

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Nuevas evidencias en la susceptibilidad a la infección por dengue asociadas al polimorfismo HH del receptor FcγRIIa

Dra. C. Gissel García Menéndez,¹ Dra. C. Ana B. Pérez Díaz,¹ Dra. C. Beatriz Sierra Vázquez,¹ Dra. C. Lizet Sánchez,¹ Téc. Naífi Calzada Gutiérrez,¹ Dra. C. Mailing Álvarez Vera,¹ Dr. C. Luis Fonte Galindo,¹ Dra. C. María G. Guzmán Tirado¹

RESUMEN

Introducción: las variantes polimórficas del receptor FcγRIIa han sido asociadas con la susceptibilidad a padecer diferentes enfermedades infecciosas. Recientemente se reportó la asociación entre el polimorfismo de este receptor y la susceptibilidad a padecer la fiebre hemorrágica por dengue. **Objetivos:** explorar si la asociación a la susceptibilidad o protección de las variantes homocigóticas del receptor, pudieran estar relacionadas además, con los títulos de IgG y la exposición a diferente número de infecciones. **Métodos:** se hizo un estudio de tipo analítico retrospectivo a individuos infectados por virus dengue 4 en Ciudad de La Habana durante la epidemia de 2006, que se contactaron en 2008. Se reclutó un total de 97 individuos, de los cuales 68 habían padecido fiebre dengue y 29 fiebre hemorrágica de dengue. Se les extrajo una muestra de 10 mL de sangre total en anticoagulante que se empleó en el aislamiento de ADN. Se determinó el polimorfismo genético del receptor FcγRIIa, los títulos de anticuerpos totales IgG anti-dengue y el antecedente de infección por dengue. **Resultados:** se evidenció, de modo interesante, una relación directamente proporcional y muy significativa ($p < 0,0001$) entre los altos títulos de IgG anti-dengue con el número de infecciones padecidas. Este comportamiento fue característico en los individuos con la variante homocigótica HH. **Conclusiones:** al parecer, en aquellos individuos con polimorfismo para el receptor FcγRIIa-H/H podría haber una tendencia a la no eliminación de los anticuerpos IgG a través del FcγRIIa, la cual está asociada con el número de infecciones.

Palabras clave: dengue, receptor FcγRIIa, polimorfismo, título de IgG anti-dengue.

INTRODUCCIÓN

La fiebre dengue (FD), caracterizada por un cuadro febril acompañado, entre otras manifestaciones, de cefalea y *rash*, es causada por cualquiera de los 4 serotipos del virus dengue (VD), perteneciente al género flavivirus. El virus es transmitido de humano a humano por el mosquito *Aedes aegypti*. El espectro clínico de la infección puede variar desde individuos asintomáticos hasta aquellos en los que la infección tiene un desarrollo más severo, conocido como fiebre hemorrágica del dengue (FHD).¹

Durante la infección primaria, el VD entra a la célula mediante la interacción de la proteína E

de su envoltura con un receptor celular aún no caracterizado.² Durante la infección secundaria, el virus, además de utilizar su receptor primario para entrar a la célula, es capaz de hacerlo formando inmunocomplejos (IC) con anticuerpos heterólogos no neutralizantes preexistentes. La interacción con receptores alternativos, como los receptores Fcγ I y II, puede resultar en el fenómeno de inmunoamplificación dependiente de anticuerpos (ADA). Hipotéticamente, este fenómeno contribuiría a explicar la inmunopatogenia del daño severo causado por VD.³ Sin embargo, a pesar de la alta frecuencia de infecciones secundarias, solo un pequeño porcentaje progresa a FHD; por ello, se piensa que factores adicionales relacionados con

¹ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

el ambiente, el hospedero y factores virales, contribuyen al desarrollo de la forma grave de la enfermedad.⁴⁻⁷

La producción de anticuerpos contra ciertos antígenos puede resultar un incremento selectivo de inmunoglobulinas IgG de ciertas subclases.⁸⁻¹⁰ En general, los anticuerpos IgG antivirales están altamente restringidos a IgG1 e IgG3.¹¹ Se ha descrito para el receptor FcγRIIa, que la variante para la histidina une de modo eficiente la IgG2 (FcγRIIa-H/H131), mientras que la isoforma de la arginina presenta muy baja afinidad por este ligando uniendo de manera preferencial las IgG1 e IgG3 (FcγRIIa-R/R131).¹² De esta forma las variantes alélicas del FcγRIIa están vinculadas a las diferencias en el proceso de fagocitosis y, en consecuencia, a una susceptibilidad hereditaria a enfermedades asociadas con inmunocomplejos,¹³ infecciosas y de tipo autoinmunes.¹⁴

Contrario a la compleja situación epidemiológica del dengue en el Sudeste asiático, la experiencia en Cuba ha sido más limitada.^{15,16} Esto ofrece un escenario único para el estudio de los factores genéticos del hospedero asociados con la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad. Recientemente, nuestro grupo reportó la asociación significativa entre la variante polimórfica HH del FcγRIIa con la enfermedad por dengue en una muestra de individuos de la población cubana, todos adultos, que evolucionaron con la infección clínica por dengue y fueron clasificados como FD y FHD, comparados con un grupo de infección asintomática.¹⁷ Teniendo en cuenta la asociación de las diferentes variantes polimórficas del receptor FcγRIIa con la susceptibilidad de padecer varias enfermedades infecciosas, como son la malaria, las infecciones respiratorias agudas^{18,19} y la recientemente demostrada en dengue,¹⁷ los autores del presente trabajo establecieron como objetivo conocer qué relación pudiera existir entre el polimorfismo del receptor Fc, los títulos de IgG remanentes a los 2 años de haber padecido la infección y la exposición a diferente número de infecciones.

MÉTODOS

MUESTRA

El estudio, de tipo analítico retrospectivo, se realizó a individuos infectados por VD4 en Ciudad

de la Habana durante la epidemia de 2006. Los mismos se contactaron a los dos años de haber padecido la enfermedad por dengue, en el año 2008. A estas personas, que habían sido ingresadas en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), se les diagnosticó dengue según los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y se les confirmó la infección mediante la detección de IgM en suero al sexto día del inicio de la fiebre.²⁰

Se reclutó un total de 97 individuos nacidos en Ciudad de La Habana, de los cuales 68 habían padecido FD y 29 FHD. Se les extrajo una muestra de 10 ml de sangre total en anticoagulante (EDTA), que se empleó en el aislamiento de ADN, el cual se extrajo utilizando un estuche comercial de extracción QIAGEN (QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit, información disponible en la página www.qiagen.com). A partir del ADN se procedió a la caracterización del genotipo del receptor FcγRIIa, previamente reportado.¹⁷ Se alcanzaron además 5 mL de sangre en tubo seco para la obtención del suero (alrededor de 2 mL de suero).

DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL RECEPTOR FcγRIIa

Para determinar el polimorfismo genético se empleó la metodología antes descrita.¹⁷ Brevemente, se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) el fragmento de 1 kb correspondiente al gen FcγIIa. La reacción utilizó como cebador sentido el P63 (5'-CAAGCCTCTGGTCAAGGTC) y antisentido FγRII-3' (5'-CAATGACCACAGCCACAA TC). A esta fase se le denominó PCR1. El producto obtenido se empleó en una reacción de amplificación anidada utilizando los cebadores sentido específicos: 494A (5'-ATTCTCCCATTGGATC) y 494G (5'-ATTCTCCCGTTGGATC), y el cebador antisentido P52 (5'-GAAGAGCTGCC CATGCTG). La reacción de amplificación se denominó como PCR2 y PCR3, respectivamente. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidium.

DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS TOTALES IGG ANTI-DENGUE

Los títulos de anticuerpos IgG anti-dengue presentes en los individuos 2 años después de haber padecido la enfermedad, se determinaron mediante un procedimiento ELISA de inhibición, según el protocolo descrito por *Vázquez* y otros.²¹

Inmunoglobulinas humanas anti-dengue, disueltas en una solución carbonato/ bicarbonato a una concentración de 10 µg/mL y pH 9,5, se adsorbieron en placa de poliestireno y se incubaron toda la noche (18 h, aproximadamente) a 4 °C. A continuación, la superficie no cubierta por anticuerpos fue bloqueada con 150 µL de albúmina de suero (ABS) 1 % en PBS. Se incubó a 37 °C por 1 h. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-T, pH 7,4; se añadieron después 100 µL de la dilución de trabajo de la suspensión del antígeno en cada pozo (diluido 1:40 en PBS-T). Se incubó la placa 1 h a 37 °C y se lavó en iguales condiciones. Las muestras de suero y los controles (positivo y negativo) se añadieron a razón de 100 µL por pozo a la dilución 1/20 en PBS-T. Tras similares condiciones de lavado e incubación, se añadieron 100 µL del conjugado anti-dengue-peroxidasa diluido 1/8 000 en PBS-T con 2 % de suero de ternera; se dejó incubar de nuevo 1 h a 37 °C. Seguido de 3 lavados, 100 µL por pozo de sustrato se adicionaron y al cabo de 30 min la reacción se detuvo con 100 µL de ácido sulfúrico 12,5 % en cada pozo. Los valores de densidad óptica se determinaron a 492 nm en un lector Micro-ELISA (*Dynex Technologies Denkendorf Germany*). Se consideraron positivos aquellos sueros que presentaron un porcentaje de inhibición mayor o igual que 50 % en relación con el control negativo.

DETERMINACIÓN DEL ANTECEDENTE DE INFECCIÓN POR DENGUE

Para saber la historia de infección por dengue se empleó el ensayo de neutralización por reducción del número de placas (NRNP, sigla en inglés), siguiendo lo descrito por *Morens* y otros en 1985,²² con las modificaciones realizadas por *Álvarez* y otros en 2005.²³

Lo sueros a estudiar se inactivaron inicialmente a 56 °C por 30 min y se trataron con cloroformo.

Luego se preparó una dilución de los sueros de 1/30. Los controles positivo y negativo se utilizaron a la dilución 1/10. Las cepas virales utilizadas en el ensayo VD1 (Angola, 7 pases en C6/36), VD2 (A15, con 2 pases en ratón y 2 en C6/36), VD3 (116/00, con 6 pases en C6/36) y VD4 (Dominica, 5 pases en C6/36), se diluyeron en medio de mantenimiento a 40 ufp (unidades formadoras de placas) por cada 50 µL. Una vez preparadas las diluciones de las muestras, cada una se mezcló a razón de 100 µL volumen-volumen con la dilución de trabajo de cada cepa viral por separado. Posteriormente, las mezclas se incubaron durante 1 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. Luego se inocularon por triplicado 50 µL de cada una de las mezclas virus-suero y de los controles, en 500 µL de suspensión de células BHK 21 clono 15, en placas de 24 pozos a una concentración de 2 × 10⁵ células/mL. Las placas se incubaron durante 4 h en atmósfera húmeda (5 % de CO₂) y una vez finalizado el tiempo, le fueron añadidos 500 µL de medio de recubrimiento (MEM-E 2X, glutamina, SFBI, carboximetilcelulosa viscosidad media y antibióticos) a cada pozo, incubándose a 37 °C por 5 d para VD2, 6 d para VD4 y 7 para los virus VD1 y VD3. Posteriormente, a la incubación se le decantó el medio, las monocapas celulares fueron lavadas con agua corriente. A cada pozo de las placas le fue añadido 0,5 mL de una solución colorante *naphtol blue black* (ácido acético 60 mL, *naphtol blue black* 1g y 13,6 g de acetato de sodio). El valor porcentual de reducción del número de placas con respecto al control viral se calculó según la ecuación:

$$\% \text{ reducción} = [1 - (X_s/X_m)] * 100 \%$$

Donde:

X_s = promedio del número de placas obtenidas por cada dilución del suero.

X_m = promedio del número de placas obtenido para el control del virus.

Toda muestra de suero con un porcentaje de reducción superior o igual que 50 % se consideró positivo para la presencia de anticuerpos contra el serotipo viral en cuestión.

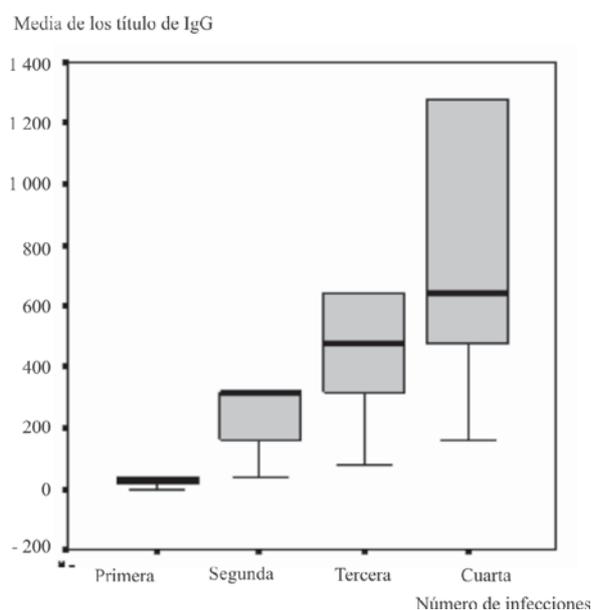
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En las asociaciones establecidas con el título de IgG anti-dengue y, teniendo en cuenta que esta variable no sigue una distribución normal, se aplicó la prueba estadística de Kruskal Wallis para la comparación de medias, mediante el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 11.5.1.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LOS TÍTULOS DE IGG TOTALES CON EL NÚMERO DE INFECCIONES

Se analizó la posible relación entre los niveles de IgG antiVD con el número de infecciones (Fig. 1). El análisis mostró diferencias altamente significativas ($\chi^2 = 23,7$, $p < 0,0001$), lo cual evidencia que existe una relación directamente proporcional entre los altos títulos de IgG anti VD con el número de infecciones padecidas.



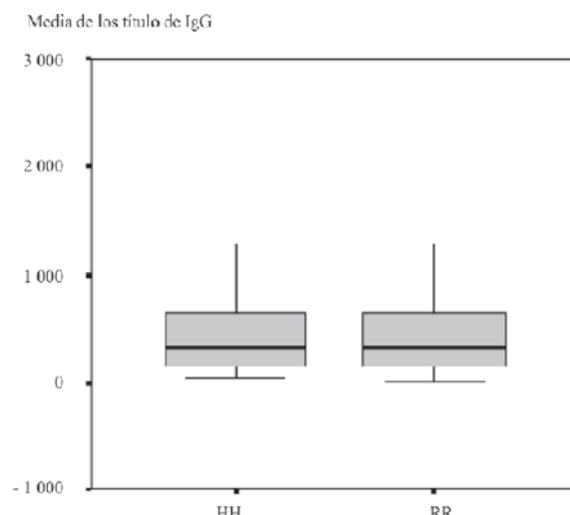
Cada caja representa el valor medio de los títulos IgG en los individuos estudiados. La línea horizontal dentro de la caja representa los valores medio y las líneas superiores e inferiores muestran los valores máximos y mínimos, respectivamente. Se observa un aumento proporcional de los títulos de IgG con el número de infecciones (prueba estadística de Kruskal Wallis para la comparación de medias $\chi^2 = 23,7$; $p < 0,0001$).

Fig. 1. Relación entre la media de los títulos de anticuerpos IgG anti virus dengue y el número de infecciones en los individuos que padecieron la enfermedad por dengue.

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LOS TÍTULOS DE IGG TOTALES FRENTE A LAS VARIANTES GENOTÍPICAS

Conociendo que el polimorfismo del receptor Fc γ RIIa-HH se había asociado a la presencia de manifestaciones clínicas, entonces ¿qué relación pudieran tener los títulos de IgG con las variantes genotípicas homocigóticas del receptor?

El análisis mostró una distribución similar de ambos genotipos en relación con la media de los títulos de IgG; no se encontró una asociación significativa ($p = 0,33$) (Fig. 2).



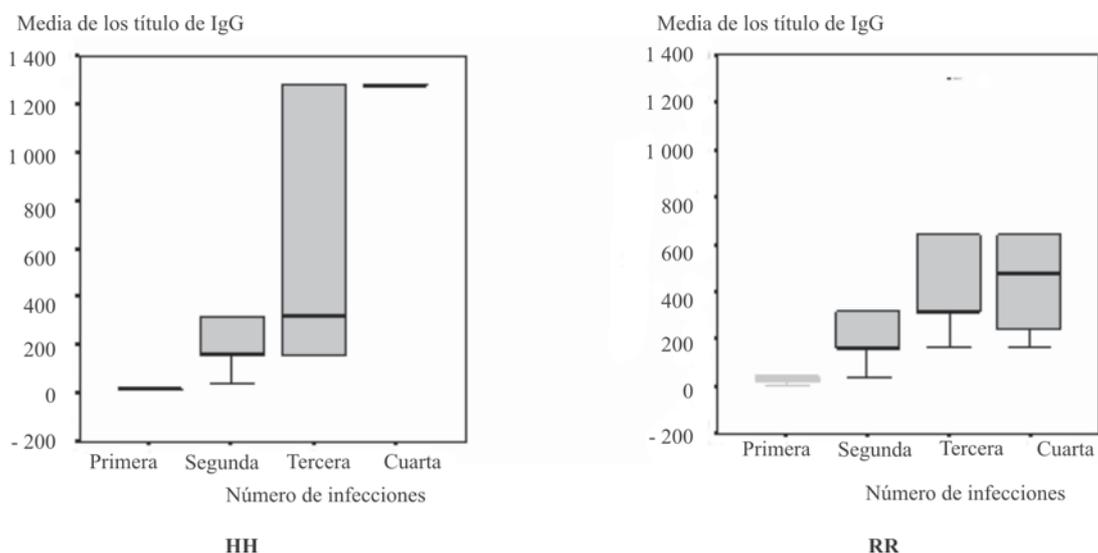
Cada caja representa el valor medio de los títulos IgG en los individuos estudiados. La línea horizontal dentro de la caja representa los valores medio y las líneas superiores e inferiores muestran los valores máximos y mínimos, respectivamente. No existe relación significativa entre la media de los títulos de IgG anti virus dengue y las variantes homocigóticas del receptor Fc γ RIIa (prueba χ^2 ; $p = 0,33$).

Fig. 2. Relación entre la media de los títulos de IgG anti virus dengue y las variantes genotípicas homocigóticas del Fc γ RIIa.

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LOS TÍTULOS DE IGG TOTALES CON EL NÚMERO DE INFECCIONES Y LAS VARIANTES GENOTÍPICAS

Resultaba interesante en este punto relacionar los tres aspectos, es decir, el número de infecciones sufridas con las variantes genéticas y los títulos totales de IgG antidengue.

Solo para la variante genética HH los títulos de IgG muestran una tendencia al aumento de manera proporcional en relación con el número



Cada caja representa el valor medio de los títulos IgG en los individuos estudiados. La línea horizontal dentro de la caja representa los valores medio y las líneas superiores e inferiores muestran los valores máximos y mínimos, respectivamente. Se observa un aumento proporcional cercano a la significación estadística de los títulos de IgG para la variante homocigótica HH relacionado con el número de infecciones padecidas ($\chi^2=7,8$; $p=0,05$).

Fig. 3. Relación entre la media de los títulos de IgG anti virus dengue y el número de infecciones para cada variante genotípica homocigótica del Fc γ RIIa.

de infecciones padecidas (Fig. 3). Sin embargo, esta relación no llega a ser significativa, quizá debido al reducido número de muestras en los grupos surgidos de la nueva división ($\chi^2=7,8$; $p=0,05$).

DISCUSIÓN

En Cuba se ofrece una oportunidad excelente y única para identificar algunos de los determinantes genéticos mayoritarios relacionados con el cuadro grave de la enfermedad por dengue. Como se conoce, la presencia de anticuerpos no neutralizantes en los individuos es un requisito para que tenga lugar la FHD/SSD. Debido al eficiente control del vector y el monitoreo de la enfermedad desarrollado en el país, a las bondades del sistema de salud y la voluntad política, Cuba constituye un modelo natural para estudiar las implicaciones del fondo genético en la severidad de la enfermedad. La experiencia cubana ha generado materiales de investigación únicos, que incluye en ello las posibilidades de acceder a personas con historia de infección por dengue en epidemias reportadas y bien caracterizadas.

Como ya se mencionaba, las variantes polimórficas del receptor Fc γ RIIa han sido asociadas

con la susceptibilidad a padecer diferentes enfermedades infecciosas.²⁴⁻²⁶ Recientemente, nuestro grupo aportó nuevas evidencias sobre el papel del polimorfismo del receptor Fc γ RIIa como un factor de riesgo en la patogénesis de la FHD.¹⁷ Basados en una población de adultos bien caracterizada desde los puntos de vista epidemiológico y clínico con los cuadros de FD, FHD e infección asintomática, se comprobó y confirmó la asociación de la variante homocigótica HH con la susceptibilidad a padecer la enfermedad por dengue, así como la variante RR se vio asociada con la protección. A partir de estos resultados y teniendo en cuenta que las subclases IgG1 e IgG3, inmunoglobulinas predominantes en la infección por dengue,¹³ se unen con mayor afinidad a la variante polimórfica Fc γ RIIa-R/R131,^{14,27} postulamos que quizá las señales generadas después de la interacción entre el receptor Fc γ RIIa y el complejo virus-anticuerpo (VD/IgG1/3) pudiera estar asociada a una ineficiente o eficiente unión, con consecuencias desiguales en individuos con diferentes variantes genéticas.

El comportamiento que muestran los títulos de IgG y el número de infecciones en aquellos individuos cuyo receptor Fc γ RIIa presenta la variante polimórfica HH sugiere: un aumento de los títulos

de anticuerpos, tras el desarrollo de infecciones sucesivas por el virus y, posiblemente, una disminución en la eliminación de estos.

El presente trabajo provee nuevas evidencias que apoyan lo antes reportado,¹⁷ porque pone en evidencia que aquellos individuos con el genotipo RR son capaces de eliminar los anticuerpos, independientemente del número de infecciones a las que han sido expuestos y los individuos HH, en cambio, muestran una tendencia a la no eliminación con el aumento del número de infecciones.

Hasta donde conocemos, este es el primer trabajo que analiza el polimorfismo genético del receptor FcγRIIa en relación con la exposición a la infección por VD y apoya el hecho antes descrito,¹⁷ porque los individuos con la variante RR serían mayores productores de anticuerpos y como elemento compensatorio sus mayores eliminadores, al poseer el receptor de mayor afinidad por las subclases IgG1 e IgG3 que son las subclases que maduran su afinidad en la medida en que se incrementan los episodios de enfrentamiento al virus.

Para dar sustento a la hipótesis del presente trabajo es necesario desarrollar futuros estudios con un mayor número de muestras que determinen, entre otros aspectos de interés, la afinidad del inmunocomplejo VD/IgG1/3 a las variantes polimórficas del receptor FcγRIIa y las señales de transducción intracelulares que pudieran favorecer la inmunoamplificación o la eliminación eficiente de las partículas virales.

New evidence in the susceptibility to dengue infection associated to HH polymorphism of FcγRIIa receptor

ABSTRACT

Introduction: polymorphic variants of FcγRIIa receptor have been associated to susceptibility to develop several infectious diseases. The relationship between the polymorphism of this receptor and the susceptibility to dengue hemorrhagic fever was recently reported. **Objectives:** to explore whether the association of the homocytotic variants of the receptor to susceptibility to or protection from a disease could be also related with the IgG antibody titers and the exposure to a number of infections. **Methods:** a retrospective analytical study was performed on individuals who had been infected with the dengue virus 4 during the 2006 epidemic in the City of Havana and were tracked down in 2008. A total number of 97 individuals were recruited of whom 68 had suffered dengue fever and 29 had had dengue hemorrhagic fever. A 10-mL blood sample was taken from each of them and then placed in EDTA anticoagulant for DNA

isolation and 5 mL placed in dry tubes to obtain serum. The genetic polymorphism of FcγRIIa receptor, the total anti-dengue IgG antibody titers and the antecedent of dengue infection were determined. Results: it was interesting to note that there was very significant direct relation ($p < 0.0001$) between high anti-dengue IgG antibodies titers and the number of infections suffered by these people. This behaviour was present in those individuals with the HH homocytotic variant. **Conclusion:** it seems that those individuals with polymorphism in FcγRIIa-H/H receptor would tend to non-elimination of IgG antibodies through this receptor, which is associated to the number of infections suffered by the individual.

Key words: dengue, FcγRIIa receptor, polymorphism, anti-dengue IgG titer.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-96.
- Chen WJ, King CC, Chien LY, Chen SL, Fang AH. Changing prevalence of antibody to Dengue virus in paired sera in the two years following an epidemic in Taiwan. *Epidemiol Infect.* 1997;119(2):277-9.
- Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 1988;239(4839):476-81.
- Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):821-3.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A, Vaughn DW, Kalayanaraj S, Green S, et al. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(1):96-101.
- Mangada MN, Igarashi A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology.* 1998;244(2):458-66.
- Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology.* 1999;257(1):1-6.
- Soderstrom T, Enskog A, Samuelson BE, Cedergren B. Immunoglobulin subclass (IgG3) restriction of anti-P and anti-Pk antibodies in patients of the rare P blood group. *J Immunol.* 1985;134(1):1-3.
- Burton DR, Woof JM. Human antibody effector function. *Adv Immunol.* 1992;51:1-84.
- Koraka P, Suharti C, Setiati TE, Mairuhu AT, Van Gorp E, Hack CE, et al. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4332-8.
- Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr J Infect Dis.* 1990;(8 suppl):16-28.
- Kimberly C, Altaf A, Lisa B, Steketee R, Bernard L, Ya Ping S. Polymorphism of Fc Receptor IIa for Immunoglobulin G Is Associated with Placental Malaria in HIV-1-Positive Women in Western Kenya. *J Infect Dis.* 2004;190(6):1192-8.
- Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest.* 1992;89(4):1274-81.
- Platonov AE, Kuiper EJ, Verzhinina IV, Shipulin GA, Westerdaal N, Fijen CA. Meningococcal disease and polymorphism of FcγRIIa (CD 32) in late complement component-deficient individuals. *Clin Exp Immunol.* 1998;111(1):97-101.
- Guzman MG, Kouri G, 1987-2007. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(6):522-3.

16. Libel M. Brote de dengue en Cuba, 2006. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas, Habana: OPS; 2006.
17. Garcia G, Sierra B, Perez 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 Fc gamma RIIa polymorphism. *Am J Trop Med Hyg.*;82(6):1153-6.
18. Loke H, Bethell D, Phuong CXT, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to Dengue Hemorrhagic fever in Vietnam: Evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Hyg.* 2002;67(1):102-6.
19. Collins O, Christopher R, Keller C, Dorothy A, Were T, Richard O, et al. Association of Fc-receptor IIa (cd32) polymorphism with malarial Anemia and high-density parasitemia in infants and Young children *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(4):573-57.
20. Vazquez S, Valdes O, Pupo M, Delgado I, Álvarez M, Pelegrino JL, et al. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods.* 2003;110(2):179-84.
21. Vazquez S, Perez AB, Ruiz D, Rodriguez R, Pupo M, Calzada N, et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol* 2005;33(2):132-7.
22. 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(2):250-4.
23. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Guzman G. Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of Some Factors. *Dengue Bulletin.* 2005;29.
24. Cooke G, Aucan C, Walley AJ, Segal SG, Greenwood B, Hill AVS. Association of Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism with severe Malaria in West Africa. *Am J Trop Hyg.* 2003; 69(6):565-8.
25. Yee AM, Phan HM, Zuniga R, Salmon JE, Musher DM. Association between Fc gamma RIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2000;30(1):25-8.
26. Bossuyt X, Moens L, Van Hoeyveld E, Jeurissen A, Bogaert G, Sauer K. Coexistence of (Partial) Immune Defects and Risk of Recurrent Respiratory Infections. *Clinical Chemistry.* 2007;53(10):1124-130.
27. Rascau A, Repp R, Westerdal N, Kalden J, de Winkel J. Clinical relevance of Fc gamma polymorphisms. *Ann NY Acad Sci.* 1997;815:282-95.

Recibido: 7 de junio de 2011. Aprobado: 10 de julio de 2011.
Gissel García Menéndez. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Autopista Novia del Mediodía, Km 6 ½. Lisa. La Habana, Cuba. AP 601. CP 17100. Correo electrónico: gmd@ipk.sld.cu