígado vs los valores de ALT, AST, o la magnitud de inmunocomplejos/complemento depositados en endotelio vs niveles de albúmina o hallazgos clínicos que indiquen disfunción endotelial y extravasación de líquidos. Para el análisis cuantitativo del infiltrado celular se usará el método de "fracción de área de inmunoreactividad" (60) en el cual el sistema de microscopía está asociado a un programa de computador diseñado para cuantificación estereológica (MicroBrightfield, Inc., Williston, VT). Las secciones de tejido coloreadas por técnicas de inmunocitoquímica serán delineadas para los estudios cuantitativos. 30 áreas para evaluación cuantitativas serán asignadas en forma sistemática en posiciones RANDOM dentro del área delineada para análisis cuantitativo y con intervalos de 20 μ m. La suma de puntos que caen sobre las células de interés para cuantificación (inmunorreactividad positiva para el marcador

inmunológico, ej, células CD4 o CD8 positivas) dividida por el número total de puntos contenidos en el GRID estima la fracción de área de inmunoreactividad de la población celular buscada en el área de interés delimitada (ej., área de inflamación tisular) (61). Este método mide el porcentaje del área de interés que es inmunoreactiva para el marcador celular específico que es investigado. Una variante de esta metodología puede utilizar una cuantificación del número absoluto de células por área de interés delimitada, esta vez contando el número de células positivas para el marcador buscado dentro de cada una de las 30 áreas determinadas para el análisis cuantitativo dentro del área de interés. El conteo celular por este método será realizado por una persona que desconoce los grupos diagnósticos designados.

11. PRODUCTOS

Logros	Metas	Indicadores
Establecer el tropismo del virus dengue	Identificar los órganos blanco del virus dengue	Número de órganos infectados con el virus dengue
Evaluar la magnitud de las reacciones inmunopatológicas en la infección por dengue y su correlación con los estadios del daño tisular	Establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre la presencia del virus y diferentes poblaciones celulares	Prueba estadística para datos no pareados calculada
Determinar si los LTCD8⁺LTCD4⁺ dobles positivos, forman parte de los mecanismos patogénicos tisulares del dengue grave	Establecer si a los pacientes quienes presenten aumento en el número de LTCD8 ⁺ LTCD4 ⁺ dobles positivos les va peor en términos de morbi-mortalidad que a quienes no presenten confección.	Diferencias estadísticas en la complicaciones y muerte entre los pacientes con aumento de los LTCD8 ⁺ LTCD4 ⁺ dobles positivos y quienes no presenten aumento.
Establecer si la confección del virus dengue con microorganismos como <i>Leptospira</i>, hantavirus y malaria entre otros se asocia a una mayor gravedad de la enfermedad.	Establecer si a los pacientes a quienes se les encuentre confección les va peor en términos clínicos que a quienes no presenten confección.	Diferencias estadísticas en la frecuencia de hospitalización, complicaciones, muerte y promedio de medicamentos prescritos, otras pruebas de laboratorio solicitadas.

12. RESULTADOS

- **Fortalecimiento Comunidad Científica:**

Formación	Descripción	Personas	Beneficiario
Especialista en patología	Participación y realización del trabajo de investigación dentro del proyecto	1	Comunidad académica, sistemas de servicios de salud.
Estudiantes Pregrado	semillero de investigaciones, internado especial	2	Comunidad académica, sistemas de servicios de salud
Transferencia de tecnología	Un curso sobre microscopia confocal	20	Grupos de la unión temporal, Patólogos, estudiantes de especialización en patología y de posgrado

- Apropiación Social del Conocimiento:**

Publicación	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Artículo en Revista indexada	Divulgación de resultados	1	Comunidad académica.
Presentación en evento nacional	Presentaciones orales o poster en eventos nacionales	1	Comunidad científica nacional
Presentación en evento internacional	Presentaciones orales o poster en eventos internacionales	1	Comunidad científica nacional e internacional

- Generación de nuevo Conocimiento:**

Resultado	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Esclarecimiento de la inmunopatología del dengue grave	Contribuir con información crítica con el propósito de impactar en un futuro el manejo y el diagnóstico oportuno del dengue grave. El uso basado en evidencia de la evidencia generada tendría impacto en el manejo adecuado y oportuno de los casos de dengue para prevenir complicaciones y disminuir la mortalidad por esta causa.	1	Autoridades nacionales, departamentales y locales de salud y comunidad en general

13. IMPACTOS

Impacto esperado	Plazo (años)	Indicador verificable	Supuestos*
Entendimiento de la fisiopatología del dengue grave	Corto plazo	Tropismo viral y tipo de reacciones inmunopatológicas	Evidencia de que las reacciones inmunopatológicas y el tropismo viral están asociadas a las complicaciones y muerte por dengue
Disminución de las complicaciones y mortalidad del dengue	Mediano plazo	Mortalidad atribuible a dengue	Uso de los resultados para manejo oportuno de los sujetos con dengue
Aplicación estrategias terapéuticas que regulen la respuesta inmune	Largo plazo	Número de medicamentos disponible	Evidencia de la disminución de las complicaciones y mortalidad por virus dengue

14. COBERTURA / LUGARES DE EJECUCIÓN

La ejecución del proyecto será en 3 municipios alto índice de letalidad por Dengue en Colombia: Bucaramanga, Cali y Neiva.

Los diferentes experimentos que se contemplan en el proyecto se llevarán a cabo en las Universidad Industrial de Santander, la Universidad del Valle y el hospital John Hopkins USA.

15. CRONOGRAMA POR FASES

N° ACTIVIDAD	ACTIVIDAD	INICIO	FINAL	EJECUCIÓN
1	Aprobaciones Institucionales	01/01	02/01	2 meses
2	Planeación Proyecto	03/01	03/01	1 mes
3	Elaboración de POEs y Protocolo	03/01	04/01	2 meses
4	Vinculación estudiantes	03/01	04/01	2 meses
5	Adquisición de reactivos y materiales	04/01	12/01	9 meses
6	Optimización tinciones Inmunohistoquímica	07/01	10/01	4 meses
7	Entrenamiento confocal Hopkins	10/01	10/01	1 mes
8	Optimización tinciones confocal	10/01	12/01	3 meses
9	Elaboración base datos	04/01	05/01	2 meses
10	Selección de muestras y tejidos	06/01	08/01	3 meses

11	Procesamiento de las muestras	01/02	04/03	16 meses
12	Ingreso de datos	02/02	06/03	17 meses
13	Caracterización clínica casos	09/01	05/02	17 meses
14	Elaboración Primer Informe avance	12/01	12/01	1 mes
15	Elaboración Segundo informe avance	12/02	12/03	1 mes
16	Socialización resultados en Congreso	08/02	08/02	1 mes
17	Análisis Datos	07/03	09/03	3 meses
18	Elaboración Informe final	08/03	10/03	3 meses
19	Escritura del manuscrito	09/03	11/03	3 meses
20	Cierre del proyecto	12/03	12/03	1 mes

16. POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES

No se anticipan riesgos mayores que amenacen el cumplimiento de los objetivos del proyecto, dado que existe ya un banco de muestras de diferentes órganos de pacientes fallecidos por dengue. Adicionalmente, las técnicas que se utilizarán en el estudio ya han sido previamente estandarizadas y los investigadores tienen una amplia experticia en la realización y análisis de estas técnicas. Existe un riesgo menor de que algunas muestras no se encuentren en las condiciones óptimas de calidad requerida para la aplicación de técnicas como la microscopía confocal, para esto se prevé que el número de muestras se cumplirá recolectándolas de manera prospectiva con la calidad requerida.

17. BIBLIOGRAFIA

1. Martínez, E. 2008. Dengue, estudios avanzados. 22: 52-3
2. Instituto Nacional de Salud, SIVIGILA 2010, 2011 y 2012. Reporte epidemiológico.
3. Guzmán, M, Álvarez M, Rodríguez R. et. Al. 1999. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997 Int J Infect diseases 3:130-5
4. Instituto Nacional de Salud, Ministerio de la Protección Social, Organización Panamericana de la Salud. 2009 Guía de atención clínica integral del paciente con dengue. Pags. 1-28
5. World Health Organization. 2009. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Págs.1-144
6. Méndez, A., González, G. 2006. Manifestaciones clínicas inusuales del dengue hemorrágico en niños. Biomédica. 26:61-70.
7. Rodríguez, J. 2008. Manifestaciones neurológicas del dengue. Acta neurol Colombiana. 24:S73-75
8. Martina, B; Koraka, P; Osterhaus, A. 2009 Dengue virus pathogenesis: an integrated view. Clinical Microbiological reviews, 22:564-81
9. Halstead, S. B. 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. Yale J Biol Med 42:350-62
10. Kurane, I., B. L. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, A. L. Rothman, P. G. Livingston, J. Janus, and F. A. Ennis. 1990. Human immune responses to dengue viruses. Southeast Asian J Trop Med Public Health 21:658-62.
11. Kurane, I., B. L. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, A. Meager, J. Janus, and F. A. Ennis. 1991. 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* 88:1473-80.
12. Kurane, I., A. L. Rothman, P. G. Livingston, S. Green, S. J. Gagnon, J. Janus, B. L. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, and F. A. Ennis. 1994. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol Suppl* 9:59-64.
 13. Green, S., D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, A. Nisalak, R. Lew, B. L. Innis, I. Kurane, A. L. Rothman, and F. A. Ennis. 1999. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis* 179:755-62.
 14. Thein S, Aung M, Shwe T, Aye M, Aye K and Aaskov J. 1997. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med.* 56: 566-572
 15. Burke et al 1998. A prospect study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* 38:172-180
 16. Sangkawbba N., S.Rojanasuphot et al. 1984. Risk factors for Dengue shock Síndrome. A prospective Epidemiologic study in Rayong., Thailand. The 1980 outbreak. *Am. J. Epidemiol.* 120:653
 17. Kurane, I., B. L. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, A. Meager, and F. A. Ennis. 1993. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 48:222-9.
 18. Green, S., S. Pichyangkul, D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Nimmannitya, A. Nisalak, I. Kurane, A. L. Rothman, and F. A. Ennis. 1999. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 180:1429-35.
 19. Chaturvedi, U. C., E. A. Elbishbishi, R. Agarwal, and A. S. Mustafa. 2001. Cytotoxic factor-autoantibodies: possible role in the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 30:181-6.
 20. Halstead, S. B. 2003. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* 60:421-67
 21. Morens, D. M. 1994. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis* 19:500-12
 22. Rothman, A. L. 2003. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res* 60:397-419.
 23. Rothman, A. L., and F. A. Ennis. 1999. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257:1-6.
 24. Kurosu T, Chaichana P, Yamate M, Anantapreecha S, Ikuta K. 2007. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 362:1051-6
 25. Thein S, Aaskov J, Myint TT, Shwe TN, Saw TT, Zaw A. 1993. Changes in levels of anti-dengue virus IgG subclasses in patients with disease of varying severity. *J Med Virol.* 40:102-6.
 26. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Lin YS. 2003. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol.* 69:82-90.
 27. Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC, Chiu SC, Hsiao YL, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Lin YS. 2008. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab Invest.*88:1079-89.
 28. Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, Balmaseda A, Harris E. 2008. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever *Virology.* 376:429-35.
 29. Chen JP, Cosgriff TM. 2000. Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 11:461-83.
 30. Silva LK, Blanton RE, Parrado AR, Melo PS, Morato VG, Reis EA, Dias JP, Castro JM, Vasconcelos PF, Goddard KA, Barreto ML, Reis MG, Teixeira MG. 2010 Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *Eur J Hum Genet.* 30 June.

31. Acioli-Santos B, Segat L, Dhalia R, Brito CA, Braga-Neto UM, Marques ET, Crovella S. 2008. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Hum Immunol.* 69:122-8.
32. Chen RF, Wang L, Cheng JT, Chuang H, Chang JC, Liu JW, Lin IC, Yang KD. 2009. Combination of CTLA-4 and TGFbeta1 gene polymorphisms associated with dengue hemorrhagic fever and virus load in a dengue-2 outbreak. *Clin Immunol.* 131:404-9.
33. Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, Hill A. 2002. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg.* 67:102-6.
34. Rothman, A. L. 2004. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 113:946-51.
35. Loke, H., D. B. Bethell, C. X. Phuong, M. Dung, J. Schneider, N. J. White, N. P. Day, J. Farrar, and A. V. Hill. 2001. Strong HLA class I--restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis* 184:1369-73.
36. An, J., D. S. Zhou, J. L. Zhang, H. Morida, J. L. Wang, and K. Yasui. 2004. Dengue-specific CD8+ T cells have both protective and pathogenic roles in dengue virus infection. *Immunol Lett* 95:167-74.
37. Wahid SF, Sanusi S, Zawawi MM, Ali RA. 2000. A comparison of the pattern of liver involvement in dengue hemorrhagic fever with classic dengue fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 31:259-63
38. Trung DT, Thao le TT, Hien TT, Hung NT, Vinh NN, Hien PT, Chinh NT, Simmons C, Wills B. 2010. Liver involvement associated with dengue infection in adults in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 83:774-80.
39. Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, Khen NT, Drouet MT, Huong VT, Ha DQ, Buisson Y, Deubel V. 2001. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch.* 438:107-15.
40. de Macedo FC, Nicol AF, Cooper LD, Yearsley M, Pires AR, Nuovo GJ. 2006. Histologic, viral, and molecular correlates of dengue fever infection of the liver using highly sensitive immunohistochemistry. *Diagn Mol Pathol.* 15:223-8.
41. Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, Pannuti CS. 2008. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci.* 267:36-40.
42. Misra UK, Kalita J, Syam UK, Dhole TN. 2006. Neurological manifestations of dengue virus infection. *J Neurol Sci.* 244:117-22.
43. Cam BV, Fonsmark L, Hue NB, Phuong NT, Poulsen A, Heegaard ED. 2001. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic. *Am J Trop Med Hyg.* 65:848-51.
44. Ramos C, Sánchez G, Pando RH, Baquera J, Hernández D, Mota J, Ramos J, Flores A, Llausás E. 1998. Dengue virus in the brain of a fatal case hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol.* 4:465-8
45. Limonta D, Capó V, Torres G, Pérez AB, Guzmán MG. 2007. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol.* 40:50-4.
46. Wali JP, Biswas A, Chandra S, Malhotra A, Aggarwal P, Handa R, Wig N, Bahl VK. 1998. Cardiac involvement in Dengue Haemorrhagic Fever. *Int J Cardiol.* 64:31-6.
47. Salgado DM, Panqueba CA, Castro D, R Vega M, Rodríguez JA. 2009. Myocarditis in children affected by dengue hemorrhagic fever in a teaching hospital in Colombia. *Rev Salud Pública.* 11:591-600
48. Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, Xhaja K, Schmidt D, Martin KJ, Allen PD, Rodríguez JA, Dinsmore JH, López JR, Bosch I. 2010. Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 29:238-42
49. de Araújo JM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, Coelho JM, Nogueira RM. 2009. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods.* 155:34-8.

50. Upadhaya BK, Sharma A, Khaira A, Dinda AK, Agarwal SK, Tiwari SC. 2010. Transient IgA nephropathy with acute kidney injury in a patient with dengue fever. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 21:521-5.
51. Lum LC, Lam SK, Choy YS, George R, Harun F. 1996. Dengue. encephalitis: a true entity? *Am J Trop Med Hyg;* 54:256 – 9
52. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis.* 189:1411-8.
53. Kangwanpong D, Bhamarapavati N, Lucia HL. 1995. Diagnosing dengue virus infection in archived autopsy tissues by means of the in situ PCR method: a case report. *Clin Diagn Virol.* 3:165- 72.
54. Rele MC, Rasal A, Despande SD, Koppikar GV, Lahiri KR. 2001. Mixed infection due to *Leptospira* and Dengue in a patient with pyrexia. *Indian J Med Microbiol.* 19:206-7.
55. Perez MA, Gordon A, Sanchez F, Narvaez F, Gutierrez G, Ortega O, Nuñez A, Harris E, Balmaseda A. 2010. Severe coinfections of dengue and pandemic influenza A H1N1 viruses. *Pediatr Infect Dis J.* Aug 3
56. Pancharoen C, Thisyakorn U. 1998. Coinfections in dengue patients. *Pediatr Infect Dis J.* 17:81-2.
57. Moreno, J; Devia, C. 2009 Guía de autopsias clínicas y viscerotomías en eventos de salud Pública. Gobernación del Valle del Cauca, UES Valle. Págs1-16
58. Vargas DL, Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, AW., Pardo, CA. 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 57:67-81
59. Laast VA, Pardo CA, Tarwater PM, Queen SE, Reinhart TA, Ghosh M, Adams RJ, Zink MC, Mankowski JL. 2007. Pathogenesis of simian immunodeficiency virus-induced alterations in macaque trigeminal ganglia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 66:26-34.
60. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM et al. 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS;* 96:857-881.