

AMPLIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS EN LA INMUNOPATOGÉNESIS DEL DENGUE GRAVE, IMPLICACIONES PARA EL DESARROLLO Y USO DE LAS VACUNAS

Antibody-dependent enhancement in the immunopathogenesis of severe dengue, implications for the development and use of vaccines

Brian Alejandro CÁCERES MUNAR^{1*}, Jaime Eduardo CASTELLANOS PARRA², Mauricio Humberto RODRÍGUEZ PANDURO¹

¹Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Calle 28 n°. 6-02, Bogotá D.C, Colombia.

²Instituto de Virología, Universidad El Bosque, Av. Carrera 9 n°. 131-A-02, Bogotá D.C, Colombia.

*For correspondence: bcaceres@unicolmayor.edu.co

Received: 30th April 2019, Returned for revision: 18th July 2019, Accepted: 01st August 2019.

Associate Editor: María Cristina Navas.

Citation/Citar este artículo como: Cáceres BA, Castellanos JE, Rodríguez MH. Amplificación de la infección dependiente de anticuerpos en la inmunopatogénesis del dengue grave, implicaciones para el desarrollo y uso de las vacunas. Acta biol. Colomb. 2019;24(3):439-451. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v24n3.79410>

RESUMEN

Actualmente, la infección por el virus de dengue (DENV) es uno de los problemas más importantes de salud pública en países tropicales y endémicos como Colombia, pues en tanto puede ser producida por cuatro diferentes serotipos virales, durante las infecciones secundarias se presentan frecuentemente cuadros más severos que incluso pueden llevar a desenlaces fatales. El centro de la fisiopatología del dengue grave es el daño producido al endotelio, que se traduce en un aumento en la permeabilidad vascular que se evidencia como fuga plasmática, descontrol en la coagulación y daño de órganos. Aunque hay varias teorías que explican la enfermedad severa, el fenómeno denominado amplificación de la infección dependiente de anticuerpos (antibody dependent enhancement, ADE) es el más conocido. En este, se postula que el virus causante de una infección secundaria es reconocido, pero no neutralizado, por anticuerpos generados en la infección previa e internalizado en las células susceptibles usando receptores Fc-gamma, lo cual aumenta la replicación viral e induce modificaciones en la respuesta inmune celular que contribuyen al desarrollo de dengue grave. En este escrito, se realiza una revisión de los hallazgos sobre los mecanismos involucrados en el fenómeno de ADE y cómo pueden contribuir a la progresión hacia dengue grave, describiendo los conceptos de ADE extrínseco e intrínseco, además de como este fenómeno debe ser tenido en cuenta para el diseño, desarrollo e implementación de una vacuna para dengue, en tanto es capaz de afectar su eficacia y seguridad.

Palabras clave: Anticuerpos, dengue grave, inmunomodulación, patogénesis, vacuna.

ABSTRACT

Dengue virus infection is the most important vector transmitted disease in tropical countries such as Colombia, where all the four dengue virus serotypes are circulating and are involved in successive secondary infections which induce severe or even fatal cases. The central key to understanding the severe dengue cases is the endothelial function damage which appears as plasma leakage, coagulation impairment, and organ compromise. Severe dengue could be explained by different theories, among them the antibody-dependent enhancement (ADE) phenomenon is the best known. This theory postulates that the second heterotypic virus causing a secondary infection is recognized by antibodies raised during the first infection but are ineffective to neutralize the virus. Instead this virus-antibody complex is internalized by Fc-gamma receptor-bearing cells increasing the viral replication and inducing an aberrant immune response that contributes to severe dengue presentation. This manuscript is aimed to review the evidence about the ADE phenomenon and its involvement in the severe evolution of dengue cases. Here, it will be described the extrinsic and intrinsic ADE concepts and how these phenomena must be considered to the design, development, and implementation of a dengue vaccine because the evidence indicates that ADE affects both efficacy and safety of vaccine prototypes.

Keywords: Antibodies, immunomodulation, pathogenesis, severe dengue, vaccine.

INTRODUCCIÓN

El virus del dengue (cuyo acrónimo oficial es DENV), es un arbovirus, una abreviatura que significa “*arthropode-borne virus*”, y hace referencia a que son virus que pueden ser transmitidos por insectos. En el caso del DENV, los mosquitos involucrados en la transmisión principalmente son las hembras de las especies *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* (Lindenbach *et al.*, 2007; Velandia y Castellanos, 2011). Existen cuatro serotipos de DENV (DENV-1 al DENV-4) que se encuentran agrupados en un solo serocomplejo dentro del género *Flavivirus*, familia Flaviviridae (Velandia y Castellanos, 2011). La infección por cualquiera de estos serotipos puede causar enfermedad que se clasifica clínicamente como dengue, dengue con signos de alarma (formas no graves del dengue) y dengue grave (Organización Mundial de la Salud, 2009).

La enfermedad por DENV es la primera enfermedad viral transmitida por vectores en Colombia con un total de 1 401 240 casos registrados en un periodo de 26 años (1990-2016) (Padilla *et al.*, 2017). Se estima que, en todo el mundo, alrededor de 4 000 millones de personas viven en zonas de transmisión de DENV y los cálculos epidemiológicos estiman que ocurren 390 millones de casos cada año (intervalo 284 - 528 millones), de los cuales aproximadamente entre 500 000 y 1 000 000 son diagnosticados como dengue grave y 20 000 de ellos, principalmente niños, terminan como casos fatales (Bhatt *et al.*, 2013). En Colombia, durante el 2018, se reportaron un total de 21 242 casos de dengue y 23 057 de dengue con signos de alarma, mientras que los casos de dengue grave fueron 526, para un total de 44 825 casos (Instituto Nacional de Salud, 2018) y para marzo de 2019 el número de casos reportados había alcanzado la mitad de la cifra total del 2018.

Si tenemos en cuenta que Colombia es un país hiperendémico para DENV pues circulan todos los serotipos de DENV (Ministerio de Salud y Protección Social y Federación Médica Colombiana, 2013), resulta plausible pensar que la alta proporción de casos moderados y severos se explique por el fenómeno denominado amplificación de la infección dependiente de anticuerpos (ADE, por la sigla en inglés de *antibody dependent enhancement*) que ha sido frecuentemente involucrada en la patogénesis de los cuadros más severos (Wang *et al.*, 2017). Este fenómeno consiste en la existencia de una reacción heteróloga entre anticuerpos no neutralizantes o subneutralizantes que inicialmente están dirigidos contra el serotipo de DENV que causó una infección previa y un segundo serotipo de DENV que está causando la infección presente (por ejemplo, anticuerpos específicos para DENV-3 que reaccionan con DENV-2 pero que no lo neutralizan) (Halstead y O'Rourke, 1977; Wang *et al.*, 2017). Esta interacción heteróloga, modifica la patogénesis de la infección por DENV respecto a una infección en condiciones normales, lo cual se refleja en un aumento de las proporciones de células infectadas y un

cambio en la respuesta de la inmunidad innata y adaptativa (Castillo *et al.*, 2019). Este fenómeno de amplificación que de aquí en adelante llamaremos ADE, es una de las variables sobre la que existe mayor evidencia de su participación en la progresión a dengue grave, ya que explica los aumentos en la carga viral en los pacientes, la hiperactividad celular de monocitos y macrófagos, la activación del complemento y la producción de un perfil aberrante de citocinas; todo lo cual contribuye a la disfunción endotelial característica del dengue grave (Castillo *et al.*, 2019). En tanto hay evidencia contradictoria, no es aún claro si la reactividad cruzada de los anticuerpos con otros miembros de la familia Flaviviridae como el virus Zika (ZIKV) o el virus de la encefalitis japonesa (JEV) pudieran también afectar el desarrollo de enfermedad severa por dengue (Anderson *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2019).

Además de lo anterior, este fenómeno de ADE se puede producir no solamente por una infección previa con alguno de los serotipos de DENV (Delgado *et al.*, 2018), sino también con virus vacunales, por tal razón uno de los requisitos para la vacuna de dengue es que sea tetravalente y capaz de generar una inmunidad equilibrada para todos los serotipos evitando el fenómeno de ADE con los serotipos naturales. La primera vacuna autorizada en el mundo para uso en humanos tuvo resultados apropiados en la disminución significativa de los casos graves en los grupos vacunados, aunque en un programa de vacunación masiva en Filipinas en 2017 se produjeron varios casos graves y fatales que pudieran estar relacionados con la vacuna y que se encuentran en estudio (Dyer, 2019).

Dada la importancia epidemiológica de DENV y sus complicaciones clínicas (evidenciadas en los casos de dengue grave y fatales), en Colombia y otros países hiperendémicos, resulta importante entender el fenómeno de ADE y su papel como factor de riesgo en la aparición de formas severas durante la infección. Por otra parte, es clave revisar la evidencia correspondiente en el caso del uso de vacunas y el dengue severo. En este documento, se realiza una revisión de los hallazgos en lo que respecta a los mecanismos involucrados en la inmunopatogénesis del dengue que podrían contribuir a su progresión a dengue grave, se describe el fenómeno de ADE (extrínseco e intrínseco), se exponen los hallazgos de este fenómeno en otros flavivirus con respecto a DENV y se discute la relación de este fenómeno con posibles implicaciones en el uso de las vacunas según diversos criterios y estudios propuestos a la fecha.

El presente documento se propone revisar y describir el fenómeno de amplificación dependiente de anticuerpos, presentando la evidencia que lo soporta (y los estudios que no), para entender su impacto en el desarrollo y uso de vacunas para dengue. Para ello, se realizó una búsqueda de la literatura contenida en la bases de datos Pubmed, Science Direct, Google Scholar y Scopus utilizando palabras clave y combinaciones de las mismas en inglés y español, por

ejemplo: Antibody-dependent enhancement, dengue virus, dengue fever, severe dengue, Dengue Vaccine, flaviviridae and Antibody-dependent enhancement. Solo fue tomada en cuenta la literatura de la última década y se incluyeron algunos estudios anteriores a este periodo y que a consideración de los autores eran pertinentes o fundamentales.

DENV y proteínas estructurales E y prM

Los DENV son virus de ARN de sentido positivo (grupo IV en la clasificación propuesta por Baltimore) y hacen parte de la familia Flaviviridae, género *Flavivirus* (Westaway *et al.*, 1985; Velandia y Castellanos, 2011). Los viriones del DENV presentan morfologías icosaédricas de aproximadamente 40 - 50 nm de diámetro acompañada de una envoltura de lípidos donde están insertadas múltiples copias de la proteína de envoltura (E) y la precursora de membrana (prM). La nucleocápside posee la tercera proteína estructural (Proteína C, core) empaquetando una hebra de ARN genómico que tiene un tamaño de alrededor 11 kb y que codifica para diez productos, las tres proteínas estructurales y siete no estructurales (Lindenbach *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013).

Después de su maduración durante el ensamblaje y gemación, el DENV dispone a las proteínas E y prM en la membrana y a la proteína C en la cápside viral, la cual, debido a su carácter muy básico y a su peso aproximado de 10 kDa participa activamente en el ensamblaje viral y la encapsidación específica del genoma viral (Velandia y Castellanos, 2011; Nemésio *et al.*, 2013). La proteína prM y la proteína M intervienen en la maduración del virus, pues después de traducirse, es clivada por la furina celular (un miembro de la familia de proteasas tipo subtilisina/ kex2p de mamíferos) en la posición 91 de los 166 aminoácidos que lo componen, para producir el péptido pr y la proteína M (Zhang *et al.*, 2003; Hsieh *et al.*, 2014). Después de este corte, el cambio conformacional que sufre la partícula viral es irreversible y en este momento se considera una partícula viral madura e infecciosa, en la cual el fragmento M se encuentra cubierto por la proteína E (Perera y Kuhn, 2008). Gracias a la criomicroscopía electrónica, se sabe que después del corte realizado por la furina, la proteína M queda constituida por un bucle ubicado en los primeros 20 aminoácidos del extremo amino terminal, un dominio α -helicoidal (también denominado MH) y dos dominios transmembranales MT1 y MT2 (Zhang *et al.*, 2003). La importancia del dominio MH fue confirmada por estudios de mutagénesis dirigida realizados en nueve residuos altamente conservados (Hsieh *et al.*, 2014), demostrando que la sustitución por alanina en cuatro de estos residuos disminuyen significativamente la producción de partículas recombinantes similares a virus (VLP) y partículas en un sistema de replicón, debido a que la furina necesita de ciertas secuencias consenso de aminoácidos básicos tipo

Arg-Xaa-Arg / Lys-Arg para realizar el corte (Thomas, 2002). También se conoce que después de su síntesis en el retículo endoplasmático rugoso, la prM actúa como una chaperona formando un heterodímero con la proteína E cuyas funciones específicas serían dos, la primera ayudar a plegar adecuadamente a E y la segunda evitar que por afinidad la proteína E se incorpore a compartimientos ácidos de la vía secretora (Guirakhoo *et al.*, 1992; Hsieh *et al.*, 2014). Además de las funciones ya mencionadas de prM y M, estas proteínas tienen también funciones no estructurales; los estudios de Catteau *et al.*, (2003) demostraron que existe un ectodominio intraluminal de la proteína M con propiedades pro apoptóticas en líneas celulares como la Neuro2a y HepG2, debido a nueve aminoácidos que están ubicados en el extremo C-terminal y que fue denominado ApoptoM, lo cual podría explicar en parte el efecto citopático producido por DENV.

La proteína E, presenta una masa de aproximadamente 50 kDa y posee tres dominios en su porción extracelular claramente definidos (I, II y III respectivamente) con glicosilaciones en Asn67 y Asn153 (Velandia y Castellanos, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Una vez en la membrana, se arreglan como dímeros de tipo cabeza y cola, y se conoce bien que los dominios II y III intervienen en la unión del virus a los receptores celulares, entre los cuales se han descrito HSP-90 y 70 (proteínas de choque térmico), CD14, GRP8/BiP, el receptor de laminina, receptores de lectina tipo C, receptor de manosa, integrinas $\alpha v \beta 3$ y receptores de heparán sulfato (Miller *et al.*, 2008; Dejnirattisai *et al.*, 2011). Por otro lado, en tanto es la proteína más inmunogénica, es la que más se usa para el diseño de vacunas, y por ejemplo recientemente se reportó un prototipo de vacuna de nanopartículas de ácido-poliláctico glicólico recubiertas de la proteína E recombinante que fue probada en ratones (Metz *et al.*, 2018). No obstante, es importante tener presente que también es la proteína en la que más se acumulan las diferencias genéticas entre los serotipos de DENV (extra-serotipo) e inclusive entre las cepas que se encuentran en un mismo serotipo (intra-serotipo), que por ejemplo ha permitido que se definan dos grupos antigénicamente diferentes para DENV2 (Qiu *et al.*, 2018). Los epítopes a los que se unen los anticuerpos se denominan posiciones dominantes de antigenicidad y recientemente usando un algoritmo matemático se identificaron 97 de estos en la superficie de la proteína E y se hizo la correlación con el estudio previo realizado con sueros de monos por Katzelnick *et al.*, (2015) encontrando que los epítopes en E son similares entre serotipos, pero que existe mayor similitud en algunos de ellos entre DENV de serotipos diferentes, lo cual puede ayudar a entender mejor la reactividad cruzada de anticuerpos por los serotipos que causan infección en diferentes momentos.

En adición a lo mencionado, (Chaudhury *et al.*, 2017), en un estudio que analizó 406 anticuerpos monoclonales (mAb) humanos que incluían características generales, de actividad

y de residuo del epítipo al que se une (datos almacenados en la base de datos de anticuerpos contra DENV (DENV-Ab-DB)); identificaron que de 99 mAbs generados durante una infección primaria, el 45 % de estos era exclusivamente específico para el serotipo infectante, mientras que el 55 % restante podía reconocer a más de un serotipo. Sorprendentemente, de 139 mAbs de infección secundaria solo el 4 % resultó ser específico para un único serotipo de DENV. Además, también se observó que los epítopes de la proteína E que son opsonizantes y que son reconocidos en las infecciones secundarias, se encontraban en el péptido de fusión (dominio II de la proteína E), en la cadena A del dominio III y en la región bisagra entre el dominio I y II, mientras que los epítopes específicos en cada serotipo se encontraron en la cresta lateral del dominio III, ya que no se encontró reactividad cruzada de mAbs en esta región en infecciones secundarias. En otra investigación, también se identificó un epítipo perteneciente a DENV-3 ubicado en el residuo Gly264 el cual se comparte con DENV-1 y DENV-2; y otro epítipo que se comparte entre DENV-1 y DENV-2 y está ubicado en el residuo Gln211, aunque para este caso, el DENV-1 posee una lisina, DENV-2 posee una arginina. En ese trabajo solo se analizaron epítopes por fuera del dominio III ya que en este se encuentran las secuencias responsables de la mayor parte de los anticuerpos con alta capacidad de neutralización (Mikita y Padlan, 2016). Estas diferencias en el reconocimiento de los mAbs en infecciones secundarias en relación con las primarias debido a la similitud de los epítopes, son esenciales para comprender la patogénesis que contribuye con la progresión a dengue grave, en especial durante el transcurso de fenómenos como el ADE por el reconocimiento cruzado de epítopes (Chaudhury *et al.*, 2017).

Amplificación de la infección dependiente de anticuerpos (ADE)

El primer investigador en postular la hipótesis de ADE como responsable de la severidad del dengue grave fue Scott Halstead en 1977 (Halstead y O'Rourke, 1977), básicamente, su estudio consistió en utilizar leucocitos mononucleares de sangre periférica en los cuales identificó que a un MOI de 0,001 - 0,1 las células no eran permisivas al virus, sin embargo al agregar al medio, suero no neutralizante de una persona positiva para un serotipo diferente, estas se volvieron permisivas a la infección, y con esto, postuló un posible mecanismo en el cual el DENV es reconocido por anticuerpos de tipo IgG, los cuales a su vez facilitan el ingreso a las células usando el receptor para inmunoglobulinas, amplificando la infección. Ampliando la explicación, se puede entender que la infección por alguno de los cuatro serotipos del DENV confiere inmunidad contra el virus infectante, pero no inmunidad permanente contra los otros tres serotipos dando espacio para infecciones secundarias heterotípicas o consecutivas (Sangkawibha

et al., 1984; Mikita y Padlan, 2016). En la actualidad, se sostiene que estas infecciones heterotípicas secundarias mediadas por ADE son el mayor factor de riesgo para la presentación de dengue grave (Wang *et al.*, 2017), ya que como se explicó anteriormente, algunas inmunoglobulinas G (IgG) pueden ser reactivas para dos o más serotipos de DENV (que reconozca algún epítipo que comparten dos o más serotipos de DENV), pero no necesariamente es neutralizante, sino opsonizante y por consiguiente, se produce un aumento temprano de la fusión de partículas virales dentro del endosoma (Flipse *et al.*, 2016), aumento de la infectividad viral (Dejnirattisai *et al.*, 2010) e inclusive una inhibición en la señalización intracelular de la inmunidad innata (Kou *et al.*, 2011) (mecanismos que se explicaran adelante con mayor detalle).

Se entiende adicionalmente, que el bajo potencial de neutralización de los anticuerpos por el cual se desarrolla el fenómeno ADE está relacionado (además de la similitud de epítopes que se mencionó anteriormente) con la disminución de los títulos de anticuerpos a medida que pasa el tiempo entre una infección primaria y el momento en el que se contrae una infección heteróloga secundaria. Por esta razón, se ha establecido que después de un periodo de dos o más años entre estos dos eventos es en el que se puede presentar con mayor probabilidad el fenómeno de ADE (Halstead, 2017b). Por ejemplo, en el estudio de Katzelnick *et al.*, (2017) que incluyó 6684 niños de Nicaragua, concluyeron que aquellos que presentaban títulos de anticuerpos entre 1:21 y 1:80 tenían un riesgo de dengue grave 7,64 veces mayor (95 % CI: 3,19-18,28) en comparación con niños que poseían títulos mayores a 1:1280 (infección más reciente) cuyo riesgo de dengue grave era de 1,5 %. También se determinó que los anticuerpos contra DENV tienen una vida media de cuatro años y que a los tres años después de una infección en el 22 % de los niños los títulos disminuyen hasta 1:21 y 1:80.

Por otro lado, un análisis de datos de dos epidemias de DENV-2 ocurridas en Cuba durante los periodos de 1981 (La Habana) y 1997 (Santiago de Cuba) de personas que habían tenido una infección sensibilizadora con DENV-1 que se transmitió entre los años 1977 y 1979, dieron como resultado una tasa de mortalidad tres a cuatro veces más alta en la epidemia de 1997 que en la de 1981, es decir 20 años después de la sensibilización por DENV-1, resultados que se pueden explicar por la disminución del potencial de neutralización de los anticuerpos a medida que transcurre el tiempo (Guzmán *et al.*, 2002). En contraste, Anderson *et al.*, (2014) en un estudio de dos cohortes (1998-2002 y 2004-2007) con niños tailandeses entre cuatro y 16 años, encontraron que la gravedad de una infección secundaria por DENV, es consistente con el intervalo de tiempo en el que se produce la infección secundaria, ya que los niños presentaron infecciones subclínicas en el intervalo de tiempo de 1,41 años, pero aquellos niños que

tuvieron una infección primaria durante el estudio tenían mayor probabilidad de evolucionar a dengue grave si eran infectados por un segundo serotipo después de 1,92 años de la primera infección. De manera interesante, en neonatos también se ha descrito que se puede presentar el fenómeno de ADE. En un estudio prospectivo en Vietnam (Chau *et al.*, 2009) se reportó que casi la totalidad de las madres tenían anticuerpos neutralizantes para alguno de los cuatro serotipos de DENV y que al momento del nacimiento se encontró la misma proporción de neonatos con anticuerpos específicos en el suero obtenido de sangre umbilical (por transferencia materna), pero además en mayor concentración en comparación con el suero de las madres. Durante la evaluación posterior de los recién nacidos, se encontró que los anticuerpos específicos desaparecen en el 90 % de los lactantes a los seis meses, lo cual puede ayudar a explicar la protección en niños menores de cuatro meses y la mayor probabilidad de desarrollar dengue grave mediado por ADE en niños mayores a seis meses.

En tanto las células blanco del DENV (monocitos, macrófagos y células dendríticas maduras) poseen el receptor Fc γ , son éstas quienes contribuyen mayoritariamente al desarrollo de ADE y a una posterior progresión a dengue grave. Recientemente, se identificó que las células dendríticas que se activan por la vía TLR2/MyD88 en una infección secundaria por DENV son capaces de orientar una respuesta humoral y celular polarizada hacia linfocitos T CD4 Th2 (T helper2) (George *et al.*, 2017). Adicionalmente, esta polarización celular hace que las concentraciones séricas de citocinas del perfil Th2 como IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13 aumenten significativamente, derivando hacia el desarrollo de dengue grave. Estas citocinas se encuentran aumentadas en los sueros de pacientes con dengue grave, evidenciando una actividad inmune antiinflamatoria, contraria a los requerimientos para la eliminación del virus y células infectadas y contribuyendo por esta vía al daño endotelial; todo ello en comparación con pacientes que presentan la forma leve de dengue, en cuyo caso las citocinas que se encuentren elevadas son IFN γ e IL2 (propias de la respuesta de células Th1) (Chaturvedi, 2009). Este fenómeno, que describe una elevada producción de citocinas que contribuirán a el daño endotelial y posterior fuga plasmática es mejor conocido como tormenta de citocinas (Kurane *et al.*, 1991) y es otro de los mecanismos que explican la patogénesis del dengue grave.

ADE extrínseco

En condiciones de ADE, el proceso temprano de infección celular mediada por anticuerpos (ADE extrínseco), comienza con la unión del complejo virus-anticuerpo al receptor Fc γ (Fc γ R, Fc gamma receptor) por la región Fc (crystallizing fragment) del anticuerpo IgG. Los receptores Fc γ en humanos, se clasifican en tres tipos, Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII

o también denominados por sus clústeres de diferenciación (CD) CD64, CD32 y CD16 respectivamente (Guilliams *et al.*, 2014). Estos receptores Fc γ se expresan en monocitos, macrófagos y células dendríticas y cumplen la función de ser potentes inductores de la fagocitosis en microorganismos opsonizados (DENV para este caso), sin embargo, como se muestra en la Figura 1, en condiciones de ADE para DENV, estos receptores contribuyen aumentando la infectividad viral que a su vez se relaciona con mayor activación inmune y endotelial favoreciendo la progresión a dengue grave (Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2017).

Para el particular caso de DENV, se sabe que la isoforma IIA del receptor (Fc γ RIIA, CD32) es más eficiente al momento de mejorar la infectividad del complejo inmune. Esta isoforma presenta una cadena α sobre la membrana celular que contiene en la subunidad complementaria un ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), el cual es un motivo estructural ubicado en la cola citoplasmática de estas cadenas con función en la transducción de señales en células inmunes (Guilliams *et al.*, 2014). En un estudio *in vitro* de Rodrigo *et al.*, (2006) cuyo objetivo fue evaluar la influencia de los receptores Fc γ RIA y Fc γ RIIA (competentes y no competentes de señalización transfectados en células COS-7) sobre la capacidad infectiva de los complejos inmunes de DENV-2; se concluyó que Fc γ RIIA es más eficiente que Fc γ RIA para promover la infectividad viral, estos autores plantean como hipótesis que Fc γ RIIA está localizado en balsas lipídicas y dominios membranales en los que están los receptores virales y en donde los complejos inmunes débilmente unidos pueden interactuar más fácilmente e iniciar la entrada a la célula. En otro trabajo *in vitro* utilizando células NIH 3T3 transfectadas con Fc γ RIIA y Fc γ RIIB o solo una de las dos, pero con sus motivos intracelulares intercambiados, es decir, Fc γ RIIA con un motivo de ITIM y Fc γ RIIB con un motivo ITAM, que luego fueron inoculadas con DENV-2 en presencia de suero, se determinó que las dos isoformas se unen a los complejos inmunes, sin embargo, Fc γ RIIA-ITIM inhibió el fenómeno de ADE, concluyendo así que el proceso de activación de las células depende de la fosforilación del motivo ITAM, presente nativamente en receptores Fc γ RIIA (Boonnak *et al.*, 2013). Por otra parte, los receptores Fc γ no son el único factor determinante en la unión y entrada del virus bajo condiciones de ADE, pues se ha demostrado que determinantes moleculares en la proteína E de DENV juegan un papel clave en la unión celular tanto en condiciones normales como en condiciones de ADE (Chotiwan *et al.*, 2014).

Ahora bien, durante el proceso de entrada a la célula en condiciones de ADE, un ensayo *in vitro* realizado en células P388D1, que consistió en el seguimiento de partículas de DENV opsonizadas con anticuerpos en comparación con partículas de DENV no opsonizadas utilizando DiD como etiqueta fluorescente con el objetivo de identificar si los anticuerpos influían o no en la dinámica de entrada viral

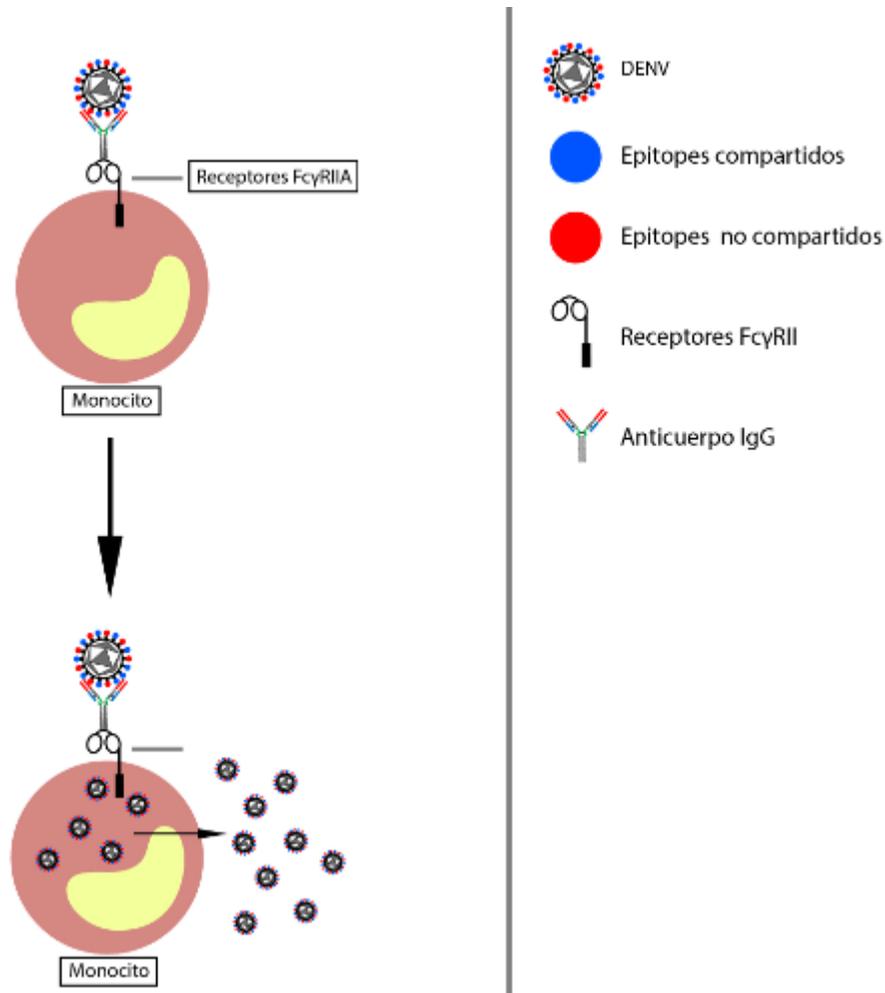


Figura 1. Representación del fenómeno de ADE extrínseco. Los anticuerpos de tipo IgG contra DENV pueden reconocer epítopes propios del serotipo (no compartidos) o bien, epítopes que estén presentes en dos o más serotipos (compartidos). En consecuencia, de esto, los receptores FcγRIIA en las células susceptibles a DENV (monocitos por ejemplo), reconocen los complejos inmunes a través de la porción Fc de la inmunoglobulina y favorecen un aumento en la proporción de células infectadas que llevan a un aumento en la producción de nuevos viriones.

(Ayala-Nunez *et al.*, 2016), se determinó que la entrada de DENV en condiciones de ADE está dada por la dinamina que es una GTPasa involucrada en la endocitosis mediada por clatrina, y también por la actina en el sentido que esta es capaz de formar protuberancias que ayudan a envolver las partículas opsonizadas en procesos de fagocitosis (que para este caso vendrían después de la unión de los complejos inmunes con los receptores FcγRIIA) (Freeman y Grinstein, 2014). En resumen, las vías que intervienen en la entrada de DENV en condiciones de ADE son tanto la endocitosis mediada por clatrina (vía clásica) y vías fagocíticas que involucran actina.

ADE intrínseco

Después de la internalización del DENV por el FcγR, la activación de la cascada de señalización por los motivos ITAM induce un apagamiento de la inmunidad innata,

proporcional al aumento en la producción de partículas virales (ADE intrínseco). Por ejemplo, en el reporte de Modhiran *et al.*, (2010) se describieron análisis de RT-qPCR, western blot y microarrays con el objetivo de identificar si las infecciones por DENV mediadas por el complejo inmune tenían algún efecto sobre la señalización de los receptores tipo toll (TLRs). En resumen, encontraron que la unión de los complejos inmunes disminuía la transcripción de TLRs, además de estimular la expresión de SARM (Sterile-alpha and armadillo motif) y TANK en células monocíticas (Figura 2), lo que aparentemente contribuye a mayores tasas de replicación viral y por ende, viremias más altas y mayor activación inmune, que se pueden relacionar con el desarrollo de dengue grave.

Los TLRs son proteínas que participan en las respuestas de inmunidad innata, y cumplen la función de reconocer componentes moleculares expresados por los patógenos. Para el caso de los virus, los TLR 4 y 7 reconocen proteínas

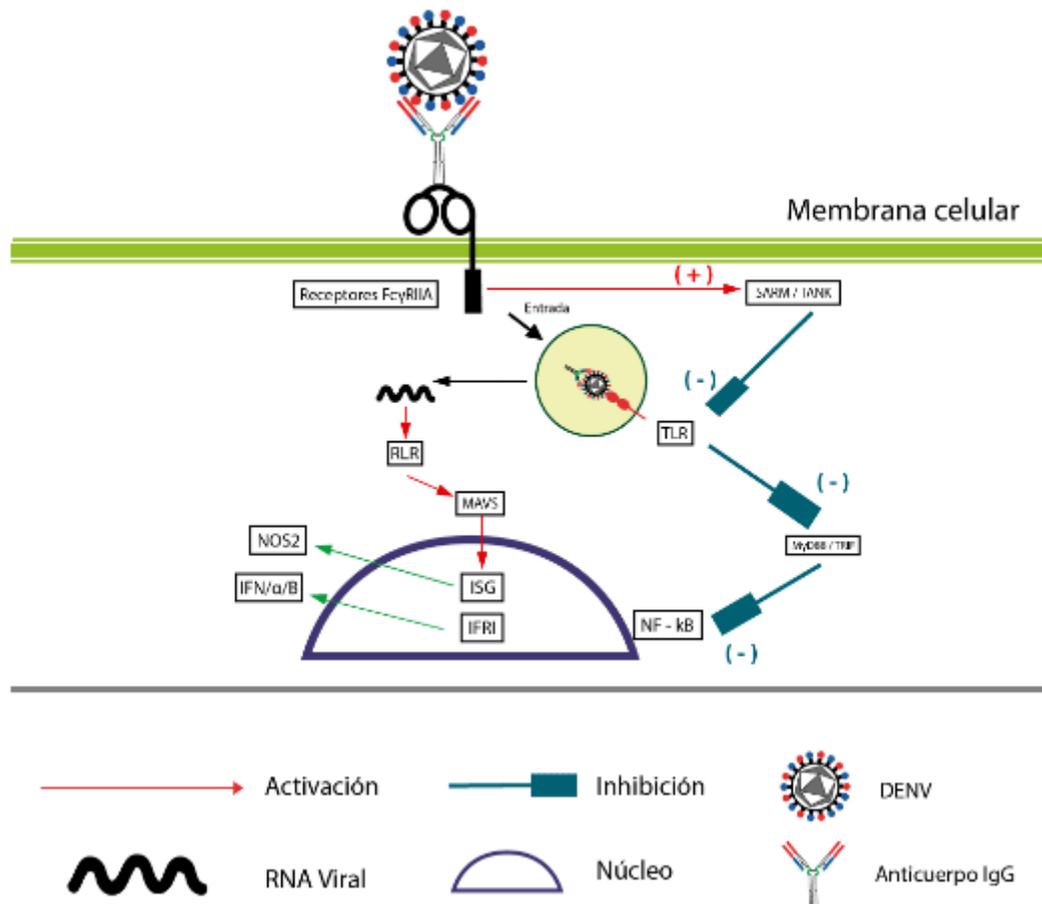


Figura 2. Esquema del ADE intrínseco. La unión de los complejos inmunes a los receptores FcγRIIA estimula la sobreexpresión de SARM y TANK. En tanto SARM es la única proteína perteneciente a la familia de proteínas con dominio TIR con capacidad de inhibir la expresión de los TLRs (que reconocen el virión en el lisosoma), la cascada de señalización utilizada por estos se ve afectada. Por ejemplo, proteínas como MyD88 que cumplen el objetivo de activar el factor nuclear-κB para inducir la expresión de citocinas en pro de controlar la infección viral no se activan, dando como resultado un aumento en la producción de partículas virales. También se esquematizan otras vías de señalización como la de RLR-MAVS que son activadas por el RNA viral y cumplen la función de activar factores de transcripción como los IFNs que aumentarán la expresión (flechas verdes) de componentes antivirales como óxido nítrico y/o IFN tipo I.

virales en la superficie, mientras que los TLR 3, 7, 8 y 9 son endosomales y se activan con los ácidos nucleicos (Koyama *et al.*, 2008). Una vez estos TLRs reconocen su diana, inician una cascada de señalización reclutando a una familia de proteínas adaptadoras con un dominio TIR (Toll/interleukin-1 receptor), entre las cuales están MyD88, TIRAP (MAL), TRIF (TICAM) y TRAM (TICAM2), cuyo objetivo es activar factores de transcripción como el factor nuclear-κB (NF-κB) y algunos miembros de los factores reguladores de interferón (IRF) (O'Neill y Bowie, 2017) o regular la expresión de IFN tipo I, principales citocinas involucradas en la respuesta antiviral. Ahora bien, bajo condiciones de ADE esta respuesta de los TLRs se ve afectada por el aumento de expresión de SARM, esta proteína también pertenece a la familia de proteínas con dominio TIR, sin embargo, es la única con función de suprimir los TLRs (Modhiran *et al.*, 2010), conllevando a la disminución en la expresión de IFN de tipo I, lo cual es un aspecto clave

en la inmunopatogénesis de DENV en condiciones de ADE, ya que estos IFN de tipo I son capaces de activar la vía JAK/SAT cuyo objetivo es la activación de los ISG (interferon-stimulated genes), entre los cuales se encuentra el NOS2 (Nitric oxide synthase, inducible), encargado de aumentar los niveles de óxido nítrico (NO), que tienen un potente efecto inhibitorio de la replicación (Samuel, 2001; Flipse *et al.*, 2013). Como se puede evidenciar en la figura 2, también se ha encontrado que la activación de los ISG, puede ocurrir a través de otras vías independientes de interferón como la RLR-MAVS (Ayala-Nunez *et al.*, 2016). Se ha propuesto que estas respuestas antivirales tempranas son inhibidas en gran parte por procesos que aumentan la autofagia celular, ya que proteínas autofágicas como ATG5 y ATG12 suprimen la inducción de ISG. En resumen, la modulación de los TLR favorece la replicación viral y una respuesta inmune distorsionada (Huang *et al.*, 2016).

Infecciones de baja severidad en las que se evidencia ADE

A pesar de la amplia evidencia *in vitro* de ADE como el principal determinante para la progresión a dengue grave, hasta la fecha no existe evidencia *in vivo* (en humanos) que corrobore los mecanismos tanto de ADE intrínseco como extrínseco reportados; cuando se realizan experimentos con modelos animales (ratones por ejemplo) el ADE se puede o no evidenciar, además las condiciones específicas que suceden cuando se produce dengue grave son difíciles de reproducir (Sasmal *et al.*, 2019). De hecho, existen estudios que no respaldan el ADE como un actor de la progresión a dengue grave. En un estudio que incluyó 4 441 bebés brasileros junto con sus madres, en un periodo de seguimiento de un año identificó que 40 cursaron con una infección sintomática por DENV (DENV-3 en la mayoría de los casos) y 20 con infecciones inaparentes por DENV. Una vez realizado el ensayo de ADE a partir de muestras de plasma de los lactantes con infección primaria para DENV con el objetivo de identificar si las IgG de origen materno podían aumentar la infección, se identificó que tanto los lactantes que presentaron fiebre hemorrágica por dengue (FHD) (antigua clasificación clínica para dengue grave) como los que no presentaron FHD tuvieron una infección viral aumentada, concluyendo así que el ADE no puede ser el único determinante para el desarrollo de FHD (Libraty *et al.*, 2009). Por otro lado, Laoprasopwattana *et al.*, (2005) tampoco encontraron una relación entre los altos títulos de amplificación *in vitro* de sueros de niños, con la presentación de una infección severa por DENV-2 o DENV-3, aunque los métodos de laboratorio y en especial la cepa usada en la infección del ADE, pudieran explicar el hallazgo contradictorio. Sin embargo, probablemente en la inmunopatología de los casos severos de DENV, estén involucrados otros aspectos clave además del ADE, por ejemplo la tormenta de citocinas (Kurane *et al.*, 1991), el genotipo del virus (Vicente *et al.*, 2016), el origen étnico (García *et al.*, 2010), etc.

ADE y su relación con otros flavivirus

Resulta de gran interés que se haya reportado que el fenómeno de ADE no solo ocurre entre los 4 serotipos de DENV, sino también con otros virus pertenecientes a la familia Flaviviridae por la presencia de epítopes similares que pueden ser reconocidos por anticuerpos generados en una infección previa por un flavivirus. En lo que respecta a ZIKV, cronológicamente en el 2016 Priyamvada *et al.*, (2016) identificó que anticuerpos monoclonales humanos derivados de plasmoblastos de pacientes positivos para dengue poseen una reactividad cruzada con ZIKV y además causan ADE cuando se realizan ensayos en células U937. En la misma vía de evidencia, se describió que células K562 que

expresan FcγR, se infectan 4,4 y 1,6 veces más con ZIKV y DENV respectivamente al usar un suero positivo para DENV (Castanha *et al.*, 2017). Posteriormente Hermanns *et al.*, (2018) identificó la existencia de un aumento de la infección por ZIKV amplificado por anticuerpos para DENV en cultivos organotípicos de placenta humana. Corroborando los anteriores hallazgos Bardina *et al.*, (2017) utilizando muestras de plasma que provenían de pacientes en fase de convalecencia por infección de DENV, identificaron mediante ensayos *in vitro* que la reactividad (medida por ensayos de ELISA) de estas muestras a la proteína E de ZIKV era 350 veces mayor en comparación con las muestras de control, además los ensayos de ADE realizados en células K562 derivadas de humano Fcγ positivas mostraron una elevada amplificación de la infección en comparación con los controles. Adicionalmente, las muestras de plasma fueron administradas a ratones infectados con ZIKV en los que se evidenció un aumento de la viremia, morbilidad y algunos signos como fiebre. Finalmente, hasta la fecha el estudio más reciente de este fenómeno que involucra a DENV y ZIKV se encuentra reportado en los estudios realizados por Brown *et al.*, (2019), básicamente en un modelo animal de ratones homocigotos recesivos para Stat2 (knockout), que fueron infectados con ZIKV después de inocularlos con plasma de pacientes positivos para DENV o con plasma negativo para cualquier flavivirus. En el primer grupo se describió un aumento de seis veces en la replicación de ZIKV en la placenta y daños histopatológicos más acentuados en los ratones inoculados con sueros reactivos para DENV en comparación con los controles. Adicionalmente, se demostró que el pre-tratamiento con un anticuerpo monoclonal humano que tiene actividad amplificadora para DENV y ZIKV y su derivado modificado para no interactuar con FcγR, induce en el primer caso una disminución de tamaño en el feto y hasta un 50 % de reabsorción de la placenta y no así cuando se usa el monoclonal modificado, confirmando la reactividad cruzada y que el efecto de mayor infección y daño en la placenta es mediado por receptores Fc.

En contravía de estos hallazgos, en varios estudios no se ha identificado el fenómeno de ADE. Por ejemplo, no se encontró asociación con la presentación del síndrome de Guillain-Barré por ZIKV y la seropositividad previa para DENV en la Polinesia Francesa (Cao-Lormeau *et al.*, 2016). En una investigación realizada con voluntarios colombianos con serología positiva para ZIKV, sus sueros no indujeron ADE en monocitos U937 (Delgado *et al.*, 2018); lo cual se puede explicar por un alto título de anticuerpos neutralizantes en muestras tomadas antes de los dos años de haber cursado la infección.

Para el caso de otros Flaviviridae, en relación con la reactividad cruzada de anticuerpos de DENV no neutralizantes, en un estudio con pacientes pediátricos en Asia, se describió que el 57 % de los niños con anticuerpos específicos para virus de encefalitis japonesa

(JEV) presentaban dengue sintomático, mientras que en el grupo de seronegativos para JEV la proporción fue de 46 % (Anderson *et al.*, 2011). En adición, aunque no se encuentra reportada amplificación debido a reactividad cruzada con anticuerpos para DENV, estudios en ratones como los realizados por Gould y Buckley (1989) describieron ADE entre los virus de la fiebre amarilla (YFV) y JEV, mientras que Wallace *et al.*, (2003) identificaron en ratones el mismo fenómeno entre JEV y el virus de la encefalitis del valle de Murray (MVE).

Relación de ADE con la eficacia de las vacunas

Para comprender la relevancia que el fenómeno de ADE podría tener en una posible vacuna, es necesario entender que los serotipos de DENV poseen diferencias en sus secuencias de aminoácidos entre sí, por ejemplo, cuatro genotipos de DENV-3 difieren en aproximadamente el 7 % en los residuos de aminoácidos de la proteína E, y curiosamente, estos residuos se encuentran ubicados en lugares próximos o en sitios que podían ser reconocidos por anticuerpos (Wahala *et al.*, 2010). Es claro que una vacuna para DENV debe producir una respuesta inmune equilibrada de por vida para los cuatro serotipos, ya que una respuesta heterogénea de anticuerpos en los vacunados puede amplificar una infección secundaria e inducir una progresión hacia dengue grave. Una de las vacunas mejor conocidas y recientemente desarrollada, es la CYD-TDV (nombre comercial Dengvaxia), que fue diseñada utilizando el esqueleto de la vacuna contra la fiebre amarilla YF-17D (debido a su atenuación y a la inducción rápida y duradera de inmunidad) e insertando las proteínas E de los cuatro serotipos de DENV que dio como resultado una vacuna quimérica y tetravalente (Yauch y Shrestha, 2014). Fue la primera en ser aprobada para el uso en humanos, para esto se verificó previamente que cada serotipo inducía una excelente respuesta de anticuerpos y que también la formulación con los cuatro serotipos era adecuada. Sin embargo, en los estudios en humanos después de su administración parece producirse un fenómeno de interferencia, en el que uno de los virus no genera suficiente respuesta (Swaminathan *et al.*, 2013) y en ensayos clínicos por ejemplo se encontró que la inmunización tuvo mayor eficacia protectora para DENV-4 (77 %) y no tanto para DENV-2 (34 %) (Malisheni *et al.*, 2017).

Un análisis más detallado de las tasas de hospitalización por dengue en los grupos vacunados y no vacunados con la vacuna CYD-TDV, lanza algunas preocupaciones, pues la cifra de hospitalizados en quienes eran seronegativos para DENV antes de ser vacunados, es levemente mayor que en los vacunados seropositivos y que en aquellos que no fueron vacunados y que habitan en las zonas de estudio, permitiendo lanzar la hipótesis de que la vacuna “sensibiliza” a los seronegativos y los puede poner en una condición de riesgo de dengue grave (Halstead, 2017a). La

tasa de hospitalización de los vacunados a cinco años fue de 1,44 % (295/20 439) y el pico ocurrió en niños de cinco a ocho años, ya que seguramente por su corta edad eran seronegativos al momento de la vacunación. En principio, los datos publicados relacionados con esta vacuna, permiten inferir que las tasas de hospitalización no se reducen con el tiempo post-vacunación, posiblemente por la reducción en los títulos neutralizantes con el paso del tiempo, lo cual puede proporcionar en el individuo un ambiente ideal para que una infección por DENV se potencie, y se desencadene una modulación de los mecanismos de inmunopatogénesis que en última instancia conducirán a dengue grave y todas sus características clínicas conocidas.

Otra preocupación con respecto a las vacunas es la universalidad de la protección, en tanto los serotipos pueden tener variaciones específicas dependiendo del lugar geográfico en el que circulen, lo cual presupone que una vacuna que proteja de para los cuatro serotipos de DENV, debería estar en constante actualización o considerar la protección a virus de todo el mundo (Malisheni *et al.*, 2017).

Los resultados expuestos sugieren una amplificación de la enfermedad de dengue después de los cinco años de la administración de la vacuna CYD-TDV, debido a la disminución del potencial de neutralización de los anticuerpos y que conllevan a la aparición de reacciones cruzadas de anticuerpos durante infecciones naturales, favoreciendo el desarrollo de ADE. Se puede plantear que los anticuerpos que un individuo genera contra DENV después de la vacunación, no son suficientes para predecir la protección inmunológica de este individuo frente al virus, pues se ha propuesto que la inmunidad celular contra las proteínas no estructurales también juega un papel clave en la respuesta inmune y la protección contra dengue en las infecciones secundarias (Weiskopf *et al.*, 2013). Como esta vacuna está basada en el esqueleto del virus vacunal de fiebre amarilla, no se genera actividad para proteínas no estructurales de dengue que al parecer son necesarias para el adecuado control de la infección.

Una vacuna tetravalente que recientemente ha probado ser segura y bien tolerada conocida como DENVax o TAK-003, se basa en un esqueleto de un virus DENV-2 atenuado y en el cual han sido insertadas las proteínas prM y E de los otros serotipos, es capaz de generar una respuesta humoral y celular a largo plazo (Whitehead *et al.*, 2017), aunque se requiere comprobar que no induce ADE a largo plazo en individuos que viven en zonas endémicas. Para terminar, durante el desarrollo de una vacuna, se necesita considerar el fenómeno de reactividad cruzada no solo como uno de los factores para el desarrollo de ADE. El razonamiento de la existencia de epítopes conservados entre los flavivirus capaces de dar lugar a una “inmunidad generalizada” debe considerarse, sin embargo, serían necesarios diversos estudios para confirmar que estos epítopes pueden generar una inmunidad persistente

CONCLUSIONES

Existen diversos mecanismos que están involucrados en la inmunopatogénesis de la infección por DENV y que se asocian con resultados desfavorables en la evolución de una infección por el virus. Para el caso particular de ADE, su desarrollo está relacionado con el bajo potencial de neutralización que poseen los anticuerpos que continúan siendo opsonizantes durante una infección secundaria. Además, la inhibición de las vías de señalización producto de este fenómeno contribuye al desarrollo de dengue grave, aunque en la patogénesis de dengue grave también están involucrados otros fenómenos inmunes como la tormenta de citocinas y el pecado antigénico original. Existe información relevante de que el fenómeno de ADE también puede ocurrir entre DENV y otros flavivirus como por ejemplo ZIKV o JEV, lo cual se relaciona con la similitud antigénica de estos virus por su cercanía filogenética. Para el caso de la vacuna, se requiere que los prototipos además de generar una respuesta inmune equilibrada descarten la aparición del fenómeno de ADE que pueda inducir enfermedad grave ante el contacto con un virus natural

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Diana Marcela Castillo Perdomo de la Universidad El Bosque por sus contribuciones al desarrollo científico de estudiantes en formación. Revisión elaborada en el marco del Proyecto 55696, Contrato 406-2016 Financiado por Colciencias.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses

REFERENCIAS

- Anderson KB, Gibbons RV, Thomas SJ, Rothman AL, Nisalak A, Berkelman RL, *et al.* Preexisting Japanese encephalitis virus neutralizing antibodies and increased symptomatic dengue illness in a school-based cohort in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(10):e1311. Doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001311>
- Anderson KB, Gibbons RV, Cummings DA, Nisalak A, Green S, Libraty DH, *et al.* A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand. *J Infect Dis.* 2014;209(3):360-368. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jit436>
- Ayala-Nunez NV, Hoornweg TE, van de Pol DP, Sjollem KA, Flipse J, van der Schaar HM, *et al.* How antibodies alter the cell entry pathway of dengue virus particles in macrophages. *Sci Rep.* 2016;6:28768. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep28768>
- Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, Duehr J, Frere JJ, Brown JA. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting anti-flavivirus immunity. *Science.* 2017;356(6334):175-180. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.aal4365>
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504-507. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Boonnak K, Slike BM, Donofrio GC, Marovich MA. Human FcγRII cytoplasmic domains differentially influence antibody-mediated dengue virus infection. *J Immunol.* 2013;190(11):5659-5665. Doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203052>
- Brown JA, Singh G, Acklin JA, Lee S, Duehr JE, Chokola AN, *et al.* Dengue virus immunity increases Zika virus-induced damage during pregnancy. *Immunity.* 2019;50(3):751-762. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.005>
- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet.* 2016;387(10027):1531-1539. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
- Castanha PMS, Nascimento EJM, Braga C, Cordeiro MT, Carvalho OV, Mendonça LR, *et al.* Dengue Virus-Specific Antibodies Enhance Brazilian Zika Virus Infection. *J Infect Dis.* 2017;215(59):781-785. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw638>
- Castillo JA, Naranjo JS, Rojas M, Castaño D, Velilla PA. Role of Monocytes in the Pathogenesis of Dengue. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2019;67(1):27-40. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00005-018-0525-7>
- Chaturvedi UC. Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever. *Indian J Med Res.* 2009;129(1):1-3.
- Chau TN, Hieu NT, Anders KL, Wolbers M, Lien Le B, Hieu LT, *et al.* Dengue Virus Infections and Maternal Antibody Decay in a Prospective Birth Cohort Study of Vietnamese Infants. *J Infect Dis.* 2009;200(12):1893-1900. Doi: <https://doi.org/10.1086/648407>
- Chaudhury S, Gromowski GD, Ripoll DR, Khavrutskii IV, Desai V, Wallqvist A. Dengue virus antibody database: Systematically linking serotype-specificity with epitope mapping in dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(2):e0005395. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005395>
- Chotiwan N, Roehrig JT, Schlesinger JJ, Blair CD, Huang CYH. Molecular Determinants of Dengue Virus 2 Envelope Protein Important for Virus Entry in FcγRIIA-Mediated Antibody-Dependent Enhancement of Infection. *Virology.* 2014;456-457:238-246. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.03.031>
- Catteau A, Kalinina O, Wagner MC, Deubel V, Courageot MP, Despre P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *Printed in Great Britain. J Gen Virol.* 2003;84(10):2781-2793. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.19163-0>

- Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, et al. Enhancing cross-reactive anti-prM dominates the human antibody response in dengue infection. *Science*. 2010;328(5979):745-748. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1185181>
- Dejnirattisai W, Webb AJ, Chan V, Jumnainsong A, Davidson A, Mongkolsapaya J, et al. Lectin Switching During Dengue Virus Infection. *J Infect Dis*. 2011;203(12):1775-1783. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir173>
- Delgado FG, Torres KI, Castellanos JE, Romero-sanchez C, Simon-Lorière E, Sakuntabhai A, et al. Improved Immune Responses Against Zika Virus After Sequential Dengue and Zika Virus Infection in Humans. *Viruses*. 2018;10(9):480. Doi: <https://doi.org/10.3390/v10090480>
- Dyer O. Philippines to charge Sanofi staff and government officials over dengue vaccine. *BMJ (Int Ed)*. 2019;364:l1088. Doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.l1088>
- Flipse J, Wilschut J, Smit JM. Molecular mechanisms involved in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in humans. *Traffic*. 2013;14(1):25-35. Doi: <https://doi.org/10.1111/tra.12012>
- Flipse J, Dioso-toro MA, Hoornweg TE, Van de Pol DP, Urcuqui-Inchima S, Smit JM. Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in Primary Human Macrophages; Balancing Higher Fusion against Antiviral Responses. *Sci Rep*. 2016;6:1-13. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep29201>
- Freeman SA, Grinstein S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev*. 2014;266(1):193-215. Doi: <https://doi.org/10.1111/imr.12212>
- García G, Sierra B, Pérez AB, Aguirre E, Rosado I, Gonzalez N, et al. Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FcγRIIIa polymorphism. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(6):1153-1156. Doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0353>
- George JA, Kim SB, Choi YJ, Patil AM, Hossain FM, Uyangaa E, et al. TLR2/MyD88 pathway-dependent regulation of dendritic cells by dengue virus promotes antibody-dependent enhancement via Th2-biased immunity. *Oncotarget*. 2017;8(62):106050-106070. Doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22525>
- Gould EA, Buckley A. Antibody-dependent enhancement of yellow fever and Japanese encephalitis virus neurovirulence. *J Gen Virol*. 1989;70(6):15-18. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-6-1605>
- Guilliams M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2014;24(4):183-192. Doi: <https://doi.org/10.1038/nri3582>
- Guirakhoo F, Bolin RA, Roehrig JT. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology*. 1992;191(2):921-931. Doi: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90267-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90267-5)
- Guzmán MG, Kourí G, Valdés L, Bravo J, Vázquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica*. 2002;11(4):223-227. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1020-49892002000400003>
- Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med*. 1977;146(1):201-217. Doi: <https://doi.org/10.1084/jem.146.1.201>
- Halstead SB. Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. *Vaccine*. 2017a;35(47):6355-6358. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.089>
- Halstead SB. Achieving safe, effective, and durable Zika virus vaccines: lessons from dengue. *Lancet Infect Dis*. 2017b;17(11):378-382. Doi: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30362-6](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30362-6)
- Hermanns K, Göhner C, Kopp A, Schmidt A, Merz WM, Markert UR, et al. Zika virus infection in human placental tissue explants is enhanced in the presence of dengue virus antibodies in-vitro. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1):1-8. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0199-6>
- Huang X, Yue Y, Li D, Zhao Y, Qiu L, Chen J, et al. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection inhibits RLR-mediated Type-I IFN-independent signalling through upregulation of cellular autophagy. *Sci Rep*. 2016;6:22303. Doi: <http://doi.org/10.1038/srep22303>
- Hsieh SC, Wu YC, Zou G, Nerurkar VR, Shi PY, Wang WK. Highly Conserved Residues in the Helical Domain of Dengue Virus Type 1 Precursor Membrane Protein Are Involved in Assembly, prM Protein Cleavage and Entry. *J Biol Chem*. 2014;289(48):33149-33160. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.610428>
- Instituto Nacional de Salud. Informe evento dengue, Colombia a periodo epidemiológico XIII-2018. Bogotá D.C: Instituto Nacional de Salud; 2018. 3p.
- Katzelnick LC, Fonville JM, Gromowski GD, Bustos Arriaga JB, Green A, James SL, et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*. 2015;349(6254):1338-1343. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.aac5017>
- Katzelnick CL, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017;358:929-932. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
- Kou Z, Lim JY, Beltramello M, Quinn M, Chen H, Liu S, et al. Human antibodies against dengue enhance dengue viral infectivity without suppressing type I interferon secretion in primary human monocytes. *Virology*. 2011;410(1):240-247. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.11.007>
- Koyama S, Ishii KJ, Coban C, Akira S. Innate immune response to viral infection. *Cytokine*. 2008;43(3):336-341. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.009>

- Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, *et al.* Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest.* 1991;88(5):1473-1480. Doi: <https://doi.org/10.1172/JCI115457>
- Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, *et al.* Dengue Virus (DV) enhancing antibody activity in preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection. *J Infect Dis.* 2005;192(3):510-519. Doi: <https://doi.org/10.1086/431520>
- Libraty DH, Acosta LP, Tallo V, Segubre-Mercado E, Bautista A, Potts JA, *et al.* A prospective nested case-control study of dengue in infants: rethinking and refining the antibody-dependent enhancement dengue hemorrhagic fever model. *PLoS Med.* 2009;6(10):e1000171. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000171>
- Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. *Fields Virology.* 5 ed. Philadelphia: Editorial Lippincott Williams & Wilkins; 2007.p. 1101-11052.
- Malisheni M, Khaiboullina SF, Rizvanov AA, Takah N, Murewanhema G, Bates M. Clinical Efficacy, Safety, and Immunogenicity of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine (CYD-TDV) in Children: A Systematic Review with Meta-analysis. *Front Immunol.* 2017;8:863. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00863>
- Metz SW, Thomas A, Brackbill A, Xianwen Y, Stone M, Horvath K, *et al.* Nanoparticle Delivery of a Tetravalent E Protein Subunit Vaccine Induces Balanced, Type-Specific Neutralizing Antibodies to Each Dengue Virus Serotype. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(9):e0006793. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006793>
- Mikita CP, Padlan EA. Can we find a possible structural explanation for antibody-dependent enhancement of dengue virus infection resulting in hemorrhagic fever? *Med Hypotheses.* 2016;88:49-52. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.11.006>
- Ministerio de salud y protección social, Federación Médica Colombiana. *Dengue memorias.* Bogotá D.C: Ministerio de salud y protección social; 2013. 22p.
- Miller JL, de Wet BJM, Martinez-Pomares LM, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, *et al.* The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e17. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040017>
- Modhiran N, Kalayanarooj S, Ubol S. Subversion of innate defenses by the interplay between DENV and pre-existing enhancing antibodies: TLRs signaling collapse. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(12):e924. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000924>
- Nemésio H, Palomares-jerez MF, Villalain J. Hydrophobic segment of dengue virus C protein . Interaction with model membranes. *Mol Membr Biol.* 2013;30(4):273-287. Doi: <https://doi.org/10.3109/09687688.2013.805835>
- O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol.* 2017;7(5):353-364. Doi: <https://doi.org/10.1038/nri2079>
- Organización Mundial de la Salud. *Dengue: Pautas para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control.* Ginebra: OMS; 2009. p. 10-12.
- Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachon E, Vera MJ. *Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016.* *Biomédica.* 2017;37(2):27-40. Doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3769>
- Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(4):369-377. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>
- Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, *et al.* Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(28):7852-7857. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1607931113>
- Qiu J, Shang Y, Ji Z, Qiu T. *In-silico* Antigenicity Determination and Clustering of Dengue Virus Serotypes. *Front Genet.* 2018;9:621. Doi: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00621>
- Rodrigo WWSI, Jin X, Blackley SD, Rose RC, Schlesinger JJ. Differential Enhancement of Dengue Virus Immune Complex Infectivity Mediated by Signaling-Competent and Signaling-Incompetent Human FcγRIIA (CD64) or FcγRIIA (CD32). *J Virol.* 2006;80(20):10128-10138. Doi: <http://doi.org/10.1128/JVI.00792-06>
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, *et al.* Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol.* 1984;120(5):653-669. Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113932>
- Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):778-809. Doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778-809.2001>
- Sasmal SK, Takeuchi Y, Nakaoka S. T-Cell mediated adaptive immunity and antibody-dependent enhancement in secondary dengue infection. *J Theor Biol.* 2019;470:50-63. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.03.010>
- Swaminathan S, Khanna N, Herring B MS. Dengue vaccine efficacy trial: does interference cause failure?. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(3):191-192. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70028-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70028-8)
- Thomas G. furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(10):753-766. Doi: <http://doi.org/10.1038/nrm934>
- Velandia ML, Castellanos JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral Dengue virus: structure and viral cycle. *Infectio.* 2011;15(10):33-43. Doi: [http://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70074-1](http://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70074-1)

- Vicente CR, Herbing KH, Fröschl G, Malta Romano C, de Souza Areias, Cabidelle A, *et al.* Serotype influences on dengue severity: a cross-sectional study on 485 confirmed dengue cases in Vitória, Brazil. *BMC Infect Dis.* 2016;16:320. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1668-y>
- Wahala WMPB, Donaldson EF, de Alwis R, Accavitti-Loper MA, Baric RS, de Silva AM. Natural strain variation and antibody neutralization of dengue serotype 3 viruses. *PLoS Pathog.* 2010;6(3):e1000821. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000821>
- Wallace MJ, Smith DW, Broom AK, Mackenzie JS, Hall RA, Shellam GR MP. Antibody-dependent enhancement of Murray Valley encephalitis virus virulence in mice. *J Gen Virol.* 2003;84(7):1723-1728. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.189800>
- Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, *et al.* High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology.* 2003;305(2):330-338. Doi: <http://doi.org/10.1006/viro.2002.1704>
- Wang TT, Sewatanon J, Memoli MJ, Wrammert J, Bournazos S, Bhaumik SK, *et al.* IgG antibodies to dengue enhanced for Fc γ R11A binding determine disease Severity. *Science.* 2017;355(6323):395-398. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.aai8128>
- Weiskopf D, Angelo MA, de Azeredo EL, Sidney J, Greenbaum JA, Fernando AN, *et al.* Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(22):E2046-E2053. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1305227110>
- Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MC, Igarashi A, Kääriäinen L, *et al.* *Flaviviridae.* *Intervirology.* 1985;24(4):183-192. Doi: <http://doi.org/10.1159/000149642>
- Whitehead SS, Durbin AP, Pierce KK, Elwood D, McElvany BD, Fraser EA, *et al.* In a randomized trial, the live attenuated tetravalent dengue vaccine TV003 is well-tolerated and highly immunogenic in subjects with flavivirus exposure prior to vaccination. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2017;11(5):e0005584. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005584>
- Yauch LE, Shresta S. Dengue virus vaccine development. *Adv. Virus Res.* 2014;88:315-372. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00007-6>
- Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol.* 2003;10(11):907-912. Doi: <https://doi.org/10.1038/nsb990>
- Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, *et al.* Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat. Struct Mol Biol.* 2013;20(1):105-110. Doi: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2463>