



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**POSIBLE IMPACTO DE LOS GENES  
KIR3D EN LA INFECCIÓN POR EL  
VIRUS DEL CHIKUNGUNYA**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Fernando Figueroa Suarez como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor(a)(es):

Dra. Mercedes Fernandez-Mestre

Dra. Guillermina Alonso

CARACAS, VENEZUELA

MAYO - 2018

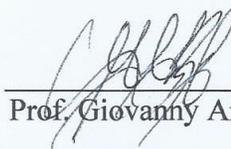
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL  
DE GRADO DEL (A) Br. FERNANDO FIGUEROA SUAREZ**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del (la) Br. Fernando Figueroa Suarez, C.I: 21.346.927, titulado “**Posible impacto de los genes *KIR3D* en la infección por el virus *chikungunya*”**”, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los veintidós días del mes de mayo del año 2018, dejando constar que la Prof. Guillermina Alonso actuó como Coordinadora del jurado examinador.



Prof. Zelandia Fermin



Prof. Giovanni Angiolillo



Prof. Guillermina Alonso  
(Co-Tutora)



Dra. Mercedes Fernandez  
(Tutora)

## RESUMEN

La fiebre Chikungunya es una enfermedad aguda, infecciosa, re-emergente, cuyo agente etiológico es el virus Chikungunya (CHIK), el cual es transmitido a humanos por mosquitos del género *Aedes*. La infección por Chikungunya es descrita como una enfermedad febril de inicio abrupto, de recuperación rápida y sin secuelas. Sin embargo, algunas veces se observan las formas crónicas, caracterizadas por artralgia persistente. Las células citotóxicas naturales (NK) juegan un papel crucial en la respuesta inmunitaria innata a la infección, controlándola a través de la lisis de las células infectadas y por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, que promueven la eliminación de microorganismos. Asimismo, la actividad de las células NK está regulada por un repertorio extenso de receptores regulatorios, incluyendo los receptores que pertenecen a la familia KIR (Receptores de muerte tipo inmunoglobulina). Los KIR proporcionan señales activadoras o inhibitoras que regulan la activación de las células NK y T, jugando un papel importante en la inmunidad contra microorganismos. Estudios de ratones infectados con CHIKV han demostrado la presencia, significativamente incrementada, de células NK en las articulaciones inflamadas, así como concentraciones incrementadas de IL-12, la cual estimula la actividad de las células NK. Estas evidencias sugieren que las células NK juegan un papel importante durante la infección por CHIKV. Fundamentados en que las funciones de las células NK están finamente controladas por el balance de receptores inhibidores y activadores, planteamos determinar el posible impacto de los genes de receptores *KIR3D* en la infección por el virus Chikungunya. Para alcanzar dicho objetivo se determinó la presencia de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* en 73 pacientes infectados por el virus CHIK y se compararon con las descritas en la población sana. Los genes KIR se definieron mediante PCR-SSP y las frecuencias se determinaron por conteo directo. Las diferencias entre pacientes, agrupados por manifestaciones clínicas y parámetros paraclínicos, y de pacientes versus controles fueron estimados por la prueba de ji cuadrado. Los resultados

demonstraron que las manifestaciones clínicas y paraclínicas observadas en el brote de Chikungunya ocurrido en Venezuela son similares a las descritas en otros países. Los genes *KIR3DL1*, *KIR3DS1* y las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* no están asociados con las manifestaciones clínicas y paraclínicas causadas por la infección por el virus Chikungunya, en la población estudiada. Sin embargo, la frecuencia levemente incrementada del gen *KIR3DL1* en los individuos con fiebre del Chikungunya posiblemente confiere susceptibilidad a sufrir la infección por el virus CHIK. Por lo tanto, el desequilibrio entre los genes KIR activadores e inhibidores podría influir en la patogénesis de la infección por virus CHIK.

*Palabras clave: Células NK, Chikungunya, Receptores KIR, manifestaciones clínicas, Alfavirus.*

## ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

CD69: Cluster de diferenciación 69.

CHIK: Chikungunya.

CLEC4M: Lectina de tipo C miembro M de la familia de dominios # 4.

D0, D1, D2: dominios tipo inmunoglobulina 0, 1 y 2, respectivamente.

DAP12: Proteínquinasa asociada a la muerte celular.

DC-SIGN o CD209: Receptor tipo lectina de células dendríticas.

DCs: Células dendríticas.

DV: Virus del dengue.

FcεRI-γ: Receptor I para la porción Fc de los anticuerpos tipo IgE.

g: Gravedad.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos.

HLA: Antígeno leucocitario humano.

ICAM: Molécula de adhesión intercelular.

IFN: Interferón.

IFN-α: Interferón alfa.

IgGs: Inmunoglobulinas G.

IL-1: Interleuquina 1.

IL-1β: Interleuquina 1 beta.

IL-1-RA: Antagonista del receptor de IL-1.

IL-2: Interleuquina 2.

IL-6: Interleuquina 6.

IL-12: Interleuquina 12.

IL-15: Interleuquina 15.

IL-18: Interleuquina 18.

IL-18BP: Proteína de unión a interleuquina 18.

IL-21: Interleuquina 21.

IP-10/CXCL-10: Proteína inducible de 10kDalton.

IRF3: Elemento de respuesta del interferón 3.

IRF7: Elemento de respuesta del interferón 7.

ITIM: Motivos inhibitorios del inmunorreceptor basados en tirosina.

ITAM: Motivos activadores del inmunorreceptor basados en tirosina.

KIR: Receptores de muerte tipo inmunoglobulina.

L-SIGN: Molécula de adhesión intracelular integrina-grabbing-3 hígado- nódulo linfático específica.

LCs: Células de Langerhans.

LRC: Conjunto de receptores de leucocitos.

MCP-1/CCL-2: Proteína quimio táctica de monocitos.

MIG/CXCL-9: Monocina inducida por el interferón  $\gamma$ .

MMP2: Metaloproteinasas de matriz extracelular.

MyD88: Proteína de diferenciación mieloide de 88 kDalton.

NaCl: Cloruro de sodio.

NCRs: Receptores de citotoxicidad natural.

NK $\kappa$ B: Factor nuclea  $\kappa$  de las células B.\*

NKRs: Receptores de células citotóxicas naturales.

NLB: Buffer de lisis nuclear.

nsPs: Proteínas no estructurales.

p: Probabilidad.

pb: pares de bases.

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

pE1 y pE2: glicoproteínas estructurales.

RCLB: Buffer de lisis de células rojas.

RIG-I: Gen inducible por ácido retinoico I.

RRV: Virus Ross River.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SSP: Iniciador de secuencia específica.

TCD4+: Células T con cluster de diferenciación 4.

TCD8+: Células T con cluster de diferenciación 8.

TE: Buffer Tris-EDTA.

TLRs: Receptores tipo Toll.

TLR3: Receptor tipo Toll 3.

TLR7: Receptor tipo Toll 7.

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

TRIF: Proteína adaptadora con dominio TIR.

VEEV: Virus de la Encefalitis Equina Venezolana.

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de la replicación del virus en la célula hospedera.....	6
Figura 2. Representación esquemática de la diseminación del virus CHIK después de la picada del mosquito.....	7
Figura 3. Cascadas de señalización anti virus CHIK vía dependiente de TLR y RIG-I. ....	9
Figura 4. Representación esquemática de la respuesta inmunitaria contra la infección por el virus CHIK.....	12
Figura 5. El macrófago es central en los signos crónicos de la enfermedad por Chikungunya...	15
Figura 6. Mecanismos de persistencia del virus CHIK e inflamación tisular en pacientes con enfermedad crónica.....	16
Figura 7. Principales diferencias estructurales entre los diferentes miembros de la familia de receptores tipo inmunoglobulina (KIR).....	20
Figura 8. Estructura de 9 exones del gen <i>KIR</i> ancestral.....	21
Figura 9. Haplotipos <i>KIR</i> definidos por secuenciación genómica.....	23
Figura 10. Visualización de ADN genómico en gel de agarosa (0.75%) en buffer TBE 1X.....	40
Figura 11. Producto amplificado correspondiente al gen <i>KIR3DL1</i> en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio.....	41
Figura 12. Producto amplificado correspondiente al gen <i>KIR3DS1</i> en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio.....	42

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores que se utilizarán para la determinación de genes <i>KIR3DL1</i> y <i>KIR3DS1</i> .....	34
Tabla 2. Manifestaciones clínicas en la infección por el virus Chikungunya.....	37
Tabla 3. Contaje absoluto de neutrófilos, linfocitos, leucocitos y plaquetas en pacientes durante la infección por <i>CHIKV</i> .....	39
Tabla 4. Distribución de la frecuencia del gen <i>KIR3DL1</i> en individuos con fiebre del Chikungunya.....	43
Tabla 5. Distribución de la frecuencia del gen <i>KIR3DS1</i> en individuos con fiebre del Chikungunya.....	43
Tabla 6. Frecuencias génicas de los genes <i>KIR3DL1</i> y <i>KIR3DS1</i> en individuos con fiebre del Chikungunya.....	44
Tabla 7. Distribución de las frecuencias de las combinaciones <i>KIR3DL1/KIR3DS1</i> en individuos con fiebre del Chikungunya y población control.....	45
Tabla 8. Comparación de la frecuencia del gen <i>KIR3DL1</i> entre individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos.....	46
Tabla 9. Comparación de la frecuencia del gen <i>KIR3DS1</i> entre individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos.....	47
Tabla 10. Comparación de la frecuencia de las combinaciones <i>KIR3DL1/KIR3DS1</i> entre individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos.....	48
Tabla 11. Comparación de la frecuencia de los genes <i>KIR3DL1</i> y <i>KIR3DS1</i> entre pacientes clasificados de acuerdo a las manifestaciones clínicas y paraclínicas más relevantes de la infección por <i>CHIKV</i> .....	49

Tabla 12. Comparación de la frecuencia de las combinaciones de los genes <i>KIR3DL1</i> y <i>KIR3DS1</i> entre pacientes clasificados de acuerdo a las manifestaciones clínicas y paraclínicas más relevantes de la infección por CHIKV.....	50
Tabla 13. Frecuencia de los síntomas de infección aguda por CHIKV.....	54
Tabla 14. Principales diferencias clínicas entre Chikungunya y Dengue (Simon y col. 2011)....	55
Tabla 15. Manifestaciones paraclínicas para el diagnóstico diferencial de la fiebre por CHIKV y DF (Tomado de: <i>Organización Panamericana de la Salud, 2011.</i> ).....	57

## INDICE

RESUMEN.....	II
ABREVIACIONES.....	IV
INDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	25
OBJETIVOS.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
RESULTADOS.....	36
DISCUSIONES.....	51
CONCLUSIONES.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	64

## INTRODUCCIÓN

La fiebre de Chikungunya es una enfermedad arboviral causada por el virus Chikungunya (CHIK), el cual es transmitido por mosquitos del género *Aedes*. La fiebre de CHIK fue reconocida, por primera vez, como una epidemia en el este de África durante los años 1952 y 1953 (Schwartz y Albert, 2010). El virus Chikungunya (CHIKV) es un alfavirus perteneciente a la familia *Togaviridae*. Estos Alfavirus son pequeños virus esféricos con envoltura, con un diámetro de 60-70 nm. El genoma es una molécula de ARN de una sola cadena, de polaridad positiva, que codifica cuatro proteínas no estructurales (nsP1-4) y tres proteínas estructurales (C, E1, E2) (Caglioti y col., 2013).

### ***Vector y Reservorio***

Dos ciclos de transmisión del virus CHIK han sido bien documentados: un ciclo selvático enzoótico y un ciclo urbano endémico/epidémico. El ciclo selvático Africano probablemente involucra varias especies de mosquitos *Aedes*, como vectores (*A. furcifer*, *A. vittatus*, *A. fulgens*, *A. luteocephalus*, *A. dalzieli*, *A. vigilax*, *A. camptorhynchites*), y primates no humanos, como hospedadores reservorio/amplificador. Los ciclos de transmisión endémico/epidémico se establecieron cuando el virus fue introducido en Asia, alrededor de 1950, en la región del océano Índico (Indian Ocean), India y el sureste Asiático, desde 2005. (Caglioti y col., 2013).

Una mutación que originó una sustitución de aminoácido en la posición 226 (A226V) de la glicoproteína estructural (E1), incrementó la infectividad y replicación de algunas cepas epidémicas del virus CHIK en las glándulas salivales de un vector urbano alternativo, *A. albopictus* (ProMED archive, 2010). Por lo tanto, el ciclo de transmisión urbano depende únicamente de *A. aegypti* y/o *A. albopictus*, vectores antropofílicos que pueden iniciar la transmisión humano-mosquito-humano y la amplificación en hospederos humanos. Este

ciclo endémico/epidémico resulta en altos niveles de exposición humana a la transmisión por mosquito, particularmente porque esos vectores se encuentran cercanos a áreas urbanas. El comportamiento y ecología del *A. aegypti*, particularmente, son ideales para la transmisión epidémica porque los mosquitos adultos hembras prefieren alimentarse de humanos, alimentándose varias veces durante un único ciclo gonotrópico, la ovoposición ocurre en contenedores artificiales como sitios de preferencias para sus larvas y habitan dentro de casas con acceso a hospederos. *A. albopictus* es un vector zoofílico y antropofílico, agresivo, silente, activo durante todo el día y con un tiempo de vida mayor al resto de los mosquitos (> 8 semanas). En décadas recientes se ha expandido a varias áreas previamente libres de *Aedes* y al parecer nuevas introducciones de *A. albopictus* han sido causadas por huevos vegetativos contenidos en maderas y gomas exportadas desde Asia al resto del mundo. Otros eventos emergentes que han contribuido con la introducción de los mosquitos *A. albopictus* en áreas previamente no afectadas, son el cambio climático y el uso incrementado de contenedores de plástico en países en desarrollo. Asimismo, los cambios climáticos pueden tener varios efectos en la biología del vector: temperaturas incrementadas pueden mejorar su sobrevivida a altas altitudes y latitudes, incrementando así la tasa de crecimiento de la población de vectores, y alterar su estacionalidad. Además, las precipitaciones incrementadas pueden afectar el hábitat de la larva y el tamaño de la población y un incremento de la humedad puede afectar favorablemente la supervivencia del vector. Finalmente, los seres humanos representan el principal reservorio del virus CHIK durante periodos epidémicos. Sin embargo, en África algunos animales (monos, roedores y aves) constituyen reservorio del virus durante periodos no-epidémicos, manteniendo la circulación del virus en el ambiente en ausencia de casos humanos. (Caglioti y col., 2013).

### ***Manifestaciones clínicas***

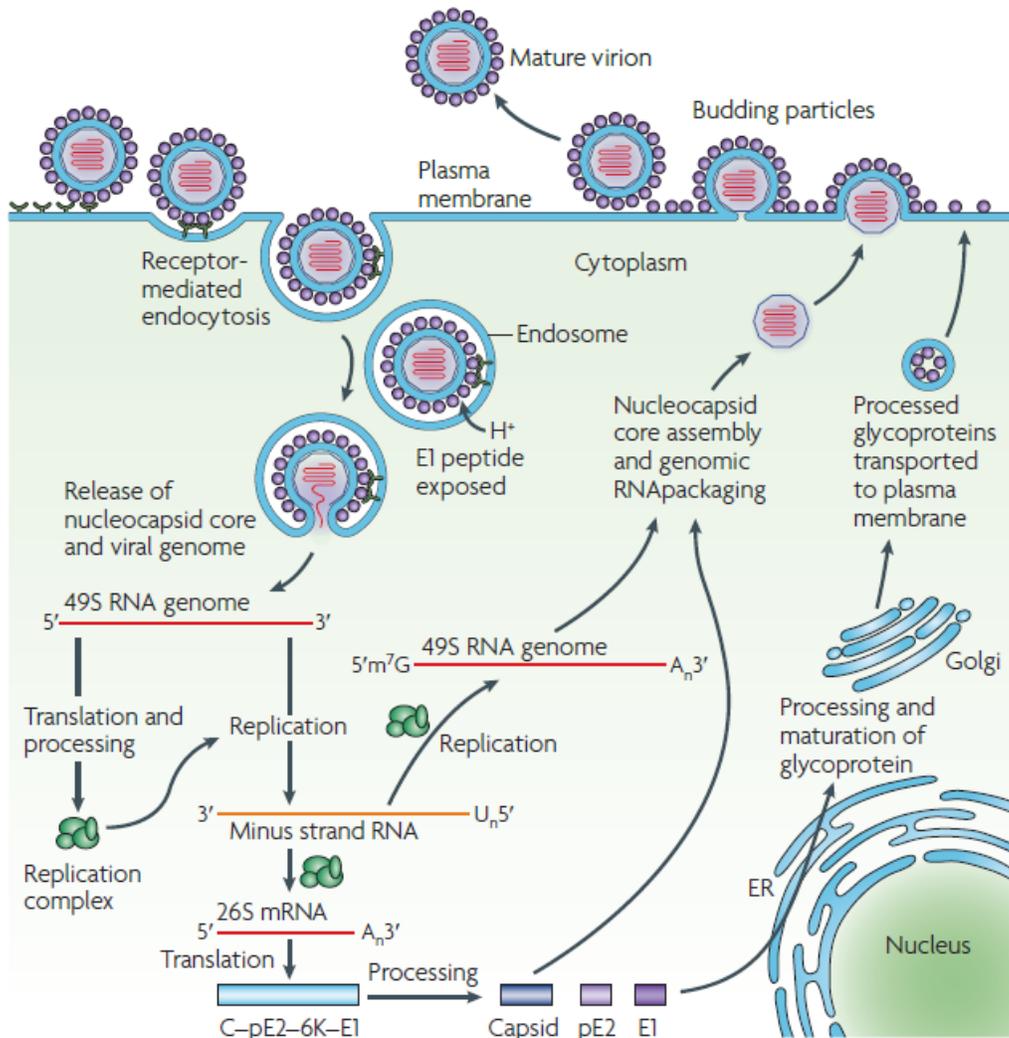
Los síntomas clásicos de fiebre, erupción cutánea, artralgia, mialgia y dolor de cabeza aparecen después de un periodo corto de incubación de 2–10 días. La fiebre es generalmente el primer síntoma en aparecer abruptamente. A los pocos días aparecen otros síntomas y signos. La artralgia o artritis usualmente afectan más de una articulación, siendo las más comúnmente afectadas las de rodillas, tobillos, manos y muñecas. Los síntomas articulares puede ser menos pronunciados y frecuentes en niños. La erupción cutánea es usualmente macula-papular y puede generar irritación. Otros síntomas menos comunes incluyen diarreas, vómitos, hemorragias, inflamación de oídos y enfermedades oculares, principalmente uveítis anterior. Los niños menores de un año de edad pueden presentar síntomas un poco diferente a niños mayores, con convulsiones febriles, cianosis perimetral, edema pedal y lesiones vesículo-bullosas en piel. En raras ocasiones pueden ocurrir manifestaciones severas, tales como enfermedades neurológicas (meningo-encefalitis, síndrome Guillain-Barré), miocarditis y falla multiorgánica, que pueden ser fatales, particularmente en neonatos y pacientes mayores con comorbilidades. Un 5% a un 28% de los pacientes infectados permanecen asintomáticos, representando un problema de salud pública porque representan una fuente indetectable de transmisión potencial. En una proporción de adultos, se ha evidenciado que la infección por el virus CHIK guía a enfermedades reumáticas meses a años después de la infección, siendo poco común en niños. Esos desórdenes músculo-esqueléticos incluyen artralgia, artritis inflamatoria, tenosinovitis (inflamación de la vaina que recubre al tendón), entesitis (inflamación en los tendones, específicamente en la unión de estos al hueso) y exacerbación de enfermedad articular existente. Los síntomas persistentes de artralgia pueden mejorar o pasan a cronicidad, afectando frecuentemente múltiples articulaciones, y están asociados con

pérdida funcional de las actividades de la vida diaria, reduciendo la calidad de vida y presentando síntomas de astenia, depresión y ansiedad. La calidad de vida puede reducirse en amplio rango de aspectos, desde físico (función, dolor, salud general) hasta mental (salud emocional y mental, funcionamiento social). Un pequeño porcentaje de los pacientes muestran evidencia de artritis crónica erosiva, la cual se asemeja a la artritis reumatoide, induciendo una respuesta inflamatoria similar, aunque el factor reumatoide suele ser negativo (Roques y col. 2015).

### ***Ciclo de vida***

En la Figura 1 se muestra el ciclo de vida de un Alfavirus. Los Alfavirus ingresan en la célula blanco por endocitosis. Unos pocos receptores, como por ejemplo la molécula de adhesión intracelular, la molécula de adhesión ICAM-3 no dependiente de integrina específica de células dendríticas (DC-SIGN o CD209), molécula de adhesión ICAM-3 no dependiente de integrina específica de hígado y nódulos linfáticos (L-SIGN; además, conocido como CLEC4M), heparán sulfato, laminina e integrinas, han sido implicados en este proceso, pero el papel de los mismos aún no ha sido establecido. Posteriormente a la endocitosis, el ambiente ácido del endosoma dispara cambios conformacionales en la envoltura viral, exponiendo el péptido E1, el cual media la fusión de la membrana celular del hospedero con el virus. Esto permite la liberación al citoplasma del core y del genoma viral. Dos precursores de proteínas no estructurales (nsPs) son traducidas del ARN mensajero viral, y el clivaje de esos precursores genera las proteínas no estructurales: nsP1–nsP4. nsP1 está involucrada en la síntesis de una hebra de ARN viral negativa y tiene propiedades de capping (caperuza) del ARN, nsP2 muestra actividades ARN helicasa, ARN trifosfatasa y proteinasa y está involucrada en apagar la transcripción de la célula hospedera, nsP3 es parte de la unidad replicasa y nsP4 es la ARN polimerasa viral. El

ensamble de esas proteínas forma el complejo de replicación viral, el cual sintetiza un ARN intermediario de una hebra negativa y de longitud completa. Este ARN intermediario sirve como molde para la síntesis del ARN sub-genómico (26S) y genómico (49S). El ARN sub-genómico dirige la expresión del precursor de proteína C-pE2-6K-E1, el cual es procesado por una serina proteasa autoproteolítica. La cápside (C) es liberada, y las glicoproteínas pE2 y E1 son generadas por un procesamiento adicional. pE2 y E1 se asocian en el Golgi y son exportadas a la membrana plasmática, donde pE2 es escindida en E2 (involucrada en la unión del receptor) y E3 (la cual media el plegamiento apropiado de pE2 y su subsiguiente asociación con E1). El ensamblaje viral es promovido por la unión de la nucleocápside viral al ARN viral y el reclutamiento de glicoproteínas de envoltura asociadas a membrana. Finalmente, la partícula de alfavirus ensamblada, con un core icosaédrico, es expresada en la membrana celular (Schwartz y Albert, 2010).

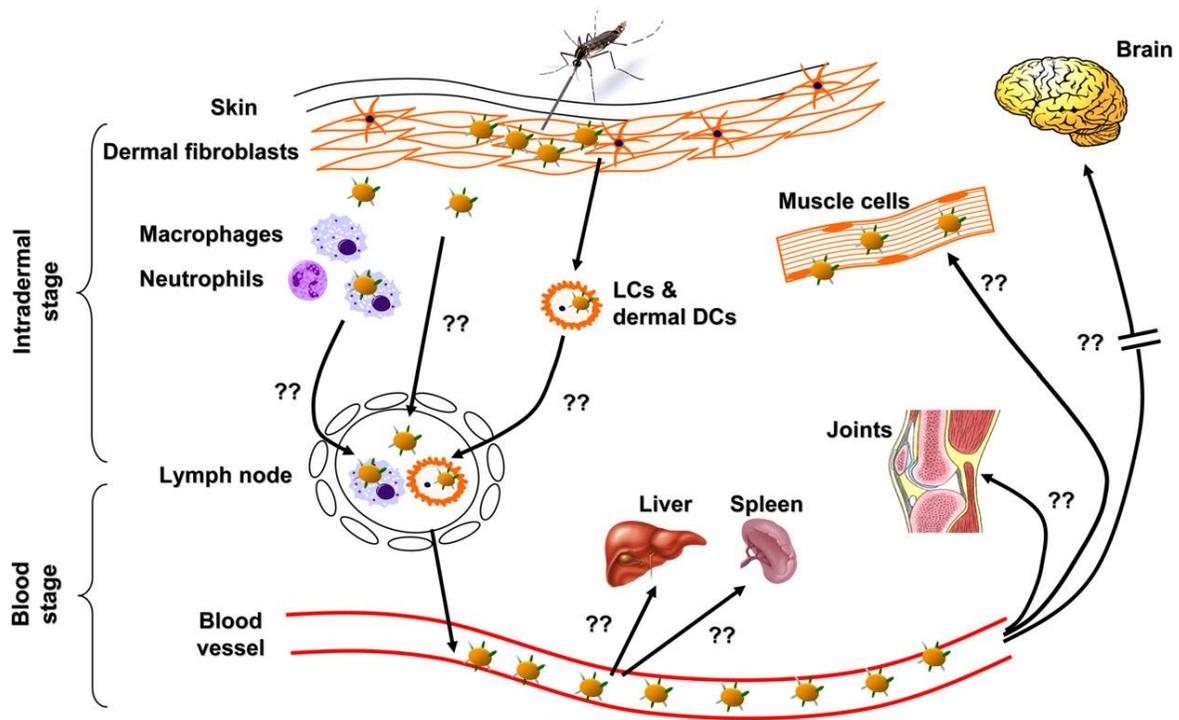


**Figura 1.** Representación gráfica de la replicación del virus en la célula hospedera (Tomado de Schwartz y Albert, 2010).

***Primer encuentro del virus CHIK con el hospedador humano: inoculación intradérmica por parte del mosquito.***

Los primeros eventos de la infección por virus CHIK aún son pobremente entendidos. Basados en estudios tempranos de modelos de enfermedad, causados por otros arbovirus, tales como el virus del dengue (DV), y el virus Ross River (RRV), se ha postulado una ruta común (Figura 2). Seguidamente a la inoculación intradérmica por

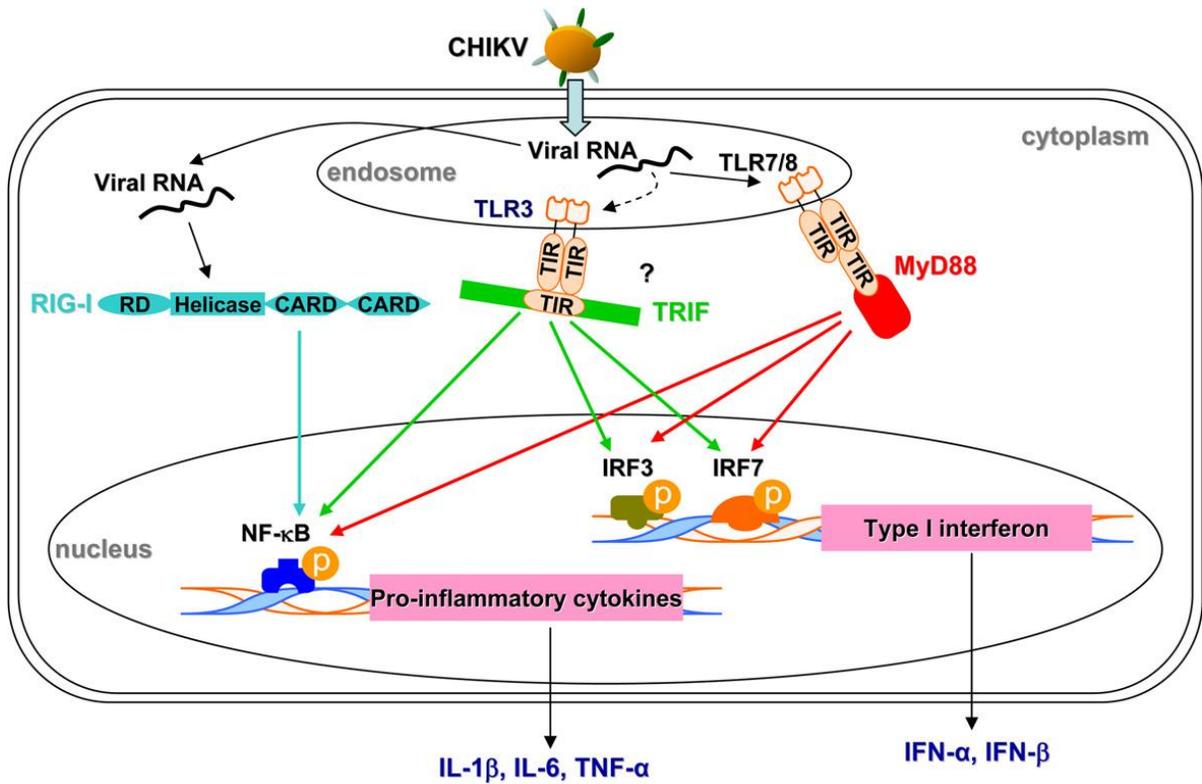
mosquitos infectados, la replicación del virus se iniciará en el sitio de inoculación. Diferentes tipos de células residentes están presentes en el sitio de inoculación, incluyendo queratinocitos, células dendríticas dérmicas (DCs), células de Langerhans (LCs) y macrófagos dérmicos. Solos los fibroblastos de la piel son susceptibles a la infección por el virus CHIK y probablemente los macrófagos dérmicos puedan ser blancos del virus CHIK, ya que se ha demostrado que macrófagos de otros tejidos en humanos o ratones son susceptibles de infección. (Revisado en Kam y col., 2009)



**Figura 2.** Representación esquemática de la diseminación del virus CHIK después de la picada del mosquito. El mosquito *Aedes* inocula el virus CHIK en compartimentos intradérmicos. Las células inmunitarias residentes en la capa intradérmica incluyendo células dendríticas (DCs), células de Langerhans (LC), macrófagos y neutrófilos, interactúan y controlan la diseminación del virus CHIK. Las células infectadas con el virus CHIK pueden migrar a los nódulos linfáticos drenantes y disparar la respuesta inmunitaria

innata para eliminar el virus. Sin embargo, el virus que escapa de los nódulos linfáticos puede ser liberado en la circulación sanguínea y diseminarse a varias partes del cuerpo (Tomado de Kam y col., 2009).

La interacción en el sitio de la inoculación más la replicación del virus CHIK *in situ* induce una respuesta inmunitaria innata local, guiando a la liberación de quimioatrayentes. Esto disparará un influjo de células inmunitarias, como los macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, basófilos y eosinófilos, las cuales pueden producir localmente diferentes citoquinas y mediadores con propiedades antivirales. Esta respuesta innata puede, además, controlar el virus en la piel. El virus CHIK es un potente inductor de IFN- $\alpha$ , una poderosa citoquina anti-virus CHIK, y de muchas moléculas inflamatorias, como TNF- $\alpha$ . Probablemente, el ARN de una sola cadena dispara la respuesta a través de las vías TLR3/TRIF, TLR7-MyD88 y/o RIG-I (Figura 3). (Revisado en Kam y col., 2009).



**Figura 3.** Cascadas de señalización anti-virus CHIK vía dependiente de TLR y RIG-I. El reconocimiento del ARN viral en los endosomas de células infectadas guía al reclutamiento de proteínas adaptadoras: MyD88 o TRIF vía sus dominios TIR. Alternativamente, el ARN viral que contiene trifosfato puede ser detectado por la ARN helicasa citoplasmática RIG-I. Esto resulta en la activación de varias cascadas de señalización y fosforilación de factores de transcripción: IRF3, IRF7 y NKkB. Estos factores de transcripción, al ser fosforilados son traslocados del citoplasma al núcleo e inducen la transcripción de interferón Tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) y citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) (Tomado de Kam y col., 2009).

## ***Diseminación del Virus***

### ***La primera parada: Los nódulos linfáticos drenantes***

Aunque, el hospedero establece una respuesta para controlar el virus en la dermis de la piel, el virus se disemina rápidamente al sistema circulatorio. Distintos escenarios explican esto. Primero, durante la inoculación, el mosquito *Aedes* inyecta la saliva, que contiene inmunomoduladores que pueden neutralizar la primera línea de defensa para potenciar la infección. Segundo, las DCs infectadas, residentes en la dermis, las LCs o macrófagos dérmicos o células infiltrantes, como macrófagos, DCs infectadas por virus CHIK recién producidos, pueden migrar a los nódulos linfáticos drenantes.

Basados en estos hallazgos, es importante determinar si el virus CHIK puede infectar LCs o células inmunitarias infiltrantes e inducir su migración. En los nódulos linfáticos drenantes, las células migratorias infectadas producirán nuevos virus, los cuales pueden infectar células susceptibles residentes. Este evento puede, además, disparar una respuesta inmunitaria local. Por ejemplo, diferentes células inmunitarias presentes en los nódulos linfáticos expresan un amplio espectro de TLRs. Después de la interacción con el virus, la producción innata de citoquinas puede ayudar a eliminar o controlar el virus en los nódulos linfáticos. Esta respuesta modulará la respuesta inmunitaria adaptativa y puede influir en la diseminación del virus a los tejidos, tales como las articulaciones o el cerebro al activar el endotelio y modificando la permeabilidad de las barreras hemato-tisular (Revisado en Kam y col., 2009).

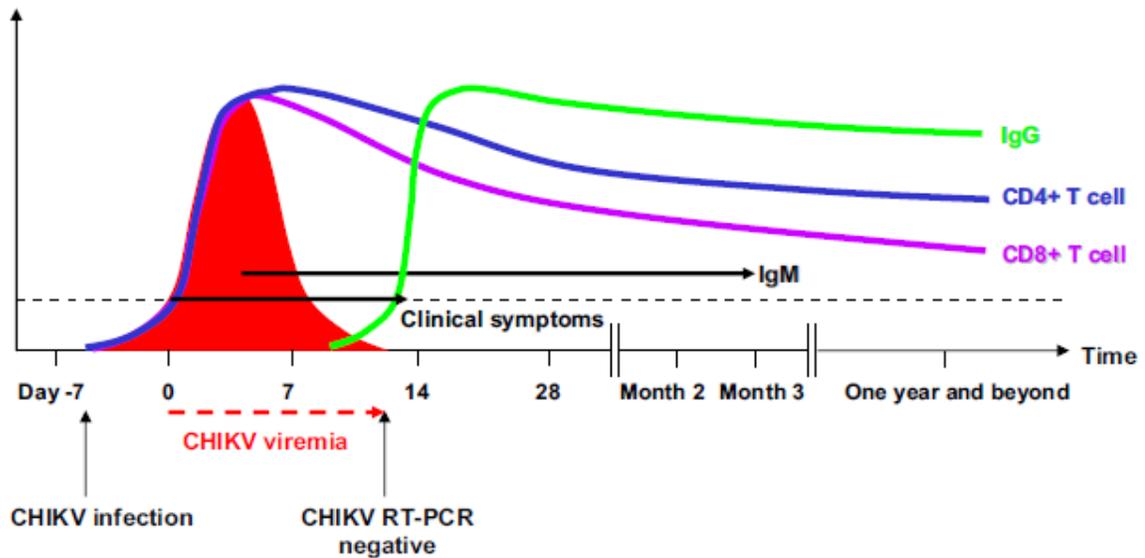
### ***Segundo: Migración a la circulación***

Los virus producidos en los nódulos linfáticos drenantes son liberados en la circulación linfática y de este modo a la sangre, a través del ducto torácico. Una vez en la sangre los virus tienen acceso a varias partes del cuerpo, incluyendo las articulaciones y el

cerebro. Durante, la primera semana la infección, la viremia de CHIK puede alcanzar altas concentraciones (carga viral de  $3.3 \times 10^9$  copias/ mL). Sin embargo, no está claro si el virus detectado es producto del virus producido en los nódulos linfáticos y otros tejidos o de células mononucleares de sangre periférica infectadas. Trabajos *in vitro* han demostrado que las células T y B no son infectadas por el virus CHIK, mientras que estudios en ratones sugieren que los macrófagos hepáticos son infectados durante la enfermedad temprana. Debido al gran número células de Küpffer, éstas pueden representar el principal reservorio de producción viral durante la primera semana de la infección. (Revisado en Kam y col., 2009).

### ***Tercero: Control de la viremia***

La viremia por el virus CHIK dura entre 2 y 10 días (Figura 4). Por lo tanto la eliminación del virus ocurre antes de que el hospedador inicie la producción de IgGs y la respuesta de las células T. Esto puede deberse a la fuerte respuesta de IFN  $\alpha/\beta$  inducida por el virus, y a que el virus CHIK es muy sensible a la acción del interferón de tipo I. En humanos, se detecta altas concentraciones de IFN- $\alpha$  durante la fase aguda de la infección por el virus CHIKV, pero después de la eliminación del virus de la sangre las concentraciones de IFN- $\alpha$  retorna a concentraciones normales (Revisado en Kam y col., 2009).



**Figura 4.** Representación esquemática de la respuesta inmunitaria contra la infección por el virus CHIK. La viremia de CHIK en sangre dura entre 2 y 10 días (carga viral en área roja). Las células TCD4+ (línea azul) y CD8+ (línea púrpura) son expandidas correspondiendo a la infección por el virus CHIK. La rápida eliminación viral ocurre antes de la expansión de los anticuerpos neutralizantes (IgG, línea verde). Los síntomas clínicos (fiebre) desaparece cuando la viremia cae a niveles indetectables (Tomado de Kam y col., 2009).

### *Fases de la infección por el virus CHIK*

#### *Fase Aguda*

La primera fase de la infección por el virus CHIKV es la aguda, con una temprana respuesta de interferón (IFN) tipo 1. El IFN- $\alpha$  es detectado el primer día de la infección y su concentración está correlacionada con la carga viral plasmática, la cual es significativamente mayor en pacientes ancianos. Sin embargo, las concentraciones de citoquinas Th1 y Th2 plasmática permanecen bajas. La respuesta IFN aguda incrementa las concentraciones de quimoquinas inducibles por esta citoquina: MIG/CXCL-9 e IP-10/CXCL-10. La carga viral está relacionada con las concentraciones de IFN- $\alpha$ , IL-1-RA,

IL-6, MCP-1/CCL-2, IL-12, IP-10/CXCL-10, IL-18, e IL-18BP. Por lo tanto, la respuesta inflamatoria a la infección por el virus CHIK contribuye con la eliminación del virus. (Revisado en: Dupuis-Maguiraga y col., 2012).

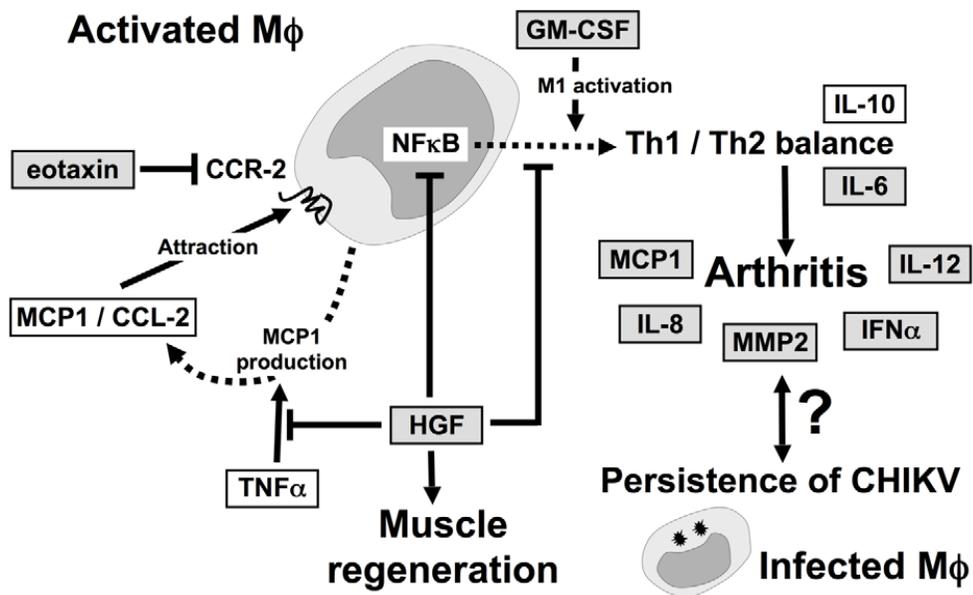
### ***Fase crónica***

La respuesta inflamatoria a la infección por virus CHIK guía a su eliminación de la sangre y a la recuperación clínica. Sin embargo, no está claro porque un subgrupo de pacientes presenta niveles variables de mialgia y artralgia, culminando en algunos casos en síndromes artríticos debilitantes. Cinco estudios han tratado de identificar los factores asociados con la enfermedad Chikungunya crónica en pacientes de Singapur, La Réunion, Dakshina Kannada (India) y Emilia Romagna (Italia), con tiempos medidos desde la inclusión (primera consulta). La proporción de pacientes con signos crónicos atribuibles al virus CHIK difieren entre las series, En Singapur, 13% de los pacientes infectados presentaban artralgia crónica después de 3 meses de infección, en Emilia Romagna, 70% de los pacientes tenían síntomas persistentes a los 6 meses y 32% tenían síntomas persistentes a los 12 meses después de la inclusión. Similarmente, 49% de los pacientes de la epidemia en Dakshina Kannada (año 2008) tenían síntomas persistentes atribuibles a Chikungunya 10 meses después de la inclusión, y casi la mitad de los pacientes estudiados en la Réunion presentaban síntomas persistentes, incluyendo posiblemente artritis, un año después de la inclusión (Revisado en: Dupuis-Maguiraga y col., 2012).

### ***Período de recuperación entre las fases aguda y crónica***

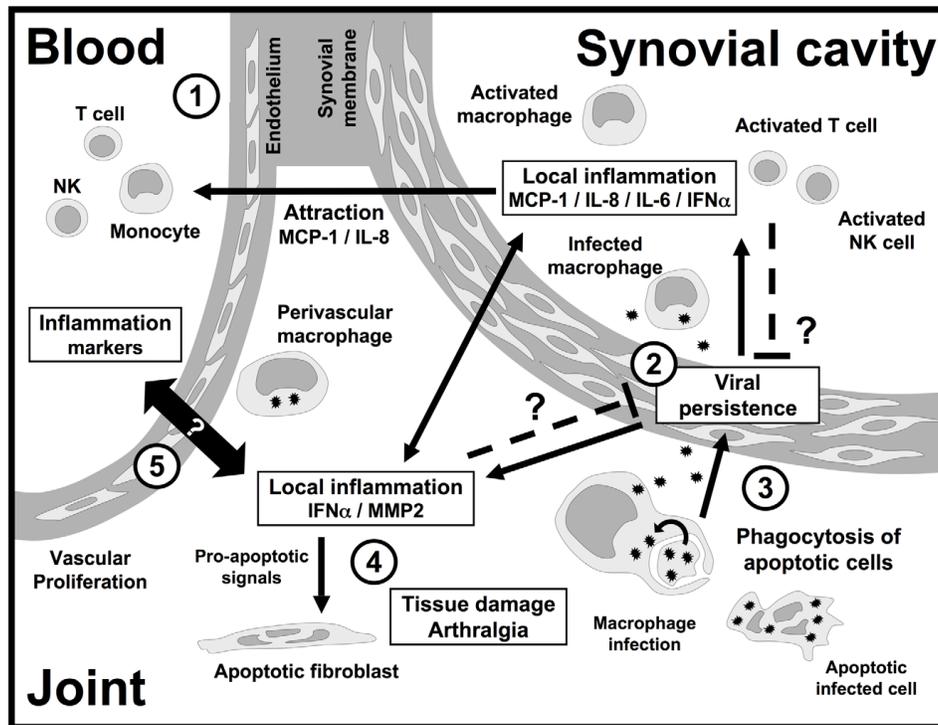
Durante el período de recuperación, se llevan a cabo los mecanismos regulatorios activos responsables de la resolución de la inflamación. Esos mecanismos involucran macrófagos y su habilidad para originar y regular la inflamación (Figura 5). La infiltración

por macrófagos, bajo el control de MCP-1/CCL-2, es un rasgo crítico de daño tisular. Los efectores inflamatorios, IL-6, IL-8, MCP-1/CCL-2, MMP2 e IFN- $\alpha$  son expresados específicamente en los tejidos de pacientes con Chikungunya crónica, quienes presentan altos niveles de ARN mensajero de IFN- $\alpha$  e IL-12 en sus leucocitos circulantes. Este proceso inflamatorio clásico puede ser regulado por el HGF y eotaxina, las cuales tienen diferentes perfiles de expresión durante la fase de recuperación en pacientes con Chikungunya, dependiendo si esos pacientes desarrollan o no la enfermedad crónica. Una vez que infiltran la articulación o músculo, los macrófagos son activados y regulan el balance local Th1/Th2, como una función de su propio estatus de activación (M1/clásico o M2/alternativo). El GM-CSF y el HGF, los cuales tienen actividades M1 y M2, respectivamente, pueden modular este balance ya que son expresados diferencialmente en Chikungunya aguda y crónica. El virus CHIK persiste en macrófagos solo en pacientes con síndrome reumático crónico. Finalmente, la influencia recíproca que conecta la persistencia viral y la inflamación local no son conocidos (Revisado en: Dupuis-Maguiraga y col., 2012).



**Figura 5.** El macrófago es central en los signos crónicos de la enfermedad por Chikungunya. Flechas sólidas: activación. Líneas sólidas de paro: regulación. Flechas punteadas: expresión. (Tomado de Dupuis-Maguiraga y col., 2012).

Datos recientes han implicado los mediadores inflamatorios no solo en la fase aguda y en la fase de resolución del Chikungunya, sino que, además, en el establecimiento de la fase crónica. En la figura 6 se muestra como la infección con el virus CHIK puede guiar al daño crónico de las articulaciones (Revisado en: Dupuis-Maguiraga y col., 2012).



**Figura 6.** Mecanismos de persistencia del virus CHIK e inflamación tisular en pacientes con enfermedad crónica. (1) Meses después de la infección aguda, los monocitos, células T y células citotóxicas naturales (NK) son atraídas a la articulación inflamada, donde son activadas. (2) La infección de los macrófagos en las articulaciones está asociado con inflamación local y la producción de citoquinas, quimocinas y efectores pro-inflamatorios, tales como MCP-1/CCL-2, IL-8, IL-6, IFN- $\alpha$ , y MMP2. (3) La fagocitosis de cuerpos apoptóticos de células infectadas probablemente contribuye a la persistencia viral. Sin embargo, el efecto benéfico o deletéreo de la inflamación local a la persistencia viral no está esclarecido. (4) Cuando esto ocurre, la artritis está acompañada por altas tasas de apoptosis de fibroblastos y destrucción del cartílago. La inflamación crónica probablemente juega el principal papel en este daño y el dolor asociado. (5) La relación potencial entre la inflamación local en la articulación y el estado de activación sistémica, demostrado por la

presencia de marcadores de inflamación en plasma y células sanguíneas, aún permanece por esclarecer. (Revisado en: Dupuis-Maguiraga y col., 2012).

### ***Células citotóxicas naturales (NK)***

Las células citotóxicas naturales (NK) son componentes celulares de la respuesta inmunitaria innata siendo la primera línea de defensa contra virus, bacterias, tumores y microorganismos (Jobim y Jobim, 2008). Originalmente fueron descritas en base a su función citotóxica y posteriormente por su morfología de linfocitos grandes y granulares, con habilidad de lisar células caracterizadas por una expresión deficiente o alterada de moléculas MHC Clase I (células tumorales y células infectadas viralmente) sin necesidad de sensibilización previa, originando así el término de “citotoxicidad natural” e introduciendo la hipótesis de “pérdida de lo propio” (Lanier, 2008). Recientemente, se ha revisado esta hipótesis planteando que las células NK vigilan no solo las células que pierden la expresión de las moléculas HLA-clase I, sino aquellas que sobre expresan los ligandos para los receptores activadores expresados por las células NK. El resultado de la interacción de las células NK con las células blanco está determinado por el conjunto de receptores activadores e inhibidores expresados en la célula NK, como de ligandos en la célula blanco, así como la suma de las fuerzas de señales traducidas (Lanier, 2008).

Al igual que otros leucocitos, las células NK son reclutadas en el tejido inflamado por citoquinas, quimioquinas, y otros factores quimiotácticos, pudiendo ser activadas por IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha/\beta$ , favoreciendo su proliferación, citotoxicidad y/o producción de IFN- $\gamma$  (Lanier, 2008; Hallet y Murphy, 2008). Además, de

su actividad citotóxica, las células NK han sido descritas como células reguladoras debido a su influencia sobre otros tipos celulares, como células dendríticas, macrófagos, linfocitos T, B y células epiteliales (Newman y Riley, 2007)

### ***Receptores de las células NK***

Las células NK poseen una variedad de receptores cuya función es el reconocimiento e interacción con moléculas HLA clase I. La interacción de receptores de las células NK con sus ligandos HLA resulta en una inhibición o activación de los mecanismos efectores de las células NK sobre una célula blanco. Bajo ciertos estímulos las células NK sintetizan una gran variedad de receptores de superficie y sus interacciones son dirigidas de manera preferente, pero no exclusiva, hacia células hematopoyéticas, en particular células dendríticas (Parham, 2005).

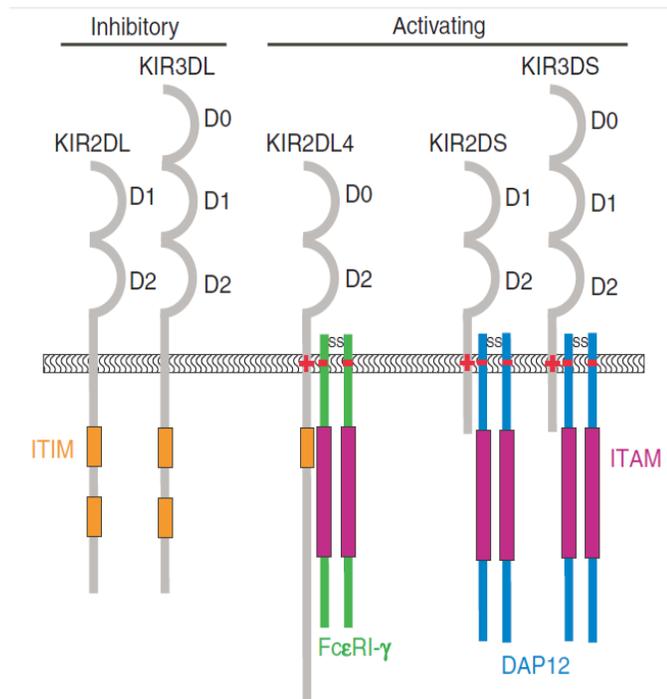
La actividad de las células NK está finamente regulada por un grupo de receptores activadores e inhibidores, cuyo balance final, luego de interactuar con su ligando específico, favorecerá o no a la activación de la célula frente a la célula blanco (Lanier, 2008). En humanos los receptores de las células NK (NKR) pueden ser divididos en dos clases:

1. Receptores NK específicos para moléculas HLA-clase I. Este grupo incluyen dos sub-grupos de receptores: los receptores pertenecientes a la familia de inmunoglobulinas (KIR, LIR o LILRs) y los receptores pertenecientes a la familia de las lectinas tipo I (CD94/NKG2),

2. Receptores NK-HLA independientes. Este grupo incluye los receptores de citotoxicidad natural (NCRs) (Landaeta, 2010).

### ***Receptores de las células NK tipo inmunoglobulinas (KIR)***

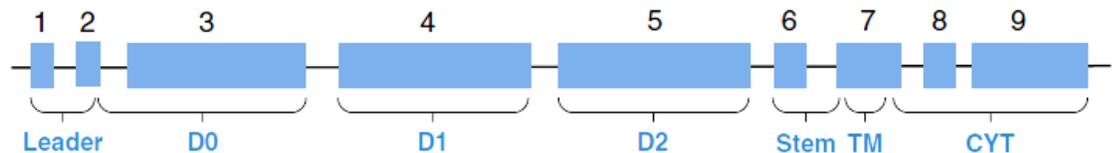
Los KIR, por killer inmunoglobulin like receptors, son glicoproteínas de membrana, pertenecientes a la súper-familia de las inmunoglobulinas, expresadas en la superficie de las células NK y sobre sub-poblaciones de linfocitos T (Revisado en: Landaeta, 2010). Estas moléculas modulan la función celular bajo el reconocimiento de su ligando, las moléculas HLA clase I expresadas en la célula blanco (Gardier, 2007). Estructuralmente, los receptores KIR presentan una región extracelular, constituida por dominios tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática (Figura 7). Basado en el número de dominios extracelulares, pueden clasificarse en receptores que presentan 2 dominios (KIR2D) y receptores con 3 dominios (KIR3D). Las características estructurales de los KIR se relacionan con su función y permite clasificarlos en KIR inhibidores y activadores. Los receptores inhibidores presentan una región citoplasmática larga (L) y contiene motivos inhibitorios basados en tirosina (ITIMs). Cuando el residuo de tirosina es fosforilado, éste se enlaza a una fosfatasa (SHIP-1) y transmite una señal inhibidora que bloquea la cascada de activación de señal generada por los diferentes receptores activadores expresados en la célula NK. Los receptores KIRs activadores presentan una región citoplasmática corta (S) y un aminoácido cargado positivamente (Lisina o Arginina), el cual permite la asociación con moléculas adaptadoras (DAP-12/KARAP, FcεRI-γ), que poseen un motivo activador basado en tirosina (ITAM), el cual transmite señales activadoras (Carrington y col,2005).



**Figura 7.** Principales diferencias estructurales entre los diferentes miembros de la familia de receptores tipo inmunoglobulina (KIR). Los KIR pueden ser divididos en tres principales subgrupos: los receptores inhibitorios, los receptores activadores y un único receptor activador conocido como KIR2DL4. La nomenclatura de los KIR está basada en el número de dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (2D o 3D) y la longitud del dominio citoplasmático (L para cola larga y S para cola corta). Los receptores con dominios citoplasmáticos largos contienen uno o dos motivos inhibitorios basados en tirosina (ITIMs) (naranja), que proporcionan función inhibitoria. Los KIR con cola citoplasmática corta y el KIR2DL4 de cola larga son receptores activadores, los cuales contienen un aminoácido básico (+) dentro del dominio transmembrana que interactúa con un aminoácido ácido (-) dentro de los dominios transmembrana de las proteínas de señalización adaptadora DAP12 (azul) o FcεRI-γ (verde), respectivamente. Estos

adaptadores proporcionan motivos activadores basados en tirosina (ITAMs) (púrpuras) que permiten la activación de la función (Tomado de: Campbell y Purdy, 2011).

La familia de los receptores KIR en humanos se encuentra codificada por 15 genes y dos pseudogenes ubicados en una región de 150 Kb aproximadamente, en el complejo de receptor leucocitario (LRC) localizado en el brazo largo del cromosoma 19 humano (19q13.4) (Lanier, 2005). Estos 15 genes poseen regiones promotoras independientes localizadas hasta 500 pares de bases (pb) antes del primer codón de transcripción. La estructura de dichos genes comprende un arreglo básico que consiste en 9 exones: los dos primeros exones que codifican la secuencia señal, los exones 3 al 5 que codifican para un dominio tipo inmunoglobulina (D0, D1, D2, respectivamente), los exones 6 y 7 que codifican el péptido conector y la región transmembrana y por último, los exones 8 y 9 que codifican la cola citoplasmática (Figura 8) (Revisado en: Torres-García y col, 2018).



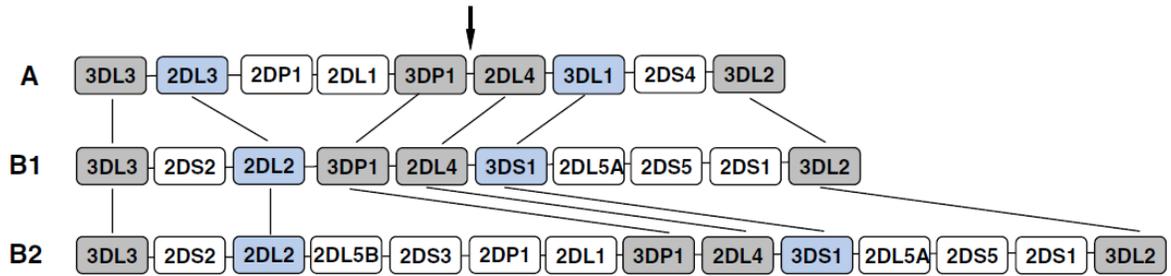
**Figura 8.** Estructura de 9 exones del gen *KIR* ancestral. La organización exón-intrón se correlaciona estrechamente con el dominio funcional (Tomado de: Bashirova y col, 2006).

### ***Diversidad Haplotípica***

La variación en el contenido génico es una de las características principales del complejo KIR. A pesar de esta variabilidad, análisis de segregación y datos de secuencia han revelado algunas características sistemáticas en la organización del complejo *KIR*. En prácticamente todos los haplotipos se pueden encontrar cuatro genes *KIR*, *3DL3*, *3DP1*,

*2DL4* y *3DL2*, por lo tanto, han sido llamados loci estructurales o framework. Múltiples eventos de recombinación recíproca parecen haber ocurrido dentro de una región única entre *3DPI* y *2DL4*, resultante en el intercambio de mitades centroméricas y teloméricas del complejo (Revisado en: Bashirova y col, 2006)

Basados en el contenido de genes se distinguen dos grupos básicos de haplotipos: Haplotipo A y B (Figura 9). El haplotipo A contiene 9 genes *KIR* y su secuencia genómica está representada por dos clones genómicos en el GenBank. Una característica del haplotipo A es la presencia de un solo gen *KIR* codificante de un KIR cola corta, *2DS4*, el cual con frecuencia muestra una eliminación del marco de lectura en el exón 5 y no codifica una proteína de membrana. Aunque los haplotipos A son fijos, en términos del número y tipo de genes presentes, muestran una alta variabilidad alélica en varios de los genes. En contraste, los haplotipos B exhiben una amplia diversidad en términos de contenido de genes y polimorfismo alélico. Se han secuenciado dos haplotipos B a partir de clones genómicos individuales (Figura 5, haplotipos B1 y B2). Basado en análisis de segregación, se han descrito más de 20 haplotipos B diferentes. Estos haplotipos contienen varias combinaciones de genes *KIR*, incluyendo varios genes *KIR* activadores. *2DL2* y *2DL3* se segregan como alelos de un mismo locus, a pesar de que originalmente se pensó que representaban dos genes distintos. Lo mismo ocurre para *3DS1* y *3DL1*. Casi todos los haplotipos contienen estos dos loci, de tal manera que prácticamente cada individuo tiene *2DL2* ó *2DL3* y *3DL1* ó *3DS1* dentro de su repertorio *KIR*. Por lo tanto, estos dos loci pueden ser considerados como loci estructurales adicionales, junto con *3DL3*, *3DPI*, *2DL4*, y *3DL2* (Revisado en: Bashirova y col., 2006).



**Figura 9.** Haplotipos *KIR* definidos por secuenciación genómica. Se muestra un haplotipo del grupo A y dos haplotipos del grupo B. Los genes *2DL2/3DL3* y *3DL1/3DS1* (de color azul) están presentes en casi todos los haplotipos *KIR*. Con una flecha se indica la zona de recombinación simétrica frecuente entre las partes centroméricas y teloméricas del complejo *KIR* (Tomado de: Bashirova y col., 2006).

#### ***Papel de las células NK en la infección por Chikungunya***

Junto al incremento de la infiltración de monocitos/macrófagos en las articulaciones inflamadas de ratones infectados, la presencia de células NK está significativamente incrementada. La IL-12, la cual estimula la actividad de las células NK, también incrementada, sugiere que las células NK activadas juegan un papel significativo durante la infección por el CHIKV. Clínicamente, se ha descrito que las células NK activadas que expresan CD69 están presentes en el líquido sinovial de pacientes con infección aguda por CHIKV. Dado que las funciones de las células NK están estrechamente controladas por los efectos concertados de receptores activadores e inhibidores, se demostró usando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) obtenidas de pacientes infectados con el CHIKV, que una expansión transitoria de células NKG2C+, que son células NK altamente citotóxicas, puede disminuir su propia actividad y así limitar, en general, la inmunopatología. Sin embargo, el papel específico de las células

NK en la infección por el CHIKV debe ser explorado en modelos de animales deficientes en células NK, especialmente desde que a las células NK se les confirió un papel patogénico en el sistema nervioso central (SNC), mediado por la infección con el virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) (Revisado en: Lum y Ng, 2015)

### **Chikungunya en América.**

En octubre del 2013, se notificaron los primeros casos de infección por el virus Chikungunya en América, específicamente en la Isla francesa de San Martín, con un total de casos sospechosos acumulados para el año 2014 de 4.830 y una tasa de incidencia de 15.755/100.000 habitantes, según reportes de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Con la llegada del virus a la isla de San Martín, se disemina por el resto del Caribe, América Central, del Norte y Sur. En el caso de Venezuela, a partir de la semana epidemiológica número 38, correspondiente al 19 de septiembre del 2014, se notificaron 841 casos sospechosos acumulados, cerrando el año con 34.642 casos sospechosos, con 2.303 casos confirmados y una tasa de incidencia de 121,5/100.000 habitantes (*Organización Panamericana de la Salud, 2011*).

## ANTECEDENTES

Las células NK pueden eliminar células blanco directamente o interactuando con células presentadoras de antígenos, las células T producen citoquinas, las cuales tienen actividad antiviral y pueden disparar la respuesta inmunitaria adaptativa. Las células NK activadas producen citoquinas inflamatorias, tales como IFN- $\gamma$ , y lisan células blancos por la exocitosis de perforinas y granzimas, guiando a la inhibición de la replicación viral e incrementando la citotoxicidad contra las células blanco (Revisado en: Thanapati y col., 2015)

Petitdemange y col. (2011) realizaron el análisis fenotípico y funcional de las células NK de 25 pacientes en las etapas temprana de la infección aguda por el virus CHIK. En este estudio demostraron que la infección por el CHIKV disminuía la capacidad de las células NK para producir IFN- $\gamma$ , particularmente en el pico de viremia. Esta declinación puede estar unida a la modulación, en esos pacientes, de los subgrupos de células NK que producen efectivamente más IFN- $\gamma$ , el subgrupo de células NK CD56<sup>brillantes</sup>. Además, el repertorio de las células NK era inusual con correlaciones fuertes y específicas entre la expresión de NKG2C y receptores KIR inhibitorios específicos. En contraste, al repertorio de células NK, el cual contiene una distribución al azar de KIRs, las células citotóxicas naturales NKG2C<sup>+</sup> en pacientes infectados con virus CHIK estaba asociado con receptores que tienen como ligandos alelos HLA-Cw. La correlación con KIR2DL1, que reconoce subtipos HLA-C2, es inverso, mientras que con KIR2DL2/ DL3, que reconocen subtipos C1, es directo. Esto sugiere que las células NK coexpresan NKG2C y receptores para alelos HLA-C1 expandidos durante una infección viral aguda. Estos hallazgos sugieren que la expansión de células NKG2C altamente citotóxicas está asociado con un imbalance

en la expresión de receptores específicos (KIR) y puede reducir la autoreactividad y limitar la inmunopatología en pacientes infectados con el virus CHIK.

Petitdemange y col. (2014) investigaron el impacto de los genes KIR inhibitorios y activadores y su ligando HLA-clase I en la susceptibilidad a la infección por el CHIKV y dengue, observándose en los pacientes infectados con el CHIKV una frecuencia incrementada de KIR2DL1 y una frecuencia disminuida de KIR2DS5, comparado a los pacientes infectados con el virus del dengue y controles. Además, observaron que la combinación de KIR2DL1 y su ligando HLA-C2 estaba significativamente asociada con la susceptibilidad a la infección con el virus CHIKV. Estos resultados les permitió sugerir que el repertorio de la célula NK formado por la interacción KIR2DL1: HLA-C2 facilitaba la infección específica por el virus CHIK.

Petitdemange y col. (2016) realizaron la caracterización de las células NK en pacientes infectados por virus dengue, el virus CHIK o ambos virus. Observándose, que la activación y diferenciación de las células NK es inducida durante la fase aguda de la infección por los virus del dengue y CHIK. Sin embargo, el análisis reveló que ambos arbovirus inducen dos firmas diferentes de la respuesta de las células NK. La infección del virus CHIKV fue asociada con una expresión incrementada de KIR2DL2/DL3, mientras que el virus del dengue con la expansión de células NK KIR2DL1+. Por otra parte, la respuesta de la célula NK disparada por la co-infección CHIK/dengue refleja una combinación de los resultados observados en pacientes mono-infectados, en términos de potencia y durabilidad (por ejemplo: NKp30, NKG2A y CD161), y un perfil único de co-expresión de KIR2DL2/2DL3 y KIR2DL1. Finalmente, describieron que la producción intracelular de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) por células NK es fuertemente estimulada en la infección aguda por el virus dengue, comparado a la infección por el virus CHIK.

Teck-Hui Teo y col. (2015), caracterizaron la patogenicidad del aislado del virus CHIK del Caribe y las consiguientes respuestas inmunitarias en un modelo murino. La infección *in vivo* de los ratones reveló que la eficacia de la replicación del aislado del Caribe era más débil con respecto al aislado de la Réunion. Demostrando, además, que la reducción de la patología articular, durante la fase aguda temprana de la infección con este aislado, estaba asociado con una respuesta Th1 pro-inflamatoria más débil y una menor actividad de la célula NK. En contraste, observaron un edema mayor en ratones infectados con el aislado del virus CHIK de La Réunion, correlacionado con una mayor actividad de las células NK y altas concentraciones de mediadores pro-inflamatorios, tales como IFN, y TNF- $\alpha$ . Por lo tanto, estos resultados sugieren un papel patogénico de las células NK durante la fase aguda temprana de la infección con el virus CHIK. Este papel patogénico de las células NK quedó demostrado, al observarse que la depleción de las células NK reducía la patología articular en ratones infectados con el virus CHIK de La Réunion. Finalmente, este estudio proporcionó evidencia de que el aislado del Caribe posee una replicación debilitada e induce una respuesta patogénica menor en el hospedero mamífero. (Teo y col., 2015).

## **OBJETIVOS**

Considerando que las célula citotóxicas naturales activadas pudiese estar jugando un papel significativo durante la infección con el CHIKV y que la función de las mismas está finamente regulada por un grupo de receptores activadores e inhibidores, cuyo balance final, luego de interaccionar con su ligando específico, favorecerá o no su activación frente a la célula blanco, nos planteamos los siguientes objetivos:

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el posible impacto de los genes *KIR3D* en la infección por el virus Chikungunya

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.- Describir las características demográficas, clínicas y paraclínicas de los pacientes con fiebre Chikungunya
2. Determinar la presencia de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* en pacientes con fiebre Chikungunya
- 3.- Comparar la frecuencia de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* entre pacientes con fiebre Chikungunya e individuos sanos.
4. Comparar la frecuencia de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* entre pacientes clasificados de acuerdo a las manifestaciones clínicas y paraclínicas.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1. Población**

En la presente investigación se incluyeron 73 individuos no emparentados, con diagnóstico clínico y molecular de infección por virus Chikungunya. Los individuos asistieron al Servicio Médico del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) entre los años 2014-2015. La confirmación de los casos sospechosos fue realizada por el Laboratorio de Biología de Virus del Centro de Microbiología y Biología Celular del IVIC, a través de la técnica de biología molecular RT-PCR (Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction), en los años correspondientes.

#### **Criterios de inclusión:**

Mayores de 18 años de edad.

Antecedentes personales negativos para enfermedades autoinmunes.

Diagnóstico molecular positivo de infección por virus Chikungunya.

#### **Criterios de exclusión:**

Menores de edad.

Personas con el sistema inmunológico comprometido, tales como individuos con trasplantes o en quimioterapia, igualmente personas con otras patologías (autoinmunes e infecciosas).

En el grupo control se incluyeron los datos del trabajo realizado y publicado por Conesa y colaboradores, en el cual se determinó la distribución de los genes KIR en la población mestiza venezolana (Conesa y col, 2015)

Previo a la recolección de los datos clínicos y de la toma de muestra de sangre periférica, cada uno de los individuos participantes firmó un consentimiento informado, aprobado por el comité de Bioética del IVIC.

## **2. Extracción de ADN Genómico**

El ADN genómico se obtuvo a partir de 5 mL de sangre periférica utilizando EDTA como anticoagulante y fue extraído en conjunto con la MSc. Daniela Rauseo, empleando el método con solvente orgánico (Bunce, 2000)

El procedimiento fue el siguiente:

La muestra de sangre periférica con anticoagulante se centrifugó por 10 minutos a 1000 g para obtener los leucocitos (capa blanca), éstos fueron lavados con 10 mL de buffer de lisis de células rojas (RCLB: Red Cell Lysing Buffer) y se agitó por inversión. Luego se centrifugó de nuevo por 10 minutos a 1000 g, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con RCLB hasta que el precipitado de leucocitos quedó blanco. El precipitado se re-suspendió en 3 mL de buffer de lisis nuclear (NLB: Nuclear Lysing Buffer) y se dejó en baño a 56°C hasta que se disolvió el precipitado. Una vez disuelto, se añadió 1 mL de cloruro de sodio (NaCl 5,25 M), se agitó en vórtex, se añadió 2 mL de cloroformo, se agitó nuevamente hasta formar una solución lechosa, se centrifugó por 20 minutos a 1000 g. Luego con una pipeta de polipropileno se aspiró el ADN (fase acuosa) y se transfirió a un tubo de polipropileno de 50 mL. A la fase acuosa se le añadió 2 volúmenes de etanol 95% frío, se rotó el tubo hasta que el ADN precipitó, se atrapó el ADN con una pipeta de polipropileno y se traspasó a un tubo de 1,5 mL estéril. El ADN se lavó con etanol 70% y se centrifugó por 5 minutos a máxima velocidad, se retiró el etanol. Finalmente, se re-suspendió el ADN en buffer TE 1X.

### **3. Ajuste de la concentración de ADN.**

La concentración de ADN se estimó por lectura de la densidad óptica (DO), midiendo la absorbancia a 260nm y a 280nm de cada muestra (2 µl) utilizando un nanodrop (NanoDrop™ 2000).

La concentración del ADN (µg/mL) viene dada por la fórmula:

[ADN] doble cadena = 50 µg /mL (factor constante) × DO 260nm.

1DO260nm = 50 µg de ADN/mL

Se calculó el índice = DO260nm / DO280nm. Este cociente debe ser  $\geq 1.7$ , para confirmar la ausencia de proteínas, las cuales pueden interferir con la reacción en cadena de la polimerasa. La concentración del ADN se ajustó a 200µg/mL.

### **4. Calidad del ADN.**

Luego del ajuste de la concentración del ADN, la calidad del mismo se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa (Agarosa LE, ACTGENE) al 0.7% en TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). En cada pozo se colocaron 2µl de buffer de carga mezclado con 5µl de ADN cuya concentración fue previamente ajustada a 200 µg/mL. En uno de los pozos de los geles se colocó como control 5µl del fago lambda (Promega) sin digerir y ajustado a una concentración de 200 µg/mL. Se dejó correr a 100 voltios por media hora.

### **5. Métodos para el análisis de los polimorfismos**

Para el análisis de los genes estudiados se utilizó la técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica fue descrita en 1983 por Kary Mullis (Mullis y Faloona, 1987)

El principio básico de la PCR es el incremento exponencial de la secuencia específica de ADN utilizando iniciadores oligonucleotídicos, cuyas secuencias corresponden con la secuencia blanco y delimitan el segmento de ADN a amplificar (Mullis y Faloona, 1987).

Para la determinación de los genes *KIR* (*KIR3DL1* y *KIR3DS1*) se utilizó la técnica PCR-SSP (reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencia específicas), la cual se fundamenta en que solo los iniciadores cuyas secuencias son perfectamente complementarias a la muestra del ADN, hibridan y producen el fragmento correspondiente al gen de interés (Shymala y Ames, 1993). Después del proceso de PCR, los fragmentos de ADN amplificados se separan mediante electroforesis en geles de agarosa, previamente teñidos con bromuro de etidio. La interpretación de los resultados de la PCR-SSP se basa en la presencia o ausencia de un fragmento específico de ADN. Dado que la amplificación durante la reacción de PCR puede ser adversamente afectada por diversos factores (errores de pipeteo, calidad deficiente del ADN, presencia de inhibidores, etc.), es incluido un par de iniciadores que amplifican un control interno. Este par de iniciadores amplifican una región conservada de un gen constitutivo, que está presente en todas las muestras de ADN humano y se utiliza para verificar la integridad de la reacción de PCR. En presencia de una banda positiva de tipificación (amplificación específica de un alelo), el producto del par de iniciadores del control interno puede estar débil o ausente debido a las diferencias en concentración y a las temperaturas de fusión entre los pares de iniciadores específicos y el par de iniciadores del control interno.

### 5.1. PCR-SSP para la determinación de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1*

Para detectar la presencia o ausencia del gen *KIR3DL1*, responsable de señales inhibitoras, y del gen *KIR3DS1*, responsable de señales activadoras, se utilizaron los iniciadores y el protocolo descrito por Zhuang y colaboradores (Zhuang y col. 2012) (Tabla 1). Como controles internos de la PCR se utilizaron los iniciadores del grupo sanguíneo ABO descrito por Olsson y colaboradores (Olsson, 1998).

La PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystem empleando la siguiente mezcla de reacción: PCR Buffer 1X, 1 pmol/μl de cada uno de los iniciadores para cada gen *KIR* específico (Tabla V), 0.1 pmol/μl de los iniciadores ABO (Forward y Reverse), 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de KCl, 0.4 mM de Tris-HCl, 3.25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2U de la enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen), 2 μl de muestra de ADN genómico (25 ng) y agua destilada para completar un volumen total de reacción de 20 μl. En todas las reacciones se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) y un control positivo (mezcla de reacción con ADN de un individuo *KIRDL1/KIR3DS1* positivo).

La condición de la PCR fue la siguiente: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 90 segundos a 72°C. Finalmente, la extensión de 10 minutos a 72°C.

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa (Agarosa LE, ACTGENE) al 1.5 %, coloreado con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó por 45 min a 100 voltios. Como referencia se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Lucigen).

**Tabla 1. Secuencias de los iniciadores que se utilizarán para la determinación de genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1*.** Se indica la secuencia de los iniciadores y el tamaño del producto amplificado correspondiente, así como la secuencia de los iniciadores *ABO* como control positivo de la reacción

<b>Gen</b>	<b>Secuencia de los iniciadores</b>	<b>Tamaño del producto amplificado</b>
<b><i>KIR3DL1</i></b>	Forward: 5'-AAGACACCCCCTACAGATACCATCT-3' Reverse: 5'-GCAGGCAGTGGGGACCTTAGACA-3'	277 pb
<b><i>KIR3DS1</i></b>	Forward: 5'-CAGCGCTGTGGTGCCTCGC-3' Reverse: 5'-CTGTGACCATGATCACCAT-3'	249 pb
<b><i>ABO</i></b>	ABO-516: 5'-GCTGGAGGTGCGCGCCTAC-3' ABO-926: 5'-ACGAATTCTACTTGTTTCAGGTGGCTCTCGTC-3'	419 pb

## 6. Análisis estadístico

Las frecuencias observadas (F) se determinaron a través de la relación entre el número de veces que se observó el gen *KIR3D* (*KIR3DL1* y *KIR3DS1*) y el número total de individuos estudiados (N).

$$F = \frac{n^{\circ} \text{ veces que se observa el gen } KIR3D}{N}$$

*N*

Las frecuencias génicas estimadas ( $f$ ) fueron calculadas usando la fórmula de Bernstein modificada. (Norman y col. 2001).

$$f = 1 - \sqrt{1 - F}$$

Donde  $F$  corresponde a la frecuencia de los portadores.

La significancia estadística de las diferencias de frecuencias entre los grupos (casos versus controles) fue estimada por la prueba de ji cuadrado ( $X^2$ ) Mantel-Haenszel usando tablas de contingencia 2x2. La fuerza de asociación fue determinada a través de los Odds Ratio (OR), que es una medida de asociación entre una exposición y un resultado. Estima cuantas veces ocurre la infección en los individuos portadores de un gen en particular, con respecto al grupo de individuos que no lo tienen. El OR se calculó de acuerdo con la fórmula de Woolf (Woolf, 1955) y para los casos que presentaron valores iguales a cero se aplicó la formula modificada por Haldane (Haldane, 1956).

Los valores de ( $p$ ) se corrigieron multiplicándolos por el número de comparaciones hechas (corrección de Bonferroni) (Svejgaard y Ryder, 1994) y se consideraron significativas cuando el valor de probabilidad ( $p$ ) era menor o igual a 0,05. Los análisis descriptivos se realizaron con el paquete estadístico SPSS, versión 20.0. (Nie y col., 2011).

## **RESULTADOS**

### **1. Descripción del grupo de pacientes**

Partiendo de una base de datos, del Laboratorio de Biología de Virus del Centro de Microbiología y Biología Celular del IVIC, de 400 casos sospechosos de infección por virus Chikungunya, solo fueron seleccionados 73 pacientes porque cumplieron con todos los criterios de inclusión, incluyendo el diagnóstico clínico y molecular de la infección por virus Chikungunya.

#### **Características biodemográficas de los pacientes**

De los 73 pacientes seleccionados, 41 eran hombres (56%) y 32 eran mujeres (44%). El promedio de edad fue de  $36,25 \pm 13,89$  años, siendo la edad mínima 18 años y la máxima 83 años. Al agrupar a los pacientes de acuerdo al lugar de nacimiento, la mayoría de los pacientes nacieron en el estado Miranda, seguido por la ciudad de Caracas (63,6 y 18,1%, respectivamente).

#### **Manifestaciones clínicas agudas en la infección por el virus Chikungunya.**

En la tabla 2 se muestra la frecuencia de los síntomas manifestados por los pacientes durante la fase aguda de la enfermedad. El síntoma más frecuente fue la fiebre (96.67%), seguido por escalofríos (88.68%), manifestaciones cutáneas (82.45), artralgia (86.20%), mialgia (76.785%), cefalea (76.36%) y artritis (56.25%). Es importante destacar, que ningún individuo requirió hospitalización.

**Tabla 2. Manifestaciones clínicas en la infección por el virus Chikungunya.**

<b>Síntomas</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>Fiebre (n= 60)</b>	96.67 (58)
<b>Artralgia (n = 58)</b>	86.20 (50)
<b>Artritis (n = 48)</b>	56.25 (27)
<b>Manifestaciones cutáneas (n = 57)</b>	82.45 (47)
<b>Mialgia (n = 56)</b>	76.78 (43)
<b>Cefalea (n = 55)</b>	76.36 (42)
<b>Escalofríos (n = 53)</b>	88.68 (47)
<b>Dolor de espalda (n = 54)</b>	51.85 (28)
<b>Náuseas y/o vómitos (n = 54)</b>	20.37 (11)
<b>Conjuntivitis (n = 48)</b>	2.08 (1)
<b>Hemorragias (n = 50)</b>	2 (1)

**Nota:** Las frecuencias se muestran en porcentajes. Los valores en paréntesis representan la frecuencia de individuos

## **Datos Paraclínicos de los pacientes**

Los datos paraclínicos como el hemograma son frecuentemente utilizados para dirigir manejo terapéutico en los individuos afectados. Considerándose normales los contajes absolutos de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y plaquetas entre 4.500 a 10.000, 3.000 a 6.000, 1.500 a 3.000 y 150.000 a 450.000 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente (Mckenzie, 2000). Solo en 39 de los pacientes se pudo obtener los resultados del contaje absoluto de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y plaquetas en la fase aguda de la infección (Tabla 3). La mayoría de los pacientes presentaron un contaje normal de leucocitos (95%), seguido por el contaje normal de plaquetas (67%) y neutrófilos (62%). Sin embargo, un 87% de los pacientes presentó linfopenia.

**Tabla 3. Contaje absoluto de neutrófilos, linfocitos, leucocitos y plaquetas en pacientes durante la infección por CHIKV.**

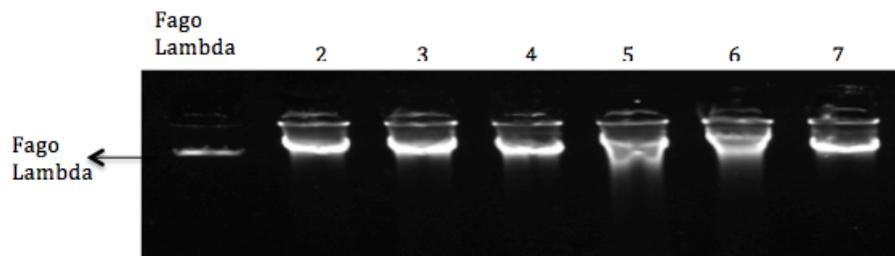
<b>Células/mm<sup>3</sup></b>	<b>Pacientes (n=39)</b>
<b>LEUCOCITOS</b>	
<b>Bajo (&lt;4.500)</b>	5,1 (2)
<b>Normales (4.500 -10.000)</b>	94,9 (37)
<b>Alto (&gt;10.000)</b>	0 (0)
<b>NEUTRÓFILOS</b>	
<b>Bajo (&lt;3.000)</b>	20,5 (8)
<b>-Normales (3.000-6.000)</b>	61,5 (24)
<b>Alto (&gt;6.000)</b>	17,9 (7)
<b>LINFOCITOS</b>	
<b>Bajo (&lt;1.500))</b>	87,2 (34)
<b>Normales (1.500-3.000)</b>	10,3 (4)
<b>Alto (&gt;3.000))</b>	2,6 (1)
<b>PLAQUETAS</b>	
<b>Bajo (&lt;150.000)</b>	33,3 (13)
<b>Normales (150.000-450.000)</b>	66,7 (26)
<b>Alto (&gt;450.000)</b>	0 (0)

**Nota:** Las frecuencias se muestran en porcentajes. Los valores en paréntesis representan frecuencias absolutas.

## Calidad del ADN

### Calidad del ADN genómico.

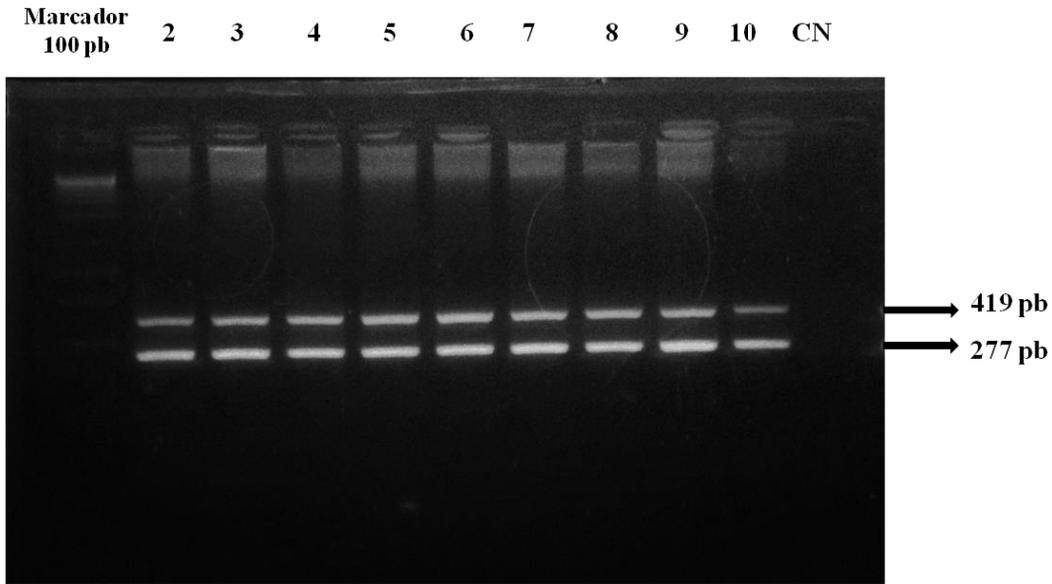
Luego ajustar la concentración de las muestras de ADN genómico a 200 µg/ml, se procedió a realizar su visualización en geles de agarosa al 0,75% en TBE 1X teñidos con bromuro de etidio, colorante utilizado para la detección de las bandas de ADN en el gel. Esto permitió confirmar si el ADN estaba ajustado a la concentración deseada al compararlo con un patrón ajustado a 200 µg/mL (Fago Lambda). Además, permitió evidenciar que el ADN genómico obtenido de las muestras de sangre periférica y almacenado por más de 3 años no estaba degradado (Figura 10).



**Figura 10. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X.** Observamos el ADN genómico (bolsillos 2 al 7) correspondientes a muestras de ADN de individuos incluidos en el estudio, así como el fago lambda ajustado a 200 µg/ml (marcador de referencia).

### Determinación del gen *KIR3DL1*

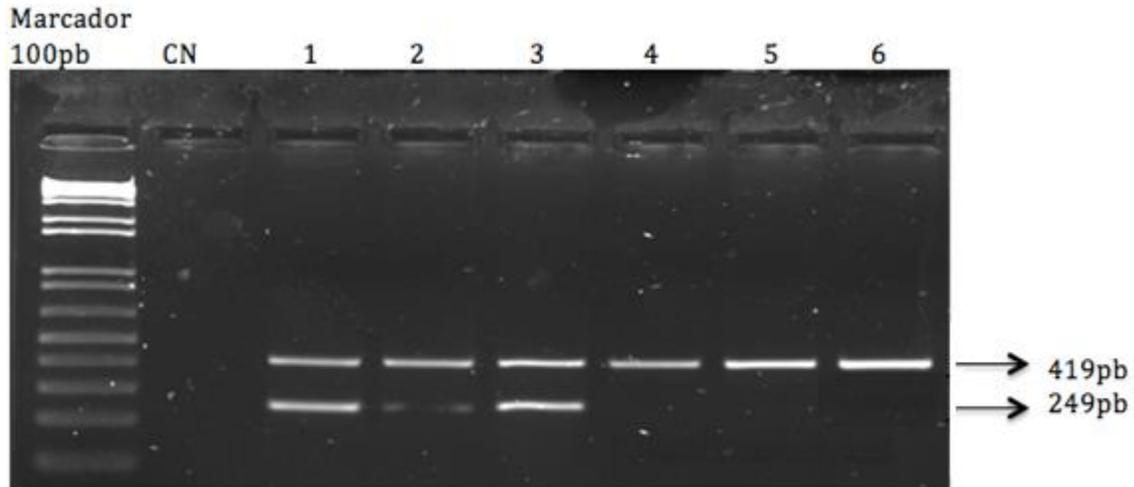
En la figura 11 se muestra el producto amplificado correspondiente al gen *KIR3DL1* (277 pb) y al control interno, gen *ABO* (419pb).



**Figura 11. Producto amplificado correspondiente al gen *KIR3DL1* visualizado en un gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio en buffer TE 1X:** Se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb (Lucigen) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los bolsillos del 2 al 10 corresponden a muestras de individuos que poseen el gen *KIR3DL1* (277 pb). En todos los bolsillos se observa presencia del control interno, *ABO* (419 pb). CN: control negativo

#### **Determinación del gen *KIR3DS1***

En la figura 12 se muestra el producto amplificado correspondiente al gen *KIR3DS1* (249 pb) y al control interno, gen *ABO* (419pb).



**Figura 12. Producto amplificado correspondiente al gen *KIR3DS1* visualizado en un gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio en buffer TE 1X:** Se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb (Lucigen) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los bolsillos del 1 al 3 corresponden a muestras de individuos que poseen el gen *KIR3DS1* (249 pb), los bolsillos 4 al 6 corresponden a muestras de individuos que no poseen el gen *KIR3DS1*. En todos los bolsillos se observa presencia del control interno, *ABO* (419 pb). Control negativo (CN)

### **Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DL1* en individuos con fiebre del Chikungunya.**

Al determinar la presencia del gen *KIR3DL1* observamos que el 96 % de los individuos con infección por virus CHIK presentaban el gen *KIR3DL1* y un 4% de los individuos no lo presentaban (Tabla 4).

**Tabla 4. Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DL1* en individuos con fiebre del Chikungunya.**

Gen <i>KIR3DL1</i>	Individuos con CHIKV
	n=(73)
<b>Presencia</b>	96 (70)
<b>Ausencia</b>	4 (3)

**NOTA.** Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del gen. La frecuencia está expresada en porcentaje.

**Presencia:** individuos con el gen *KIR3DL1*, **Ausencia:** individuos sin el gen *KIR3DL1*.

**Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DS1* en individuos con fiebre del Chikungunya**

Al determinar la presencia del gen *KIR3DS1* observamos que el 40 % de los individuos con infección por virus CHIK presentaban el gen *KIR3DS1* y un 60% de los individuos no lo presentaban (Tabla 5).

**Tabla 5. Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DS1* en individuos con fiebre del Chikungunya.**

Gen <i>KIR3DS1</i>	Individuos con CHIKV
	n=(73)
<b>Presencia</b>	40 (29)
<b>Ausencia</b>	60 (44)

**NOTA.** Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del gen. La frecuencia está expresada en porcentaje.

**Presencia:** individuos con el gen *KIR3DL1*, **Ausencia:** individuos sin el gen *KIR3DL1*.

### **Frecuencias génicas de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* en individuos con fiebre del Chikungunya.**

Al calcular la frecuencia génica de *KIR3DL1* y *KIR3DS1* en los pacientes, se observó que el gen *KIR3DL1* presentaba una frecuencia de 0,8, mientras que el gen *KIR3DS1* presentaba una frecuencia de 0.224 (Tabla 6).

**Tabla 6. Frecuencias génicas de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* en individuos con fiebre del Chikungunya.**

<b>Gen</b>	<b>Frecuencia génica</b>
<i>KIR3DL1</i>	0,8
<i>KIR3DS1</i>	0,224

### **Distribución de la frecuencia de las combinaciones *KIR3DL1/KIR3DS1* en individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos (controles)**

Al determinar la presencia de las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* observamos que el 60% de los individuos infectados con CHIKV presentaban la

combinación génica ***KIR3DL1* Presente/*KIR3DS1* Ausente**, seguida por las combinaciones ***KIR3DL1* Presente/*KIR3DS1* Presente** (36%) y ***KIR3DL1* Ausente/*KIR3DS1* Presente** (4%). La combinación ***KIR3DL1* Ausente/*KIR3DS1* Ausente** no se observó en los pacientes (Tabla 7). Con respecto a los individuos sanos (controles) se observó que la combinación ***KIR3DL1* Presente / *KIR3DS1* Ausente** presentaba la mayor frecuencia (56%), seguida por las combinaciones ***KIR3DL1* Presente / *KIR3DS1* Presente** (34%), ***KIR3DL1* Ausente / *KIR3DS1* Presente** (9%) y ***KIR3DL1* Ausente / *KIR3DS1* Ausente** (1%) (Tabla 7)

**Tabla 7. Distribución de las frecuencias de las combinaciones *KIR3DL1*/*KIR3DS1* en individuos con fiebre del Chikungunya y población control.**

<b>Combinación génica <i>KIR3DL1</i>/<i>KIR3DS1</i></b>	<b>Pacientes con CHIKV (n=73)</b>	<b>Controles (n=205)</b>
<b><i>KIR3DL1</i> Presente /<i>KIR3DS1</i> Presente</b>	36 (26)	34 (70)
<b><i>KIR3DL1</i> Presente / <i>KIR3DS1</i> Ausente</b>	60 (44)	56 (114)
<b><i>KIR3DL1</i> Ausente / <i>KIR3DS1</i> Presente</b>	4 (3)	9 (19)
<b><i>KIR3DL1</i> Ausente / <i>KIR3DS1</i> Ausente</b>	0	1 (2)

**NOTA.** Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores de la combinación génica. La frecuencia está expresada en porcentaje.

**Comparación de la frecuencia del gen *KIR3DL1* entre individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos.**

Al comparar la frecuencia del gen *KIR3DL1* entre los individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos se observó una frecuencia ligeramente incrementada del gen *KIR3DL1* en los pacientes con respecto a los controles (96% vs. 89.76%, respectivamente, OR= 2.66; IC 95%= 0.77-9.21; p=0.055). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 8).

**Tabla 8. Comparación de la frecuencia del gen *KIR3DL1* entre individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos.**

<i>KIR3DL1</i>	Pacientes con CHIKV (n=73)	Controles (n=205)	OR (IC 95%)	p
<b><i>KIR3DL1</i> Presente</b>	70	184	2.66 (0.77-9.21)	0.055

OR: Odds Ratios; IC: intervalo de confianza; p: probabilidad; p significativo <0.05

**Comparación de la frecuencia del gen *KIR3DS1* entre individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos.**

Al comparar la frecuencia del gen *KIR3DS1* entre los individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos no se observó una diferencia significativa en la frecuencia

de este gen entre estos individuos (40% vs. 43.42%, respectivamente, OR= 0.86; IC 95%= 0.49-1.48; p=0.29) (Tabla 9).

**Tabla 9. Comparación de la frecuencia del gen *KIR3DS1* entre individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos.**

<i>KIR3DS1</i>	Pacientes con CHIKV (n=73)	Controles (n=205)	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<i>KIR3DS1</i> Presente	29	89	0.86 (0.49-1.48)	0.29

OR: Odds Ratios; IC: intervalo de confianza; p: probabilidad; *p* significativo <0.05

**Comparación de las frecuencias de las combinaciones *KIR3DL1/KIR3DS1* entre individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos.**

Al comparar la frecuencia de las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* entre individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de estas combinaciones entre estos individuos (Tabla 10).

**Tabla 10. Comparación de la frecuencia de las combinaciones *KIR3DL1/KIR3DS1* entre individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos.**

	<b>Pacientes con CHIKV (n=73)</b>	<b>Controles (n=205)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>P</b>
<b><i>KIR3DL1</i> Presente / <i>KIR3DS1</i> Presente</b>	26	70	1,1	0,41
<b><i>KIR3DL1</i> Presente / <i>KIR3DS1</i> Ausente</b>	44	114	1,2	0,245
<b><i>KIR3DL1</i> Ausente / <i>KIR3DS1</i> Presente</b>	3	19	0,5	0,081
<b><i>KIR3DL1</i> Ausente / <i>KIR3DS1</i> Ausente</b>	0	2	0,5	0,317

OR: Odds Ratios; IC: intervalo de confianza; p: probabilidad; *p* significativo <0.05.

**Comparación de la frecuencia de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* entre los pacientes clasificados de acuerdo a las manifestaciones clínicas y paraclínicas.**

Al comparar la frecuencia de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* con las características clínicas y paraclínicas manifestada por los pacientes, no se observaron diferencias significativas. En la tabla 11 se muestran las comparaciones entre los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* y las características clínicas y paraclínicas más resaltantes en la infección por el virus del chikungunya, tales como la poliartralgia, poliartritis, conteo de plaquetas y leucocitos.

**Tabla 11. Comparación de la frecuencia de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* entre pacientes clasificados de acuerdo a las manifestaciones clínicas y paraclínicas más relevantes de la infección por CHIKV.**

<b>Gen</b>	<b>Poliartralgias</b>	<b>Poliartritis</b>	<b>Plaquetas</b>	<b>Leucocitos</b>
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>P</i>	<i>p</i>
<i>KIR3DL1</i>	0,743	0,503	0,792	0,293
<i>KIR3DS1</i>	0,613	0,832	0,556	0,073

Nota: Se indican los valores de probabilidad (*p*), *p* significativo <0.05.

**Comparación de la frecuencia de las combinaciones de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* entre los pacientes clasificados de acuerdo a las manifestaciones clínicas y paraclínicas.**

Al comparar la frecuencia de las diferentes combinaciones de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* con las características clínicas y paraclínicas manifestada por los pacientes, no se observaron diferencias significativas. En la tabla 12 se muestran las comparaciones entre las combinaciones de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* y las características clínicas y paraclínicas más resaltantes en la infección por el virus del chikungunya, tales como la poliartralgia, poliartritis, conteo de plaquetas y leucocitos.

**Tabla 12. Comparación de la frecuencia de las combinaciones de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* entre pacientes clasificados de acuerdo a las manifestaciones clínicas y paraclínicas más relevantes de la infección por CHIKV.**

	<b>Poliartralgias</b>	<b>Poliartritis</b>	<b>Plaquetas</b>	<b>Leucocitos</b>
	<i>p</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>p</i>
<b><i>KIR3DL1 Presente/KIR3DS1 Presente</i></b>	0,867	0,615	0,841	0,077
<b><i>KIR3DL1 Presente/KIR3DS1 Ausente</i></b>	0,656	0,956	0,729	0,84
<b><i>KIR3DL1 Ausente/KIR3DS1 Presente</i></b>	1	0,511	0,792	0,293
<b><i>KIR3DL1 Ausente/KIR3DS1 Ausente</i></b>	1	1	1	1

Nota: Se indican los valores de probabilidad (*p*), *p* significativo <0.05.

## DISCUSIÓN

La fiebre de Chikungunya es una enfermedad arboviral causada por el virus Chikungunya (CHIK), el cual es transmitido por mosquitos del género *Aedes* (Schwartz y Albert, 2010). Hasta el año 2005, la infección por CHIKV fue endémica en África, Asia y la India. Sin embargo, en 2007 se notificó, por primera vez, la transmisión de la enfermedad en un brote autóctono en el noreste de Italia, así como casos esporádicos autóctonos en diferentes países de Europa, por ejemplo en Francia (año 2010). Posteriormente, en diciembre de 2013, Francia confirmó casos autóctonos de CHIK en la isla caribeña de Saint Martín y desde entonces, la transmisión local se ha confirmado en más de 43 países y territorios en la Región de las Américas. Para esas fechas, Venezuela tenía una población inmunológicamente virgen para el CHIKV, así como la ecología favorable para establecer un ciclo de transmisión local, y en junio de 2014, las autoridades de salud de Venezuela notificaron los primeros casos de CHIK, alegando que eran casos importados de República Dominicana o Haití (Camacho y col., 2017).

Es bien sabido que la primera línea de defensa del hospedero contra la infección de patógenos es la respuesta inmunitaria innata, debido a que la respuesta inmunitaria adaptativa requiere más de una semana para desarrollarse. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria innata sería crucial en la defensa contra la infección por CHIKV. La vía de IFN de tipo I es una vía antiviral innata vital y se ha documentado que la infección por CHIKV provoca la respuesta de IFN de tipo I, junto con la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias (Revisado en Lum y Ng, 2015). Las células citotóxicas naturales (NK), que juegan un papel central en el control de infecciones virales, son activadas en respuesta a los interferones tipo I (IFN) y han sido identificadas como componentes importantes de la

respuesta inmunitaria innata contra patógenos. La contribución de las células NK en la respuesta inmunitaria antiviral ha sido ampliamente estudiada en modelos murinos de infecciones virales, demostrando que las células NK no solo contienen la replicación viral al lisar las células infectadas durante las primeras etapas de infección, antes de desarrollarse la respuesta inmunitaria adaptativa, sino que también juegan un papel inmuno-regulador crítico durante el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa (Revisado en: Jost y Marcus, 2013). La actividad de las células NK está finamente regulada por un grupo de receptores activadores e inhibidores, cuyo balance final, luego de interactuar con su ligando específico, favorecerá o no a la activación de la célula frente a la célula blanco (Lanier, 2008). Entre estos receptores, están los que pertenecen a la familia KIR (Receptores de muerte tipo inmunoglobulina). Los KIR proporcionan señales activadoras o inhibitoras que regulan la activación de las células NK y T, jugando un papel importante en la inmunidad contra microorganismos. Estudios de ratones infectados con CHIKV han demostrado la presencia, significativamente incrementada, de células NK en las articulaciones inflamadas, así como concentraciones incrementadas de IL-12, la cual estimula la actividad de las células NK (Revisado en: Lum y Ng, 2015), sugiriendo que las células NK juegan un papel importante durante la infección por CHIKV. Fundamentados en que las funciones de las células NK están finamente controladas por el balance de receptores inhibidores y activadores, en la presente investigación se determinó el posible impacto de los genes de receptores *KIR3D* en la infección por el virus Chikungunya.

### **Manifestaciones clínicas**

La infección por Chikungunya, generalmente, se describe como una enfermedad febril de inicio súbito, frecuentemente acompañada de dolor de cabeza, mialgia, erupción y la característica artralgia, la cual le dio el nombre a esta infección. Chikungunya significa,

en el idioma de los habitantes de la meseta de Makonde de Tanzania, “aquel que se encorva” y describe la apariencia inclinada de las personas que padecen la característica y la dolorosa artralgia. Otras manifestaciones clínicas observadas en la infección por Chikungunya, pero que son menos frecuentes, son: náuseas, vómitos y síntomas hemorrágicos, como epistaxis o sangrado de las encías. (Revisado en: Renault y col. 2007). Asimismo, se han descrito casos con manifestaciones crónicas, siendo la artritis la principal manifestación clínica, y casos atípicos (alrededor del 0.3% de los casos) con manifestaciones clínicas específicas (*Ministerio de salud pública de República Dominicana, 2014*).

En el presente estudio, observamos que las principales manifestaciones clínicas presentadas por los individuos infectados por el virus CHIK, fueron: fiebre (96.67%), escalofríos (88.68%), artralgia (86.20%), mialgia (76.785%), cefalea (76.36%) y artritis (56.25%).

En la Tabla 11, se muestra el rango de frecuencia de los síntomas de infección aguda por CHIKV, frecuencias que fueron compiladas a partir de diversos estudios. (*Organización Panamericana de la Salud, 2011*). Al comparar las frecuencias de los síntomas de los individuos infectados por el virus CHIK incluidos en este estudio con los rangos de frecuencias notificados por OPS/OMS/CDC, se observó que las frecuencias de estas manifestaciones clínicas estaban dentro del rango o  $\pm 5\%$  por encima o debajo del mismo (Tabla 13). Sin embargo, cabe destacar que la frecuencia de poliartritis fue mayor en los pacientes venezolanos (56%) con respecto al rango de frecuencia descrito por la OPS/OMS/CDC (12-32%).

**Tabla 13. Frecuencia de los síntomas de infección aguda por CHIKV**

<b>Síntomas</b>	<b>Rango de frecuencia (% de pacientes)*</b>	<b>Frecuencia (% de pacientes incluidos en este estudio)</b>
<b>Fiebre</b>	76-100	97
<b>Poliartralgia</b>	71-100	86
<b>Poliartritis</b>	12-32	<b>56</b>
<b>Manifestaciones cutáneas</b>	28-77	82
<b>Mialgias</b>	46-72	77
<b>Cefalea</b>	17-74	76
<b>Dolor de espalda</b>	34-50	52
<b>Conjuntivitis</b>	3-56	2

Los resultados ratifican que la fiebre es la manifestación clínica más frecuente de la infección por el virus CHIK (Queyriaux y col. 2007, Simon y col. 2011, Nkoghe y col. 2012, Elsinga y col. 2017), sin embargo, este síntoma es observado en diferentes procesos infecciosos, como el dengue. No obstante, la artralgia (dolor de las articulaciones), artritis (inflamación de las articulaciones de los huesos) y la baja frecuencia o ausencia de hemorragias, son manifestaciones típicas de la infección por el virus CHIK, diferenciándola clínicamente del dengue (Tabla 14). Cabe destacar, que si bien en los pacientes incluidos en

este estudio la poliartritis presentó una mayor frecuencia con respecto a lo descrito a la literatura, la inflamación y dolor de las articulaciones periféricas es una manifestación clínica frecuente en los individuos infectados con el virus CHIK, afectando principalmente, las articulaciones interfalángicas, muñecas y tobillos. (Revisado en: Simon y col. 2011). La tenosinovitis no fue registrada en la encuesta clínica utilizada por el Servicio Médico del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

**Tabla 14. Principales diferencias clínicas entre Chikungunya y Dengue (Simon y col. 2011).**

<b>Síntomas</b>	<b>Chikungunya</b>	<b>Dengue</b>
<b>Fiebre</b>	Común	Común
<b>Erupción cutánea</b>	Día 1 al 4	Día 5 al 7
<b>Dolor retro-orbital</b>	Raro	Común
<b>Artralgia</b>	Constante	Raro
<b>Artritis</b>	Común	Ausente
<b>Mialgia</b>	Común	Común
<b>Hemorragias</b>	Raro	Común, Día 5 al 7
<b>Tenosinovitis</b>	Común	Ausente

Finalmente, ningún paciente incluido en el presente estudio manifestó complicaciones atípicas, tales como convulsiones, meningoencefalitis y síndrome Guillain-Barré, y tampoco requirieron hospitalización. Es importante resaltar, que la patogenicidad

varía con los aislado del virus CHIK, como fue recientemente demostrado por Teo y colaboradores (Teo y col., 2015). Este estudio proporcionó evidencia de que el aislado del Caribe posee una replicación debilitada e induce una respuesta patogénica disminuida en el hospedero mamífero. (Teo y col., 2015). Recientemente, el análisis filogenético del virus CHIK circulante en Venezuela, demostró que éste pertenece al genotipo asiático, representando un nuevo clado: el clado del Caribe. Este clado incluye las cepas circulantes en Trinidad y Tobago, Guyana, USA, El Salvador, Haití, Panamá, Brasil, República Dominicana, Guatemala, Jamaica, México, Islas Vírgenes Británicas (Camacho y col. 2017). Apoyando estos hallazgos que la cepa del genotipo Asiático fue introducida en el Caribe y se movilizó a lo largo de la región de los países de América, como lo notificó Trinidad y Tobago, México, Nicaragua, Colombia y Venezuela. (Camacho y col. 2017).

### **Datos Paraclínicos**

De los 39 pacientes con información relacionada con datos paraclínicos, se observó que un 87% de ellos presentaron linfopenia y un 33% trombocitopenia. Resultados comparables con lo descrito en la literatura. En la infección por el virus Chikungunya se ha descrito que entre un 10% y 40% de los casos desarrollan trombocitopenia y entre un 70% al 100% linfopenia (Petitdemange y col., 2015). Por lo tanto, el conteo de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y plaquetas, permite establecer un diagnóstico diferencial entre la fiebre por el CHIKV y la fiebre por el virus del dengue (DV) (Tabla 15).

**Tabla 15. Manifestaciones paraclínicas para el diagnóstico diferencial de la fiebre por CHIKV y DF (Tomado de: Organización Panamericana de la Salud, 2011.).**

	<b>Fiebre CHIKV</b>	<b>Fiebre Dengue</b>
<b>Leucopenia</b>	++	+++
<b>Linfopenia</b>	+++	++
<b>Neutropenia</b>	+	+++
<b>Trombocitopenia</b>	+	+++

A mayor número de cruces (+) mayor severidad

Es importante resaltar, que la linfopenia no es un efecto directo del virus, ya que no infecta linfocitos T y B, sin embargo, el IFN tipo I puede inducir la muerte de linfocitos, como ocurre en otras infecciones (Tomado de: Schwartz y Albert, 2010). Por otra parte, las infecciones virales se han asociado con conteos de plaquetas reducidos. Esa disminución en el conteo de plaquetas ha sido atribuida al receptor tipo toll 7 (TLR7) expresado en plaquetas. La estimulación plaquetaria vía TLR7 media la formación de grandes agregados de plaquetas y neutrófilos, tanto en sangre de ratón como humana. Este proceso da como resultado la internalización de las plaquetas por neutrófilos, reduciendo así su conteo (Koupenova y col. 2014.)

#### **Genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* en la infección con el virus Chikungunya**

Al determinar la presencia del gen *KIR3DL1* observamos que el 96 % de los individuos con infección por virus CHIK presentaban el gen *KIR3DL1* y un 4% de los

individuos no lo presentaban. Sin embargo, al comparar la frecuencia del gen *KIR3DL1* observada en los individuos con fiebre del Chikungunya con la de los individuos sanos, se encontró una frecuencia levemente incrementada del gen *KIR3DL1* en los pacientes con respecto a los controles (96% vs. 89.76%, respectivamente, OR= 2.66; IC 95%= 0.77-9.21; p=0.055), si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa, sugiere que su presencia incrementa la susceptibilidad a sufrir la infección por el virus CHIK. Por otra parte, la frecuencia génica de *KIR3DL1* en los pacientes fue de 0.80 versus 0.69 en los controles. Estos resultados concuerdan con los descritos por Petitdemange y col. (2014), al observar en los pacientes infectados con el CHIKV una frecuencia incrementada del receptor *KIR2DL1* y una frecuencia disminuida de *KIR2DS5* (Petitdemange y col. 2014)

*KIR3DL1* es uno de los genes más polimórfico de la familia KIR. El dominio citoplasmático de *KIR3DL1* posee dos motivos ITIM (I/VxYxxL) que median su función inhibitoria. Al ocurrir el engranaje del receptor con su ligando (HLA-A y alotipos HLA-B que expresan el epítipo Bw4) resulta en la fosforilación de los motivos ITIM, por quinasas de la familia Src, y el subsiguiente reclutamiento de proteínas tirosina fosfatasas (SHP-1 y SHP-2). Esas fosfatasas inhiben la actividad de la célula NK por la de-fosforilación de sustratos claves, incluyendo Vav-1, ZAP70, PLC- $\gamma$  y LAT. Por lo tanto, la actividad disminuida de las células NK, mediada por el engranaje del receptor *KIR3DL1* con su ligando, facilitaría la infección por el virus CHIK, debido a que la citotoxicidad celular y la producción de citoquinas mediada por las células NK es inhibida. En consecuencia, la pérdida de esta señal inhibitoria, a través de la ausencia o alteración de la expresión de su ligando HLA-clase I durante la infección viral, guiaría a la activación de las células NK que dependen del compromiso de *KIR3DL1* para evitar su activación. Como consecuencia,

la lisis mediada por las células NK eliminaría las células infectadas y la producción, por parte de las células NK, de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo el IFN- $\gamma$ , ensamblaría la subsiguiente respuesta inmunitaria (revisado en: O'Connor y McVicar, 2013) Asimismo, el locus *KIR3DL1* es único al codificar ambos tipos de receptores: KIR3DL1 y KIR3DS1. *KIR3DS1* es un alelo del locus *KIR3DL1* y se ha encontrado con alta frecuencia en muchas poblaciones. Sin embargo, la proteína KIR3DS1 se caracteriza por poseer una cola citoplasmática truncada y un residuo lisina en la región transmembrana que facilita su asociación con proteínas adaptadoras activadoras (DAP12). A pesar del notable grado de conservación en el dominio de unión al ligando en ambos receptores (KIR3DL1/KIR3DS1) KIR3DS1 no interactúa con HLA-Bw4. En el presente estudio se observó que el gen *KIR3DS1* estaba presente en un 40 % de los individuos con infección por virus CHIK, sin embargo, al comparar esta frecuencia con la descrita en individuos sanos no se observó una diferencia significativa (40% vs. 43.42%, respectivamente, OR= 0.86; IC 95%= 0.49-1.48; p=0.29), sugiriendo que posiblemente otros receptores KIR activadores pudiesen estar disminuidos, favoreciendo así las señales mediadas por los receptores KIR inhibidores, como lo descrito por Petitdemange y col. (2014), quienes describieron una frecuencia disminuida de KIR2DS5 en los pacientes infectados con el CHIKV.

Estos resultados ratifican que la actividad de las células NK está finamente regulada por un grupo de receptores activadores e inhibidores, cuyo balance final, luego de interaccionar con su ligando específico, favorecerá o no a la activación de la célula frente a la célula blanco (Lanier, 2008). En virtud de ello, sería relevante incrementar el número de individuos con fiebre de Chikungunya, estudiar el perfil KIR, es decir los 15 genes KIR (*KIR2DL1*, *KIR2DL2/L3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*,

*KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1/S1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* y dos pseudogenes: *KIR2DP1* y *KIR3DP1*) para establecer los haplotipos característicos en estos pacientes, y finalmente, estudiar la variabilidad de estos genes. Por ejemplo, el gen *KIR3DL1* es altamente polimórfico, variabilidad que se ha sugerido influye en la función de este receptor, así como en la modulación de la cantidad de receptor expresado en la superficie celular (Revisado en: O'Connor y McVicar, 2013).

### **Combinaciones *KIR3DL1/KIR3DS1* entre individuos con fiebre del Chikungunya e individuos sanos.**

Al determinar la presencia de las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* se observó en los individuos infectados con CHIKV tres de las cuatro combinaciones génicas posibles, en contraste al grupo control, donde se observó las cuatro combinaciones. Sin embargo, al comparar la frecuencia de las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* entre ambos grupos no se observaron diferencias significativas, corrobora la importancia de estudiar los 15 genes KIR para establecer los haplotipos característicos en estos pacientes, así como también determinar la variabilidad de los ligandos de estos receptores, es decir la variabilidad de los genes HLA clase I.

### **Comparación de la frecuencia de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* entre pacientes clasificados de acuerdo a las manifestaciones clínicas y paraclínicas.**

Al establecer comparaciones de frecuencia de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* y sus combinaciones entre pacientes clasificados de acuerdo a las manifestaciones clínicas y paraclínicas no se observaron diferencias significativas, indicando que otros componentes celulares, como monocitos/macrófagos y linfocitos CD4 juegan un papel patogénico en la

infección con el virus CHIK. Por ejemplo, los linfocitos T CD4+ se han encontrado en líquido sinovial de pacientes con enfermedad crónica (Caglioti y col., 2013). Además, la activación de linfocitos, en el microambiente óseo, podría conllevar a la expresión de la proteína RANKL en la membrana plasmática, que al auto-escindir-se se une a su receptor específico RANKR, que se expresa en los osteoclastos, activando así la osteoclastogénesis y con ello la reabsorción o pérdida de la densidad ósea (Revisado en: Yavropoulou y Yovos, 2008). Por otra parte, la importancia de los monocitos/macrófagos en dirigir la patología inducida por CHIKV ha sido evidenciado en ratones depletados de macrófagos, en estos ratones la patología asociada con la infección es mejorada, sugiriendo el papel crítico de los macrófagos en dirigir la patología. Asimismo, se ha sugerido que los monocitos / macrófagos son el vehículo celular para la diseminación del virus, además, de ser un reservorio celular para la infección persistente por CHIKV (Revisado en: Lum y Ng, 2015).

Los resultados obtenidos sugieren que un desequilibrio entre los genes KIR activadores e inhibidores podría influir en la patogénesis de la infección por virus CHIK, ya que la sobre-activación de las células NK o la pérdida de la inhibición de las células efectoras (NK/células T), podría conllevar al desarrollo de las complicaciones clínicas crónicas, mientras que la inhibición de las funciones de las células NK (citotóxicas y reguladoras, como es la producción de citoquinas) favorecería la infección viral.

Por lo tanto, es recomendable:

1. Incrementar el número de individuos con fiebre de Chikungunya para estudiar el perfil KIR y establecer los haplotipos característicos en estos pacientes.

2. Determinar la variabilidad alélica de los genes *KIR*, ya que la misma puede modular la función de los receptores *KIR*.

3. Determinar la variabilidad de los ligandos de estos receptores, es decir la variabilidad de los genes HLA clase I, ya que la ausencia o alteración de la expresión de las moléculas HLA-clase I afectaría la activación de las células NK.

Todo esto, para corroborar o no si los haplotipos de genes *KIR*, las variaciones alélicas de estos genes y sobre todo las combinaciones *KIR*-ligando específico, pueden estar jugando un papel importante en la susceptibilidad a la infección por el virus Chikungunya.

## CONCLUSIONES

1. Las manifestaciones clínicas y paraclínicas observadas en el brote de Chikungunya en Venezuela son similares a las descritas en otros países.
2. La frecuencia levemente incrementada del gen *KIR3DL1* en los individuos con fiebre del Chikungunya, si bien no fue estadísticamente significativa, sugiere que su presencia incrementa la susceptibilidad a sufrir la infección por el virus CHIK.
3. El gen *KIR3DS1* y las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* no están asociadas con susceptibilidad a la infección por el virus Chikungunya.
4. Los genes *KIR3DL1*, *KIR3DS1* y las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* no están asociados con las manifestaciones clínicas y paraclínicas causadas por la infección por el virus Chikungunya, en la población estudiada.
5. La fiebre Chikungunya es una enfermedad multifactorial que involucra un agente etiológico, factores genéticos del hospedero y del virus, así como una desregulación de la respuesta inmunitaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bashirova, A., Martin, M., McVicar, D., Carrington, M. 2006. The Killer Immunoglobulin-Like Receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu. Rev. Genom. Hum. G.* **7**:277-300.
- Bunce, M. 2000. Histocompatibility testing. Lidwell and Navarrette C. Imperial College Press, London.
- Caglioti C., Lalle E., Castilletti C., Carletti F., Capobianchi M., Bordi L. 2013. Chikungunya virus infection: an overview. *New Microbiol.* **36**: 211- 227.
- Camacho D., Reyes J., Negrodo A., Hernández L., Sánchez-Seco M., Comach G. 2017. Asian genotype of Chikungunya virus circulating in Venezuela during 2014. *Acta Trop.* **174**: 88-90
- Campbell, K.S., Purdy, A.K. 2011. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology.* **132**: 315–325.
- Carrington, M., Norman P., Williams, A., Bateman, A. Khakoo, S. 2005. The KIR gene cluster. KIR and their role in disease. *Mol. Interv.* **5**: 226-240.
- Conesa A., Fernández-Mestre M., Padrón D., Toro F., Silva N., Tassinari P., Blanca I. y col. 2010. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the mestizo population from Venezuela. *Tissue Antigens.* **75**: 724- 729.
- Dupuis-Maguiraga L., Noret M., Brun S., Le Grand R., Gras G., Roques P. 2012. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**: e1446.

- Elsinga J., Gerstenbluth I., van der Ploeg S., Halabi Y., Lourents N., Burgerhof J., van der Veen H. y col. 2017. Long-term Chikungunya Sequelae in Curaçao: Burden, Determinants, and a Novel Classification Tool. *J. Infect. Dis.* **216(5)**: 573-581.
- Gardier, C. 2007. Killer cell immunoglobulin-like receptor on NK cells: The how, where and why. *Int. J. Immunogenet.* **35**:1-8.
- Haldane J. 1956. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann. Hum. Genet.* **20**: 309-311
- Hallet, W. and Murphy, W. 2008. Positive and negative regulation of natural killer cells: Therapeutic implications. *Semin. Cancer Biol.* **16**:367-382.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=kir3dl1> consultado 28 de Abril 2018.
- Jobim, M., Jobim, L.F. 2008. Natural killer cells and immune surveillance. *J. Pediatr. (Rio J)*. **84 (4)**: 58-65.
- Jost S. y Altfeld M. 2013. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* **31**: 163- 194.
- Kam Y., Ong E., Rénia., Tong J., Ng L. 2009. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. *Microbes Infect.* **11**: 1186- 1196.
- Koupenova M., Vitseva O., MacKay C., Beaulieu L., Benjamin E., Mick E., Kurt-Jones E., Ravid K, Freedman, J. 2014. Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. *Blood* **124(5)**: 791-802.
- Landaeta, M. 2010. Comprendiendo la inmunopatogenia de las artropatías seronegativas. *Hospital Clinic Universidad de Chile.* **26(2)**:168-180.
- Lannier, L. 2005. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**: 225- 274.

- Lanier, L. 2008. Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition. *Nature Immunology*. **9**:503-510.
- Lum F., Ng L. 2015. Cellular and molecular mechanisms of Chikungunya pathogenesis. *Antiviral Research*. **120**: 165-174.
- Martin, M., Gao, X., Lee, J., Nelson G., Detels R., Buchbinder S., Hoots K. y col. 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* **31**: 429–434.
- McKenzie S. 2000. Hematología Clínica. Manual Moderno. Segunda edición. DF. Mexico.
- Messaoudi, I., Vomasse, J., Totonchy, T., Kreklywich, C.N., Habberthur, K., Springgay, L., Brien, J.D. y col. 2013. Chikungunya virus infection results in higher and persistent viral replication in aged rhesus macaques due to defects in anti-viral immunity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7 (7)**: e2343.
- Ministerio de salud pública de Republica Dominicana. Guía de manejo clínico para la infección por el virus chikungunya (CHIKV).[en línea]. 2014 [citado el 1 de mayo del 2018];[8 vistas]. Disponible en: URL: [http://www1.paho.org/dor/images/stories/archivos/chikungunya/guia\\_chikv2.pdf?ua=1](http://www1.paho.org/dor/images/stories/archivos/chikungunya/guia_chikv2.pdf?ua=1)
- Mullis K., Faloona F. 1987. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*. **155**: 335-350.
- Newman, K., Riley, E. 2007. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 279- 291.
- Ng L., Chow A., Sun Y., Kwek D., Lim P., Dimatatac F., Ng L. C. y col. 2009. IL-1 $\beta$ , IL-6 and RANTES as Biomarkers of Chikungunya. *PLoS One*. **4(1)**: e4261.
- Nie N, Hull H, Bent D. 2011. SPSS. Chicago: IBM.

- Nkoghe D., Kassa R., Caron M., Grard G., Mombo I., Bikié B., Paupy C. y col. 2012. Clinical forms of Chikungunya in Gabon, 2010. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**: e1517.
- Norma P., Stephens H., Verity D., Chancanayingyong D., Vaughan R. 2001. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics*. **52**: 195-205.
- O'Connor G., McVicar D. 2013. The Yin-Yang of KIR3DL1/S1: Molecular Mechanisms and Cellular Function. *Crit Rev Immunol.* **33(3)**: 203-218.
- Olsson, M.L. 1998. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion*, **38(2)**:168-73.
- Organización Panamericana de la Salud. 2011. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en las Américas. Washington, D. C.
- Parham, P. 2005. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 201-214.
- Petitdemange C., Becquart P., Wauquier N., Béziat V., Debré P., Leroy E., Vieillard V. 2011. Unconventional Repertoire Profile Is Imprinted during Acute Chikungunya Infection for Natural Killer Cells Polarization toward Cytotoxicity. *PLoS Pathog.* **7**: 1-13.
- Petitdemange C., Wauquier N., Jacquet J., Theodorou I., Leroy E., Vieillard V. 2014. Association of HLA Class-I and Inhibitory KIR Genotypes in Gabonese Patients Infected by Chikungunya or Dengue Type-2 Viruses. *PLoS One.* **10**: 1-8.
- Petitdemange C., Waiquier N., Vieillard V. 2015. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. *J Allergy Clin Immunol.* **135(4)**: 846-55.

- Petitdemange C., Wauquier N., Devilliers H., Yssel H., Mombo I., Caroon M., Nkoghé D. y Col. 2016. Longitudinal Analysis of Natural Killer Cells in Dengue Virus- Infected Patients in Comparison to Chikungunya and Chikungunya/Dengue Virus-Infected Patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**: 1- 17.
- Promed mail. CHIKUNGUNYA AND DENGUE – FRANCE (2): RISK. 2010. Citado el 19 de noviembre de 2017. En línea en: <http://www.promedmail.org/post/20100731.2564>.
- Queyriaux B., Simon F., Grandadam M., Michel R., Tolou H., Boutin J. 2007 Clinical burden of Chikungunya virus infection. *Lancet Infect. Dis.* **8(1)**:2-3.
- Renault P., Solet J., Sissoko D., Balleydier E., Larrieu S., Filleul L., Lassalle C. y col. 2007. A Mayot Epidemic of Chikungunya Virus Infection on Réunion Island, France, 2005- 2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77(4)**: 727- 731.
- Roques P., Nq L., Sam I., Higgs S. 2015. Chikungunya: international focus issue. *Vector-Borne Zoonot.* **15**: 221- 222.
- Schwartz O., Albert M. 2010 Biology and pathogenesis of Chikungunya virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:491-500.
- Shyamala, V., Ames, G. 1993. Genome walking by single specific primer-polymerase chain reaction. *Method Enzymol.* **217**: 436-446).
- Simon F., Javalle E., Oliver M., Leparac-Goffart I., Marimoutou C. 2011. Chikungunya virus infection. *Curr Infect Dis Rep.* **13**: 218-228
- Svejgaard A., Ryder L. 1994. HLA and Disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens.* **43**: 18-27.

- Teng T., Kam Y., Lee B., Hapuarachchi H., Wimal A., Ng L., Ng L.F. 2015. A Systematic Meta-Analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. *J Infect Dis.* **211**: 1925- 1935
- Teo T., Her Z., Tan J., Lum F., Lee W., Chan Y., Ong R. y col. 2015. Caribbean and La Réunion Chikungunya Virus Isolates Differ in Their Capacity To Induce Proinflammatory Th1 and NK Cell Responses and Acute Joint Pathology. *J. Virol.* **89**: 7955- 7969.
- Thanapati S., Das R., Tripathy A. 2015. Phenotypic and functional analyses of NK and NKT- like populations during the early stages of Chikungunya infection. *Front. Microbiol.* **6**: a895.
- Torres-García, D., Barquera, R., Zuñiga, J. 2008. Receptores de células NK (KIR): estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, **1**:57-65.
- Woolf B. 1955. On estimating the relation between blood group and disease. *Human Genet* **19**:251-253.
- Yavropoulou M., Yovos J. 2008. Osteoclastogenesis – Current knowledge and future perspectives. *J. Musculoskelet Neuronal Interact.* **8(3)**: 204-2016.
- Zhuang Y., Song Y., Zhu C., Zhang Y., Wang D., Nie X., Liu Y. y colaboradores. 2012. Association of KIR Genotypes and Haplotypes with Syphilis in a Chinese Han Population. *Scand. J Immunol.* **75**: 361-367.