

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Producción *ex vivo* de TNF α y óxido nítrico por células sanguíneas en presencia de virus dengue

Dra. Ana B. Pérez,¹ Lic. Gissel García,² Dra. Beatriz Sierra,³ Lic. Mayling Álvarez,⁴ Lic. Susana Vázquez,⁵ Dra. María V. Cabrera,⁶ Dr. Luis Valdés⁷ y Dra. María G. Guzmán⁸

RESUMEN

OBJETIVO: niveles elevados de TNF α se han vinculado al desarrollo de la forma clínica severa de la infección por dengue. La producción de óxido nítrico parece estar disminuida en casos con fiebre hemorrágica del dengue al comparar con la fiebre dengue, sin embargo, no se conoce el papel de estos mediadores en una infección terciaria por el virus. **MÉTODOS:** la capacidad de las células sanguíneas de individuos con antecedentes de infección por dengue de producir TNF α y óxido nítrico al ser cultivadas con un serotipo diferente del virus en una infección terciaria *ex vivo*, fue medida en los sobrenadantes de cultivo mediante el empleo de un estuche ELISA comercial y el *test* de Griess, respectivamente. **RESULTADOS:** la estimulación con virus dengue indujo la liberación de altos y variables niveles de TNF α en el sobrenadante de células de sangre total de los individuos estudiados, apoyando el posible papel del TNF α en la patogénesis de una infección terciaria sintomática por dengue. La síntesis de óxido nítrico, en las condiciones experimentales estudiadas, no difirió entre casos con historia de fiebre dengue y fiebre hemorrágica del dengue, al parecer estaba algo inhibida en presencia de anticuerpos heterotípicos. **CONCLUSIONES:** los niveles diferenciales de síntesis de TNF α entre individuos pudieran tener implicaciones en el desarrollo de una infección natural terciaria por dengue.

Palabras clave: Dengue, TNF α , óxido nítrico.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el dengue se ha convertido en una importante enfermedad infecciosa emergente en las áreas tropicales y subtropicales del mundo.¹ La infección es causada por 1 de 4 serotipos virales existentes y se manifiesta por 2 formas clínicas: la fiebre dengue (FD) y la fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por

dengue (FHD/SCD). La FHD se asocia generalmente a una infección secundaria por un serotipo viral heterólogo al de la primoinfección.²

Varios estudios han defendido el papel de las citoquinas proinflamatorias, y especialmente de TNF α , en la inducción de extravasación de plasma, rasgo clínico dominante de la FHD/SCD. Este fenómeno ha sido atribuido a una disfunción de las células endoteliales vasculares provocada por esta

¹ Especialista de I Grado en Inmunología. Investigadora Auxiliar. Instructora. Departamento de Virología, Centro Colaborador OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su Vector, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Máster en Ciencias. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada. Instructora. Departamento de Virología, IPK.

³ Máster en Ciencias. Especialista de I Grado en Inmunología. Profesor Auxiliar. Investigador Auxiliar. Departamento de Virología, IPK.

⁴ Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología. Investigador Auxiliar. Instructor. Departamento de Virología, IPK.

⁵ Doctora en Ciencias. Licenciada en Bioquímica. Profesora Titular. Investigador Titular. Departamento de Virología, IPK.

⁶ Máster en Ciencias. Especialista de I Grado en Microbiología. Centro Provincial de Higiene y Epidemiología (CPHE), Santiago de Cuba.

⁷ Especialista de II Grado en Epidemiología. Profesor Titular. CPHE, Santiago de Cuba.

⁸ Doctora en Ciencias. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular. Profesor Titular. Departamento de Virología, IPK.

citoquina.³⁻⁵ Existen numerosas evidencias de asociación *in vivo* de niveles elevados de TNF α y la enfermedad severa que derivan tanto de estudios que detectan la citoquina en suero o plasma,^{6,7} como en los que muestran su presencia al nivel de células mononucleares de sangre periférica de pacientes.⁸ Así mismo, se han correlacionado los niveles aumentados de TNF α con las manifestaciones hemorrágicas⁹ y del receptor II de TNF α con trombocitopenia.¹⁰ La asociación de un genotipo particular de TNF α (alelo A en TNF-308) a la respuesta patogénica en la infección por dengue ha sido recientemente reportado.¹¹

Por su parte, el óxido nítrico (ON) es reconocido como un importante mensajero intracelular y extracelular, que se ha asociado a la patogénesis de fiebres hemorrágicas virales y en especial a la infección por dengue, por mediar daño de células endoteliales y posible participación en la génesis de la extravasación de líquido.¹²

En el presente estudio sus autores se propusieron evaluar la capacidad de células sanguíneas de individuos que habían padecido FD o FHD, de producir TNF α y ON al ser estimuladas *ex vivo* con virus dengue.

MÉTODOS

MUESTRA

El estudio se llevó a cabo utilizando sangre venosa periférica procedente de 30 individuos con antecedentes de haber padecido infección secundaria a virus dengue 2, en la epidemia de Santiago de Cuba de 1997.¹³ En todos los casos los individuos habían padecido una infección primaria veinte años antes por dengue 1, en la primera gran epidemia de dengue clásico ocurrida en Cuba en 1977-1978.¹⁴ La muestra se dividió en 2 grupos de acuerdo con la forma clínica de presentación de la infección: 15 fiebre dengue y 15 fiebre hemorrágica por dengue. Los individuos seleccionados fueron de sexo masculino y estaban comprendidos en un rango de edad entre 20 y 45 años.

La presencia de anticuerpos neutralizantes en los sueros de los individuos del estudio fue explorada a los 4 serotipos del virus por ensayo de neutralización,¹⁵ se detectaron solo anticuerpos anti-dengue 1 y dengue 2 en todos los casos.

VIRUS

El virus dengue 3 cepa 116/00 fue crecido en células Vero inoculadas a una multiplicidad de 0,1. El sobrenadante de cultivo fue cosechado a las 48 h y clarificado por centrifugación a 6 000 g por 30 min a 4 °C. El título viral se calculó por el método de placas en células BHK21.¹⁶ Se preparó un control antigénico celular en iguales condiciones sin inoculación del virus.

ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS *EX VIVO*

Se realizó punción de la vena cubital y extracción de 5 mL de sangre periférica de cada individuo de la muestra. La sangre se incubó en tubos de 4,5 mL a razón de 1 mL de sangre por tubo en presencia de 10⁴ ufp (0,1 mL) de virus dengue 3 infectivo, o el control celular, por 18 h a 37 °C, 5 % de CO₂ en atmósfera húmeda. Pasado este tiempo los sobrenadantes de cultivo (plasma) fueron cosechados siguiendo una centrifugación a 300 g y congelados a - 70 °C hasta su uso.

DETERMINACIÓN DE TNF α

Se realizó la cuantificación de TNF α en los sobrenadantes de cultivo mediante un estuche comercial de ELISA tipo *sandwich* (R&D system). Los resultados fueron expresados en pg/mL.

DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Los niveles de ON en sobrenadantes de cultivo fueron determinados por la acumulación de nitritos con el empleo de la reacción calorimétrica de Griess.¹⁷ Brevemente, 50 mL del sobrenadante de cultivo fueron mezclados con igual volumen de una mezcla de nitrato reductasa 2 U/mL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), NADPH 1,72 mM (Sigma), FAD 0,22 mM (Sigma), Tampón fosfato pH 7,5 y 100 mL de reactivo Griess (1 % sulfanilamida/0,1 % naftilenediamina dihidroclorito/2,5 % H₃PO₄). Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente se leyó la densidad óptica (DO) en un

lector de microplacas (UV MAX Kinetic microplate reader, DYNEX Technologies, Inc.) a una absorbancia de 540 nm. La concentración de nitrito se determinó usando una curva estándar de nitrito de sodio. La sensibilidad aproximada del ensayo fue de 1 mM. Los resultados fueron expresados por la concentración neta de nitritos dada por la diferencia [concentración de nitritos en cultivo con virus dengue] - [concentración de nitritos en cultivo con control celular].

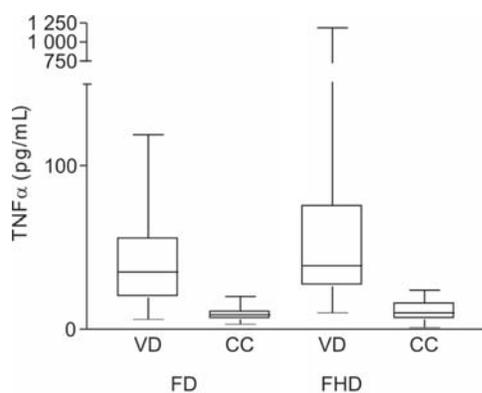
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en los 2 grupos de la muestra (FD y FHD) fueron comparados por la prueba T de Student usando el programa GraphPad sobre Windows (Versión 2.00, 1995).

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE TNF α

Los resultados obtenidos se aprecian en la figura 1, donde se exponen la media y desviación estándar de los valores de concentración de TNF α de ambos grupos de estudio en el cultivo con el virus dengue 3 y con un control de células Vero.



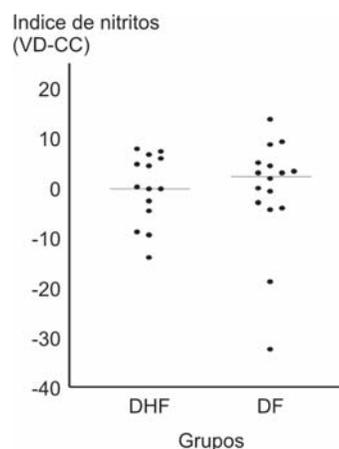
VD: virus dengue, CC: control celular, FD: fiebre dengue, FHD: fiebre hemorrágica de dengue.

Fig. 1. Niveles de TNF α en sobrenadantes de cultivo de células de sangre total de individuos con antecedentes de FD y FHD en presencia de virus dengue.

En general se detectó la liberación de TNF α de células sanguíneas tras el cultivo con el virus. Las células de sangre total de 70 % de los casos produjeron, en presencia del virus dengue, una concentración de TNF α que triplicó la detectada en los cultivos con control de células Vero y en 30 % de los individuos fue capaz de sextuplicar los niveles del control. Solo 4 casos no llegaron a duplicar los valores de TNF α en presencia del virus. Aunque la media de los niveles de la citoquina en el cultivo de los individuos que sufrieron FHD fue mayor que la de los casos de FD, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Los niveles de ON en sobrenadantes de cultivo se muestran en la figura 2. El índice de ON fue bajo en la mayoría de los casos. Aunque el cultivo de algunos casos con historia de FD mostró mayores niveles de ON en presencia de virus, la diferencia con el grupo de FHD no fue significativa. Los índices oscilaron en algunos casos cercanos al valor de 0 o por debajo de este, lo que sugiere un efecto inhibitor del cultivo en presencia del virus sobre la producción de ON en esos individuos.



VD: virus dengue, CC: control celular, FD: fiebre dengue, FHD: fiebre hemorrágica de dengue.

Fig. 2. Niveles de ON en sobrenadantes de cultivo de células de sangre total de individuos con historia de FD o FHD.

DISCUSIÓN

Los monocitos parecen ser la población celular más permisible para la replicación del virus dengue.¹⁸ Varios grupos han realizado estudios acerca de los efectos de la infección viral sobre estas células y la participación de factores secretados por ellas en la fisiopatología de la enfermedad severa por dengue.³⁻⁶ Además de los monocitos, los linfocitos T CD4+ son capaces de secretar TNF α al exponerse a antígenos de virus dengue *in vitro*.¹⁹ Estudios con células humanas y líneas celulares en cultivo, así como de infección experimental en modelo murino,^{20,21} han sugerido la participación del TNF α en la patogénesis de la infección por dengue.

La predisposición de un humano a sufrir un cuadro clínico grave en el desarrollo de una infección terciaria por dengue no ha sido suficientemente estudiada, esta había sido asociada a formas leves de la enfermedad. Por primera vez en Cuba se reporta que 15 % de los casos de FHD durante la epidemia de dengue 3 de Ciudad Habana, 2001, habían sufrido previamente infecciones por virus dengue 1 y dengue 2.²² Es por esto que en este estudio se exploró si existían diferencias entre individuos con FD o FHD en su capacidad de producir TNF α cuando sus células sanguíneas fueran estimuladas con virus dengue *ex vivo* simulando una infección terciaria. La situación epidemiológica extraordinaria de Cuba permite lograr una muestra homogénea de individuos con similar historia de infecciones naturales por dengue. Partiendo del conocimiento de que variables como serotipo infectante, secuencia de infecciones e intervalo entre estas, constituyen factores de riesgo conocidos en la patogenia de la FHD,²³ la posibilidad de controlar estas variables otorga un elevado rigor a los resultados en una investigación.

Estudios previos cultivan células mononucleares de sangre periférica humana con virus dengue para determinar niveles de citoquinas inducidas.^{24,25} En el presente estudio se consideró conveniente diseñar el experimento con el empleo de sangre total para reproducir en lo posible el ambiente natural en que ocurre la infección *in vivo*. La presencia de anticuerpos anti-dengue a los títulos reales es importante para un estudio de esta naturaleza, pues

se conoce que tanto la neutralización como la amplificación viral dependiente de anticuerpos (ADA) son fenómenos que modifican los niveles de inducción de citoquinas en las células del sistema inmune durante la infección por dengue.²⁶ De esta forma, una infección secuencial (secundaria o terciaria) pudiera inducir un aumento de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF α .

En el presente estudio no se constataron diferencias significativas en los niveles de TNF α entre los 2 grupos estudiados. Esto pudiera explicarse porque ambos grupos comparados son individuos que sufrieron una infección secundaria y por tanto, simulan una infección terciaria *ex vivo* al nuevo serotipo dengue 3. La exposición de las células inmunes a un tercer virus implica que los anticuerpos heterotípicos anti-dengue 1 y dengue 2, pudieran, en alguna medida, neutralizar el serotipo 3 dada su reactividad cruzada.

En esta simulación de infección terciaria en cultivo, el virus dengue indujo una importante liberación de TNF α en ambos grupos. Sin embargo, la desviación estándar mostró valores elevados, lo cual indica grandes diferencias en los niveles de concentración de la citoquina en el sobrenadante de cultivo entre los individuos de un mismo grupo. La variable producción de TNF α en las condiciones experimentales pudiera asociarse a una diferencial susceptibilidad a padecer una infección natural terciaria con diferente presentación clínica. Una hiperinducción de TNF α implicaría, en ese caso, una infección terciaria natural severa y por el contrario, una producción disminuida de esta citoquina vincularse a la forma asintomática de la infección.

Al analizar la producción de ON por las células sanguíneas ante la presencia del virus dengue, se observó un efecto de aparente inhibición en ambos grupos de estudio. La presencia de anticuerpos heterotípicos en la sangre de los individuos pudo haber mediado una supresión de la enzima ON sintasa a través de la infección mediada por receptores Fc de las células diana, como se reportó recientemente en células de línea monoclónica.²⁴ Este efecto inhibitorio pudiera ser el responsable de los niveles disminuidos de ON en el suero de pacientes que desarrollaron la forma clínica severa.²⁷

La inhibición de la replicación viral por el ON parece ser de importancia para algunas infeccio-

nes virales que resultan en un aclaramiento viral más eficiente y mejor recuperación.^{28,29} También en el dengue se ha demostrado que suprime la producción de ARN y proteínas virales en las células infectadas.³⁰ Aunque la producción excesiva de ON tiene consecuencias patológicas, la supresión de su producción también puede dar lugar a efectos indeseables: en varias enfermedades vasculares se describe una reducción de la actividad de ON del endotelio como la causa principal del daño vascular.³¹ Una disminución de la producción de este mediador en la infección secundaria por dengue pudiera asociarse al daño endotelial propio de la FHD/SCD. Por otra parte, sería inhibido su papel antiviral vinculado a protección, que favorece la diseminación de la infección y la evolución hacia la gravedad.

Futuros estudios deberán continuar realizándose para demostrar la asociación de la infección secuencial y los niveles de TNF α y ON en humanos, lo cual tiene implicaciones importantes en el conocimiento de la patogenia de la enfermedad. La investigación en el campo de la inmunopatogenia del dengue es prioritaria por su alcance en el diseño de vacunas contra la enfermedad.

TNF α and nitric oxide *ex vivo* production by blood cells due to dengue virus

ABSTRACT

OBJECTIVE: High TNF α levels have been associated with the development of severe forms of dengue virus infection. The NO production seems to be lower in dengue hemorrhagic fever cases compared to dengue fever cases. However, the role of those mediators in the tertiary dengue infection has not been discovered yet. **METHOD:** The ability of whole blood cells from individuals with a history of dengue infection of producing TNF α and Nitric oxide (NO) when cultured with a different serotype of dengue virus mimicking an *ex vivo* tertiary infection, was measured in the culture supernatants by using a standard ELISA kit and Griess test, respectively. **RESULTS:** Dengue virus stimulation induced the release of very high and variable TNF α levels in whole blood cells supernatant, thus supporting the possible role of this cytokine in the pathogenesis of a symptomatic tertiary dengue infection. In these experimental conditions, there was no difference in the NO synthesis between DF and DHF cases, showing an apparent inhibition due to heterotypic antibodies. **CONCLUSIONS:** The dispersion of TNF α levels among

individuals could have some effects on the development of a tertiary natural dengue infection.

Key words: Dengue, TNF α , nitric oxide.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guzmán MG, García G, Kourí G. Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities. *Rev Panam Salud Pública* 2006;19:204-15.
2. Thomas SJ, Strickman D, Vaughn DW. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv Virus Res* 2003;61:235-89.
3. Hober D, Shen L, Benyoucef S, De Groot D, Deubel V, Watre P. Enhanced TNF α production by monocytic-like cells exposed to dengue virus antigens. *Immunol Lett* 1996;53:115-20.
4. Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz AC. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol* 1997;71:4226-32.
5. Carr JM, Hocking H, Bunting K, Wright PJ, Davidson A, Gamble J, et al. Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers. *J Med Virol* 2003;69:521-8.
6. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chung E, Granic G, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 beta (IL-1 β) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:324-31.
7. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis* 1999;179:755-62.
8. Gagnon SJ, Mori M, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute virus infections. *J Med Virol* 2002;67:41-6.
9. Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* 2001;204:494-507.
10. Libraty DH, Endy TP, Hough HSH, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis* 2003;185:1213-21.
11. Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens* 2004;64:469-72.
12. Lin CF, Lei HY, Shiao AI, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol* 2002;169:657-64.
13. Guzmán MG, Kourí G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazquez S, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol* 2000;152:793-9.
14. Mas P. Dengue fever in Cuba in 1977: some laboratory aspects. *PAHO Sci Pub* 1979;375:40-43.
15. Alvarez M, Rodríguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Guzmán MG. Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of Some Factors. *Dengue Bull* 2005;29:1-9.
16. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard

- plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985;22:250-4.
17. Stuehr DJ, Gross SS, Sakuma I, Levi R, Nathan CF. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of the endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med* 1989;169:1011-23.
 18. Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003;60:421-67.
 19. Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones. *J Virol* 1999;73:3623-29.
 20. Chen YC, Wang SY. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J Virol* 2002;76:9877-87.
 21. Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;35:33-42.
 22. Alvarez M, Rodríguez-Roche R, Bernardo L, Vázquez S, Morier L, González D, et al. Dengue Hemorrhagic Fever caused by sequential 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:1113-7.
 23. Kouri G, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ* 1989; 67:375-80.
 24. Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, et al. Dengue-Specific T Cell Responses in Peripheral Blood Mononuclear Cells Obtained prior to Secondary Dengue Virus Infections in Thai Schoolchildren. *J Infect* 2002;185:1697-703.
 25. Yang KD, Lee CS, Hwang KP, Chu ML, Shaio MF. A model to study cytokine profiles in primary and heterologously secondary Dengue-2 virus infections. *Acta Virol* 1995;39:19-21.
 26. Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus antibody dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-dengue virus free radical and pro-inflammatory cytokines production, in THP-1 cells. *J Gen Virol* 2007;88:365-75.
 27. Valero N, Espina L, Añez G, Torres E, Mosquera J. Increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:762-4.
 28. Saura M, Zaragoza C, McMillan A, Quick RA, Rohenadl C, Lowenstein JM, et al. Antiviral mechanisms of nitric oxide: inhibition of viral proteinase. *Immunity* 1999;10:21-8.
 29. Yee LJ, Knapp S, Burgner D, Hennig BJ, Frodsham AJ, Wright M, et al. Inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) haplotypes and the outcome of hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2004;5:183-7.
 30. Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *J Gen Virol* 2006;87:3003-11.
 31. Maxwell, AJ. Mechanisms of Dysfunction of the Nitric Oxide Pathway in Vascular Diseases. *Nitric Oxide* 2002; 6:101-24.

Recibido: 13 de septiembre de 2007. Aprobado: 5 de noviembre de 2007.

Dra. Ana Beatriz Pérez Díaz. Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. Autopista Novia del Mediodía, km 6 ½, entre Autopista Nacional y Carretera Central, La Lisa, CP 17100, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: 53-7-2020450; Fax: 53-7-2046051. Correo electrónico: anab@ipk.sld.cu