

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES EN SUERO DE INTERFERÓN- GAMA,
INTERLEUKINA-6, FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- ALFA EN PACIENTES CON
DENGUE CLÁSICO, DENGUE CLÁSICO CON HEMORRAGIAS Y DENGUE
HEMORRÁGICO.**

PROYECTO PRESENTADO POR:

**ALEJANDRA SALAZAR GONZÁLEZ
CRISTINA SALDARRIAGA
Estudiantes de Medicina**

COINVESTIGADORES:

**BERTHA NELLY RESTREPO
MARGARITA ARBOLEDA NARANJO
Médicas epidemiólogas**

**MARCOS RESTREPO ISAZA
Director científico ICMT**

**RUTH RAMÍREZ
Bacteriologa**

**FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD -CES-
INSTITUTO COLOMBIANO DE MEDICINA TROPICAL
MEDELLÍN
2006**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES EN SUERO DE INTERFERÓN- GAMA,
INTERLEUKINA-6, FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- ALFA EN PACIENTES CON
DENGUE CLÁSICO, DENGUE CLÁSICO CON HEMORRAGIAS Y DENGUE
HEMORRÁGICO.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA ASPIRAR AL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

PROYECTO PRESENTADO POR:

**ALEJANDRA SALAZAR GONZÁLEZ
CRISTINA SALDARRIAGA
Estudiantes de Medicina**

COINVESTIGADORES:

**BERTHA NELLY RESTREPO
MARGARITA ARBOLEDA NARANJO
Médicas epidemiólogas**

**MARCOS RESTREPO ISAZA
Director científico ICMT**

**RUTH RAMÍREZ
Bacteriologa**

**FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD –CES-
INSTITUTO COLOMBIANO DE MEDICINA TROPICAL
MEDELLIN
2006**

CONTENIDO

1. Resumen.....	4
2. Formulación del problema.....	5
2.1. Planteamiento del problema.....	5
2.2. Pregunta de investigación.....	7
3. Marco teórico y estado del arte.....	8
3.1. Aspectos inmunológicos de la infección por el virus del dengue.....	8
3.2. Inmunopatogénesis.....	9
4. Hipótesis.....	14
5. Objetivos.....	15
5.1. Objetivo general.....	15
5.2. Objetivos específicos.....	15
6. Metodología.....	16
6.1. Definición del método.....	16
6.2. Población y muestra.....	16
6.3. Criterios de inclusión y exclusión.....	16
6.4. Variables.....	16
6.4.1. Tabla de variables.....	17
6.4.2. Gráfica de variables.....	17
6.5. Instrumentos de recolección.....	18
6.6. Técnicas de recolección.....	18
6.6.1. Captación de los pacientes.....	18
6.6.2. Toma y conservación de la muestra de sangre.....	18
6.7. Procesamiento de la información.....	19
7. Consideraciones éticas.....	20
8. Resultados.....	21
9. Discusión.....	30
10. Conclusiones.....	33
11. Bibliografía.....	34
12. Anexos.....	38
12.1. Certificado de autorización voluntaria.....	38
12.2. Formulario.....	39

1. RESUMEN

Existen varias formas clínicas del dengue, así está la forma benigna o dengue clásico el cuál puede evolucionar a dengue hemorrágico o a síndrome de choque del dengue; se ha propuesto que mediadores químicos y citoquinas como FNT-alfa, IFN-gama, e IL-6 podrían estar relacionados en la respuesta inmune al virus y podrían ser la explicación básica de la patogénesis del dengue hemorrágico y del síndrome de choque del dengue. El objetivo de este estudio fue comparar los niveles de FNT-alfa, IFN-gamma, e IL-6 en los pacientes con las diferentes formas clínicas de dengue. Se incluyeron pacientes con diagnóstico de dengue por detección de anticuerpos IgM, en total fueron 32 pacientes a los cuales se les midió por 5 días los niveles de citoquinas en suero, se encontró que los niveles de FNT-alfa fueron mayores en pacientes con dengue hemorrágico excepto en el día 1, los niveles de IFN-gama fueron más bajos en pacientes con dengue hemorrágico, y la IL-6 fue mayor en dengue hemorrágico pero sin una diferencia estadísticamente significativa. Así se demostró que estas citoquinas están involucradas en la fase inicial y de efervescencia de la enfermedad pero ninguna fue predictor de infección severa.

Palabras clave

DC dengue clásico, DC+H dengue clásico más hemorragias, DH dengue hemorrágico, SCD síndrome de choque por dengue, FNT-alfa factor de necrosis tumoral alfa, IFN-gama interferón gama, IL-6 interleuquina 6

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las formas severas del dengue dependen de varios factores, no todos bien esclarecidos. Uno de ellos es la infección secuencial por más de un serotipo viral.

Se ha demostrado que los anticuerpos adquiridos contra un serotipo pueden formar complejos inmunes virus-anticuerpo los cuales permiten la infección de los monocitos y macrófagos, estimulando en estas células la producción de citoquinas como el Factor de necrosis Tumoral-alfa (TNF-alfa) y las interleukinas (IL), IL-2 e IL-6, los cuales han sido involucrados en el aumento de la permeabilidad vascular responsable de los síntomas del dengue hemorrágico. Iguales hallazgos se han demostrado para IFN-gama.

El Dengue es una enfermedad febril aguda producida por el virus del dengue, el cual pertenece al género *Flavivirus*, familia Flaviviridae, con cuatro serotipos, los cuales son transmitidos por mosquitos del género *Aedes*. Se caracteriza por presentar fiebre, cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgias y erupción que corresponde a la forma benigna denominado dengue clásico (DC) o puede evolucionar a dengue hemorrágico (DH) la forma grave de la enfermedad, o desarrollar el síndrome del choque del dengue (SCD) el cual puede ser fatal (1). Estas dos últimas formas de presentación clínica se caracterizan por trombocitopenia, fenómenos hemorrágicos y extravasación del plasma. En Colombia la incidencia de dengue ha aumentado, pasando de 17.389 casos de DC en 1990 a 76.579 en el año 2002. Igualmente DH pasó de una tasa de incidencia de 1.4 casos por 100.000 habitantes en 1990 a 14.3 por 100.000 habitantes en 2002 (2). Los serotipos circulantes han sido 1, 2 y 4 y desde el año 2001 circula el serotipo 3 (3). En el departamento de Antioquia, el promedio anual de casos de DC en los últimos 5 años (1998-2002) ha sido de 3.357 (4). Los factores que predisponen la presentación de formas

severas del dengue han sido objeto de muchos estudios y considerables debates. Uno de estos aspectos es la infección secuencial por más de un serotipo. Halstead y Kurane y Ennis (5,6) han postulado que la presencia de anticuerpos IgG contra el virus del dengue forman con el nuevo virus un complejo virus-anticuerpo, el cual se une a los monocitos/macrófagos resultando en un aumento de la infección viral.

Se ha propuesto que citoquinas y mediadores químicos producidos por los monocitos/macrófagos podrían estar relacionados en la respuesta inmune al virus y podrían ser la explicación básica de la patogénesis del DH/SCD. Algunas citoquinas implicadas son el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa), interleukina -1 (IL-1), IL-2 e IL-6. Hay mediadores químicos que también pueden inducir síntomas similares a los observados en DH/SCD. Estos incluyen fracciones del complemento como C3a y C5a e histamina. TNF-alfa es un producto de los monocitos/macrófagos y de las células T, y es directamente tóxico de las células del endotelio vascular incrementando la permeabilidad vascular (6). IL-6 puede ser producida por monocitos/macrófagos y células T, e *in vitro* se ha demostrado que puede producir aumento de la permeabilidad endotelial. IFN-gamma es una citoquina producida por linfocitos T y se ha demostrado *in vitro* que puede producir aumento de la permeabilidad endotelial y activar la expresión de receptores Fc γ en los monocitos/macrófagos (6). Los estudios sobre estas citoquinas han detectado que los niveles de TNF-alfa están más aumentados en los pacientes con dengue comparados con controles sanos (7,8,9,10). Los niveles de IL-6 están más elevados en pacientes con DH que con DC y más elevados en pacientes con dengue que sin dengue (9,11,12). El IFN-gamma aunque no induce directamente la extravasación del plasma en modelos animales, aumenta la producción de TNF-alfa por los monocitos activados e interactúa con el TNF-alfa para activar las células endoteliales *in vitro* (13,14).

En este estudio se propone comparar los niveles séricos de TNF-alfa, IFN-gama e IL-6 entre pacientes con dengue clásico sin hemorragias, Dengue clásico con hemorragias y dengue hemorrágico con el fin de identificar los diferentes comportamientos de las interleukinas según la sintomatología del paciente, lo cual sería un aporte al conocimiento de aspectos inmunológicos de la enfermedad.

2.2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Como es el comportamiento de IFN-gama, IL-6 y FNT-alfa en el suero de pacientes mayores de 18 años con las diferentes formas clínicas del dengue?

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

El dengue es una enfermedad febril aguda caracterizada clínicamente por la presencia de fiebre, cefalea, malestar general severo, dolores musculares, articulares y óseos generalizados, es producida por 4 serotipos de virus RNA: Den-1, Den-2, Den-3, Den-4, clasificados como arbovirus, de la familia Flaviviridae, género Flavivirus,. Es transmitido por mosquitos vectores del género Aedes (Aedes aegypti). Los cuadros más leves se presentan como un síndrome viral, caracterizado por una fiebre indiferenciada, y el síndrome de fiebre del dengue (FD), conocido también como dengue clásico (DC), en el cual es inusual la hemorragia. La forma más severa de la enfermedad es la Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) donde hay un aumento de la permeabilidad vascular, que puede progresar a un Síndrome de choque por dengue (SCD), a menudo fatal.

En Colombia la incidencia de dengue ha aumentado, pasando de 17.389 casos de DC en 1990 a 76.579 en el año 2002. Igualmente DH pasó de una tasa de incidencia de 1.4 casos por 100,000 habitantes en 1990 a 14.3 por 100.000 habitantes en 2002, con 50.245 casos (2). En todo el territorio colombiano han circulado los 4 serotipos. En 1971 se aisló el Den-2. Den-1 ha circulado desde conjuntamente con el Den-2. El Den-3 circuló por un período corto a mediados de los 70 y en 2001 se aisló en el municipio de Floridablanca, Santander. El Den-4 ha circulado desde 1984. En el 2002 circularon el Den-1, Den-3 y Den-4 (3). En Antioquia, la situación del dengue ha aumentado en número de casos y en número de lugares afectados. De 47 municipios que reportaron casos en 1997 se pasó a 79 en 2002. El promedio anual de casos de DC en los últimos 5 años (1998-2002) fue de 3.357, siendo el año de 1998 en el que se reportó el mayor número de enfermos con 9.746, para una proporción de incidencia de 187 por 100.000 habitantes (4). En 1989 la incidencia de DH fue de 0.02 casos por 100.000 habitantes y en 1998 de 4.25 por 100.000 habitantes (4). En Medellín y en Bello municipios del Valle del Aburrá en el 2002 fueron notificados 1849 casos de DC.

3.1. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL DENGUE

Durante la infección por el virus del dengue, se activan dos mecanismos de la respuesta inmune: la respuesta inmune humoral con producción de anticuerpos y la respuesta inmune de tipo celular en gran medida dependiente de las células T con producción de citoquinas y otros mediadores químicos.

Respuesta de anticuerpos: los anticuerpos antiviral median tres funciones fundamentales en la eliminación de las partículas virales infectantes: la neutralización del virus, la histólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Las células B. en la medida que se activan y proliferan, son capaces de capturar y procesar antígenos virales para presentarlos a las células T auxiliares, incrementando el número de estas células activadas

Los individuos residentes en zonas endémicas frecuentemente sufren infecciones secuenciales por distintos serotipos del virus. La infección secuencial o secundaria, es muy diferente desde el punto de vista inmunológico a la infección primaria. En la infección primaria, la IgM específica del virus es la primera inmunoglobulina en aparecer, aproximadamente entre el tercero y el quinto día del período febril alcanzando su pico máximo a las dos semanas. Estos niveles caen rápidamente hacia la cuarta semana, y luego más lentamente llegando a ser no detectables entre 2 y 3 meses después de la infección. La IgG se presenta a bajos niveles durante la fase febril o convaleciente temprana. Los anticuerpos neutralizantes generados son serotipo específicos, y esta especificidad aumenta con el tiempo (18). En la infección secundaria, la IgM aparece tardíamente durante la fase febril de la enfermedad precedida por la IgG, y cae a niveles no detectables hacia los 30 días. Los niveles de IgG son altos y se detectan aún en la fase aguda de la enfermedad, aumentando considerablemente en las 2 semanas siguientes (18).

Estos anticuerpos son serotipo-específicos; después de un corto período de protección cruzada, los individuos infectados con un serotipo son completamente susceptibles a la infección por otros serotipos, quedando una inmunidad duradera de por vida a la reinfección por serotipos homólogos (18,5). Los fagocitos mononucleares son

probablemente las células blanco de la infección (5,11), y se sabe que los anticuerpos anti-dengue, a través de la porción Fc de la IgG, especialmente de los subtipos IgG1 e IgG3, aumentan la infección por el virus porque dichas células poseen receptores Fc (5). Este fenómeno es llamado aumento de la infección dependiente de anticuerpos (ADE) y se refiere específicamente al proceso por el cual el complejo virus-anticuerpo se une en mayor proporción a la superficie celular de los monocitos, llevando a una mayor internalización del virus y por consiguiente a la infección de las células que poseen receptores Fc γ ; esto se observa a altas diluciones del suero, cuando se ha perdido la actividad neutralizante (18,19).

3.2. INMUNOPATOGENESIS

Kurane y Ennis (6) han planteado un modelo hipotético de la base inmunopatológica del DH. Este modelo postula que los anticuerpos contra el virus del dengue forman complejo virus-anticuerpo aumentando por este mecanismo la infección de monocitos y macrófagos. Los linfocitos T CD4+ específicos del virus se estimulan y producen IL-2 e INF-gamma. Este último activa la expresión de receptores Fc-gamma aumentando la infección por el virus dependiente de anticuerpos. El incremento en el número de monocitos infectados por el virus y de la expresión de antígenos HLA de clase I y II, facilita el reconocimiento de los epítopes del dengue sobre las células infectadas por parte de los linfocitos T específicos del virus, lo que resulta en un alto nivel de activación de los linfocitos T, Esto lleva a un incremento en la producción de citoquinas. Después de la infección por el virus del dengue, los monocitos activados por el IFN-gama pueden producir altos niveles de TNF-alfa e IL-1 o también los monocitos infectados podrían liberar altos niveles de estas citoquinas y mediadores químicos como resultado de la lisis por parte de los linfocitos T citotóxicos, CD4+ y CD8+ específicos del virus, y/o como resultado del contacto celular con linfocitos T específicos. Se podrían generar altos niveles de anafilotoxinas como C3a y C5a, debido a la activación de dos cascadas del complemento (9). Además, la producción de citoquinas y mediadores químicos es también inducida por otras citoquinas, por ejemplo TNF-alfa que induce la producción de TNF-alfa, IL-1 e IL-6. IL-1 induce la producción de TNF-alfa, IL-1 e IL-6. Por lo tanto, un a vez se producen varias citoquinas se incrementa gradualmente sus niveles por un fenómeno en red o cascada. Esto podría llevar a altos niveles de citoquinas en cortos períodos de

tiempo (18). Se ha propuesto que algunas citoquinas podrían estar relacionadas con la respuesta inmune al virus y podrían ser la explicación básica de la patogénesis del DH/SCD como TNF-alfa, IFN-gama, IL-1, IL-2 e IL-6. Igualmente varios mediadores químicos también pueden inducir síntomas similares a los observados en DH/SCD. Estos incluyen el factor activador de plaquetas (PAF), fracciones del complemento (C3a y C5a) e histamina. TNF-alfa es un producto de los monocitos/macrófagos y de las células T, y es directamente tóxico de las células del endotelio vascular incrementando la permeabilidad vascular, (6). Los lipopolisacáridos de la superficie de los microorganismos constituyen uno de los inductores más potentes de la secreción de esta citoquina. Las interleuquinas, IL-1alfa e IL-1beta son producidas por monocitos/macrófagos. Ha sido demostrado que IL-1 puede aumentar la permeabilidad celular y puede inducir la producción de prostaglandinas. IL-6 puede ser producida por monocitos/macrófagos y células T, e in vitro se ha demostrado que puede producir aumento de la permeabilidad endotelial. IFN-gamma es una citoquina producida por células T, in vitro se ha demostrado que puede producir aumento de la permeabilidad endotelial y activar la expresión de receptores Fc γ en los monocitos/macrófagos (6). Estas citoquinas y mediadores químicos tienen efectos sinérgicos. Además la producción de citoquinas y mediadores químicos puede ser inducida por otras citoquinas: TNF-alfa induce producción de IL-1, IL-6 e IL-8 y PAF e IL-1 induce la producción de TNF-alfa, IL-1 e IL-6. Estos ciclos dan como resultados altos niveles de citoquinas y mediadores químicos con efectos sinérgicos sobre la permeabilidad vascular en un corto período de tiempo (6).

Estudios previos de citoquinas han mostrado lo siguiente. Vitarana y col (7) encontraron niveles significativamente más elevados de TNF-alfa en 4 casos de DH comparados 5 casos de DC. Yadav y col 1991, (8) reportaron niveles de TNF-alfa significativamente mas elevados en 16 casos de DF/SCD que en 8 casos de DC. Hober y col 1993 (11) en Tahiti, estudiaron los niveles de IL-6, TNF-alfa e IL-1beta en 47 niños y 18 adultos con dengue hemorrágico. El suero fue obtenido diariamente del día 1 al día 10 del inicio de la enfermedad. Los hallazgos mostraron altos niveles de TNF-alfa y de IL-6 en niños y adultos con grados III y IV de DH. Kuno y Bailey (20) en Puerto Rico, 1994, estudiaron 233 personas con diagnóstico confirmado de dengue, los cuales fueron clasificados en 6 grupos según ser adulto o niño, hospitalizado o no como indicador de severidad y tener o no presencia de hemorragia. La muestra de sangre fue obtenida a los 7 días del inicio de

la enfermedad. Los resultados mostraron que la proporción de niños hospitalizados con niveles de TNF-alfa elevados, fué significativamente mayor que en los no hospitalizados (73% vs. 36%) ($p < 0.001$). Tanto en niños como en adultos, fue mayor la proporción de pacientes con IL-6 detectable en los que estaban hospitalizados con respecto a los no hospitalizados (En niños, 48% vs. 23%; $p < 0.01$ y en adultos 48% vs. 9%; $p < 0.001$). No hubo correlación entre manifestaciones hemorrágicas y niveles de citoquinas. Bethell y col (12) en Vietnam, 1998, estudiaron los niveles de IL-6 en 443 niños con diagnóstico de DH, los cuales fueron divididos en 4 grupos, 184 sin choque, 71 en prechoque, 182 con diagnóstico de SCD no fatal y 6 con SCD fatal. Los niveles de TNF-alfa fueron más altos a mayor severidad de la enfermedad, pero no fue significativa esta tendencia. En el caso de la IL-6, el resultado obtenido fue paradójico con una tendencia negativa, es decir, los niños con choque tienden a tener bajos niveles que aquellos sin choque. Laur y col (10) en Tahití, 1998, hicieron un estudio de seguimiento de niveles de TNF-alfa en 52 niños, de los cuales 33 tenían DC, 14 tenían DH grados I ó II y 5 niños con DH grados III o IV. Las edades estaban comprendidas entre 1 mes y los 15 años. No hubo casos fatales. Fueron escogidos como controles 8 niños sanos. Los niveles de citoquinas fueron determinados en 4 muestras tomadas entre los días 1 a 10 después del inicio de la enfermedad. Los resultados mostraron niveles de TNF-alfa bajos, casi indetectables, en los controles. También fueron bajos los niveles de los niños con dengue, y aunque eran mayores que los del grupo control, estas diferencias no fueron significativas. Los niveles de TNF-alfa tuvieron un incremento lineal en todos los pacientes de todos los grados de severidad, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los casos de DC y DH ($p = 0.07$). Pinto y col (9) encontraron que TNF-alfa e IL-6 fueron significativamente más altos en pacientes con dengue que en sujetos controles. La Braga y col (21) en Brasil, 2001, estudiaron TNF-alfa, IFN-gama, IL-6 e IL-1beta, en 24 individuos con dengue y 15 controles aparentemente sanos. De los 24 pacientes, 16 tenían DC, 5 dengue clásico con manifestaciones hemorrágicas y 3 DH. Los resultados fueron los siguientes: IL-6 e IL-1beta no fueron detectadas en ningún paciente (según límite referencial de la prueba de ELISA utilizada). IL-12, fue detectada en el 33% de los pacientes. TNF-R75 se detectó en 73% de los pacientes. Se encontró que los pacientes con DH mostraron un aumento significativo para TNF-alfa cuando se compararon con pacientes con DC sin hemorragia (Prueba exacta de Fisher, $p = 0.0069$). Diamond y col (22) en estudios in vitro demostraron que el IFN-alfa y beta protegen las células contra la infección del virus del dengue. En

cuanto al IFN-gama, su efecto ha sido más variable dependiendo del tipo de célula y curso de la enfermedad.

Anita Chakravarti & Ranji Kumaria (23) encontraron que los niveles de FNT-alfa e IFN-gama fueron superiores en los pacientes con serología positiva para dengue con DC y DH que en los grupos control. Niveles significativamente altos de FNT-alfa; 258.02 pg/ml ($p < 0.005$) fueron vistos en pacientes con infección secundaria, mientras que los pacientes con infección primaria tuvieron niveles elevados de IFN-gama; 29.47 pg/ml ($p < 0.005$). El TNF-alfa estuvo elevado en la fase tardía de la enfermedad, mientras el IFN-gama se encontró elevado además en la fase temprana. No hubo diferencias significativas entre pacientes con DC y DH, pero si entre estos con respecto al grupo control

Trai-Ming Yeh y cols (24) midieron niveles en suero de IFN-gama y FNT- alfa los cuales no mostraron diferencias en pacientes con DH que murieron y entre los que no.

Se investigó la presencia de TNF-alfa en suero de 4 pacientes con dengue (25), lo cuál mostró una gran activación de los efectos de las células endoteliales y aumento en los niveles de TNF-alfa, en los controles no se detectó el TNF-alfa

Pretratamiento con antagonistas mAb contra TNF- alfa inhibió más del 70% la activación celular endotelial, así como los efectos en el suero producidos por estas, estos resultados sugieren que el TNF-alfa es un factor crítico para la activación y efectos de las células endoteliales producido en suero de pacientes con dengue.

4. HIPÓTESIS

Ho: El promedio de los niveles de TNF-alfa, IL-6 e IFN- gama es igual en pacientes con dengue clásico sin hemorragia, dengue clásico con hemorragia y dengue hemorrágico.

Ha: El promedio de los niveles de TNF-alfa, IL-6 e IFN-gama es diferente en pacientes con dengue clásico sin hemorragia, dengue clásico con hemorragia y dengue hemorrágico.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Comparar los niveles de TNF-alfa, IL-6 e IFN-gama en pacientes con dengue clásico sin hemorragias, dengue clásico con hemorragias y dengue hemorrágico.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar los niveles en suero de TNF-alfa, IL-6 e IFN-gama según hospitalización.
- Comparar los niveles en suero de TNF-alfa, IL-6 e IFN-gama según presencia de trombocitopenia, hepatomegalia, edemas e hipotensión.
- Descripción de los síntomas, signos y hallazgos de laboratorio de los casos de dengue.

6. METODOLOGÍA

6.1. DEFINICIÓN DEL MÉTODO

Se realizó un estudio cross sectional de tipo analítico, el cual se realizó en el departamento de Antioquia, de abril de 2005 a abril 2006.

6.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

El universo estaba constituido por todos los pacientes con dengue del municipio del Valle del Aburrá en edades comprendidas entre 18 a 46 años.

Los pacientes se captaron en la zona del valle de Aburrá en Antioquia. El diagnóstico del dengue se hizo por detección de anticuerpos IgM, inhibición de la hemoaglutinación. La medición de los niveles de citoquinas se realizó diariamente durante 5 días iniciando en el momento de la primera consulta.

6.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

- Se incluyeron solo los pacientes con dengue que cumplieron con los criterios clínicos y de laboratorio contemplados por Organización Panamericana de la Salud (26) y que fueron mayores de 18 años.
- Fueron excluidos los pacientes con malaria confirmada con gota gruesa o los que por examen físico e interrogatorio tuvieron otra enfermedad infecciosa concomitante. Fueron excluidas las mujeres gestantes.

6.4. VARIABLES

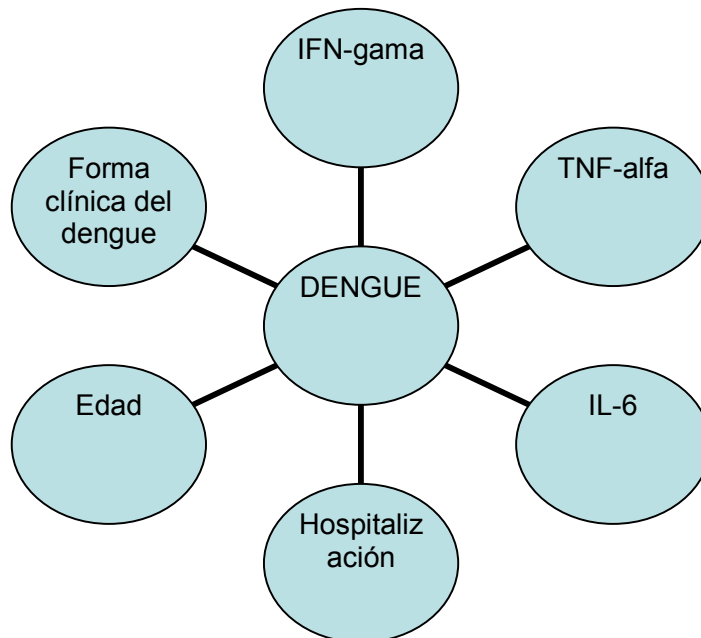
- Nivel de IFN-gama
- Nivel de TNF-alfa
- Nivel de IL-6

- Edad
- Forma clínica del dengue

Tabla 6.4.1. Operacionalización de las variables

Nombre	Definición	Dimensión	Tipo	Nivel de medición
Niveles séricos de IFN- γ	Por ELISA	pg/ml	Cuantitativa	Razón
Niveles séricos TNF- α	Por ELISA	pg/ml	Cuantitativa	Razón
Niveles séricos de PAF	Por ELISA	pg/ml	Cuantitativa	Razón
Niveles séricos de IL-6	Por ELISA	pg/ml	Cuantitativa	Razón
Infección secundaria	Presencia de Ac IgG por ELISA	1. Positivo 2. Negativo	Cualitativa	Nominal
Edad	-	Años cumplidos.	Cuantitativa	Razón
Formas clínicas	Según OPS	1. D. clásico 2. D. hemorrágic	Cualitativa	Nominal

Gráfico 6.4.2 variables



6.5. INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN:

Los datos de las variables a estudiar fueron tomados de la historia clínica y se complementaron con información suministrada por el paciente. Se utilizó un formulario para tal fin.

6.6. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN:

6.6.1 Captación de los pacientes

Los pacientes con dengue fueron captados en las instituciones de salud del Valle del Aburrá, mediante el sistema de vigilancia epidemiológica establecido en las instituciones.

6.6.2. Toma y conservación de la muestra de sangre

Para el diagnóstico de dengue se tomó una muestra de sangre periférica durante la fase aguda y otra en la fase convaleciente de la enfermedad, la cual se hizo por venopunción, tomando 5 ml de sangre en tubos estériles sin anticoagulantes. El suero se conservó refrigerado antes de ser procesado. La medición de los niveles de citoquinas se hizo diariamente en una muestra de suero de 4ml obtenida durante 5 días iniciando en el momento de la primera consulta.

El diagnóstico de dengue se hizo mediante las siguientes técnicas:

- Detección de anticuerpos IgM contra el virus del dengue, mediante un ensayo inmunoenzimático de captura (ELISA) disponible comercialmente (UMELISA® Dengue IgM - Centro de Inmunoensayo, Instituto Pedro Kouri - La Habana, Cuba).
- Aislamiento del virus del dengue, para el cual se utilizó la línea de células de mosquito C6/36 obtenida de *Aedes albopictus* como está descrito (27-28)
- Inhibición de la hemoaglutinación, según la técnica descrita en el Instituto Nacional de Salud en Colombia y el Instituto Pedro Kouri (La Habana, Cuba) (29). La cual se consideró positiva si tiene un aumento cuádruple de los títulos entre la muestra de sangre de la fase aguda y la fase convaleciente.

La cuantificación de las citoquinas, IL-6, TNF-alfa e IFN-gama, se hizo mediante estuches comerciales (Quantikine® y Quantikine® HS – High Sensitivity- (R&D Systems (Minneapolis, MN), los cuales se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.7. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN:

La base de datos se elaboró en Microsoft Excel 97 (Microsoft Corp., Redmond, WA). El procesamiento de la información se realizó en el programa SPSS® versión 10 para Windows 98 (SPSS Inc. - Chicago, ILL).

Se hizo un análisis de tipo descriptivo para todas las variables. Se calcularon promedio, valores máximos y mínimos en las variables cuantitativas y se calcularon porcentajes en las variables cualitativas.

La comparación de las diferencias de medias entre dos grupos se hizo mediante la prueba de Mann-Whitney.

El nivel de significancia aceptado fue 0.05.

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

La investigación se consideró de riesgo mínimo según el decreto 008430 de 1993 emanado por el Ministerio de Salud de Colombia. Se solicitó consentimiento informado y por escrito a los participantes. .

1. La presente investigación se consideró de riesgo mínimo.
2. El proyecto no contempló ningún experimento o procedimiento que ponga en riesgo la vida del paciente en beneficio del estudio.
3. La información sobre los pacientes fué confidencial.
4. Los pacientes no recibieron ninguna remuneración económica por participar en el estudio.
5. El paciente estuvo en la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento de la investigación.
6. Prevalcieron los beneficios sobre los riesgos en este proyecto.
7. Se solicitó consentimiento informado y escrito a los pacientes, para la revisión de la historia clínica y para la toma de muestras de sangre, previa información clara y oportuna.

8. RESULTADOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

El total de participantes en el estudio fueron 32 pacientes con diagnóstico de dengue, las edades oscilaron entre los 18 y 46 años, edades considerados como criterios para ingreso al estudio. El promedio de edad fue 30,3 años. El 40,6% de los participantes eran hombres (13/32).

FORMAS CLÍNICAS

La forma clínica más frecuente fue dengue clásico mas manifestaciones hemorrágicas (DC+H) 56,3%, seguido de dengue clásico (DC), 34,4%. Solo se registraron 3 casos que cumplieron con los criterios de dengue hemorrágico (DH). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre sexos. ($\chi^2=0,258$, $p=0,879$). Tabla No 8.1

Tabla N° 8.1 Distribución de las formas clínicas del dengue						
Formas clínicas	Hombre		Mujer		Total	
	No	%	No	%	No	%
Dengue clásico	4	36,4	7	63,6	11	34,4
Dengue clásico más hemorragias	8	44,4	10	55,6	18	56,3
Dengue hemorrágico	1	33,3	2	66,7	3	9,4
Total	13	40,6	19	59,4	32	100

Todos los casos se confirmaron por ELISA y por Inhibición de Hemaglutinación (IH). Los serotipos del virus del dengue detectado por IH fueron D1 en 6 pacientes (18,8%); D2 en 17 (53,1%); D3 en 6 (18,8%) y D4 en 2 (6,3%). No se obtuvo dato en un paciente.

Los signos y síntomas clínicos generales más frecuentes en los pacientes fueron fiebre, cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgias, astenia, erupción y epigastralgia. Se destaca el edema de extremidades en 11 pacientes y presentaron hipotensión arterial, 6 personas.

Tabla No 8.2 Signos y síntomas generales de dengue		
Signos y síntomas	Nº	%
Fiebre	32	100
Cefalea	32	100
Dolor retroocular	24	75,0
Mialgias	28	87,5
Artralgias	26	81,3
Escalofrío	16	50,0
Astenia	21	65,6
Anorexia	15	46,9
Erupción	19	59,4
Hiperalgnesia cutánea	4	12,5
Náuseas y vómitos	16	50,0
Epigastralgia	19	59,4
Congestión nasal o faríngea	6	18,7
Edema de extremidades	11	34,4
Hipotensión arterial	6	18,8

Las manifestaciones hemorrágicas más frecuentes fueron las de piel representadas en petequias y púrpura. Le siguen en frecuencia las hemorragias por mucosas de las cuales la más frecuente fueron epistaxis y hematuria.

Tabla No 8.3 Signos y síntomas hemorrágicos de dengue		
Signos y síntomas	Nº	%
Petequias	18	56,3

Púrpura	2	6,3
Epistaxis	7	21,9
Hematuria	5	15,6
Melena	3	9,4
Metrorragia	5	15,6
Gingivorragia	4	12,5
Prueba del torniquete positiva	6	18,8

Otros hallazgos fueron la presencia de anasarca en un paciente. Se hospitalizaron el 81,3% (26/32). Ningún paciente tuvo hepato-esplenomegalia. Ningún paciente falleció.

HALLAZGOS DE LABORATORIO

El promedio del recuento de plaquetas por formas clínicas se presenta en la Gráfica 8.1. La tendencia es al descenso durante los primeros días, luego se eleva el día 4 y llegar en el día 5 al máximo promedio. Este comportamiento es semejante para las tres formas clínicas pero con mayor descenso en los casos de DH y DC+H.

Gráfica 8.1

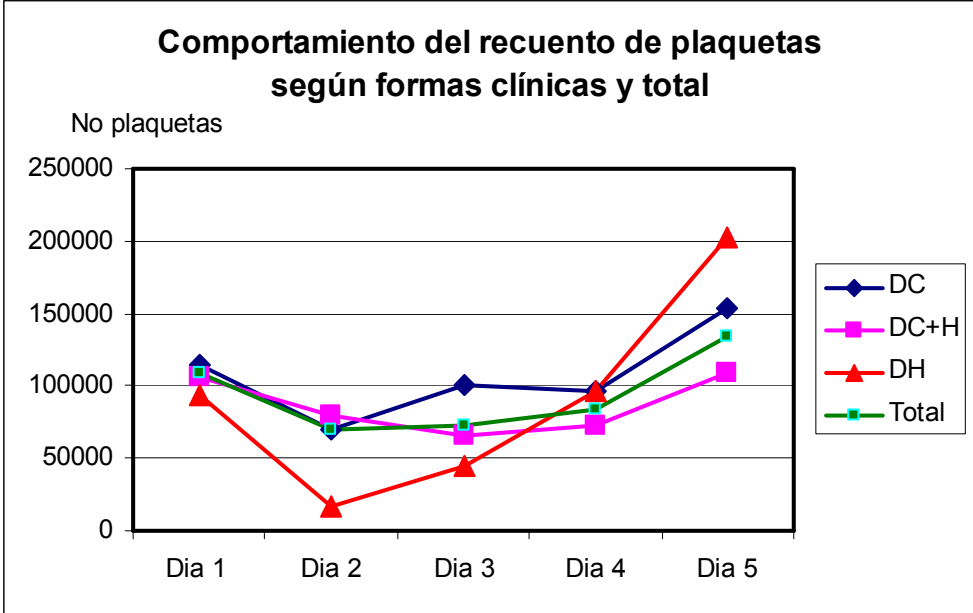


Gráfico 8.1

Las variaciones mayores del hematocrito se presentaron en los casos de DH.

Tabla No 8.4 Comportamiento del promedio del hematocrito por día y por forma clínica de dengue					
Forma clínica	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
DC	41,2	43,0	45,2	45,7	47,4
DC+H	43,3	42,1	42,7	42,5	42,1
DH	46,8	40,9	39,5	36,3	SD
Total	42,9	42,2	43,1	42,3	43,4

El mayor descenso en los niveles de hemoglobina fue en los casos de DH.

Tabla No 8.5 Comportamiento del promedio de la hemoglobina por día y por forma clínica de dengue					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
DC	14,5	14,6	15,0	15,5	SD
DC+H	14,5	14,5	14,6	14,9	14,5
DH	17,1	14,5	12,3	12,5	SD
Total	14,8	14,5	14,4	14,7	14,5

COMPORTAMIENTO DE LOS NIVELES DE TNF-ALFA, INF-GAMA, IL-6

La muestra de suero para el estudio de las citoquinas se inició el día en que el paciente fue captado, por lo tanto los días transcurridos entre la toma de la muestra y la fecha de inicio de síntomas fueron diferentes para cada paciente. El promedio de días para la toma de la primera muestra (día 1) fue 4; para la segunda toma (día 2) fue 5; para la tercera toma (día 3) fue 6,9; la cuarta toma (día 4) fue 8 días; la quinta toma (día 5) fue 9,5 y la última muestra (día 6) fue 30 días. Con base a este criterio se analizaron los resultados.

Niveles de citoquinas según forma clínica y día de la toma de la muestra

TNF-alfa. En los pacientes con dengue clásico los niveles de TNF-alfa se elevaron a partir del día 1, alcanzando el nivel más elevado el día 3, permaneciendo así hasta el día 5, para luego disminuir en la convalecencia. En los pacientes con dengue clásico con hemorragias la elevación se presenta también a partir del día 2, para disminuir a partir del día 4, aun a niveles inferiores que los encontrados en el día 1. Aunque fueron pocos los pacientes con DH encontrados en esta serie, se observó en ellos un aumento de esta citoquina a partir del día 2 permaneciendo en cifras elevadas y en ascenso hasta el día 5, para descender en el día 6. Al comparar los niveles de TNF-alfa entre las formas clínicas por día se encontraron niveles más elevados para todos los días de medición a excepción del primero en los pacientes con DH, sin embargo estas diferencias solo fueron estadísticamente significativas al comparar DC vs DC+H el día 1. No hubo diferencias significativas desde el punto de vista estadístico entre los niveles por día de ninguna de estas citoquinas. Ver Tabla 8.6 y Gráfico 8.2 A

IFN-gama. Los niveles de IFN-gama fueron mas elevados en los pacientes con DC y DC+H que en los pacientes con DH en todos los días de seguimiento. En los pacientes con DC el aumento se presenta después del día 3, con niveles muy elevados el día 4 para luego descender. En los pacientes con DC+H los niveles son altos los días 1 y 2, para descender a partir del día 3. Los niveles en los casos de DH fueron bajos e incluso imperceptibles, sin embargo se elevan el día 4. No hubo diferencias significativas de los niveles de esta citoquina entre formas clínicas por día de la toma de la muestra. Ver Tabla 8.6 y Gráfico 8.2 B.

IL-6. Los niveles de IL-6 se elevan después del segundo día en todos los casos. Permanece elevada en los casos de DC hasta el día 3, para luego descender y volver a elevarse el día 6 en DC y el día 5 en DC+H. Aunque los niveles de IL-6 son más elevados en los casos de DH estas diferencias no fueron significativas. Ver Tabla 8.6 y Gráfico 8.2 C.

Gráfico No 8.2 Comportamiento de los niveles de citoquinas según forma clínica y día de la fecha de la toma de la muestra

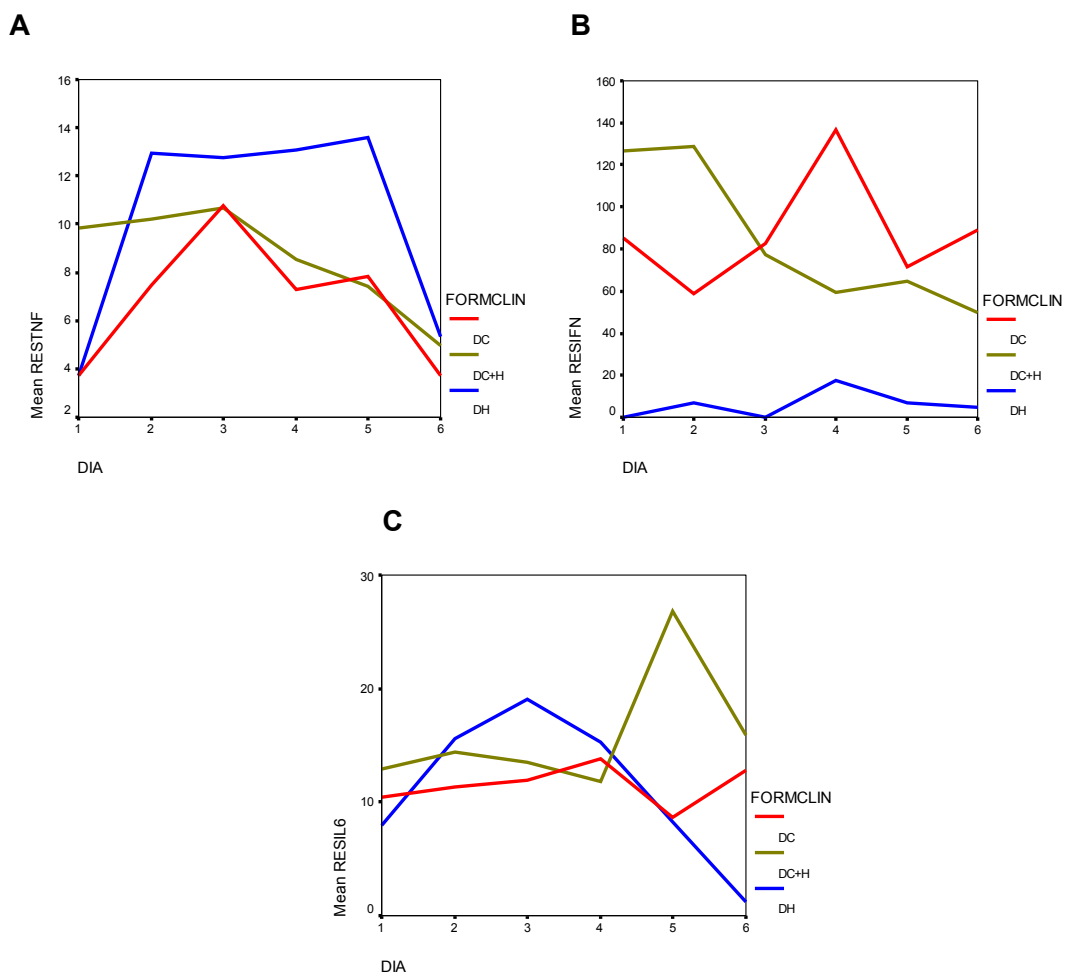


Tabla No. 8.6 Niveles de citoquinas según día de estudio y forma clínica

Citoquina (pg/ml)	Día	DC Promedio (DE) ^a	DC+H Promedio (DE) ^a	DC vs DC+H Valor de p	DH Promedio (DE) ^a	DC vs DH Valor de p
TNF-alfa	1	3,706 (3,838)	9,818 (9,637)	0,031	3,719 (2,565)	0,769
	2	4,955 (5,507)	10,183 (7,897)	0,387	12,949 (2,791)	0,126
	3	10,759 (12,849)	7,376 (8,189)	0,438	12,765 (2,121)	0,170
	4	7,283 (4,544)	8,519 (5,790)	0,521	13,058 (2,737)	0,038
	5	7,562 (4,553)	7,416 (6,669)	0,550	13,585 (3,065)	0,088
	6	3,700 (3,716)	4,945 (5,652)	0,979	5,354 (3,159)	0,368
IFN-gama	1	85,398 (172,424)	126,768 (210,717)	0,412	0,0 (0,0)	0,291
	2	58,862 (88,391)	128,710 (180,840)	0,465	12,949 (2,791)	0,291
	3	82,668 (161,052)	77,175 (119,027)	0,842	0,0 (0,0)	0,291
	4	136,834 (246,170)	59,124 (78,018)	0,363	17,389 (15,799)	0,885
	5	71,745 (184,951)	64,781 (110,207)	0,642	7,102 (12,301)	0,769
	6	89,157	49,624	0,467	4,826	0,170

		(155,022)	(82,529)		(8,359)	
IL-6	1	10,399 (7,687)	12,935 (10,753)	0,707	7,983 11,157	1,00
	2	11,328 (8,505)	14,406 (9,058)	0,276	15,552 (12,547)	0,769
	3	11,930 (7,455)	13,467 (8,840)	0,363	19,068 (13,088)	0,225
	4	13,854 (9,071)	11,857 (9,509)	0,611	15,347 (15,974)	0,885
	5	8,636 (6,258)	26,804 (48,374)	0,394	8,291 (5,932)	1,00
	6	12,790 (9,071)	15,850 (15,863)	0,790	1,198 (2,075)	0,038

^a DE = desviación estándar

No se encontraron diferencias en los niveles de las tres citoquinas entre los pacientes hipotensos y normotensos ($p=0,264$; $0,832$; $0,796$ para TNF-alfa, IFN-gama e IL-6 respectivamente); hospitalizados y ambulatorios ($p=0,658$; $0,979$; $0,448$) y entre pacientes con edemas y sin edemas, en la primera muestra de suero.

Tabla No. 8.7 Niveles de citoquinas según presencia de edemas, hipotensión y tipo de manejo

Citoquinas (pg/ml)	DC	DC	DC	DC	DC	DC
	Promedio (DE) ^a	Promedio (DE) ^a	Promedio (DE) ^a	Promedio (DE) ^a	Promedio (DE) ^a	Promedio (DE) ^a
	Hipotenso	Normotenso	Edemas	No edemas	Ambula- torio	Hospitali- zado
TNF-alfa	8,023 5,276	6,942 8,691	8,954 11,940	6,197 5,256	7,086 8,521	7,231 8,339

IFN-gama	83,153	104,703	109,553	96,006	58,932	112,559
	149,518	198,324	239,848	161,363	79,468	204,897
IL-6	10,171	11,928	12,667	11,039	11,601	12,534
	10,453	9,657	12,794	7,864	7,677	9,988

^a DE= desviación estándar

9. DISCUSIÓN

El objetivo de este proyecto fue evaluar la cinética de los niveles séricos de, TNF-alfa, IFN-gama e IL-6 y comparar su comportamiento según formas clínicas y según algunos hallazgos clínicos en una población de 32 adultos con dengue. Las citoquinas son moléculas necesarias en la modulación de la respuesta inmune ante la presencia de infecciones, sin embargo pueden desencadenar respuestas inadecuadas en las personas. Se ha demostrado que TNF-alfa activa células endoteliales y puede iniciar eventos que implican la disfunción de las mismas y así podría participar en algunas de las manifestaciones clínicas y de laboratorio observadas en pacientes con dengue hemorrágico y síndrome del choque del dengue. Además TNF-alfa es considerada una molécula antiviral, que puede tener importancia en la atenuación de la infección por el virus del dengue (30). La producción de TNF-alfa puede darse cuando monocitos/macrófagos son infectadas por el virus del dengue, igualmente su producción aumenta cuando los niveles de IFN-gama son elevados en pacientes infectados, ya que estimulan la producción de los monolitos (14).

In vitro IFN-gama puede producir aumento de la permeabilidad endotelial y activar la expresión de receptores $Fc\gamma$ en los monocitos/macrófagos (13, 31). Kurane y cols (14) han reportado que IFN-gama aumenta la infección de monocitos humanos por el virus del dengue y regula la expresión de antígenos HLA clase I y clase II, permitiendo un incremento del número de células infectadas y facilitando el reconocimiento de antígenos del virus del dengue por las células. IL-6 es un pirógeno endógeno que también incrementa la permeabilidad de la célula endotelial³¹. Los niveles más elevados de IL-6

han sido detectados al inicio de la enfermedad y se le considera involucrada en la aparición de los síntomas generales del dengue y posteriormente vuelve a elevarse el día del choque, razones por las que varios autores consideran que esta citoquina refleja la severidad de la enfermedad (11,27,32).

En este estudio se observó un incremento de los niveles de TNF-alfa para todas las formas clínicas. Hallazgos ya descritos en la literatura (20,7,8,36). Además fueron más elevados estos niveles en los pacientes con DH que en los pacientes con DC y DC+H. Estos datos coinciden con los de Kittigul y cols 2000(33) y Gagnon y cols 2002 (34). También se observó que los niveles más elevados de esta citoquina coinciden con los días críticos (del día 3 al día 6 de la fecha de inicio de síntomas) que son los momentos donde se puede dar la extravasación plasmática, razón por la cual fue más evidente en los casos de DH, en los que los niveles de TNF-alfa persistieron más días elevados. En todas las formas clínicas hay un decrecimiento de los niveles después de la fecha crítica, esto coincide con Hober y cols, 1993 (11) que demostraron descenso de esta citoquina un día después del diagnóstico del choque.

Varios autores han relacionado los niveles de IL-6 con la severidad de la enfermedad (30,20). Estos hallazgos coinciden con los del presente estudio en el cual se observó incremento de esta citoquina en el período crítico y los niveles fueron más elevados en los casos de DH.

Los niveles de IFN-gama detectados en nuestros pacientes fueron elevados en pacientes con DC y DC+H y bajos en pacientes con DH. Kurane y col, 1991 (14) encontraron niveles semejantes de INF-gama entre niños con DH y con DC. Restrepo y cols (36) encontraron niveles de INF-gama menores en niños con DH frente a niños con DC y niveles elevados

en gestantes con DH con respecto a las gestantes con DC.

En los pacientes hospitalizados fueron más elevados los niveles de IFN-gama e IL-6. TNF-alfa tuvo niveles más elevados en pacientes hipotensos que en normotensos. En pacientes con edemas se observaron niveles mayores de IFN-gama e IL-6 que en pacientes sin edemas. Restrepo y cols (36), encontraron en gestantes con niveles de IL-6 e IFN-gama más elevados, a diferencia de los niños hospitalizados en los que los niveles de IL-6 fueron más bajos, caso contrario se observa en los niveles de TNF-alfa e IFN-gama. Kuno & Bailey 1994 (20) en Puerto Rico observaron niveles de IL-6 significativamente más altos en adultos y niños hospitalizados que en pacientes ambulatorios. Bethell y cols 1998 (12) en Vietnam reportan que la IL-6 fue baja en pacientes con choque. Juffrie y col 2001 (32), encontraron diferencias significativas mayores en los niveles de IL-6 entre los niveles de pacientes con choque que en los pacientes normotensos.

Las características clínicas de los pacientes con dengue fueron semejantes a las reportadas en la literatura (1). Cabe destacar la presencia de edemas en un considerable número de pacientes, hallazgo que no es registrado en forma frecuente y que puede ser un signo de severidad importante. Se pudo comprobar la circulación de los 4 serotipos de dengue, demostrando una situación de hiperendemia en el departamento de Antioquia.

10. CONCLUSIONES

En conclusión con este estudio se pudo constatar que IL-6, TNF-alfa e IFN-gama están involucradas en la infección por el virus del dengue en la fase inicial y en la fase de efervescencia de la enfermedad, pero ninguna demostró ser un marcador de infección severa (predictor de gravedad) porque su comportamiento fue semejante en las diferentes formas clínicas, aunque TNF-alfa fue más consistentemente elevado en las formas más severas de la enfermedad, caso contrario a IFN-gama cuyos niveles fueron inferiores en las formas severas (DH). Según Sekut y cols, 1994 (35), los niveles de TNF-alfa en el suero es un signo de la presencia de un estímulo inflamatorio, pero no es una medición cuantitativa de la reacción del huésped. Hober y cols, 1998 (30) consideran que los niveles locales de las citoquinas son más indicativos del estado inflamatorio del huésped, entonces aunque su elevación es mayor en la etapa crítica, no es útil a nivel pronóstico por la variación de los niveles en el curso de la enfermedad, su rápida desaparición de la circulación, por las diferencias inmunológicas, y posiblemente por la técnicas usadas en su medición. En cuanto a IL-6 Bethel y cols (12) consideran que su disminución durante la fase crítica posiblemente es debido a la disminución general de proteínas de la circulación provocado por la extravasación.

Por lo tanto la medición en suero de estas moléculas no es útil para conocer el pronóstico de la enfermedad, sería pertinente entonces avanzar en estudios para su medición local, que no solo permitan evaluar en forma temprana que pacientes van a desarrollar formas severas, si no también evaluar futuros tratamientos para las formas severas.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Mic Rev* 1998;480-496
2. SIVIGILA. Sistema de Vigilancia en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud de Colombia 2002; Semana epidemiológica 52:3-4
3. SIVIGILA. Sistema de Vigilancia en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud de Colombia; 2002 Semana epidemiológica 2;:2
4. Sierra ML, Vélez LM, Castañeda AM, Galeano LA, Molina AL, Tabares Z et al. Análisis de la morbimortalidad. Diagnóstico de la Situación de Salud en Antioquia. *Revista Epidemiológica de Antioquia*. 2002;25:83-205
5. Hastead SB. Pathogenesis of dengue. Challenges to molecular biology. *Science* 1988;238:476-481.
6. Kurane A, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue virus infections. En: Gubler DJ, Kuno G eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International 1997:273-290
7. Vitarana T, de Silva H, Withana N, Gunasekera C. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Ceylon Medical Journal* 1991;36:63-65
8. Yadav M, Kamath KR, Iyngkaran N, Sinniah M. Dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome: are they tumor necrosis factor-mediated disorders? *FEMS Microbiological Immunology* 1991;4:45-49
9. Pinto L, Solange O, Braga E, Nogueira R, Kubelka C. Increased Pro-inflammatory Cytokines (TNF-alfa and IL-6) and Anti-inflammatory Compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian Patients during Exanthematic Dengue fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1999;94:387-394
10. Laur F, Murgue B, Deparis X, Roche C, Cassar O, Chungue E. Plasma levels of tumor necrosis factor alfa and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1998;92:654-656
11. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, Imbert P et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alfa (TNF-alfa), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1beta (IL-1beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Hyg*, 1993;48:324-331

12. Bethell D, Flobbe K, Than Phuong CX, Day N et al. Pathophysiologic and prognosis role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1998;177:778-80
13. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Virology* 1999;257:1-6
14. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, Ennis FA. Activation of T Lymphocytes in Dengue Virus Infections. High Levels of Soluble Interleukin 2 Receptor, Soluble CD4, Soluble CD8, Interleukin 2 and Interferon-gamma in Sera in Children with Dengue. *J Clin Invest* 1991;88:1473-1480
15. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, Kanesa.Tasan N, Hayes CG, Watts DM. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:180-3
16. Guzman MG, Kouri G, Vasquez S, Rosario D, Bravo J, Valdes L. DFH Epidemics in Cuba, 1981 and 1997:Some Interesting Observation. *Dengue Bulletin* 1999;23:3943
17. Bravo J, Guzman MG, Kouri G. Why dengue hemorrhagic in Cuba? Individual risk factors for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81:816-20
18. Innis SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:444-451
19. Klicks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Anitbody-dependent enhancement o dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:444-451.
20. Kuno G, Bailey RE. Cytokine responses to dengue infection among Puerto Rican patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994;89:179-182
21. Braga E, Moura P, Pinto L, Ignacio S, Oliveira MJ, Cordeiro MT, Kubelka CF. Detection of Circulant Tumor Necrosis Factor-alfa, Solubel Tumor Necrosis Factor p75 and Interferon.gamma in Brazilian Patients with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:229-232
22. Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha beta, and gamma interferons. *J Virol* 2000;74:4957-66
23. Anita Chakravarti & Ranji Kumaria. Circulating levels of tumour necrosis factor-alfa & interferon-gamma in patients with dengue haemorrhagic fever during an outbreak.

- Azad medical college & associated Lok Nayak Hosp. New Delhi, India. *Indian J. Med.* 2006;123:25-30
24. Trai-Ming Yeh and cols. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:142-147
 25. Jose E. Cardier, Eliana Mariño, Egidio Romano, Peter Taylor, Ferdinando Liprandi, Norma Bosch, Alan L. Rotman. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF- α in endothelial cells damage in dengue. *Cytokine* 2005;30:359-365
 26. Organización Panamericana de la Salud. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: Guías para su prevención y control. Publicación Científica No 578.1995
 27. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Use of mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies for routine surveillance of dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984;33:158-165
 28. Guzmán MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:621-627
 29. Instituto Pedro Kouri. La Habana, Cuba. Laboratorio de Arbovirus. Departamento de Virología. Centro Colaborador de la OPS/OMS para el estudio de las Enfermedades Víricas. Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del virus del dengue. 2001.:44-51
 30. Hober D, Nguyen TL, Shen L, Ha DQ, Huong VT, Benyoucef S, et al. Tumor necrosis factor alpha levels in plasma and whole-blood culture in dengue-infected patients: relationship between virus detection and pre-existing specific antibodies. *Journal of Medical Virology* 54:210-218, 1998.
 31. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgraduate Medical Journal* 80:588-601, 2004.
 32. Juffrie M, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJP. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secret phospholipase A2. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 65:70-75, 2001.

33. Kittigul L, Temprom W, Sujirarat D, Kittigul C. Determination of tumour necrosis factor- α levels in dengue virus infected by sensitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of virological methods* 90:51-57, 2000.
34. Gagnon SJ, Mori M, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanaraj S, et al. Cytokine Gene Expression and Protein Production in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Children With Acute Dengue Virus Infections, *J Med Virol* 67:41-46, 2002.
35. Sekut L, Menús A, Fr, Braceen MF, Conolly KM. Evaluation of the significance of elevated levels of systemic and localized tumor necrosis factor in different animal models of inflammation. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 124:813-820, 1994
36. Restrepo BN, Isaza DM, Salazar CL, Ramírez R, Ospina M. Niveles séricos de IL-6, TNF- α e IFN- γ en niños menores de 1 año y gestantes con y sin dengue. [tesis de maestría], Instituto de Ciencias de la Salud-CES, 2003

12. ANEXOS

12.1. CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN VOLUNTARIA

Yo _____

Con CC _____ de _____

Acepto participar en forma voluntaria en el proyecto: “Estudio comparativo de los niveles en suero de Interferón-gama, Interleuquina-6, Factor de necrosis tumoral-alfa, en pacientes de raza mestiza con dengue. Antioquia” el cuál será llevado a cabo por investigadores del instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES. Entiendo que el estudio tiene como finalidad conocer algunas características personales que pueden propiciar la presentación de síntomas y signos graves del dengue y para ello me serán tomadas 2 muestras de sangre para la confirmación de la enfermedad y 4 ó 5 muestras para estudiar las citoquinas. Cada muestra será de 4ml y será realizado el procedimiento por personal entrenado.

Además se revisará la historia clínica para la recolección de datos referentes al dengue. Los exámenes no tendrán ningún costo. Los datos recolectados serán confidenciales. Los resultados del diagnóstico me serán suministrados. No recibiré ninguna remuneración económica y tengo la autonomía de retirarme del proyecto en el momento que considere necesario.

Firma del participante _____

Firma del investigador _____

Firma del testigo _____

11.2. FORMULARIO

Estudio comparativo de los niveles en suero de Interferón-gama, IL-6 y TNF-alfa en pacientes de raza blanca con dengue

Numero de la encuesta: □□□ Fecha de inscripción: Día □□ Mes □□ Año □□

1. Raza: Mestizo americano

Ciudad: _____

Institución de Salud: _____

Historia Clínica #: _____

2. Edad (años cumplidos): □□

3. Sexo 1. Hombre 2. Mujer

Fecha de inicio de síntomas: Día □□ Mes □□ Año □□

4. Síntomas y signos del dengue

Síntomas y signos	Fecha		Fecha		Fecha	
	Res	Val	Res	Val	Res	Val
Resultados y valores						
Fiebre						
Cefalea						
Dolor retro-ocular						
Mialgias						
Artralgias						
Escalofrió						
Astenia						
Anorexia						
Erupción						
Náuseas y vómitos						
Epigastralgia/dolor abdominal						
Linfadenopatias						
Congestión nasal/rinorrea						
Congestión faríngea						
Dolor de garganta						
Congestión ocular						

Hiperalgnesia cutánea						
Petequias						
Púrpura/equimosis						
Epistaxis						
Hematemesis						
Melenas						
Metrorragias						
Hematuria						
Hemorragia gingival						
Ascitis						
Edemas en extremidades (rln)						
Anasarca (rln)						
Derrame Pleural						
Hepatomegalia						
Esplenomegalia						
Prueba del torniquete positiva						
Hospitalizado por dengue						

		Fecha		Fecha		Fecha	
Síntomas y signos		Res	Val	Res	Val	Res	Val
Choque							
Presión arterial							
Pulso							
Obs	1. Enf alérgicas						
	2. Enf crónicas						
Muerte por dengue							

5. Diagnóstico por:

- | | | | | | | |
|---------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------|
| | Día | Mes | Año | | | |
| 1. IH 1 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 1. <input type="checkbox"/> Positiva (Títulos) | 2. <input type="checkbox"/> Negativa | 9. <input type="checkbox"/> SD |
| 2. IH 2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 1. <input type="checkbox"/> Positiva (Títulos) | 2. <input type="checkbox"/> Negativa | 9. <input type="checkbox"/> SD |

3. Aisl viral 1. Positivo 2. Negativo 9. SD

4. IgM Primera semana

1. Positivo 2. Negativo 9. SD

Segunda semana

1. Positivo 2. Negativo 9. SD

6. Serotipo aislamiento viral _____

7. Anticuerpos IgG contra el virus del dengue 1. Positivo 2. Negativo

8. Exámenes de laboratorio relacionados con el dengue, 2005-2006

Exam	Fecha1	Res1	Fecha 2	Res2	Fecha 3	Res3	Fecha 4	Res4	Fecha 5	Res5
Hcto										
Hb										
Alb										
TP										
TPT										
Plaq										
ALT										
AST										

Examen	Hcto	Hb	Alb	TP	TPT	Plaq	ALT	AST
Valores de referencia								

9. Resultados de niveles de citoquinas, 2006

Exam	Fecha1	Res1	Fecha 2	Res2	Fecha 3	Res3	Fecha 4	Res4	Fecha 5	Res5
IL-6										
TNF										
IFN										

Examen	IL-6	TNF-alfa	IFN-gama
Valores de referencia			

10. Diagnóstico definitivo: 1. DC 2. DH (Grado I II) 3. Choque (Grado III IV)
4. Indiferenciado 9. SD

