

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Amplificación dependiente de anticuerpos del virus dengue en cepas cubanas utilizando anticuerpos monoclonales

Lic. Maritza Pupo,<sup>1</sup> Dra. Nevis Amín,<sup>2</sup> Lic. Mailing Álvarez,<sup>3</sup> Lic. Luis Morier,<sup>4</sup> Lic. Hermis Rodríguez,<sup>5</sup> Lic. Zolia González<sup>6</sup> y Dra. María Guadalupe Guzmán<sup>7</sup>

### RESUMEN

Se describieron los diferentes comportamientos de anticuerpos monoclonales anti-dengue serotipo 2 (H3/6, 4G3) y anti-proteína recombinante de la envoltura del virus dengue cuando fueron enfrentados a diferentes cepas de los serotipos 2 y 4 de este virus (D2 Nueva Guinea C, A15 cepa cubana y A15 propagada 53 veces en cultivo de riñón de perro Beagly y D4 H-2412 cepa prototipo) en un ensayo de inmunoamplificación dependiente de anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales han demostrado ser una herramienta eficaz para explicar que la neutralización y el incremento de la multiplicidad viral pueden realizarse como funciones biológicas separadas. Solamente el AcM H3/6 fue capaz de producir el fenómeno *amplificación dependiente de anticuerpos* frente a la cepa A15 con un incremento significativo en la multiplicación viral. Los AcMs 4G3 y 4B6 no fueron capaces de inmunoamplificar la multiplicación viral de las cepas estudiadas.

**Palabras clave:** Dengue, ADA, anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos actúan como un arma de importancia inmunológica en la prevención y el control de muchas infecciones. Aquellos que son específicos contra un virus pueden neutralizar a este evitando la infección viral de forma diferente, como por ejemplo la lisis celular uniéndose a las células infectadas y activando la cascada del complemento o uniéndose al receptor Fc de las células asesinas o monocitos/macrófagos, etc. Sin embargo, los anticuerpos específicos pueden incrementar o "amplificar" también la replicación viral, un efecto conocido como *amplificación dependiente de anticuerpos* (ADA).<sup>1,2</sup> El primer reporte de este fenómeno fue hecho por *Hawkes* y otros,<sup>3</sup> quienes estudiaron la neutralización en

algunos arbovirus. Después de estos estudios otros investigadores, basados en hallazgos epidemiológicos y de laboratorio, describieron el mismo fenómeno para el virus dengue y sugirieron que este desempeña un papel importante en la patogénesis de la fiebre hemorrágica del dengue/ síndrome de choque por dengue (FD/SCD).<sup>4,5</sup>

El dengue hemorrágico (DH) tiene una respuesta inmune secundaria como factor de riesgo.<sup>5</sup> La reemergencia de los 4 serotipos y la circulación de estos simultáneamente, incrementan el riesgo de la infección secuencial. La hipótesis más aceptada para DH está basada sobre el fenómeno ADA.<sup>6</sup> Este fenómeno sucede cuando el virus infectante forma un complejo con

<sup>1</sup> Doctora en Ciencias de la Salud. Licenciada en Microbiología. Investigadora Titular. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf" (IPK).

<sup>2</sup> Máster en Virología. Doctora en Medicina. Aspirante a Investigadora. Instituto Finlay de Sueros y Vacunas.

<sup>3</sup> Máster en Virología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada. IPK.

<sup>4</sup> Máster en Virología. Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.

<sup>5</sup> Máster en Bacteriología. Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigador. IPK.

<sup>6</sup> Licenciada en Biología. Especialista en Cultivo de Tejidos. IPK.

<sup>7</sup> Doctora en Ciencias Médicas. Doctora en Medicina. Investigador Titular. IPK

anticuerpos no neutralizantes, a través los receptores FcγR en las células fagocíticas mononucleares.<sup>1</sup> La replicación del virus induce a estas células infectadas a liberar mediadores vasoactivos que producen permeabilidad vascular y manifestaciones hemorrágicas típicas del DH. Se ha descrito que los virus que portan varios determinantes amplificadores podrían mostrar mayor incremento en la infección, con un correspondiente incremento en la severidad de esta, mientras virus que portan pocos determinantes amplificadores podrían producir infecciones leves.<sup>6</sup> Por otra parte, durante las epidemias cubanas de 1981 y 1997 se observaron infecciones severas en hospederos inmunes al virus dengue 1, cuando fueron posteriormente infectados de forma secundaria con el virus dengue 2.<sup>7</sup>

Los anticuerpos monoclonales (AcM) han probado ser una herramienta precisa para mostrar que las funciones de neutralización e incremento pueden ser separadas. La mayoría de los anticuerpos monoclonales utilizados para reportar la actividad de ADA en el virus dengue, han reconocido epítopes sobre la superficie de glicoproteínas, 2 de estas han sido la de la envoltura E y la prM.<sup>2</sup> La caracterización con AcM de los llamados epítopes amplificadores han mostrado que están involucrados epítopes serotipos específicos, subcomplejo específico y de reactividad cruzada a los diferentes serotipos y al grupo (flavivirus).<sup>8</sup> En este trabajo se estudió mediante ensayos de ADA 3 AcM, 2 producidos contra el virus dengue 2 (H3/6 y 4G3) y 1 contra una proteína recombinante (PRE) del serotipo 4 (4B6), los cuales fueron enfrentados a diferentes cepas virus dengue con el objetivo de conocer si sobre estas existían determinantes amplificadores de la replicación viral reconocidos por esos anticuerpos.

## MÉTODOS

### CULTIVO DE CÉLULAS

Las células C6/36 HT *Aedes albopictus*<sup>9</sup> fueron crecidas en medio MEM con aminoácidos no esenciales 0,2 mM, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomocina 100 mg/mL y suero fetal bovino 10 % (SFB).

Cultivos primarios de células de riñón de perro Beagle (RPB)<sup>10</sup> fueron crecidos en medio Dulbecco MEM suplementado con 10 % SFB y 100 U/mL de penicilina más 100 mg/mL de estreptomocina.

El BHK-21 clono 15, amablemente suministrado por el profesor SB Halstead, *John de Hopkins University*, fue crecido en medio MEM suplementado con aminoácidos no esenciales y 10 % de SFB.

Las células de macrófagos P338D1 (ATCC, TIB-63) fueron crecidas en medio RPMI 1640 con glutamina 2 mM y 10 % SFB.

### CEPAS VIRALES

Se estudiaron 3 cepas de virus dengue, dengue 2 (DEN-2) y 1 dengue 4 (DEN-4) mantenidas en el Laboratorio de Arbovirus del Instituto de Medicina Tropical. El virus dengue 2 A15 aislado en la epidemia cubana de 1981 y la cepa 58 de la epidemia cubana de 1997,<sup>11,12</sup> las cuales estaban relacionadas a la fiebre hemorrágica de dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD); el virus DEN-2 A15 con 53 pases en RPB y el Dengue 4 H-241 se utilizaron para llevar a cabo el ensayo de inmunoamplificación. Las características de estos virus se muestran en la tabla 1.

**TABLA 1.** Características de las cepas virales

Cepas	Desde sistema biológico	No. de pases	Sistema biológico para activar	No. de pases	Título de Nt UFP/mL
Dengue 2 A 15	CRL	3	C6/36 HT	1	1,2 x 10 <sup>5</sup>
Dengue 2 58 1997	C6/36 HT	4	C6/36 HT	-	3 x 10 <sup>6</sup>
Dengue 2 53p	RPB	53	-	-	3 x 10 <sup>3</sup>
Dengue 4 H241	CRL	18	C6/36 HT	3	1,3 x 10 <sup>4</sup>

CRL: cerebro de ratón lactante.

## TITULACIÓN VIRAL

La infectividad viral fue determinada por unidades formadoras de placas como se ha descrito previamente por *Morens* y otros.<sup>13</sup>

## NEUTRALIZACIÓN

La actividad de neutralización fue medida usando un método de neutralización por reducción de placas (NTRP).<sup>14</sup> Brevemente, se utilizaron diluciones en base 2 de los AcMs desde 1/20 hasta 1/20480, las que fueron mezcladas con una dilución del virus de 1/200 e incubadas a 37 °C por 1 h. De estas mezclas se añadieron 50 µL sobre células BHK-21 y los tiempos de incubación fueron dependientes del serotipo empleado.

## ENSAYO DE ADA

Se realizó un semi-microensayo en células de macrófagos P338D1.<sup>15</sup> Las condiciones óptimas habían sido establecidas previamente. Los AcM producidos *in vivo* fueron diluidos desde 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-6</sup>. Estas fueron mezcladas v/v con cada cepa seleccionada, diluida para lograr una multiplicidad de infección (moi) de 0,1 y 0,5. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 1 h para facilitar la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Posteriormente cada mezcla fue añadida a células P338D1 e incubadas a 37 °C y atmósfera de CO<sub>2</sub> 5 %. El virus fue cosechado por congelación y descongelación a las 96 h y titulado hasta punto final.

## ANTICUERPOS MONOCLONALES

El AcM H3/6 derivado del virus DEN-2 cepa Nueva Guinea C (NG-C)<sup>16</sup> y el AcM 4G3<sup>17</sup> fueron obtenidos en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Las células híbridas fueron reproducidas en ratones BALB/c para la obtención del AcM.<sup>18</sup> Las características de los AcMs se muestran en la tabla 2.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se determinó el incremento en el número de placas, mediante la relación de la media del conteo de placas obtenida de los cultivos de células infectadas en presencia de AcMs entre la media

del conteo de placas de cultivos infectados en presencia de suero control negativo para cada dilución.<sup>19</sup> Significación estadística del incremento de la multiplicación viral calculado por la fórmula de *Detre* y *White*.<sup>19,20</sup>

**TABLA 2.** Características biológicas de los AcMs

AcMs	Especificidad	IH*	FC*	Nt*	Isotipo
4G3	complejo	16	8	1980	IgG1
H3/6	complejo	8	NR	1050	IgG1
4B6	serotipo 4	80	NR	40	IgG2a

NR: no realizado, IH: inhibición de la hemaglutinación, FC: fijación de complemento, \* Título de cada AcM para cada ensayo.

## RESULTADOS

Este estudio estuvo basado en 3 AcMs contra la proteína de la envoltura del dengue (E). Estos anticuerpos poseían los isotipos IgG1 e IgG2a, los que han sido descritos previamente como isotipos amplificadores de la multiplicidad viral.<sup>1</sup>

Todos los AcMs tuvieron actividad neutralizante contra el virus homólogo. Los AcMs 4G3 y H3/6 mostraron altos títulos de neutralización (1/1980 y 1/1050), mientras que el 4B6 neutralizó en menor dilución (1/40). No hubo neutralización cruzada.

EL AcM H3/6 exhibió un mayor número de placas (tabla 3) y fue el único capaz de desarrollar un incremento viral estadísticamente significativo en células P338D1 contra el virus D2 A15 (fig.). Este AcM no fue capaz de reconocer al virus D2 A15 con 53 pases en PDK ni a la cepa D4 H-241. Sin embargo, mostró un ligero incremento que no fue estadísticamente significativo. El AcM 4G3 no reconoció a ninguna de las cepas; no obstante, es interesante destacar que fueron producidas algunas placas con el virus D-2 A15 pasado 53 veces en RPB cuando el anticuerpo estuvo presente, aunque esto no tuvo un valor estadísticamente significativo. El AcM 4B6 específico a la cepa D-4 H-241 mostró resultados similares (fig.).

**TABLA 3.** Incremento de la multiplicidad en las cepas cubanas en presencia de AcMs anti-dengue

AcMs	Título de amplificación/incremento del número de placas		
	D2 A15	D2 A15 53p	D4 H241
4G3	10 <sup>6</sup> /0	10 <sup>6</sup> /6	10 <sup>6</sup> /0
H3/6	10 <sup>8</sup> /12	10 <sup>8</sup> /0	10 <sup>8</sup> /0
4B6	10 <sup>6</sup> /0	10 <sup>6</sup> /0	10 <sup>6</sup> /2

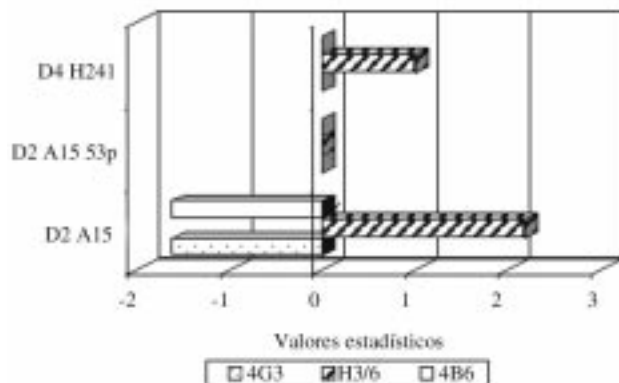


Fig. Comparación del análisis estadístico en los ensayos de ADA en P338D1 con los AcM anti-dengue 2 y 4. El análisis estadístico está basado en la fórmula de Detre y White y fueron considerados valores significativos mayores que 1,96.

## DISCUSIÓN

Los AcMs son herramientas útiles y sensibles para los estudios de ADA. El uso de estos en la amplificación viral es de hecho una situación artificial, no obstante permite una cercana aproximación a la forma natural y pueden ser utilizados como un modelo para el suero policlonal. Existen varios reportes de su aplicación en este tipo de ensayos.<sup>20-24</sup> Los AcMs que reconocen las proteínas E y prM han sido hasta ahora capaces de amplificar la multiplicación por el virus dengue.<sup>1,25</sup> El fenómeno de ADA ha sido atribuido al isotipo IgG aunque la IgM en presencia de complemento ha estado involucrada también, al menos, de forma teórica.<sup>1</sup> Los subtipos de anticuerpos no han sido un parámetro para explicar la amplificación de diferentes cepas, sin embargo ha sido reportado que AcMs IgG1, IgG2a e IgG2b específicos al virus dengue pueden amplificar la infección cuando se utilizan células que poseen el receptor Fc.

Este estudio mostró diferentes comportamientos de AcMs derivados de los virus Den-2 y Den-4 en ensayos de ADA utilizando células P338D1 y diferentes cepas de virus dengue.

El AcM H3/6, el cual reconoce al complejo dengue fue el único AcM-amplificador que se utilizó en células P338D1 para producir el fenómeno ADA. Este AcM reaccionó con la cepa D2-A15, produciendo un incremento viral significativo. Sin embargo, este mismo fenómeno no fue detectable cuando el AcM se enfrentó a la cepa D2 A15 después de 53 pases en RPB. La incapacidad del

H3/6 de desarrollar ADA con esta cepa pudiera ser debido a la ausencia del epítipo amplificador viral involucrado en el efecto ADA. Los autores de este trabajo consideran que los pases sucesivos de esta cepa en este sistema no permisivo pudieron variar o producir la pérdida de estos determinantes. Por otra parte el AcM H3 /6 no produjo efecto ADA con la cepa D4 H241, posiblemente debido a que este AcM generado a partir de una cepa de dengue 2 no sea capaz de reconocer epítopos amplificadores en una cepa del serotipo 4.

No se observó incremento con el AcM 4G3 frente a la cepa D2 A15, pero sí se observó un incremento en el número de placas contra D2 A15 53p RPB. Una inferencia a esta observación pudiera estar relacionada con el origen de este AcM, el cual fue seleccionado por un ELISA celular donde este anticuerpo podía reconocer a la proteína E y parte de la membrana celular.<sup>26</sup> La proteína E puede estar expuesta en diferentes formas sobre un cultivo celular que en el cerebro de ratones lactantes infectados.<sup>27</sup>

Algunos estudios han encontrado que el ADA es una característica de anticuerpos tipo específicos.<sup>20</sup> En este trabajo el AcM 4B6<sup>18</sup> falló para incrementar la infección con las cepas de virus dengue ensayadas en células P338D1. Sin embargo, este hallazgo puede estar relacionado a la tipo-especificidad del anticuerpo.

Por otra parte, muchos investigadores han tratado de relacionar el perfil serológico de los anticuerpos con los títulos de inhibición de la hemaglutinación y neutralización. En estos resultados los AcMs estudiados tuvieron bajos

títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y altos títulos de anticuerpos neutralizantes, por lo que se pudieron relacionar estas características con el incremento de la multiplicidad viral. Los primeros estudios acerca del ADA solo relacionaron este fenómeno con epítopes grupo o complejo específicos, a partir de los resultados obtenidos con AcMs con actividad IH y pobre actividad neutralizante. Sin embargo, experimentos posteriores mostraron que AcMs con baja o ninguna actividad IH eran capaces de producir ADA;<sup>27,28</sup> de la misma forma que AcMs no neutralizantes eran capaces de producir ADA. Todos estos resultados pudieron establecer que habían 3 tipos de AcMs: amplificadores y neutralizantes, amplificadores y no neutralizantes y no amplificadores y neutralizantes;<sup>29,30</sup> por lo que el epítipo amplificador podía ser cualitativamente diferente y la actividad amplificadora puede ser mostrada por el mismo AcM en diferentes concentraciones.

De los AcMs, 2 (4G3 y 4B6) mostraron actividad neutralizante y no amplificadora, mientras que el H3/6 mostró ambas actividades. *Cardosa* obtuvo resultados similares en el estudio de ADA de AcMs contra la proteína E del virus dengue 2.<sup>31</sup>

Comparando el fenómeno de ADA con el AcM H3/6 cuando este fue probado contra el virus dengue 2 cepa A15 y A15 53 p en RPB, se puede sugerir que el epítipo amplificador pudo haber sufrido algún cambio durante el proceso de atenuación de la cepa que no se evidenció amplificación alguna. Existe un criterio general reportado por *Burton* que solo los anticuerpos anti-E, los cuales se unen a espículas de la envoltura del virus, serán neutralizante o mostrarán actividad antiviral. Sin embargo, no se conoce (o no se reporta) si todos los anticuerpos específicos a envoltura neutralizan el virus.

El fenómeno ADA puede ser, a primera vista, un fenómeno provocado por anticuerpos que se unen pero no neutralizan al virus, pero en este caso el incremento ocurre con anticuerpos neutralizantes pero a concentraciones subneutralizantes.<sup>32,33</sup> El virus dengue es un clásico ejemplo de este fenómeno donde la neutralización es a concentraciones relativamente altas, mientras que la amplificación es observada a bajas concentraciones. Sin embargo, algunos investigadores señalan que la amplificación es un

evento *multihit* donde existe una correlación excelente entre la unión de las espículas de la proteína viral de la envoltura y la neutralización, sugiriendo que la neutralización está directamente relacionada con los sitios de ocupación sobre el virión. En el caso del virus dengue plantean que también ocurre un efecto *multihit*, pero en este caso la internalización del virus, gracias a los receptores Fc del anticuerpo, es una alternativa para permitir a las células blanco una unión más estrecha de la envoltura a bajas concentraciones de anticuerpos.<sup>32</sup> En resumen, en lo que sí muchos investigadores están de acuerdo, es que ambos fenómenos, unión y neutralización, están muy relacionados y merecen ser estudiados profundamente

#### SUMMARY

The different behaviors of antidengue monoclonal antibodies serotype 2 (H3/6, 4G3) and antiprotein recombinant from the dengue virus sheath were described when they faced diverse strains from the serotypes 2 and 4 of this virus (D2 New Guinea C, A15 Cuban strain and A15 propagated 53 times in culture of Beagley dog kidney and D4 H-22412 prototype strain) in an immunoamplification assay dependent of antibodies. The monoclonal antibodies have proved to be an efficient tool to explain that the neutralization and increase of viral multiplicity may be carried out as separate biological functions. Only the H3/6 monoclonal antibody was capable of producing the amplification assay dependent phenomenon against the A15 strain with a significant rise in the viral multiplication. The 4G3 and 4B6 monoclonal antibodies were not capable of immunoamplifying the viral multiplication of the studied strains.

**Key words:** Dengue, ADA, monoclonal antibodies.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kurane I, Mady BJ, Ennis FA. Antibody enhancement of dengue virus infection. *Rev Med Virol* 1991;1:211-21.
2. Porterfield JS. Antibody dependent enhancement of viral infectivity. *Adv Virus Res* 1986;31:335-54.
3. Hawkes RA. Enhancement of the infectivity of arbovirus by specific antisera produced in domestic fowls. *Aust J Exp Med Sc* 1964;42:465-82.
4. Halstead SB, O'Rourke EJ. Antibody enhanced dengue virus in primate leucocytes. *Nature* 1977;265:739-41.
5. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue virus and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 1977;146:210-7.
6. Morens D, Halstead SB. Disease severity related antigenic differences in dengue 2 strains detected by dengue 4 monoclonal antibodies. *J Med Virol* 1987 d;22:169-74.
7. Guzmán MG, Kourí G, Halstead SB. Do escape mutants explain rapid increases in the case fatality rates within epidemics? *Lancet* 2000;355:1902-3.
8. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock and hemorrhages: pathogenic cascade. *Rev Inf Dis* 1989;11(suppl 4):S830-9.

9. Zhu G, Liu Z, Wang J. Improve technique for dengue micro cell culture. *Chinese Med J* 1984;97:73.
10. Castillo A, Morier L, Soler M, Guzmán MG, González Z. Obtención de células de cultivo primario de perro beagle (RPB) y establecimiento de un banco criopreservado. *Rev Cubana Med Trop* 1995;47(3):199-200.
11. Kourí G, Guzmán MG, Bravo J, Triana C. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic. *Bull WHO* 1989;107:375-80.
12. Kourí G, Guzmán MG, Valdés L, Carbonel I, del Rosario D, Vázquez S, et al. Re-emergence of dengue in Cuba a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis* 1998;4(1):89-92.
13. Morens DM. Antibody dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis* 1994;19:500-12.
14. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Ravihat P, Rayboure N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue virus by semi-micro methods in BHK-21. Comparison of the BHK-21 suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985;250-4.
15. Halstead SB, Larsen K, Klik S, Peiris JSM, Cardoso J, Porterfield JS. Comparison of P388D1 mouse macrophage cell line and human monocytes for assay of dengue 2 infection enhancing antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32(1):157-63.
16. Hermida C, Pupo M, Guzmán MG, González M, Marcet R. Empleo de un anticuerpo monoclonal anticomplejo en la purificación viral. *Rev Cubana Med Trop* 1992;44(3):171-6.
17. Pupo M, Rodríguez H, Vázquez S, Vilaseca JC, Álvarez M, Otero A, et al. Monoclonal antibodies raised to the dengue-2 virus (Cuban strain A15) which recognize viral structural proteins. *Hybridoma* 1997;16:4.
18. Pupo M, Rodríguez R, Álvarez M, Amin N, Rodríguez H, Morier L, et al. Development of a monoclonal antibody specific to a recombinant protein from dengue virus type 4 expressed in *Pichia pastoris*. *Hybridoma* 2000;20(1):35-41.
19. Halstead SB, Venkateshan CN, Gentry MK, Larsen LK. Heterogeneity of infection enhancement of dengue 2 strains by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1984;132(3):1529-32.
20. Detre K, White C. The comparison of two Poisson distributed observations. *Biometrics* 1970;26:851-4.
21. Morens DM, Halstead S B, Marchette NJ. Profiles of antibody dependent enhancement of dengue virus type 2 infection. *Microbiol. Pathogenesis* 1987 a;3:231-7.
22. Morens DM, Larsen LK, Halstead SB. Study of the distribution of antibody dependent enhancement determinants on dengue 2 isolated using dengue 2 derived monoclonal antibodies. *J Med Virol* 1987b;22:163-7.
23. Morens DM, Venkateshan CN, Halstead SB. Dengue 4 virus monoclonal antibodies identify epitopes that mediate immune infection enhancement of dengue 2 viruses. *J Gen Virol* 1987c;68:91-8.
24. Morens DM, Halstead SB. Disease severity related antigenic differences in dengue 2 strains detected by dengue 4 monoclonal antibodies. *J Med Virol* 1987d;22:169-74.
25. Morens DM, Halstead SB. Measurement of antibody dependent infection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. *J Gen Virol* 1990;71:2909-14.
26. Halstead SB, Venkateshan CN, Gentry MK, Larsen LK. Heterogeneity of infection enhancement of dengue 2 strains by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1984;132(3):1529-32.
27. Lee E Weir RE, Dalgarno L. Changes in the dengue virus major protein on passaging and their localization on three-dimensional structure of the protein. *Virology* 1997;232:281-90.
28. Brandt WE, McCown JM, Gentry MK, Russell PK. Immune enhancement of dengue 2 virus replication in the U937 human monocyte line by cross-reactive monoclonal antibodies. *Fed Proc* 1981;40:1065.
29. Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995;1:55-7.
30. Morens DM. Antibody dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis* 1994;19:500-12.
31. Cardoso MJ. Dengue vaccine design: issues and challenges. *Brit Med Bull* 1998;54(2):395-405.
32. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 2004;113:946-51.
33. Burton DR, Williamson RA, Parren PWH. Antibody and virus: Binding and Neutralization. *Virology* 2000;270:1-3.

Recibido: 13 de enero de 2004. Aprobado: 16 de septiembre de 2004.

Lic. Maritza Pupo. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2, AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana. Teléfs 202-04-36 al 45. Correo electrónico: mpupo@ipk.sld.cu.