

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE METILPREDNISOLONA
SOBRE EL NIVEL DE CITOCINAS EN PACIENTES CON
SÍNDROME FEBRIL AGUDO TIPO DENGUE**

CAROLINA CORONEL RUIZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2009**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE METILPREDNISOLONA
SOBRE EL NIVEL DE CITOCINAS EN PACIENTES CON
SÍNDROME FEBRIL AGUDO TIPO DENGUE**

CAROLINA CORONEL RUIZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Magíster
en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Director:
MD, MSC. LUIS ANGEL VILLAR CENTENO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2009**

PROYECTO TITULADO:

"EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA METILPREDNISOLONA SOBRE EL NIVEL DE CITOCINAS EN PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL AGUDO TIPO DENGUE"

PRESENTADO POR:

CAROLINA CORONEL RUIZ

DIRECTOR:

Doctor Luis Ángel Villar Centeno

CALIFICADOR:

Doctora Bertha Nelly Restrepo Jaramillo

CALIFICADOR:

Doctor Jaime Eduardo Castellanos Parra

DEDICATORIA

A Dios por acompañarme a lo largo de mi vida, por escucharme, darme la fuerza y la serenidad para continuar luchando para lograr mis objetivos, y porque me permites aprender algo nuevo cada día.

A ti mamá, que desde el primer momento de mi vida me enseñaste el verdadero valor de la vida, por brindarme tu amor y tus sabios consejos.

A ti papá, por tu apoyo incondicional y por tu ejemplo de esfuerzo y dedicación.

A mis hermanas Karime y Claudia, mis grandes amigas, por estar siempre a mi lado, por compartir conmigo alegrías, tristezas, logros y sueños.

A mis amigos por compartir conmigo esta experiencia, por su apoyo y constante cooperación.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Luis Ángel Villar por su orientación, dedicación e interés durante mi proceso de formación.

Ruth Martínez, Fredi Díaz, por su colaboración en la coordinación del proyecto y por su orientación.

Andrea Gómez, Andrés González, Reinaldo Espíndola, Diana Tiga, Lizmary Herrera, Dorian Niño, Silvana Orozco, Ronald Díaz por su colaboración en la captación y seguimiento de los pacientes.

Al Laboratorio Clínico de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, directoras, bacteriólogas, técnicos, secretarias, por su invaluable colaboración durante el período de captación y seguimiento de los pacientes.

TABLA DE CONTENIDO

pág.

INTRODUCCIÓN	15
1. JUSTIFICACIÓN	17
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 Epidemiología	19
2.2 Vector	22
2.3 Virus	23
2.4 Manifestaciones clínicas	24
2.5 Patogénesis.....	28
2.6 Diagnóstico.....	33
2.7 Tratamiento.....	34
3. INTERVENCIÓN POR EVALUAR.....	37
3.1 Metilprednisolona:.....	37
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	39
5. OBJETIVOS	40
5.1 Objetivo General.....	40
5.2 Objetivos Específicos.....	40
6. DISEÑO	41
6.1 Población.....	42
6.2 Asignación de los pacientes.....	45
6.3 Intervenciones	45
6.4 Variables.....	47
6.5 Tamaño de muestra.....	48
6.6 Aleatorización	49
6.7 Captación y seguimiento.....	51

6.8	Procesamiento de las muestras	55
6.9	Determinación de los niveles de citocinas.....	56
6.10	Diagnóstico.....	58
6.11	Recolección y almacenamiento de la información.....	58
6.12	Análisis de datos.....	58
6.13	Disposiciones éticas vigentes	59
7.	PRESUPUESTO.....	61
8.	RESULTADOS	62
9.	DISCUSIÓN	75
9.1	Hallazgos principales.....	75
9.2	Hallazgos secundarios.....	75
9.3	Limitaciones.....	77
	CONCLUSIONES	79
	BIBLIOGRAFÍA	80

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Efecto de los glucocorticoides sobre los componentes de las reacciones inflamatoria/inmunitaria.	38
Cuadro 2. Escala diagnóstico clínico de dengue	43
Cuadro 3. Dosis de Metilprednisolona o placebo administradas de acuerdo al peso del paciente.....	46
Cuadro 4. Número de sobres placebo de N-acetilcisteína administrados de acuerdo al peso del paciente.	47
Cuadro 5. Aleatorización de los pacientes del proyecto "Evaluación de la eficacia y Seguridad de la Metilprednisolona y la N-acetilcisteína para disminuir la severidad en Dengue".	49
Cuadro 6. Procedimiento realizado de acuerdo al puntaje obtenido en la escala	56
Cuadro 7. Métodos determinación citocinas.....	57
Cuadro 8. Distribución basal de las variables en los pacientes intervenidos con MTP o Placebo	64
Cuadro 9. Niveles de citocinas basales y post intervención en el grupo de pacientes intervenidos con MTP o con placebo.....	68
Cuadro 10. Niveles de citocinas basales en el grupo de pacientes con diagnóstico de dengue o con SFA.	69
Cuadro 11. Asociación de los niveles de citocinas basales y recuento de plaquetas	74
Cuadro 12. Asociación de los niveles de citocinas basales y recuento de leucocitos.....	74

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Grupos de intervención proyecto “Evaluación de la eficacia y Seguridad de la Metilprednisolona y la N-Acetilcisteína para disminuir la severidad en Dengue”. Ensayo clínico 2X2.....	41
Figura 2. Captación y seguimiento.....	54
Figura 3. Distribución de los individuos intervenidos con MTP o Placebo de acuerdo a la edad	63
Figura 4. Distribución de los individuos intervenidos con MTP o Placebo de acuerdo al diagnóstico	66
Figura 5. Niveles de citocinas basales en pacientes con SFA tipo dengue	67
Figura 6. Niveles basales de IL-1 β en el grupo de pacientes con diagnóstico de dengue o con SFA	70
Figura 7. Niveles basales de IL-6 en el grupo de pacientes con diagnóstico de dengue o con SFA	70
Figura 8. Niveles basales de IL-8 en el grupo de pacientes con diagnóstico de dengue o con SFA	71
Figura 9. Niveles basales de TNF- α en el grupo de pacientes con diagnóstico de dengue o con SFA	71
Figura 10. Niveles basales y post-intervención de TNF-alfa en el grupo de pacientes intervenidos con MTP o placebo	72
Figura 11. Niveles basales y post-intervención de IL-6 en el grupo de pacientes intervenidos con MTP o placebo.....	73

LISTA DE ANEXOS

pág.

Anexo 1.	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ACLARAR LA CAUSA DEL SINDROME FEBRIL AGUDO. Universidad Industrial de Santander – COLCIENCIAS	94
Anexo 2.	CONSENTIMIENTO INFORMADO UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER-COLCIENCIAS ENSAYO CLÍNICO: EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA METILPREDNISOLONA Y LA N-ACETILCISTEÍNA PARA DISMINUIR LA SEVERIDAD EN DENGUE	98
Anexo 3.	ACTA 34 DE NOVIEMBRE DE 2005. EL SUSCRITO SECRETARIO EJECUTIVO DE LA SALA ESPECIALIZADA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS DE LA COMISIÓN REVISORA.....	106
Anexo 4.	Definición operativa de las variables	108
Anexo 5.	FORMATO CLÍNICO PARA ENVIÓ DE MUESTRAS. ECA CIE-UIS COLCIENCIAS	110

Título: Efecto de la administración de Metilprednisolona sobre el nivel de citocinas en pacientes con Síndrome Febril Agudo tipo dengue*

Autor: Carolina Coronel-Ruiz**

Palabras clave: Síndrome Febril Agudo, Dengue, Metilprednisolona

Objetivo: Determinar si en individuos con síndrome febril agudo tipo dengue los niveles de citocinas (IL-6, TNF- α) difieren en el grupo que recibe Metilprednisolona comparado con el grupo control.

Materiales y Métodos: Ensayo Clínico Factorial 2x2, en pacientes de 5 años o más, con síndrome febril agudo tipo dengue de ≤ 120 horas, provenientes del área Metropolitana de Bucaramanga. Se realizó aleatorización estratificada por edad ($<15/\geq 15$ años) y recuento de plaquetas ($\leq 100.000/>100.000$ plaquetas/ mm^3) a una de 4 combinaciones (Metilprednisolona-N-acetilcisteína, Metilprednisolona-placebo, N-acetilcisteína-placebo, placebo Metilprednisolona - placebo N-acetilcisteína). Se tomó suero en la evaluación basal (pre-intervención) y entre las 48 y 72 horas post-intervención, se almacenó a -70°C hasta la determinación de los niveles de citocinas a través de ensayo inmunométrico enzimático en fase sólida por quimioluminiscencia. El diagnóstico se realizó por ELISA IgM en muestra pareada, aislamiento viral, RT-PCR.

Resultados: 49 sujetos fueron incluidos en el grupo MTP + Placebo NAC, y 49 en el grupo Placebo MTP + Placebo NAC. No se encontró diferencias en los niveles basales de citocinas entre los grupos TNF- α ($p=0.50$), IL-1 β ($p=0.26$), IL-8 ($p=0.89$). Se encontró diferencia en los niveles basales de IL-6 ($p=0.034$). En el análisis bivariado no se encontró asociación entre los niveles de citocinas y la intervención. Se realizó ANOVA de mediciones repetidas para determinar si los niveles de citocinas se asocian con el recuento de plaquetas y el recuento de leucocitos durante el seguimiento. Se encontró asociación negativa entre los niveles de TNF- α , IL-6, IL-8 y el recuento de plaquetas (coeficientes -120881.1, -14647.34, -3272.42 respectivamente, $p<0.001$). Se observó asociación positiva entre IL-1 β y el recuento de leucocitos (coeficiente 15449.86, $p=0.002$), mientras IL-8 presentó asociación negativa (coeficiente -84.83932, $p=0.001$).

Conclusión: En el ensayo clínico no se evidenció el efecto de la administración de Metilprednisolona sobre los niveles de IL-6 y TNF- α .

* Proyecto de grado

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Director: MD, MSc. Luis Ángel Villar Centeno

Title: Effect of Methylprednisolone on cytokine levels in patients with acute febrile dengue-like syndrome*

Author: Carolina Coronel Ruiz**

Keywords: Acute febrile syndrome, Dengue, Methylprednisolone

Objective: to determinate if IL-6 and TNF- α levels are different in patients with acute febrile dengue-like syndrome who receive Methylprednisolone compared to placebo.

Methods: Factorial 2*2 clinical trial in patients from the metropolitan area of Bucaramanga older than 5 years with acute febrile dengue-like syndrome within the first 120 hours of evolution. Patients were assigned using stratified random allocation regarding age (<15/ \geq 15 years) and platelet count (\leq 100.000/ $>$ 100.000 cells/mm³) to one of four groups: (Methylprednisolone – N-acetylcysteine, Methylprednisolone – Placebo NAC, N-acetylcysteine – Placebo MTP, or Placebo MTP - Placebo NAC). Serum samples were taken at baseline evaluation and between 48 and 72 hours post intervention, and stored at -70°C until measurement of cytokine levels using sequential solid-phase chemo-luminescence enzymatic assay. Diagnosis of dengue was carried out using IgM ELISA on paired samples, viral isolation or RT-PCR.

Results: 49 patients were allocated to each treatment group. No differences were found between the two groups in baseline levels of TNF- α ($p=0.50$), IL-1 β ($p=0.26$) and IL-8 ($p=0.89$), but baseline IL-6 levels were statistically different ($p=0.034$). On bivariate analysis no relation was found between cytokine levels and treatment. Repeated-measures ANOVA was done to determinate if cytokine levels were correlated with platelet count during follow up. TNF- α , IL-6 and IL-8 were negatively associated, while IL-1 β was positively associated. Repeated-measures ANOVA was done to determinate if cytokine levels were correlated with platelet and leukocyte counts during follow up. TNF- α , IL-6 and IL-8 levels were negatively associated with platelet counts (coefficients -120881.1, -14647.34, and -3272.42 respectively, $p<0.001$); IL-8 levels were negatively associated with leukocyte counts (coefficient -84.83932, $p=0.001$), and IL-1 β levels were positively associated with leukocyte counts (coefficient 15449.86, $p=0.002$).

Conclusion: This clinical trial could not establish the effect of methylprednisolone on IL-6 and TNF- α levels.

* Proyecto de grado

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Director: MD, MSc. Luis Ángel Villar Centeno

INTRODUCCIÓN

Dengue es la arbovirosis humana que causa mayor morbilidad en el mundo. La infección por dengue es transmitida por la picadura de un mosquito *Aedes aegypti*, el cual se encuentra en áreas tropicales y subtropicales, afectando más de 100 millones de personas cada año y aproximadamente 2500 - 3000 millones de personas alrededor del mundo se encuentran en riesgo de infección(1-5).

La infección por dengue puede ser asintomática o causar dos formas de la enfermedad: la primera se caracteriza por un síndrome febril que comprende un espectro de manifestaciones como dolor de cabeza, dolor retroorbital, mialgias, artralgias, y en algunos casos manifestaciones hemorrágicas. La segunda forma de la enfermedad conocida como dengue hemorrágico, se caracteriza por la presencia de signos hemorrágicos, hemoconcentración, y evidencia de extravasación plasmática. En los últimos años se ha observado en el sudeste de Asia y en América, cuadros atípicos de dengue con compromiso de órganos específicos como el sistema nervioso central, el hígado, y el miocardio asociados a mortalidad (26-30).

La patogénesis de la enfermedad se encuentra relacionada con alteraciones en la regulación de la respuesta del sistema inmune ante la infección, específicamente el incremento en los niveles de citocinas y la alteración del endotelio, que juegan un rol importante en los problemas hemostáticos de los pacientes con dengue. Los estudios realizados in vitro, y realizados en pacientes con dengue, reportan el incremento en los niveles de algunas citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (38-60).

Debido a la ausencia de terapia antiviral específica, el manejo de la enfermedad se basa en medidas de soporte hídrico y manejo de los síntomas. Se ha propuesto el uso de corticoides para tratamiento en dengue, por sus propiedades

antiinflamatorias. Se han desarrollado estudios en individuos que presentan complicaciones asociadas a la enfermedad como Síndrome de Choque por Dengue (SCD) (76-81). Sin embargo, se carece de estudios que evalúen la eficacia de la administración temprana de corticoides en la enfermedad, y la relación de la administración del corticoide con los niveles de mediadores de respuesta inflamatoria.

1. JUSTIFICACIÓN

Dengue es la arbovirosis humana que causa mayor morbilidad y mortalidad en el mundo. Se estima que más de cien millones de personas son infectadas por este virus cada año, por lo que se ha convertido en un importante problema de salud pública. Durante las últimas décadas América ha registrado un aumento en el número de casos de dengue, especialmente países como Brasil, Colombia, Cuba, Ecuador, Perú y Venezuela (1-7).

En Colombia el dengue es una enfermedad endemo-epidémica en zonas por debajo de los 1800 metros sobre el nivel del mar, por lo que gran parte de nuestra población está en riesgo de presentarla. En el departamento de Santander el número de casos de dengue se ha incrementado en los últimos años. El diagnóstico de la infección por virus dengue es el más común en los pacientes que consultan a los servicios de urgencias de Bucaramanga y su área metropolitana (8-11).

En la infección por dengue el proceso de patogénesis no se conoce en su totalidad. Se considera que el proceso está asociado a la sensibilización en la primoinfección, en la cual los anticuerpos producidos no confieren inmunidad permanente para los cuatro serotipos, ocasionando que la infección por otro serotipo del virus pueda producirse. El riesgo de presentar las formas severas de la enfermedad se asocia con la infección secundaria. En enfermedades infecciosas caracterizadas por el desarrollo de procesos inflamatorios como sepsis y meningitis la determinación de los niveles de citocinas constituye una herramienta eficaz para conocer los mecanismos de respuesta del individuo frente a diferentes microorganismos e identificar las reacciones que se presentan en los pacientes cuando existe una respuesta exagerada de éstos mediadores de repuesta inflamatoria. En el caso de la infección por dengue las citocinas son liberadas directamente por las células infectadas o por la interacción entre estas

células y otras células del sistema inmune. Se han asociado niveles elevados de IL-6, TNF- α , e IL-8 con el desarrollo de dengue hemorrágico. Algunos estudios sugieren que la alteración del endotelio y los elevados niveles de citocinas en la infección por dengue son los responsables de la alteración del proceso de coagulación. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual las citocinas inducen el proceso de extravasación plasmática (38-60).

Ante la ausencia de tratamiento antiviral específico y el desarrollo de complicaciones durante el curso de la enfermedad, en la actualidad el tratamiento estándar para el manejo de las formas severas de la enfermedad consiste en la administración de líquidos endovenosos para corregir las alteraciones hemodinámicas. Se han desarrollado estudios en los que se administran corticoides en pacientes con síndrome de choque por dengue, los cuales evalúan como principales desenlaces muerte, días de hospitalización, número de complicaciones, necesidad de transfusión (76-81). Sin embargo, no se ha estudiado la eficacia de los corticoides administrados tempranamente en pacientes con dengue. En consecuencia, el propósito del presente estudio es evaluar el efecto de la Metilprednisolona en los niveles de citocinas en pacientes con síndrome febril agudo tipo dengue.

2. MARCO TEÓRICO

El dengue es una enfermedad causada por un arbovirus que se encuentra ampliamente distribuido en más de cien países del mundo, el cual es transmitido a humanos a través de la picadura de un mosquito infectado de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. La incidencia y distribución geográfica del dengue se han incrementado gradualmente en los últimos años en los centros urbanos de las zonas tropicales y subtropicales del planeta debido a diversos factores ecológicos, climáticos, culturales y socioeconómicos de dichas regiones, y actualmente constituye la arbovirosis más frecuente alrededor del mundo, convirtiéndose en un problema de salud pública (1-5).

2.1 Epidemiología

Durante el siglo XIX, la infección por virus dengue fue considerada como una enfermedad esporádica, causante de brotes en intervalos de tiempo prolongados (6-7).

La primera epidemia de dengue hemorrágico en el sudeste de Asia ocurrió en 1954 en Manila, Filipinas, luego de la cual se reportaron otras en países cercanos (6). En la década de los 80 el reporte de casos de dengue aumentó en cinco veces comparado con las anteriores (6). Estudios desarrollados en Indonesia determinaron que DENV-1 y DENV-2 fueron los serotipos circulantes en ésta región durante esta década, mientras que en los últimos años DENV-3 ha predominado y se encuentra asociado con los casos severos de dengue, por lo que se ha postulado que este serotipo podría tener algunas propiedades que le confieran mayor virulencia. DENV-4 se ha aislado en la mayoría de epidemias y es el serotipo detectado en mayor proporción en infecciones secundarias (6-7).

En el sur de Asia los primeros reportes de casos de dengue hemorrágico se realizaron entre 1964 y 1966, y la primera epidemia se reportó en Sri Lanka en

1989, luego de la cual el número de casos de dengue se ha incrementado cada año. DEN-3 fue el serotipo responsable de las epidemias en Sri Lanka junto con DENV-2 (7). En India los primeros reportes de dengue se realizaron en 1991 y la primera epidemia de dengue hemorrágico ocurrió en 1996. Actualmente el comportamiento de la enfermedad en el sur de Asia es similar al que se presenta en el sudeste de Asia, aunque algunos de los países asiáticos han implementado programas para el control del vector, disminuyendo la incidencia de la enfermedad. En el este de Asia, China es el país más afectado por dengue mientras que en otros países de la región no se han reportado casos. La primera epidemia de dengue en China ocurrió en 1978, a partir de ésta se reportó una epidemia en las Islas Hainan entre 1985 y 1986. En esta región de Asia la tasa de mortalidad es menor, comparada con el resto del continente. Actualmente la infección por dengue constituye una de las diez principales causas de hospitalización en los países asiáticos, principalmente en niños menores de 15 años (7).

La primera epidemia de dengue en América se inició en 1827 en las Islas Vírgenes y posteriormente se extendió a países como Cuba y Venezuela. Los casos de dengue continuaron presentándose en el Caribe entre 1885 y 1920 (6-7). En 1897 tanto en la Habana como en Texas se reportaron epidemias (6). En la década de 1960 se documentaron epidemias en el Caribe ocasionada por DENV-3 (1962-1963) y por DENV-2 y DENV-3 (1968-1969). En 1970 se documentó la presencia de DENV-2, y de DENV-3 principalmente en Colombia y Puerto Rico. Entre 1977-1978 se registró la introducción de DENV-1 en América, inicialmente en Jamaica y posteriormente se extendió a otras islas del Caribe, a América Central y América del Sur. En 1978 ocurrió una epidemia en Cuba producida por DENV-1, la cual afectó medio millón de personas, principalmente en el oriente de este país (6). Posteriormente, en el segundo trimestre de 1981, se desarrolló una epidemia de dengue hemorrágico causada por DENV-2 que afectó cerca de 10 millones de personas (6-7). La mayor parte de los casos correspondieron a infecciones

secundarias y el grupo de edad entre los 5 y 10 años presentó las mayores tasas de incidencia (6). La introducción de DENV-1 en América, ocasionó brotes de dengue hemorrágico en Cuba, Colombia, Brasil, Venezuela, Guyana Francesa y Puerto Rico. La incidencia y distribución geográfica del dengue se han incrementado gradualmente en las últimas cinco décadas, principalmente en el sudeste de Asia, América Central, Suramérica, y África. Actualmente la enfermedad es endémica en 112 países. La Organización Mundial de la Salud estima que alrededor de 2.500 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la infección, principalmente en áreas urbanas de regiones tropicales y subtropicales. De acuerdo con la OMS, anualmente ocurren al menos cien millones de casos de dengue y 500000 casos de dengue hemorrágico, con una tasa de mortalidad de 0,5 a 3,5%, principalmente en los países asiáticos (1-5).

En Colombia, los primeros casos de dengue se reportaron en los años setenta ocasionados por DENV-1, DENV-2, y DENV-3 (6). La circulación de DENV-4 fue notificada en 1986 (6-7). En la década de 1990, la incidencia de dengue, dengue hemorrágico y muerte por dengue se incrementó. En el 2004, Colombia fue el país de América con mayor número de casos de dengue hemorrágico y muertes por esta causa. En el 2006, se presentaron 38.795 casos de dengue, mientras que en el año 2007, se observó un incremento del 12% en el número de casos reportados en el país, durante el cual se notificaron al SIVIGILA 43.541 casos de dengue, de los cuales 89% (n=38.895) corresponden a dengue clásico y 11% (n=4.646) corresponden a dengue hemorrágico. En el 2007, el 75% de los casos de dengue reportados al SIVIGILA corresponden a los departamentos de Antioquia, Atlántico, Casanare, Cesar, Cundinamarca, Huila, Meta, Norte de Santander, Santander y Valle (8-10).

En el departamento de Santander el dengue es una enfermedad endémica con epidemias cada 2 a 3 años. Entre 1998 y 2004 la Secretaría de Salud departamental reportó 45.823 casos de dengue, de los cuales 4.634 casos se

consideraron como dengue hemorrágico (11). En el año 2007, la secretaría de salud reportó un total de 4.456 casos de dengue, de los cuales 3.126 casos corresponden a dengue clásico y 1330 casos corresponden a dengue hemorrágico. En la actualidad, Bucaramanga, Girón, Floridablanca y Piedecuesta constituyen cuatro de los trece municipios híperendémicos del país (8).

La situación de dengue en América ha empeorado en los últimos 20 años, con el incremento del número de casos y de los países afectados, y una mayor frecuencia de las manifestaciones severas del dengue hemorrágico y de síndrome de choque por dengue. En Colombia, la infección por dengue constituye un problema prioritario en salud pública debido a la transmisión continua de la enfermedad, el comportamiento de los ciclos epidémicos cada dos o tres años, el aumento en la frecuencia de los brotes de dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue, la circulación simultánea de los cuatro serotipos y la presencia de *Aedes aegypti* en el 90% del territorio nacional, en zonas situadas por debajo de los 2200 metros sobre el nivel del mar, y al proceso de desplazamiento forzado ocasionado por la violencia (11).

2.2 Vector

La transmisión del virus dengue involucra dos especies de mosquitos, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, procedentes de los bosques de Asia y África. El ciclo urbano-epidémico es la forma más importante de transmisión en los países tropicales y subtropicales. El vector principal, *Aedes aegypti*, se reproduce en contenedores de aguas de sitios domésticos y peri-domésticos, incrementando la frecuencia de contacto entre mosquitos y humanos (12 - 14).

El tamaño y el estadio biológico del vector constituyen dos parámetros esenciales para la dinámica de transmisión del virus. De igual forma, diversos factores como la temperatura, los períodos de lluvia, la capacidad de reproducción del vector y la

forma de alimentación son factores que contribuyen a la infección de los mosquitos por el virus dengue. Se ha sugerido que la alta densidad del vector en zonas endémicas es producto de la expansión geográfica que ha ocasionado el crecimiento no planificado de asentamientos urbanos, el cual se encuentra asociado con condiciones de hacinamiento, y la carencia de servicios sanitarios como los de recolección de desechos sólidos, suministro de agua potable y atención médica, lo cual ha generado las condiciones óptimas para el crecimiento de larvas, el desarrollo del vector y por consiguiente el aumento en la incidencia de la enfermedad (13-14).

En el momento en el cual la hembra adulta pica a un humano infectado el virus entra, replicándose inicialmente en el intestino y posteriormente se disemina hacia el torrente circulatorio, hemolinfa, cuerpo graso, esófago, glándulas salivares y demás tejidos del insecto. Una vez el mosquito adquiere el virus permanece infectado y asintomático toda su vida (14).

El período de incubación del virus dentro del mosquito es de 7 a 14 días. Una vez el virus se replica en las glándulas salivares, el mosquito puede transmitir el virus a otro humano a través de su picadura (13). La cantidad de sangre tomada por el vector y por lo tanto el tamaño del inóculo influyen en el periodo de diseminación del virus y su capacidad de alcanzar las glándulas salivares. Así mismo, la temperatura del ambiente y la humedad relativa afectan la replicación del virus en el mosquito. La velocidad de replicación se incrementa en períodos de lluvia, y disminuye con el incremento de la temperatura (13).

2.3 Virus

El virus dengue es un virus RNA de cadena sencilla de polaridad positiva perteneciente a la familia Flaviviridae, clasificado antigénicamente en cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) (15). Su genoma contiene

aproximadamente 10.600 nucleótidos (16). El virus maduro es esférico y la envoltura viral tiene un diámetro aproximado de 50 nm, está compuesto por tres proteínas estructurales: proteína C, proteína M, y proteína E, y por siete proteínas no estructurales: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. Las proteínas NS se encuentran asociadas a la replicación del RNA viral (16). La proteína NS1 se expresa en la superficie de las células infectadas, sus niveles plasmáticos se correlacionan con la carga viral y es detectable en la fase aguda de los pacientes con infección secundaria, por lo que se sugiere que podría contribuir a la formación de los complejos inmunes característicos de la forma severa de la enfermedad. La proteína NS3 se encuentra involucrada en el ensamblaje del virus y posee actividad de proteasa, helicasa, y NTPasa, mientras que la proteína NS5 tiene actividad de RNA polimerasa. La actividad de las proteínas NS2a, NS2b, NS4a, NS4b no se conoce claramente (17-19). Estas proteínas se conservan en los cuatro serotipos del virus, por lo cual es posible diseñar compuestos que sean activos contra todos los serotipos del virus.

2.4 Manifestaciones clínicas

La infección por dengue puede ser asintomática o conducir a un amplio rango de manifestaciones que incluyen síndrome febril indiferenciado, dengue clásico, dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue. Las manifestaciones clínicas del dengue dependen de la edad del paciente: los infantes y niños menores de 15 años presentan síndrome febril indiferenciado, el cual puede estar acompañado de exantema, mientras que el dengue clásico es común en niños mayores de 15 años y adultos (26-30). La enfermedad se caracteriza por el desarrollo de fiebre cuya duración varía entre dos y siete días, acompañada de signos y síntomas inespecíficos como dolor de cabeza, dolor retroocular, mialgias, artralgias, exantema, náuseas, vómito y linfadenopatía (26-28), y en algunos casos se ha reportado además la presencia de manifestaciones hemorrágicas menores como petequias, epistaxis, gingivorragia, hematuria y menorragia. Una característica importante durante la enfermedad es el desarrollo de leucopenia,

linfocitosis y moderada trombocitopenia (29,30). El período de recuperación se encuentra asociado con fatiga y depresión, y es más prolongado en adultos (28-30).

En el sudeste de Asia dengue hemorrágico en niños, mientras que en América se observa en todos los grupos de edad. Aproximadamente 250.000-500.000 personas desarrollan la forma severa de la enfermedad cada año, la cual

se caracteriza por el desarrollo de fiebre alta, manifestaciones hemorrágicas y signos de falla circulatoria. Si bien en la fase febril es similar al dengue clásico, posterior a éste periodo se presentan sus manifestaciones distintivas.

La principal característica del dengue hemorrágico constituye el proceso de extravasación plasmática, el cual ocurre 24-48 horas después de la defervescencia y se manifiesta con taquicardia, hipotensión, hemoconcentración (incremento del hematocrito >20%) e hipoalbuminemia y se hace evidente con colección de líquido en la cavidad pleural y abdominal (26-30). Las manifestaciones hemorrágicas varían de acuerdo a la severidad de la enfermedad: al final de la fase febril se observa una prueba de torniquete positiva y la aparición de petequias, lo que sugiere que existe un incremento en la fragilidad capilar evidenciada tempranamente en los sitios de venopunción (26-30). El desarrollo de epistaxis y de sangrado gastrointestinal en la forma de hematemesis y melena constituyen las formas más comunes de sangrado severo (28). Algunos factores del hospedero tales como la preexistencia de gastritis y úlcera péptica así como el consumo de algunos fármacos pueden contribuir al sangrado gastrointestinal durante el curso de la enfermedad (28).

Cerca del 4% de los casos de dengue desarrolla hepatitis, sin embargo, el desarrollo de hepatitis fulminante es característico en dengue hemorrágico y

síndrome de choque por dengue. En menor número de casos se ha observado la presencia de casos atípicos de dengue con compromiso de órganos específicos como el sistema nervioso central, pulmones, miocardio (28).

En la mayoría de los casos de dengue se observa leucopenia, trombocitopenia e incremento de las enzimas hepáticas pese a que en los primeros días de la enfermedad sus valores son normales. Inicialmente la infección por dengue se caracteriza por una disminución en el número de neutrófilos y de monocitos. A medida que se desarrolla la enfermedad la cantidad de leucocitos disminuye y se observa un aumento en el número de linfocitos y la aparición de linfocitos atípicos (29, 30-33).

Durante la infección aguda por dengue los procesos de coagulación y de fibrinólisis se encuentran activados. Se ha reportado un incremento en el tiempo parcial de tromboplastina y reducción de la concentración de fibrinógeno en los casos de dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue acompañados de trombocitopenia (26,27).

Los mecanismos asociados con la trombocitopenia que se desarrolla en el dengue involucran la disminución en la producción de plaquetas en la médula ósea, evidenciada por el incremento de megacariocitos, y el incremento en la destrucción periférica de las mismas, principalmente en el hígado y en menor proporción en el bazo. Se ha demostrado que la destrucción de debe a la interacción entre antígeno y anticuerpo, la cual se realiza sobre la superficie de las plaquetas (30). Estudios de Phanichyakarn y col., sugieren que el complemento cumple una función en la destrucción inmune de las plaquetas en los pacientes con dengue hemorrágico. Así mismo, la agregación espontánea de las plaquetas a células endoteliales infectadas induce lisis de las células y la destrucción de las plaquetas. Otro mecanismo asociado con trombocitopenia incluye el consumo de

plaquetas durante el proceso de coagulación, el cual ocurre en pacientes con dengue hemorrágico (30).

Teniendo en cuenta la definición de caso de dengue hemorrágico establecido por la OMS (31), el paciente debe cumplir los siguientes criterios:

1. Fiebre de 2 a 7 días
2. Manifestaciones hemorrágicas: prueba de torniquete positiva, sangrado moderado a grave de piel y mucosas, petequias, equimosis, hematomas, hematemesis, hematuria, melena, metrorragia
3. Recuento de plaquetas menor $100000/\text{mm}^3$
4. Evidencia de extravasación plasmática
5. Hemoconcentración (desviación en el hematocrito $>20\%$).
6. Hipoproteinemia / Hipoalbuminemia.
7. Ascitis, derrame pleural, derrame pericárdico, evidenciada por radiografía, ecografía

De acuerdo a la severidad de la enfermedad, existen cuatro grados para la clasificación de dengue hemorrágico:

Grado I: Fiebre acompañada de síntomas inespecíficos y prueba de torniquete positiva como única manifestación hemorrágica

Grado II: Grado I + manifestaciones sangrado espontáneo

Grado III: Falla circulatoria

Grado IV: Choque severo

2.5 Patogénesis

La entrada del virus a la célula ocurre por endocitosis mediada por receptor y se caracteriza por cambios conformacionales en la proteína de envoltura del virus que favorecen la fusión de su membrana con la del endosoma (20). Durante el ensamblaje ocurre una asociación de la membrana viral con la del retículo endoplásmico.

Inicialmente se realiza el ensamblaje de las partículas inmaduras en el que la proteína M se asocia con la proteína E formando un complejo heterodimérico; posteriormente las partículas virales circulan a través del Aparato de Golgi mientras se completa el proceso de maduración antes de ser liberadas por exocitosis. La proteína M es secretada en la vía exocítica y procesada en el Aparato de Golgi generando una pequeña proteína de membrana. La proteína E, el principal componente de la superficie del virus contiene dos sitios de glicosilación Asn-67 y Asn-153. Se considera que la síntesis y el ensamblaje de la proteína E ocurre en el retículo endoplásmico, sin embargo, existe poca información sobre la participación de proteínas “chaperonas” en el plegamiento y ensamblaje de esta proteína. El proceso finaliza cuando las partículas del virus se transportan a la membrana plasmática en vesículas y son liberadas por exocitosis. Dichas vesículas son observadas en el citoplasma de las células infectadas y están asociadas con el proceso de replicación viral (21).

Una vez el virus infecta las células dendríticas en la piel tiene acceso a los órganos del sistema linfático en los cuales se replica, convirtiendo la infección en sistémica. Los tejidos y órganos blancos del virus dengue incluyen endotelio, hígado, bazo, médula ósea, músculo y neuronas (22-25).

El virus dengue puede infectar monocitos, células dendríticas y linfocitos B (33-37). Los monocitos constituyen el principal blanco en la infección por el virus, aunque éstos pueden entrar en apoptosis para prevenir la dispersión del virus disminuyendo la inflamación inducida por él mismo, siendo posteriormente fagocitados por los macrófagos (33).

Las células endoteliales cumplen una función clave en los procesos inflamatorios debido a que controlan los mecanismos de adhesión e infiltración de los leucocitos en los tejidos inflamados (33,34). Asimismo, se encuentran asociadas con la expresión de moléculas de adhesión y la producción de citocinas y quimiocinas, constituyendo un elemento importante del sistema inmune al encontrarse en contacto con células sanguíneas, citocinas circulantes, factores de crecimiento y componentes del complemento. Por otro lado, el endotelio es el principal modulador de la hemostasia al expresar moléculas involucradas en los procesos de coagulación y fibrinólisis así como producir inhibidores del proceso de coagulación sanguínea y moduladores de la fibrinólisis que inhiben la formación de trombos (20,33-37).

Las células dendríticas cumplen una función importante en la respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa en la infección por patógenos. Estas células se encuentran en todos los tejidos y son las responsables de la detección, captura y transporte del microorganismo hacia órganos linfoides secundarios, donde se realiza el proceso de presentación del antígeno (38,39). Las células dendríticas inmaduras residentes en la dermis constituyen el blanco inicial del virus dengue y

se ha propuesto que son 10 veces más permisivas que los monocitos y los macrófagos a la infección, debido a que la entrada del virus está mediada por la expresión de moléculas de superficie DC-SIGN (38,39). La infección de estas células estimula la maduración y la producción de citocinas como TNF- α e IFN- α (41-43).

Las células NK comprenden del 10 al 15% de linfocitos circulantes, constituyendo una población importante de la respuesta inmune innata. La proliferación de estas células es favorecida por la secreción de citocinas como IFN- α e IFN- β por parte de las células infectadas en tejidos y órganos. Las células NK participan en la respuesta inmune innata mediante la secreción de INF- γ , citocina involucrada en la activación de células dendríticas y macrófagos. La activación temprana de células NK es importante en la infección temprana por virus dengue, pues estas células son las responsables de la eliminación de las células infectadas mediante citólisis y citotoxicidad mediada por anticuerpos (17,71). De igual manera, están implicadas en la actividad antiviral mediante la secreción de citocinas proinflamatorias.

Los neutrófilos componen la mayor parte de la población de leucocitos en sangre periférica y representan un elemento importante en la inmunidad innata. Estas células producen TNF- α y participan en la respuesta contra las infecciones virales produciendo péptidos como defensinas, radicales de oxígeno, proteínas con actividad microbicida y quimiocinas como IL-8 y GM-CSF (44). Existe poca información sobre el papel que cumplen estas células en la infección por dengue. Sin embargo, se han cuantificado los niveles de IL-8 y de elastasa, un componente de los gránulos azurófilos de los neutrófilos en niños con infección por dengue (44-45)

En la infección por dengue la respuesta celular involucra la activación de linfocitos T CD4 y CD8 por las células dendríticas. Los linfocitos T reconocen epítopes de proteínas del virus y participan en la producción de citocinas. Asimismo, las células T están involucradas en la activación de linfocitos B, la producción de anticuerpos específicos y la respuesta de linfocitos T citotóxicos (37).

En infecciones secundarias la presencia de anticuerpos de una infección previa por un serotipo diferente favorece la replicación del virus en los monocitos, células dendríticas y macrófagos, y posteriormente realizan la presentación antigénica. A partir del proceso de presentación antigénica se inicia la activación de células de memoria que conducen a la proliferación y liberación de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-2 y TNF- α . El TNF- α es producido por las células de memoria y por monocitos infectados. Las citocinas en la infección por dengue son liberadas directamente por las células infectadas.

Se han reportado altos niveles de estas citocinas durante la fase aguda de la infección por dengue. Estas citocinas causan daño al endotelio, conduciendo a la extravasación plasmática (40). Así mismo, el daño del endotelio junto con la elevación en los niveles de citocinas constituyen la principal causa de alteración en la cascada de coagulación. Se han asociado los altos niveles de activación de células T y el aumento en la inducción de apoptosis con la severidad de la enfermedad (35).

El virus dengue infecta linfocitos B, conduce a la maduración de la célula y a la diferenciación hacia células plasmáticas y la generación de autoanticuerpos (46). De igual forma la infección de los linfocitos B induce a la producción de citocinas como IL-6 y TNF- α . Éste tipo de respuesta, acompañada de la producción de citocinas, constituye uno de los elementos relacionados con la patogénesis de la enfermedad (47-62).

La respuesta inmune humoral en infecciones virales representa un mecanismo de control de la infección y la diseminación del virus. Este tipo de regulación se manifiesta por la presencia de anticuerpos neutralizantes los cuales inhiben el ataque del virus, su internalización y posterior replicación dentro de las células (61).

En el caso de dengue los anticuerpos neutralizantes reconocen epítopes localizados en la proteína de envoltura del virus. La generación de anticuerpos contra la proteína NS1 (no estructural) se encuentra relacionada con la alteración del endotelio y se ha reportado su asociación con el desarrollo de dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue (61). Estudios realizados en pacientes con dengue severo demuestran niveles más altos de anticuerpos IgM anti-plaquetarios en el grupo que desarrolla dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue, comparado con el grupo de dengue clásico. Sin embargo, no existe asociación entre el nivel de anticuerpos con los recuentos de plaquetas. La presencia de estos autoanticuerpos sólo se ha observado en la infección por dengue (61-66). Otros estudios realizados en pacientes con dengue que buscan determinar la patogénesis de la enfermedad han demostrado que durante la respuesta humoral se producen anticuerpos IgM e IgG contra las células endoteliales (67).

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados la patogénesis de la enfermedad no se conoce completamente. Las hipótesis más aceptadas son:

- Las diferentes manifestaciones del dengue clásico, dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue pueden ser causadas por los diferentes grados de virulencia del virus. Se ha asociado alta viremia con el incremento en la severidad de la enfermedad (17-24,69).

- La infección primaria producida por un serotipo del virus dengue induce inmunidad contra la reinfección por el mismo serotipo. En una infección posterior, producida por un serotipo diferente, los anticuerpos producidos en la infección previa no pueden neutralizar las partículas virales y por el contrario permiten la entrada del virus a la célula a través del receptor Fc. Este proceso es conocido como anticuerpos potenciadores (33,68)
- Durante la infección se produce una respuesta inmune aberrante que no solamente conduce a la eliminación del virus sino que se traduce en la sobreproducción de citocinas y la fabricación de anticuerpos que poseen reacción cruzada contra proteínas tisulares (38-60). Las citocinas causan activación celular, estudios recientes proponen que existe el tipo de respuesta TH1 al inicio de la infección, y posteriormente un cambio a una respuesta tipo TH2. La generación de anticuerpos contra la proteína NS1, los cuales tienen reacción cruzada con las células endoteliales y las plaquetas, podría estar involucrada en la trombocitopenia y el desequilibrio en los procesos de coagulación y fibrinólisis responsables del riesgo elevado de sangrado. Este proceso se encuentra asociado con la hemorragia severa característica de los pacientes con dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue (61-67). Otro aspecto importante involucra el secuestro de las plaquetas por las células endoteliales, lo cual podría contribuir al desarrollo de trombocitopenia (41, 45, 50,61).

2.6 Diagnóstico

El diagnóstico de dengue se determina a partir de las manifestaciones clínicas y las pruebas de laboratorio (29-32,72,73). Los métodos utilizados para el diagnóstico incluyen serología, aislamiento viral y RT-PCR.

Las técnicas estándar para el diagnóstico serológico de la infección por dengue son la inhibición de la hemaglutinación para la detección de anticuerpos totales, ELISA para la detección de anticuerpos específicos IgM e IgG; fijación del complemento y test de neutralización. La detección de anticuerpos IgM e IgG por ELISA es ampliamente utilizada para el diagnóstico debido a que es una técnica rápida, de bajo costo y alta sensibilidad (83.9% y 98.4% para la detección de IgM) con una especificidad del 100%. Puesto que la sensibilidad aumenta a partir del sexto día de enfermedad, en la fase aguda pueden darse falsos negativos (72-73).

El aislamiento viral constituye un método de diagnóstico temprano debido a que el virus puede aislarse de muestras como suero, plasma y leucocitos. Asimismo, éste método puede utilizarse en muestras post-mortem de hígado, bazo, pulmón, ganglio linfático, líquido pleural, líquido ascítico entre otros. La sensibilidad del aislamiento del virus es alta en la fase febril y disminuye alrededor del quinto día de enfermedad, en el cual se inicia la formación de anticuerpos. Éste método es costoso, su sensibilidad es menor comparado con la RT-PCR, y requiere aproximadamente dos semanas para obtener un resultado (74).

RT-PCR es una herramienta diagnóstica útil en los primeros días de enfermedad, cuando no se detectan anticuerpos en el suero del paciente. Ésta técnica permite amplificar secuencias genómicas del virus e identificar el serotipo responsable de la infección. A pesar de su baja sensibilidad, muestra alta especificidad, por lo que es ampliamente utilizada en estudios epidemiológicos. Sin embargo, es relativamente costosa y debe ser realizada por personal capacitado en campo de biología molecular (75).

2.7 Tratamiento

Ante la ausencia de terapia antiviral específica, la OMS recomienda medidas de soporte básico para el manejo del dengue. En el caso de dengue clásico el

tratamiento consiste en aumentar el consumo de líquidos por vía oral y el uso de acetaminofén para el control de los síntomas como fiebre y mialgias. En los casos de dengue hemorrágico se recomienda soporte hídrico intravenoso, manejo sintomático y evitar el uso de fármacos que predispongan el sangrado o el desarrollo de complicaciones (76-81). En casos de trombocitopenia profunda o coagulación intravascular diseminada (CID) está indicada la transfusión de hemoderivados (76).

Debido a que la respuesta inflamatoria desempeña un papel importante en la patogénesis de dengue, se han desarrollado estudios terapéuticos enfocados a disminuir su exacerbación.

Los glucocorticoides se han utilizado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como asma, enfermedades hematológicas como púrpura trombocitopénica, algunos tipos de cáncer y alteraciones del tracto gastrointestinal. El mecanismo de acción de los glucocorticoides ocurre a través del receptor específico localizado en el citoplasma, el cual se encuentra inactivo a través de la asociación con chaperonas como hsp90. Después de la unión del glucocorticoide al receptor, la proteína hsp90 se disocia y el complejo glucocorticoide - receptor se transloca al interior del núcleo donde se une a secuencias específicas del DNA afectando la expresión de genes (82-84). Se ha propuesto el uso de corticoides debido a la capacidad de suprimir la migración de polimorfonucleares, desacelerar la activación de linfocitos, modular la diferenciación celular y revertir el incremento patológico de la permeabilidad capilar. Los glucocorticoides cumplen una función importante al direccionar la respuesta de las células T CD4 y suprimir la producción de citocinas proinflamatorias como IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-12 producidas por las células TH1 y favorecer la respuesta TH2, y por consiguiente la producción de IL-10 y TGF- β .

Se han desarrollado estudios que evalúan el efecto de la administración de un corticoide sobre el comportamiento de los niveles de los mediadores de respuesta inflamatoria en diferentes procesos inflamatorios infecciosos tales como sepsis, shock séptico, enfermedad de Kawasaki y procesos inflamatorios autoinmunes como artritis, lupus, entre otros (85-90). La administración endovenosa de Metilprednisolona en pacientes con enfermedad de Kawasaki disminuye considerablemente los niveles de IL-6 y TNF- α (85). Estudios en pacientes con Síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), el tratamiento basado en altas dosis de corticoide se encuentra asociado con la reducción de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (93).

El uso de corticoides en el manejo de dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue constituye un tema de discusión debido a que el tratamiento con corticoides no hace parte de las guías de la Organización Mundial de la Salud para el manejo de la enfermedad. A pesar de esto, los corticoides se han utilizado en algunos países, principalmente en el sudeste de Asia para el manejo de Síndrome de choque por dengue. Entre 1973 y 1993 se realizaron estudios clínicos en los cuales se evaluó la administración de corticoides en dengue, sin embargo, la mayoría de los estudios se desarrollaron en individuos menores de 15 años que presentaban Síndrome de choque por dengue en el momento de ingreso al estudio, en los cuales se evaluó el efecto de la administración del corticoide en desenlaces como muerte, número de complicaciones, días de hospitalización, necesidad de transfusión. A partir de los resultados obtenidos en los estudios clínicos, estos no constituyen evidencia suficiente para el uso de corticoides en el manejo de síndrome de choque por dengue. En la literatura es evidente la ausencia de estudios que evalúen el efecto de la administración de éste medicamento sobre los niveles de citocinas en la fase aguda del dengue.

3. INTERVENCIÓN POR EVALUAR

3.1 Metilprednisolona:

Glucocorticoide de acción sistémica, con vida media biológica intermedia (de 12 a 36 horas). Su actividad glucocorticoide es mayor y la mineralocorticoide es menor que la de la prednisolona. Se ha utilizado como agente inmunosupresor y antiinflamatorio en el manejo de enfermedades hematológicas, alérgicas, inflamatorias, neoplásicas y autoinmunes. En pacientes con alteraciones inmunitarias fulminantes como rechazo de trasplante agudo se ha utilizado en dosis de hasta 1.5 g/día (94).

La acción antiinflamatoria e inmunomoduladora de los glucocorticoides se produce por diferentes mecanismos que actúan tanto en la inmunidad humoral como en la celular. Inhiben la producción de factores de la respuesta inflamatoria sistémica, disminuyen la liberación de factores vasoactivos y quimiotácticos, así como la secreción de enzimas lipolíticas y proteolíticas, la extravasación de leucocitos y la fibrosis (Cuadro 1). Esto hace que los glucocorticoides sean moduladores del sistema inmunitario, y protegen al organismo de consecuencias letales de una respuesta inflamatoria plenamente activada (82-84, 94).

Los efectos adversos de los corticoides se han relacionado con su uso prolongado y las altas dosis. Entre ellos se encuentran hiperglucemia, hipertensión, alteración de líquidos y electrolitos, osteoporosis, entre otros. Se ha demostrado ausencia de efectos nocivos con dosis única, aunque esta sea alta (94).

Las contraindicaciones de este medicamento hacen parte de los criterios de exclusión del presente estudio: hipertiroidismo, cirrosis, osteoporosis, hipertensión, tromboflebitis, diabetes, úlcera péptica, trastorno psiquiátrico (esquizofrenia, depresión, psicosis) (94).

Cuadro 1. Efecto de los glucocorticoides sobre los componentes de las reacciones inflamatoria/inmunitaria.

Tipo de célula	Factor	Comentario
Macrófagos y monocitos	Citocinas: IL-1, IL- 6, TNF- α (citocinas que activan las células T)	Bloquean la producción y liberación
Células endoteliales	Moléculas de adherencia de leucocitos endoteliales (ELAM-1) y moléculas de adherencia intracelular (ICAM-1) Reactivos de fase aguda y citocinas	Inhiben la producción de: ELAM-1 y ICAM-1son moléculas de adherencia críticas para la localización de leucocitos.
Linfocitos	Citocinas (IL-1,IL-2,IL-3,IL-6, TNF- α , INF- γ)	Bloquean la producción y liberación

Tomada de: Hardman JG, Limbird LE editores. Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10 ed. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A. 2003. p. 1680.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la administración de una dosis oral de Metilprednisolona sobre los niveles de citocinas en pacientes mayores de cinco años con síndrome febril agudo tipo dengue de menos de 120 horas de evolución en Bucaramanga y su área metropolitana?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar si en individuos con síndrome febril agudo tipo dengue los niveles de citocinas (IL-6, TNF- α) difieren en los individuos que reciben Metilprednisolona comparado con el grupo control.

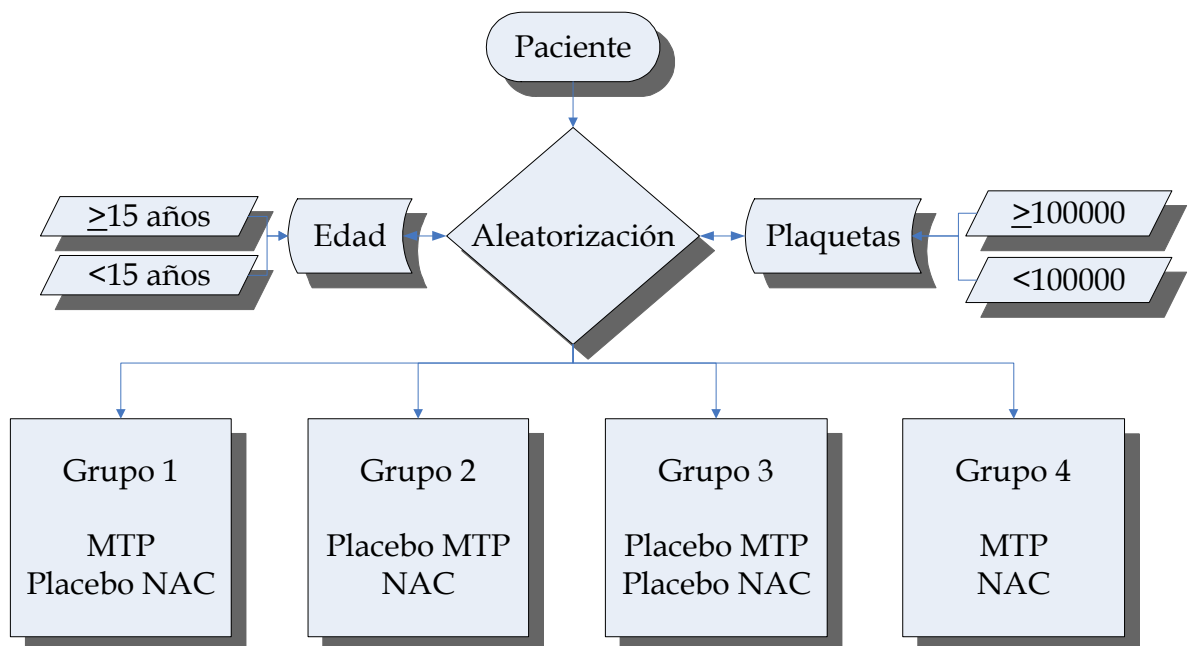
5.2 Objetivos Específicos

1. Establecer los cambios cuantitativos, en los niveles de TNF- α e IL-6, inducidos por la administración de una dosis de Metilprednisolona en pacientes con Síndrome Febril Agudo tipo dengue
2. Determinar la asociación entre los niveles de citocinas basales (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) y los niveles de plaquetas durante el seguimiento
3. Determinar la asociación entre los niveles de citocinas basales (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) y los niveles de leucocitos durante el seguimiento

6. DISEÑO

Este estudio se anidó en el proyecto macro "Evaluación de la eficacia y Seguridad de la Metilprednisolona y la N-Acetilcisteína para disminuir la severidad en Dengue", cofinanciado por COLCIENCIAS y la Universidad Industrial de Santander, código 1102-04-16433. Este estudio constituye un Ensayo Clínico Factorial 2 x 2, con enmascaramiento de los pacientes, del evaluador clínico y del bacteriólogo (Figura 1).

Figura 1. Grupos de intervención proyecto "Evaluación de la eficacia y Seguridad de la Metilprednisolona y la N-Acetilcisteína para disminuir la severidad en Dengue". Ensayo clínico 2X2.



El propósito del presente estudio es evaluar los niveles de citocinas posterior a la administración de Metilprednisolona, en los siguientes grupos:

Grupo 1: MTP- Placebo NAC (Figura 1)

Grupo 3: Placebo MTP- Placebo NAC (Figura 1)

6.1 Población

Población blanco: Pacientes mayores de 5 años con síndrome febril agudo tipo dengue en su fase temprana (de menos de 120 horas de evolución a partir del inicio de la fiebre).

Población de estudio: Pacientes mayores de 5 años de edad, residentes en Bucaramanga y su área metropolitana, que consultaron al ISABU, Hospital San Juan de Dios de Girón y la Clínica Santa Teresa, o fueron captados como sus contactos, con síndrome febril agudo tipo dengue de menos de 5 días de evolución libres de signos de extravasación plasmática

Criterios de inclusión

- Consentimiento informado. (Anexo 1, Anexo 2).
- Tolerancia a la Vía Oral (No haber presentado vómito en tres o más ocasiones en el día de ingreso).
- Historia de fiebre mayor de 72 horas, con diagnóstico clínico (≥ 7 puntos) o inmunológico de dengue.

*Escala de diagnóstico clínico de dengue.

Para optimizar el diagnóstico clínico de dengue, se propuso el uso de la escala clínica, la cual incluye la presencia en las primeras 96 horas de los siguientes hallazgos (Cuadro 2). El puntaje se asignó teniendo en cuenta el diagnóstico clínico y el resultado de las pruebas de laboratorio realizadas en las primeras 96 horas de enfermedad.

Cuadro 2. Escala diagnóstico clínico de dengue

Parámetro	Puntaje
Recuento de leucocitos de $<4.000/\text{mm}^3$	3 puntos
Recuento de plaquetas $<180.000/\text{mm}^3$	2 puntos
Exantema	1 punto
Ausencia de rinorrea	1 punto
Ausencia de diarrea	1 punto
Artralgias	1 punto
Prueba de torniquete positiva	1 punto

En un estudio previo realizado con el propósito de validar la escala clínica diseñada por el grupo de Epidemiología Clínica, se compararon los parámetros de la escala con los criterios de la OMS. La escala muestra un área bajo la curva de 81,04%, porcentaje significativamente superior al porcentaje obtenido con los criterios de la OMS. Cuando la escala suma siete puntos tiene una sensibilidad de 56,8%, especificidad de 87,3%, valor predictivo positivo (VPP) de 81,6% y un

valor predictivo negativo (VPN) de 67,1%, y cuando se obtiene un puntaje total de 9 o 10 puntos, la especificidad y el VPN alcanzan el 100% (96).

Diagnóstico serológico de la infección por virus dengue.

La infección aguda por este virus se confirmó mediante una prueba de diagnóstico rápido; para tal fin, se ha elegido la prueba para Dengue distribuida por Panbio (Brisbane, Australia), la cual detecta anticuerpos contra el virus a través de un ensayo por Inmunocromatografía. Esta prueba se corre sobre un coloide, determinando de manera separada la presencia de IgM e IgG contra el virus. La prueba ha sido evaluada previamente frente a pruebas diagnósticas convencionales como son ensayo de inhibición de la hemoaglutinación e inmunoensayo enzimático. En un metanálisis reciente mostró que su sensibilidad oscila entre 86% y 100% (97). La prueba fue evaluada en pacientes del área metropolitana de Bucaramanga después de las 72 horas de enfermedad y presentó una sensibilidad de 60,78%, especificidad de 88,89%, un VPP de 86,11% y un VPN de 41,66% (98).

Criterios de exclusión

- Evidencia de extravasación plasmática, hipotensión ó hemorragias mayores como equimosis, hematemesis, melena, rectorragia y púrpura.
- Observación:
- Si durante el seguimiento del paciente, existe una variación del hematocrito en un 20% o más, se demuestra que en el momento de ingreso del paciente al estudio presentaba evidencia de hemoconcentración.

- Intolerancia a la Vía Oral (Vómito en tres o más ocasiones al día).
- Mujeres en edad reproductiva con amenorrea mayor a 4 semanas.
- Se excluyó del grupo de intervención con metilprednisolona o su placebo (cápsulas) a los pacientes que en el momento del ingreso al estudio presentaran alguna contraindicación para el consumo de este tratamiento.
- Pacientes en período de lactancia
- Antecedentes de enfermedades como diabetes, insuficiencia suprarrenal, hipertiroidismo, enfermedad cardíaca, cirrosis, úlcera gástrica o duodenal documentada endoscópicamente y enfermedad psiquiátrica,
- Se excluyó del grupo de tratamiento de N-acetilcisteína o su placebo a aquellos pacientes con antecedente de hipersensibilidad a este fármaco.

6.2 Asignación de los pacientes

La asignación de los pacientes se realizó de forma aleatoria, estratificada por edad y recuento de plaquetas

1. Metilprednisolona (dosis oral única) - Placebo N-acetilcisteína (dos dosis orales con diferencia de 24 horas)

2. Placebo Metilprednisolona- Placebo N-acetilcisteína

6.3 Intervenciones

Metilprednisolona

Dosis única (aproximadamente 1.5 mg/kg)

Presentación: Tabletas de medrol® (metilprednisolona de Pfizer de 16 mg) empacadas en cápsulas de gelatina para conservar el enmascaramiento.

Administración: de acuerdo al peso del paciente (Ver cuadro 3)

Cuadro 3. Dosis de Metilprednisolona o placebo administradas de acuerdo al peso del paciente

Peso del paciente en Kg.	Dosis (mg)
<14	16
14 - <25	32
25 - <36	48
37 - <47	64
47 - <58	80
58 - <69	96
69 - <80	112
≥80	128

Placebo de metilprednisolona: Elaborado en el laboratorio del departamento de farmacia de la Universidad Nacional de Colombia con almidón USP y empacado

en cápsulas de gelatina. De igual manera, el número de cápsulas administradas fue asignado de acuerdo al peso del paciente (Ver cuadro 3).

Placebo de N-acetilcisteína: Sobres con polvo granular naranja libre de principio activo, empacados en sobres blancos marcados con un código único. Cada código tenía 6 sobres y fueron suministrados por el laboratorio ZAMBON.

Administración: (Ver cuadro 4).

Cuadro 4. Número de sobres placebo de N-acetilcisteína administrados de acuerdo al peso del paciente.

Peso del paciente	No. de sobres/día
Hasta 30 Kg	1
Entre 30Kg y 60 Kg	2
Mayor de 60 Kg	3

6.4 Variables

Las variables se determinaron con base en la explicación de cada uno de los objetivos del estudio (Anexo 4).

1. Niveles de citocinas en suero basal (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α).

Variable dependiente: Niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α (pg/mL)

Variable independiente: Tratamiento.

2. Modificación de la cinética de las citocinas por la intervención con Metilprednisolona

Variable dependiente: Niveles de citocinas TNF- α , e IL-6 (pg/mL) post intervención

Variable independiente Tratamiento

3. Niveles basales de citocinas como predictores de severidad.

Variable dependiente:

Recuento de plaquetas

Recuento de leucocitos

Variable independiente: Niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α (pg/mL)

6.5 Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra se determinó, considerando como principal desenlace, el efecto de la intervención sobre los niveles de IL-6 y TNF- α . El cálculo del tamaño de muestra se basó en datos de estudios realizados en pacientes con sepsis, en quienes se identificaron variaciones importantes en el curso de su enfermedad aún sin intervención (99-101).

Para el presente trabajo, se asume que la dosis alta de corticoide utilizada podría llegar a reducir los niveles de citocinas al menos la mitad de la diferencia observada en curso de procesos infecciosos agudos similares.

Con base en los supuestos señalados, la citocina que más necesitaría pacientes para su evaluación sería IL-6 que requeriría 98 pacientes, 49 en cada grupo, con un poder de 80% y un error alfa de 0,05.

6.6 Aleatorización

La aleatorización del proyecto "Evaluación de la eficacia y Seguridad de la Metilprednisolona y la N-Acetilcisteína para disminuir la severidad en Dengue", se realizó en bloques de 4 para mantener un balance en la cantidad de pacientes tratados con cada tipo de intervención, con el propósito de que por cada 4 pacientes intervenidos en el ensayo clínico cada estrato presentara 1 paciente respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Aleatorización de los pacientes del proyecto "Evaluación de la eficacia y Seguridad de la Metilprednisolona y la N-acetilcisteína para disminuir la severidad en Dengue".

INTERVENCIÓN	PACIENTES
Metilprednisolona + Placebo	1
N-acetilcisteína + Placebo	1
Metilprednisolona + N-acetilcisteína	1
Placebo + Placebo	1
Total	4

Teniendo en cuenta los cuatro posibles tratamientos se generaron hasta 24 permutaciones de bloques de cuatro, las cuales se enumeraron de 1 a 4.

Para los centros de captación de los pacientes, la clínica Santa Teresa y el grupo de atención domiciliaria, se realizó un procedimiento mediante el cual, con los

cuatro posibles tratamientos se generaron hasta 24 permutaciones de bloques de cuatro, que se enumeraron de 1 a 24. Posteriormente se generaron en computador 4 listas de 25 bloques seleccionados aleatoriamente con reemplazo. Este procedimiento generó 100 códigos de tratamiento para cada uno de los estratos.

En el momento de valoración del paciente, y posteriormente la aceptación de la participación en el estudio, el médico verificó los criterios de inclusión y de exclusión.

En el momento previo a la intervención cada médico poseía cuatro listas aleatorias que aplicó para cada uno de los siguientes estratos teniendo en cuenta la edad y el resultado del recuento de plaquetas de un cuadro hemático realizado en las últimas 24 horas.

Pacientes menores de 15 años con más de 100.000 plaquetas/ mm³.

Pacientes mayores e iguales a 15 años con más de 100.000 plaquetas/ mm³.

Pacientes menores de 15 años con un recuento de plaquetas menor ≤ 100.000 plaquetas/mm³.

Pacientes mayores e iguales de 15 años con un recuento de plaquetas ≤ 100.000 plaquetas/mm³.

Una vez el paciente era clasificado en el estrato correspondiente, se administró la intervención empleando de forma consecutiva la lista elaborada con anterioridad.

El procedimiento de aleatorización fue realizado por la ingeniera del proyecto, quien conocía que intervenciones contenía cada código de tratamiento durante el período de captación de los pacientes y recolección de la información. Esto se realizó con el propósito de mantener al personal involucrado en el estudio (médicos, enfermera y bacterióloga) ciego y garantizar que la evaluación clínica fuera enmascarada.

Debido a que el presente estudio se encuentra anidado en el proyecto macro, se conservó la aleatorización con el fin de mantener la distribución de los pacientes en cada uno de los grupos de intervención.

6.7 Captación y seguimiento

La captación de los pacientes se realizó de acuerdo al sitio de captación.

1. Clínica Santa Teresa

En la clínica, un médico adscrito al proyecto, se ubicó en el área de consulta oportuna, exclusivamente para la atención de los casos de Síndrome Febril Agudo. Aquellos pacientes que cumplían los criterios de inclusión fueron invitados a participar en el estudio. Posterior al ingreso del paciente al estudio y el proceso de intervención, el seguimiento de estos pacientes se realizó en el consultorio de Lunes a Sábado. Durante los días domingo y festivos, el médico realizó la(s) visitas en el domicilio del paciente. En el caso de ausencia del paciente al consultorio durante los días de seguimiento se realizó la visita en el domicilio.

2. Centros de captación de la Red Pública.

Esta forma de captación se realizó a partir del informe diario por parte del personal de enfermería de los centros de salud que atienden consulta de

urgencias (Toledo Plata, Rosario, Mutis, Girardot, Hospital Local del Norte, Hospital San Juan de Dios de Girón) de los pacientes cuyo motivo de consulta fue SFA y a los cuales no se les encontró foco aparente de infección. El registro de la información de estos pacientes fue controlado por la enfermera adscrita al proyecto, desde el Centro de Investigaciones Epidemiológicas ubicado en la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, y estos pacientes fueron contactados telefónicamente para invitarlos a participar en el estudio. Aquellos pacientes que aceptaron, fueron evaluados y seguidos en su domicilio.

En el momento de ingreso del paciente al estudio, el procedimiento realizado fue el siguiente:

Solicitud de firma del consentimiento informado. (Anexo 2)

Entrevista (La cual contenía preguntas relacionadas con los datos demográficos, antecedentes y sintomatología).

Examen Físico completo

Toma de muestra (Para realizar el cuadro hemático y obtener suero para realizar la prueba PANBIO, realizar la prueba serológica, realizar las mediciones de los niveles de citocinas y realizar las pruebas de química sanguínea (las cuales hacen parte de los objetivos del estudio principal en el cual se anidó este trabajo)

Adultos: 1Tubo EDTA, 2 Tubos sin anticoagulante

Niños: 1 Tubo EDTA, 1 Tubo sin anticoagulante

Durante este procedimiento, el médico fue responsable de diligenciar el formato clínico de envío de muestras. Este formato contenía los parámetros de la escala junto con otras variables, con el fin de mantener el desconocimiento de las variables incluidas en la escala por parte del médico y evitar el sesgo de selección (Anexo 5).

Envío de muestras

Las muestras tomadas desde la Clínica Santa Teresa o desde el domicilio del paciente se remitieron al Laboratorio Clínico ubicado en la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander (Anexo 5).

Posterior a la administración de los fármacos, se realizó control médico diario hasta el octavo día a partir de la fecha de inicio de fiebre. Cada control incluyó anamnesis, examen físico completo con el objetivo de observar desenlaces y detectar efectos adversos (Aparición de sibilancias, dificultad respiratoria, presencia de signos de hipersensibilidad, entre otros).

Además a las 24, 48 y 72 horas post intervención se tomó muestra de sangre un tubo con EDTA para realizar cuadro hemático y un tubo sin anticoagulante para obtener suero para la cuantificación de los niveles de citocinas y realizar las pruebas de química sanguínea correspondientes al estudio macro

En algunos casos, el seguimiento clínico se prolongó debido a la presencia de alguna de las siguientes condiciones:

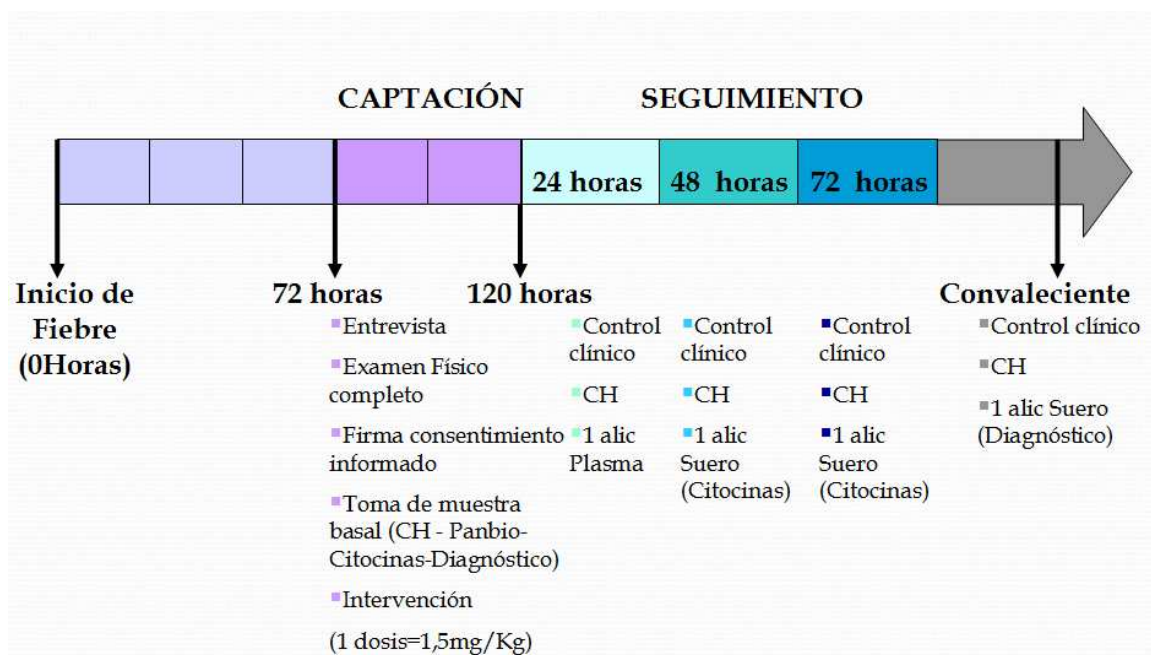
Recuento de plaquetas menor $120000/\text{mm}^3$.

Manifestaciones hemorrágicas espontáneas (sangrado gastrointestinal, gingivorragia, epistaxis, hematuria, petequias, hematomas o púrpura)

Signos de extravasación plasmática: Aumento del hematocrito mayor al 10%, hallazgos al examen físico de derrame pleural o ascitis.

Alteraciones hemodinámicas (hipotensión, taquicardia, ortostatismo o deshidratación grado II – III).

Figura 2. Captación y seguimiento.



6.8 Procesamiento de las muestras

El procedimiento realizado con cada una de las muestras fue el siguiente:

1. El tubo con EDTA se colocó en un homogenizador durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se realizó el cuadro hemático en el equipo automatizado ADVIA 60 (Tercera generación) perteneciente al Laboratorio Clínico de la Facultad de Salud de la UIS y posteriormente se tomaron 10 μL de sangre y se colocaron en una lámina portaobjetos para la elaboración del extendido de sangre periférica (ESP). Posteriormente se realizó la coloración y lectura respectiva del ESP. Adicionalmente se realizó la prueba de Velocidad de Sedimentación Globular.

Los valores de leucocitos y plaquetas obtenidos en el equipo se registraron en el formato clínico de envío de muestras debido a que hacen parte de la escala de diagnóstico establecida para la inclusión de los pacientes al estudio.

2. Los tubos sin anticoagulante se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo se tomaron alícuotas de suero 500 μL , se colocaron en tubos Eppendorff previamente marcados con el código del paciente, la fecha de toma de la muestra y el tipo de alícuota (Basal, 48h ó 72h post intervención).

Teniendo en cuenta la información clínica registrada en el formato clínico de envío de muestras y los resultados del cuadro hemático, se procedió a determinar el puntaje obtenido por el paciente de acuerdo a la escala, de la siguiente forma:

Cuadro 6. Procedimiento realizado de acuerdo al puntaje obtenido en la escala

PUNTAJE	PROCEDIMIENTO A SEGUIR
Menor de tres puntos	Reportar al médico "Paciente no intervenible" Motivo: Presenta baja probabilidad de presentar la enfermedad
Tres - seis	Evaluación mediante la detección de anticuerpos IgM e IgG en prueba rápida para dengue PANBIO Negativa: Reportar al médico "Paciente no intervenible" Positiva: Reportar al médico "Paciente intervenible"
Siete - Diez	No se realizó PANBIO Reportar al médico "Paciente intervenible"

Posteriormente las alícuotas fueron almacenadas a -70°C en la seroteca perteneciente al grupo de Epidemiología Clínica hasta el momento de su uso.

6.9 Determinación de los niveles de citocinas

La determinación de los niveles de citocinas se realizó en el equipo IMMULITE perteneciente al Laboratorio Clínico de la Universidad Industrial de Santander.

Este analizador automatizado realiza inmunoensayos quimioluminiscentes, los cuales se caracterizan por su alta sensibilidad de detección, rapidez, estabilidad del reactivo. La quimioluminiscencia es un proceso en el cual, una molécula de alta energía es excitada químicamente y se descompone liberando su energía en forma de luz. La energía requerida para la emisión de luz es generada por la emisión de un substrato específico (Fosfatasa alcalina).

Los reactivos empleados para la elaboración de las pruebas corresponden a la casa comercial **VÉLEZ LAB.**

Se utilizaron alícuotas de suero previamente descongelado y dispuesto en copillas especiales para el equipo. Las muestras empleadas se seleccionaron teniendo en cuenta la fecha de ingreso del paciente (muestra basal) y la muestra de 48 o 72 horas post intervención. El procedimiento de realizó de la siguiente forma:

Cuadro 7. Métodos determinación citocinas

MUESTRA	CITOCINA	MÉTODO
Basal (Menor 120 horas de enfermedad)	IL-1 β	Ensayo inmunométrico con dos sitios de unión, quimioluminiscente en fase sólida
	IL-6	Ensayo inmunométrico enzimático secuencial en fase sólida por quimioluminiscencia
	IL-8	Ensayo inmunométrico con dos sitios de unión, quimioluminiscente en fase sólida
	TNF- α	Ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida
Post-intervención (48-72 horas a partir de la administración del medicamento)	IL-6	Ensayo inmunométrico enzimático secuencial en fase sólida por quimioluminiscencia
	TNF- α	Ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida

6.10 Diagnóstico

En el momento de ingreso al estudio, se realizó diagnóstico serológico por Inmunocromatografía para detección de anticuerpos IgM e IgG (Brisbane, Australia). Posteriormente el diagnóstico se confirmó a través de la determinación de anticuerpos IgM por ELISA en muestra de suero obtenida en la fase aguda y en la fase convaleciente, para determinar seroconversión o aumento en los títulos de IgM. En aquellos pacientes en los que no fue posible obtener la muestra convaleciente, el diagnóstico se realizó por aislamiento viral o por RT-PCR. Los pacientes que presentaron prueba seroconversión, aumento en los títulos de IgM, aislamiento viral positivo, o RT-PCR positiva, fueron clasificados en el grupo de pacientes con dengue. Aquellos pacientes negativos se clasificaron en el grupo de Síndrome Febril Agudo.

6.11 Recolección y almacenamiento de la información

La información correspondiente a los datos de identificación del paciente, la información clínica (evaluación basal, seguimiento) y los resultados de laboratorio se registró en un formato estandarizado. La digitación de esta información se realizó por duplicado en una base de datos elaborada en el programa Access 2003. Posteriormente utilizando el programa EPIINFO 6 (Versión 6.04d), a través de la opción validate se confrontaron las bases y las inconsistencias se corrigieron a partir del formato original.

6.12 Analisis de datos

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico Stata 9.2 y se hizo análisis teniendo en cuenta los objetivos del estudio.

1. Niveles de citocinas en suero basal (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α)

Inicialmente se realizó una descripción de las características basales de los pacientes incluyendo edad, género, tiempo de evolución de la enfermedad, recuento de plaquetas, leucocitos. Posteriormente se evaluó la normalidad de las variables continuas y se reportó su media y desviación estándar (DE) en las variables normales o su mediana y rango si la distribución no fue normal.

Para esto, se utilizó la prueba t de Student para variables continuas con distribución normal, o la prueba de Mann-Whitney para las variables continuas con $p < 0,05$.

2. Modificación de la cinética de las citocinas por la intervención con Metilprednisolona

Se evaluó la normalidad de las variables y debido a que la distribución no fue normal se reportó la mediana y el rango para cada una de ellas. Para observar el posible efecto de interacción de la intervención sobre los niveles de citocinas, se realizó la prueba de Mann-Whitney. Asimismo se realizó análisis de regresión lineal para las mediciones post intervención de TNF- α e IL-6.

3. Niveles basales de citocinas como predictores de severidad.

En el caso de los datos de laboratorio (Recuento de plaquetas, recuento de leucocitos) se realizó ANOVA de medidas repetidas para determinar si los niveles de citocinas basales se encuentran asociados con el cambio en los valores de estos parámetros hematológicos durante la enfermedad

6.13 Disposiciones éticas vigentes

Según la resolución 008430 de 1993, el presente estudio, por incluir en su componente experimental la asignación aleatoria a esquemas terapéuticos, calificó

como “Investigación con riesgo mayor que el mínimo”. Sin embargo, los fármacos evaluados han sido ampliamente utilizados por décadas, las dosis de metilprednisolona y de N-acetilcisteína correspondieron a dosis evaluadas en otros estudios con las cuales se ha observado efecto positivo, cada una de las intervenciones se hizo con una dosis calculada por peso y por vía oral bajo monitoreo médico, todo lo anterior hizo que el balance beneficio/riesgo fuese positivo.

En el momento de ingreso del paciente al estudio, cada paciente desarrolló dos procesos de consentimiento informado. Inicialmente se solicitó al paciente la autorización para la toma de muestra requerida para verificar los criterios de inclusión (Anexo 1). Posteriormente se solicitó mediante el segundo consentimiento la autorización del paciente para recibir las intervenciones, dependiendo de los resultados iniciales, es decir si el paciente cumple con los criterios para participar en el estudio (Anexo 2).

En el proceso de inclusión de pacientes de 5 a 18 años de edad, se solicitó la firma del consentimiento informado a uno de sus padres o al acudiente, previa explicación al paciente y a sus padres o acudientes sobre los riesgos para la salud derivados del estudio. Cuando fue posible, y el menor comprendió el procedimiento a realizar durante la participación de éste en el estudio y sabía leer y escribir, se solicitó también al menor de edad firmar el consentimiento.

El costo de las intervenciones y del seguimiento fue asumido en su totalidad por el proyecto.

Este estudio fue evaluado y aprobado por el comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander y por el INVIMA (Anexo 3).

7. PRESUPUESTO

El estudio se anidó en el proyecto "Evaluación de la eficacia y Seguridad de la Metilprednisolona y la N-Acetilcisteína para disminuir la severidad en Dengue", cofinanciado por COLCIENCIAS y la Universidad Industrial de Santander, código 1102-04-16433.

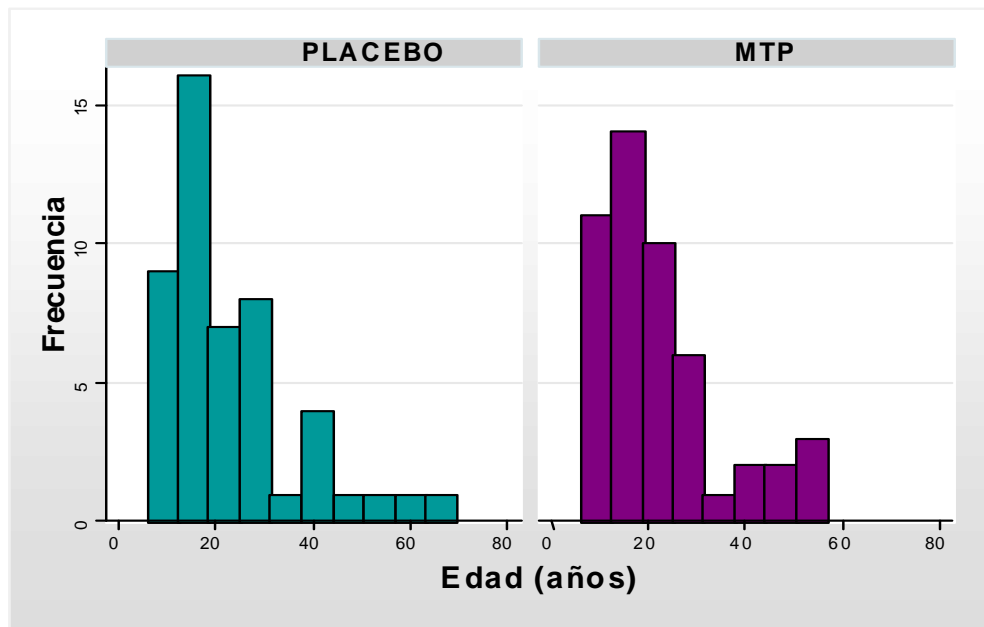
8. RESULTADOS

Descripción de la población y la muestra.

Se intervinieron 184 sujetos entre Julio de 2006 y Diciembre de 2008, provenientes de los centros de captación, los cuales cumplían con los criterios de inclusión establecidos en el estudio. Del total de sujetos intervenidos 49 fueron incluidos en el grupo Metilprednisolona + Placebo NAC, y 49 en el grupo Placebo MTP + Placebo NAC. El 46,94% de los pacientes incluidos en el estudio ingresaron en el día cuarto de enfermedad (calculado a partir de la fecha de inicio de la fiebre).

La mediana de la edad de los pacientes incluidos fue de 18 (6-63) años en los dos grupos (Figura 3). El porcentaje de hombres incluidos en el grupo MTP fue de 51,02%, mientras que en el grupo Placebo fue de 59,18%. El porcentaje de pacientes con fiebre en el momento de ingreso al estudio en el grupo que recibió Metilprednisolona fue de 8,16%, y en el grupo Placebo fue de 24,49% ($p=0,029$).

Figura 3. Distribución de los individuos intervenidos con MTP o Placebo de acuerdo a la edad



La mediana obtenida para el recuento de plaquetas de los pacientes en el momento de ingreso al estudio en el grupo que recibió Metilprednisolona fue de $146.000/\text{mm}^3$ (31.000-307.000), mientras que en el grupo Placebo fue de $153.000/\text{mm}^3$ (44.000-368.000) $p= 0,99$. El recuento de leucocitos en el momento de ingreso al estudio fue de $3.000/\text{mm}^3$ (1.500-9.100) en el grupo que recibió MTP, mientras que en el grupo Placebo fue de $2.900/\text{mm}^3$ (1.700-6.200) $p=0,38$ (Cuadro 8)

Cuadro 8. Distribución basal de las variables en los pacientes intervenidos con MTP o Placebo

VARIABLE	TOTAL n=98	MTP n=49	PLACEBO n=49	p
Edad (años)†	18 (6-63)	18 (6-54)	18(6-63)	0,69
Genero Hombre (%)	54 (55,10%)	25 (51,02%)	29 (59,18%)	0,42
Día de enfermedad (%)				0,44
2	7 (7,14)	2 (4,08)	5 (10,20)	
3	24 (24,49)	14 (28,57)	10 (20,41)	
4	46 (46,94)	21 (42,86)	25 (51,02)	
5	21 (21,43)	12 (24,49)	9 (18,37)	
Dengue confirmado n (%)	62 (63,27)	29 (59,18)	33 (67,35)	0.40
EXAMEN FÍSICO				
Temperatura (°C) §	36,90 (36.7-37.1)	36,64 (36.4-36.9)	37,16 (36.9 - 37.4)	0,009
Fiebre n (%)	16 (16,33)	4 (8,16)	12 (24,49)	0,029
Presión arterial sistólica § (mm Hg)	115,57 (113,03-118,11)	114,69 (110,99-118,39)	116,45 (112,85-120,05)	0,49
Presión arterial diastólica § (mm Hg)	72,96 (71,38-74,55)	72,22 (69,85-74,59)	73,71 (71,54-75,88)	0,35

Frecuencia cardíaca § (Lat/min)	81,85 (78,93-84,76)	80,39 (76,65-84,13)	83,31 (78,74-87,87)	0,55
Frecuencia respiratoria † (resp/min)	20 (12-32)	20 (14-32)	20 (12-32)	0,36
Peso (Kg) §*	55,33 (51,79-58,87)	54,24 (49,47-59,02)	56,42 (51,02-61,82)	0,54
Talla (cm) †	163 (110-184)	163 (110-184)	163 (121-184)	0,74

§ Media (IC95%) † Mediana (Rango) * n=90 (45 vs. 45) † n=97 (48 MTP vs. 49 Placebo)

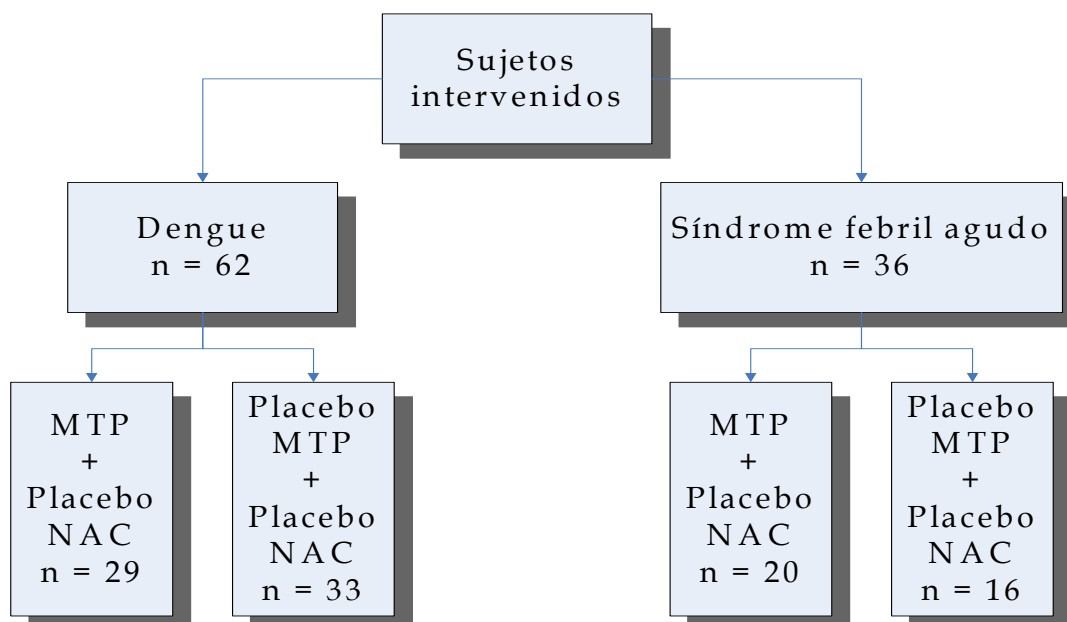
VARIABLES LABORATORIO				
VARIABLE	TOTAL	MTP	PLACEBO	p
Leucocitos (mm ³) †	2.900 (1.500-9.100)	3.000 (1.500-9.100)	2.900 (1.700-6.200)	0,37
Plaquetas (mm ³)†	149.000 (31.000-368.000)	146.000 (31.000-307.000)	153.000 (44.000-368.000)	0,99
Hematocrito §†	43,36% (42,53-44,20)	43,23% (42,08-44,39)	43,49% (42,24-44,74)	0,76

§ Media (IC95%) † Mediana (Rango) * n=90 (45 vs. 45) † n=97 (48 MTP vs. 49 Placebo)

De los 98 pacientes intervenidos, la infección por virus dengue se confirmó a 62 pacientes (63,27%). Los pacientes negativos fueron clasificados dentro del grupo de Síndrome Febril Agudo n=36 (36,73 %).

Dentro del grupo de pacientes con diagnóstico de dengue, 29 pacientes (59,18%) recibieron la dosis de MTP, mientras que 33 pacientes (67,35%) recibieron Placebo. En el grupo de pacientes con Síndrome Febril Agudo, 20 pacientes (40,82%) recibieron la dosis de MTP, mientras que 16 pacientes (32,65%) recibieron la dosis Placebo (Figura 4).

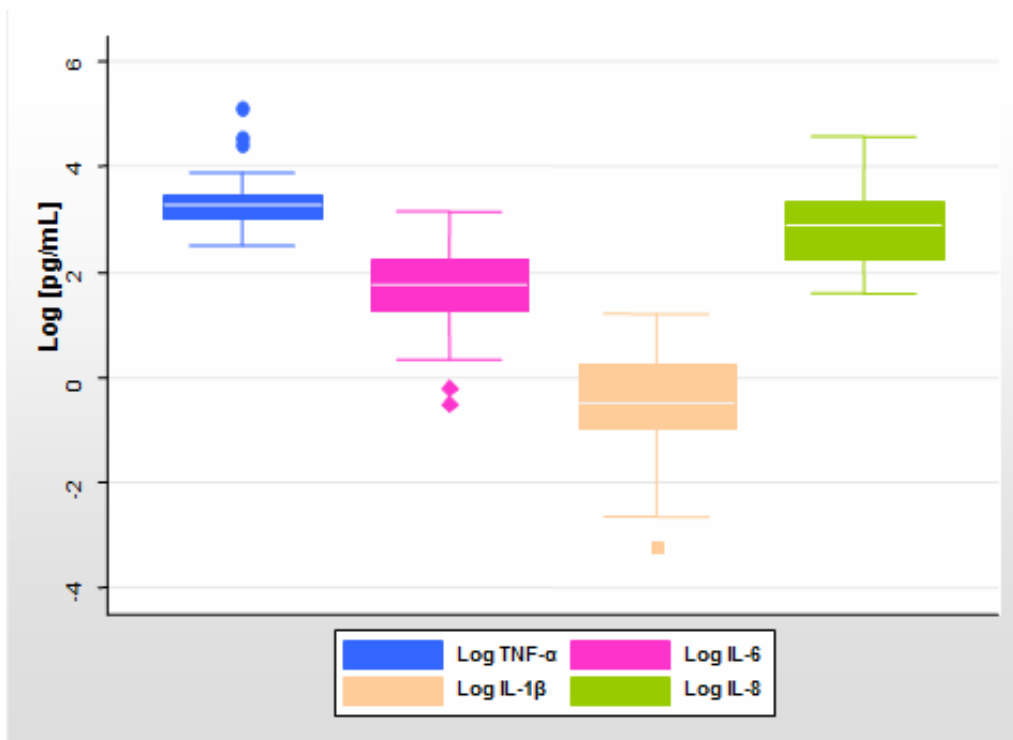
Figura 4. Distribución de los individuos intervenidos con MTP o Placebo de acuerdo al diagnóstico



Los niveles TNF- α en la muestra basal detectados en el grupo que recibió MTP fueron de 27,8 pg/mL, y en el grupo que recibió la dosis Placebo fueron 25,9 pg/mL. No se observó diferencia en los niveles de esta citocina asociada a la intervención ($p=0,50$). La concentración de IL-6 en muestra basal en el grupo que recibió MTP fue de 6,5 pg/mL y en el grupo que recibió la dosis Placebo fue de 5,2 pg/mL (Figura 5), se encontró diferencia en los niveles de esta citocina asociada a la intervención ($p=0,034$). No se encontró asociación entre la intervención y los niveles de IL-1 β e IL-8 $p=0,26$ y $p=0,89$ en muestra basal (Cuadro 9) No encontró

asociación entre los niveles de citocinas y el diagnóstico de la enfermedad (Cuadro 10) (Figura 6-9).

Figura 5. Niveles de citocinas basales en pacientes con SFA tipo dengue



La figura corresponde al Log_{10} de la concentración de las citocinas basales

TNF- α = 26,1 pg/mL IL-6= 5,8 pg/mL IL-1 β = 0,61 pg/mL IL-8= 17,8 pg/mL

Cuadro 9. Niveles de citocinas basales y post intervención en el grupo de pacientes intervenidos con MTP o con placebo.

CITOCINA	n	TOTAL	MTP	PLACEBO	p
BASAL					
TNF- α (pg/mL) †	87 (43 vs. 44)	26,1 (12,2-167)	27,8 (12,2-167)	25,9 (13,4-93,3)	0,50
IL-6 (pg/mL) †	87 (44 vs. 43)	5,8 (0,6-22,9)	6,5 (0,8-22,9)	5,2 (0,6-16,4)	0,034
IL-1 β (pg/mL) †	51 (24 vs. 27)	0,61 (0,04-3,3)	0,625 (0,13-3,3)	0,5 (0,04-3,2)	0,26
IL-8 (pg/mL) †	52 (25 vs. 27)	17,8 (0-97,4)	16 (5,8-67,1)	20,5 (0-97,4)	0,89

POST INTERVENCIÓN					
TNF- α (pg/mL) †	92 (45 vs. 47)	20,6 (10,4-540)	21,3 (10,4-94,8)	20,6 (10,4-540)	0,56
IL-6 (pg/mL) †	91 (45 vs. 46)	3,6 (0-1.520)	3,6 (0-1.520)	3,6 (0-1.001)	0,65

† Mediana (Rango)

Cuadro 10. Niveles de citocinas basales en el grupo de pacientes con diagnóstico de dengue o con SFA.

CITOCINA	n	TOTAL	DENGUE	SFA	p
BASAL					
TNF- α (pg/mL) †	87 (56 vs. 31)	26,1 (12,2-167)	26,8 (12,2-93,3)	26,1 (13,3-167)	0,98
IL-6 (pg/mL) †	87 (56 vs. 31)	5,8 (0,6-22,9)	6,8 (0,8-22,9)	5,2 (0,6-21,4)	0,69
IL-1 β (pg/mL) †	51 (31 vs. 20)	0,61 (0,04 -3,3)	0,5 (0,04-3,2)	0,695 (0,18-3,3)	0,09
IL-8 (pg/mL) †	52 (31 vs. 20)	17,8 (0-97,4)	17,8 (4,9-67,1)	17,8 (0-97,4)	0,61

POST INTERVENCIÓN					
TNF- α (pg/mL) †	92 (57 vs. 35)	20,6 (10,4-540)	21 (11,6-94,8)	19,3 (10,4-540)	0,55
IL-6 (pg/mL) †	91 (56 vs. 35)	3,6 (0-1.520)	3,6 (0-1.520)	3,7 (0-1.001)	0,74

† Mediana (Rango)

Figura 6. Niveles basales de IL-1 β en el grupo de pacientes con diagnóstico de dengue o con SFA

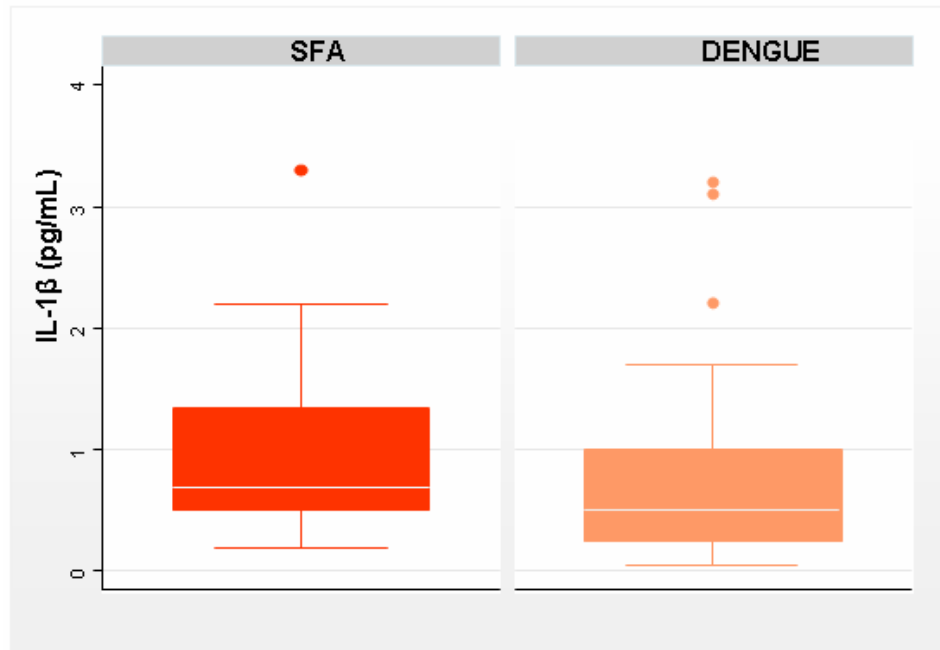


Figura 7. Niveles basales de IL-6 en el grupo de pacientes con diagnóstico de dengue o con SFA

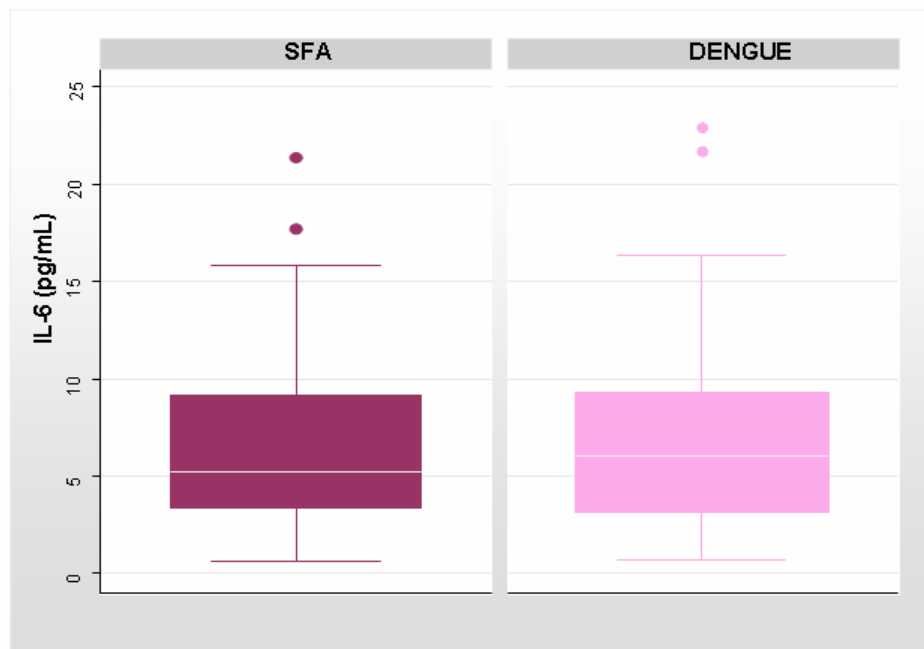


Figura 8. Niveles basales de IL-8 en el grupo de pacientes con diagnóstico de dengue o con SFA

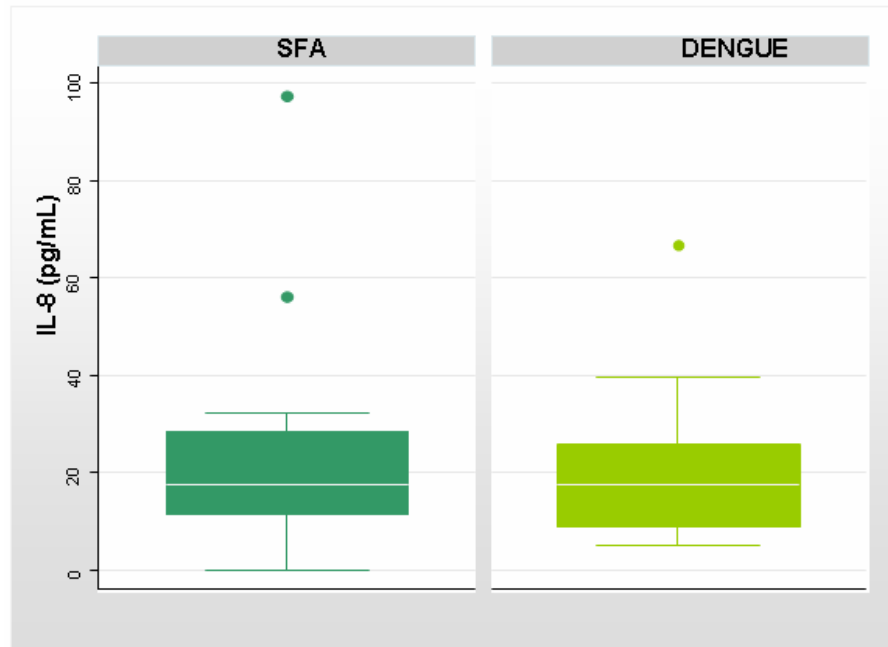
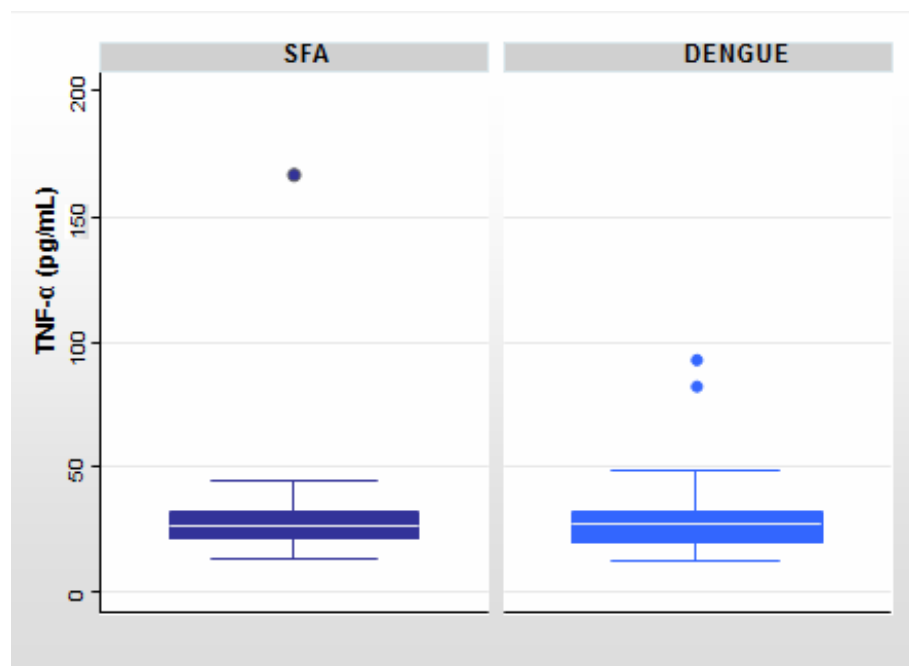


Figura 9. Niveles basales de TNF- α en el grupo de pacientes con diagnóstico de dengue o con SFA



En el análisis bivariado no se encontró asociación entre los niveles de citocinas y la intervención. La concentración de TNF- α en la muestra post-intervención fue de 21,3 pg/mL en el grupo que recibió MTP, y de 20,6 pg/mL en el grupo placebo ($p=0,56$) (Figura 10). De la misma forma, no se encontró diferencia significativa en los niveles de IL-6 detectados en la muestra post intervención en el grupo MTP 3,6 pg/mL comparado con el grupo Placebo 3,65 pg/mL ($p=0,65$) (Figura 11).

Se realizó análisis de regresión lineal ajustando por las variables fiebre e IL-6 basal y no se encontró asociación entre la intervención y los niveles de TNF- α y de IL-6 post intervención $p=0,09$ y $p=0,47$ respectivamente.

Figura 10. Niveles basales y post-intervención de TNF-alfa en el grupo de pacientes intervenidos con MTP o placebo

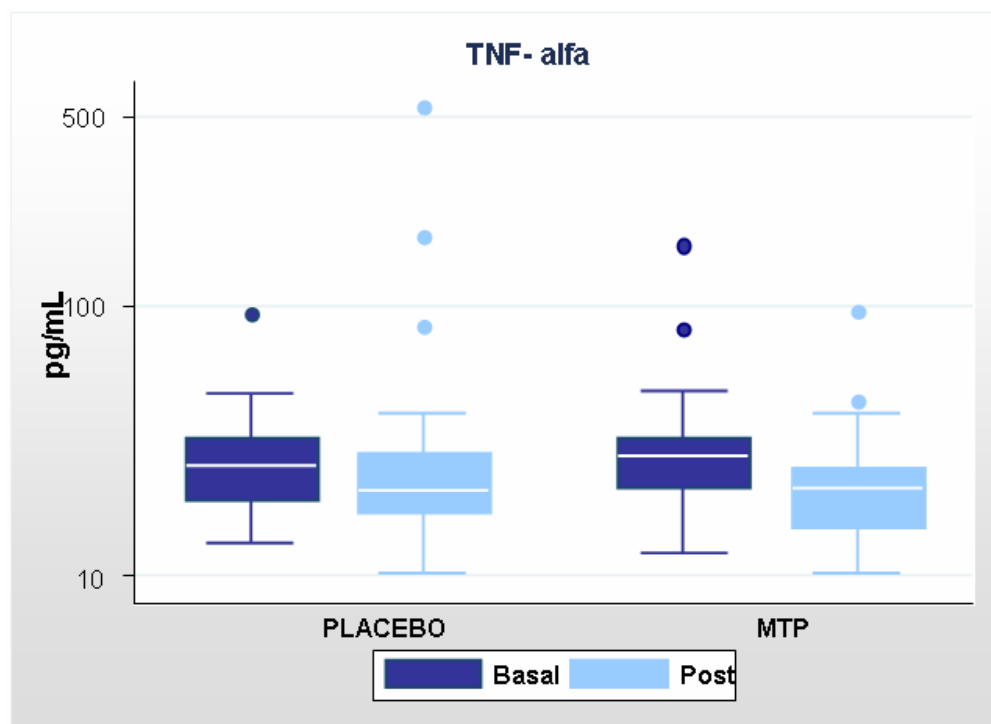
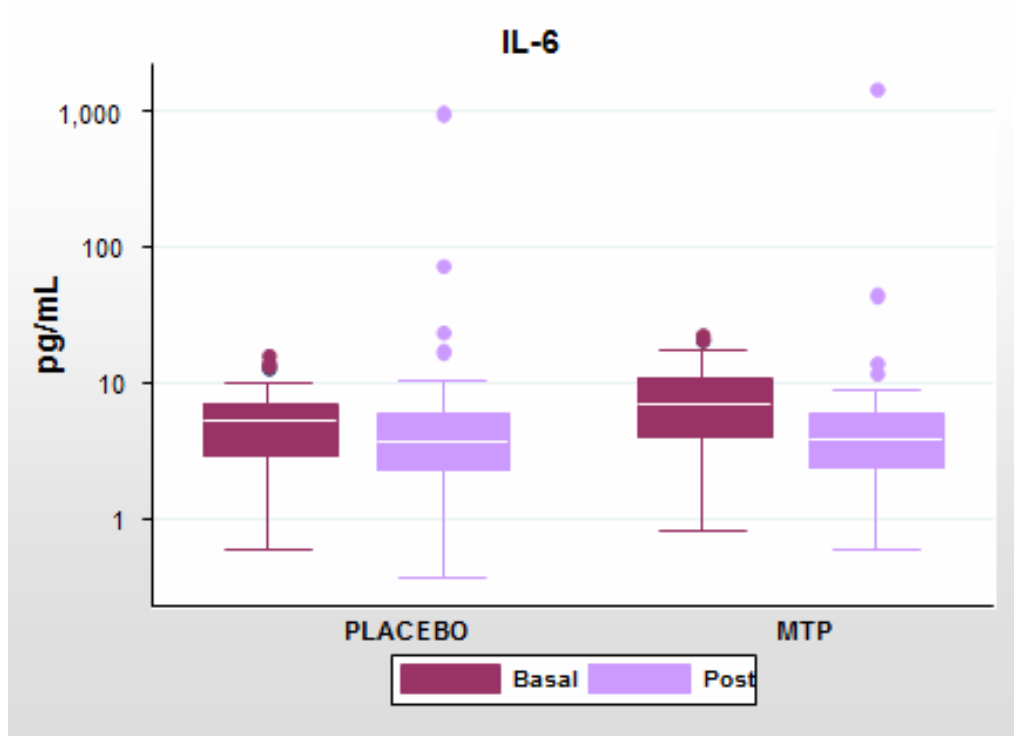


Figura 11. Niveles basales y post-intervención de IL-6 en el grupo de pacientes intervenidos con MTP o placebo



Teniendo en cuenta que la intervención no se encuentra asociada con los niveles de citocinas, se realizó ANOVA de mediciones repetidas para determinar si los niveles de citocinas basales se asocian con el recuento de plaquetas obtenido durante el seguimiento. En el análisis realizado para plaquetas se encontró asociación negativa entre los niveles de TNF- α , IL-6, IL-8 y los recuentos de plaquetas. Un aumento en 1 pg/mL de TNF- α se asocia con la disminución en 120.881 plaquetas/mm³. Así mismo el aumento en 1 pg/mL de IL-6 está asociado con la disminución en 14.647 plaquetas/mm³. De igual forma el aumento en 1 pg/mL de IL-8 está asociado con la disminución de 3.272 plaquetas/mm³. En el caso de IL-1 β , se observó el efecto contrario, en el cual el aumento en 0,1 pg/mL en la concentración de esta citocina, se asocia con el incremento en 59.592

plaquetas/mm³ (Cuadro 11). De igual forma, se realizó para el recuento de leucocitos. No se encontró asociación entre los niveles de IL-6 y TNF- α con el recuento de leucocitos. Sin embargo, en el análisis se observó asociación positiva entre la concentración de IL-1 β y el recuento de leucocitos, mientras que la concentración de IL-8 y el recuento de leucocitos presentó asociación negativa (Cuadro 12).

Cuadro 11. Asociación de los niveles de citocinas basales y recuento de plaquetas

VARIABLE	COEFICIENTE	INTERVALO DE CONFIANZA 95%		<i>p</i>
IL-1 β	595918.2	325662.8	866173.6	0.000
IL-6	-14647.34	-22708.23	-6586.446	0.000
IL-8	-3272.42	-4754.199	-1790.642	0.000
TNF- α	-120881.1	-187521	-54241.25	0.000

Cuadro 12. Asociación de los niveles de citocinas basales y recuento de leucocitos

VARIABLE	COEFICIENTE	INTERVALO DE CONFIANZA 95%		<i>p</i>
IL-1 β	15449.86	6010.146	24889.58	0.002
IL-6	93.21317	-174.2222	360.6485	0.493
IL-8	-84.83932	-136.5141	-33.16453	0.001
TNF- α	731.0131	-1489.879	2951.905	0.517

9. DISCUSIÓN

9.1 Hallazgos principales.

En el presente estudio se demuestra que la administración de una dosis oral de Metilprednisolona no modifica los niveles de citocinas. Existen ensayos clínicos que evalúan la administración de corticoides en el tratamiento de dengue, en los cuales se ha analizado como desenlace principal muerte, y otros desenlaces como tiempo de hospitalización, efectos adversos, número de complicaciones, entre otros (87). Sin embargo, no existen estudios previos que evalúen el efecto de la administración de Metilprednisolona sobre los niveles de citocinas en la infección por dengue.

La concentración de TNF- α e IL-6 obtenida posterior a la intervención, podría reflejar el comportamiento normal de estas citocinas durante la historia natural de la enfermedad.

9.2 Hallazgos secundarios.

Los niveles de cada una de las citocinas detectados en la muestra basal (48-120 horas a partir del inicio de la fiebre) constituyen una fuente de información útil para caracterizar la respuesta inmunológica que se presenta en los pacientes con Síndrome Febril Agudo en los primeros días de la enfermedad, por lo que esta información permite establecer asociaciones sobre las citocinas involucradas en el desarrollo de las forma severa de la enfermedad.

Los bajos niveles de IL-1 β detectados en los pacientes en la muestra aguda se deben a que esta citocina está involucrada en la respuesta de fase aguda, por lo que es sintetizada al comienzo de la cascada inflamatoria y se encuentra asociada con el inicio de diversos procesos infecciosos. La IL-1 β es una citocina multifuncional que cumple un papel importante en los procesos inflamatorios, y en la respuesta antiviral. Esta citocina con efecto pleiotrópico está asociada con la

coestimulación de linfocitos T, proliferación de células B, inducción de moléculas de adhesión, y la estimulación en la producción de estas citocinas. El estudio de *M.L. Avila-Aguero y col. (53)*, demostró que la IL-1 β se incrementa ligeramente durante los días de seguimiento de los pacientes con primoinfección por virus dengue. Otro estudio realizado por *Bozza y col. (54)*, en pacientes con dengue, encontró asociación entre la IL-1 β y trombocitopenia profunda OR = 1.058 (IC: 1.012–1.106). A diferencia de la asociación encontrada por *Bozza y col. (54)*, en el presente estudio la IL-1 β basal se encuentra asociada con el incremento en la cantidad de plaquetas.

IL-8 es una quimiocina, que promueve la adherencia de los neutrófilos al endotelio y la migración de estas células. Altas concentraciones de esta citocina se encuentra asociada con la alteración del endotelio, y el desarrollo de extravasación plasmática en los pacientes con dengue. En el presente estudio, se observó asociación negativa entre la concentración basal de esta citocina y el recuento de plaquetas durante la enfermedad. *Juffrie y col. (44)*, demostraron la elevación moderada de la IL-8 en el 70% de pacientes con dengue, y en mayor proporción en aquellos que desarrollaban la forma más severa de dengue la enfermedad. *M.L. Avila-Agüero y col. (53)*, demostraron la elevación considerable de los niveles de IL-8 en los pacientes durante las primeras 24 horas de hospitalización y con el transcurso observaron la disminución en los niveles de esta citocina.

La IL-6 es una citocina responsable del desarrollo de fiebre y se ha asociado con el aumento de la permeabilidad capilar en los pacientes con dengue. Estudios han demostrado altos niveles de esta citocina en los primeros días de enfermedad y su relación con el desarrollo de los síntomas. *Kurane y col. (17)*, demostraron que existe correlación positiva entre los niveles de IL-6 y severidad. Los hallazgos del estudio de *M.L. Avila-Agüero y col. (53)*, muestra altos niveles de IL-6 en los pacientes hospitalizados con diagnóstico de dengue durante el período de estudio, con el mayor valor durante las primeras 12 horas. En los resultados

obtenidos en el presente estudio se observa una asociación negativa entre la concentración de IL-6 basal y el recuento de plaquetas.

TNF- α es una citocina asociada con induce la activación de células endoteliales y se encuentra asociado con el incremento de la permeabilidad capilar. En el presente estudio no se encontró asociación entre los niveles de citocinas y el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo otros estudios como el estudio de *J.E. Cardier y col. (51)*, y el estudio de *Restrepo BN y col. (47-48)*, demostraron niveles de TNF- α superiores en muestras de pacientes con dengue, en comparación con muestras de controles sanos. Otro hallazgo del estudio *Restrepo BN y col. (47-48)*, demostró que la concentración de esta citocina es más elevada en el grupo de pacientes con dengue hemorrágico en comparación con el grupo de pacientes con dengue clásico. En los resultados obtenidos del presente estudio se observa que la concentración basal de esta citocina está asociada negativamente con el recuento de plaquetas. Otros estudios realizados en pacientes con dengue han demostrado que la concentración TNF- α es superior en pacientes con dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue en comparación con dengue clásico (51,60).

9.3 Limitaciones.

En el estudio, la determinación de la concentración de IL-1 β e IL-8 se realizó solo en muestra basal, debido a que uno de los objetivos de este estudio fue evaluar estas dos citocinas en un solo momento de la enfermedad. Sin embargo, debería considerarse que la medición de estas citocinas se realice en una muestra posterior a la basal para determinar si el comportamiento de estas dos citocinas cambia durante el transcurso de la enfermedad.

El hecho de encontrar una asociación negativa entre los niveles IL-6, TNF- α , IL-8 y los recuentos de plaquetas durante el seguimiento de los pacientes podría tener

implicaciones sobre la interacción de estas citocinas en la severidad de la enfermedad. Sin embargo, el análisis realizado en el presente estudio no evalúa severidad, debido a que no se tomó en cuenta la información correspondiente a los desenlaces clínicos (Dengue clásico – dengue hemorrágico) lo cual hace parte del objetivo principal del Ensayo Clínico proyecto “Evaluación de la eficacia y Seguridad de la Metilprednisolona y la N-Acetilcisteína para disminuir la severidad en Dengue”.

Una alternativa apropiada para evaluar si los niveles de citocinas se asocian a severidad en dengue debe tener en cuenta toda la información clínica y del laboratorio del paciente así como realizar las mediciones de la concentración de las citocinas en los diferentes momentos de la enfermedad, e incluyendo dentro del grupo de estudio controles sanos y pacientes con las diferentes manifestaciones de la enfermedad.

CONCLUSIONES

La administración de una dosis oral de Metilprednisolona no modifica los niveles de citocinas en pacientes con Síndrome Febril Agudo tipo dengue

Los niveles de IL-6, TNF- α , IL-8 se encuentran asociados con la disminución de las plaquetas durante el transcurso de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. En: Clin Microbiol Rev. 1998 Jul;11(3):480-96
2. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. En: Postgrad Med J. 2004 Oct; 80(948):588-601.
3. da Fonseca BA, Fonseca SN. Dengue virus infections. En: Curr Opin Pediatr. 2002 Feb;14(1):67-71
4. Halstead SB. Dengue. Review. En: Lancet. 2007 Nov 10; 370(9599):1644-52.
5. Stephenson JR. The problem with dengue. En: Trans R Soc Trop Med Hyg 2005; 99: 643-6.
6. Guzmán M, García G, Kourí G. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. En: Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 19(3), 2006
7. DOTRES MARTINEZ, Carlos et al. Dengue hemorrágico en el niño. En: *Cad. Saúde Pública* [online]. 1987, v. 3, n. 2, pp. 158-180.
8. Instituto Nacional de Salud INS. Subdirección de vigilancia y Control En Salud Pública. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública. SIVIGILA Enfermedades transmitidas por vectores E.T.V. Informe Final Dengue en Colombia año 2007. Available from Internet: <http://www.ins.gov.co/>

9. Instituto Nacional de Salud INS. Subdirección de vigilancia y Control En Salud Pública. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública SIVIGILA 2008. Comportamiento por regiones del dengue en el 2008. Boletín Epidemiológico numero 28 de 2008. Avalaible from Internet: <http://www.ins.gov.co/>
10. Instituto Nacional de Salud INS. Subdirección de vigilancia y control Protocolo de vigilancia de Dengue. Primer semestre 2007. Avalaible from Internet: [http:// www.ins.gov.co/](http://www.ins.gov.co/)
11. Ocazonez R., Gómez S., Cortés F. Dengue hemorrhagic fever serotype and infection pattern in a Colombian endemic area. En: Revista de salud pública. 9 (2):262-274, 2007
12. Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. En: Med Clin North Am. 2008 Nov;92(6):1377-1390.
13. Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. En: Annu Rev Entomol. 2008;53:273-91
14. Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. En: Emerg Themes Epidemiol 2005; 2:1.
15. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion En: Nature. 2004 Jan 22; 427(6972):313-9.
16. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. En: Nat Rev Microbiol. 2007 Jul; 5(7):518-28.

17. Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. En: *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007 Sep; 30(5-6):329-40.
18. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. En: *Virology*. 1999 Apr 25;257(1):1-6.
19. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. En: *Curr Opin Infect Dis*. 2006 Oct;19(5):429-36.
20. Valbuena G, Walker DH. The endothelium as a target for infections. En: *Annu Rev Pathol*. 2006;1:171-98
21. King NJ, Getts DR, Getts MT, et al. Immunopathology of flavivirus infections. En: *Immunol Cell Biol*. 2007 Jan;85(1):33-42
22. Huan-Yao Lei, Kao-Jean Huang, Yee-Shin Lin, et al. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. En: *American Journal of Infectious Diseases* 4 (1): 1-9, 2008
23. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, et al. Immunopathogenesis of dengue virus infection. En: *J Biomed Sci*. 2001 Sep;8(5):377-88.
24. Navarro-Sánchez E, Després P, Cedillo-Barrón L. Innate immune responses to dengue virus. En: *Arch Med Res*. 2005 Sep-Oct;36(5):425-35.
25. Rothman AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. En: *Adv Virus Res*. 2003; 60:397-419.

26. Chen RF, Yang KD, Wang L, Liu JW, et al. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. En: Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007 Nov; 101(11):1106-13.
27. Kittigul L, Pitakarnjanakul P, Sujirarat D, Siripanichgon K. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. En: J Clin Virol. 2007 Jun;39(2):76-81
28. Rigau-Pérez JG. Severe dengue: the need for new case definitions. En: Lancet Infect Dis. 2006 May; 6(5):297-302.
29. Chadwick D, Arch B, Wilder-Smith A, Paton N. Distinguishing dengue fever from other infections on the basis of simple clinical and laboratory features: application of logistic regression analysis. En: J Clin Virol. 2006 Feb; 35(2):147-53.
30. Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. Review. En: Baillieres Best Pract Res Clin Haematol. 2000 Jun; 13(2):261-76.
31. Balmaseda A, Hammond SN, et al. Assessment of the world health organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. En: Am J Trop Med Hyg 2005; 73:1059-1062.
32. Díaz FA, Martínez RA, Villar LA. Criterios clínicos para diagnosticar el dengue en los primeros días de enfermedad. En: Biomédica 2006;26:22-30.
33. Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. Macrophage and dengue virus: friend or foe? En: Indian J Med Res. 2006 Jul; 124(1):23-40.

34. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. En: The Journal of Infectious Diseases 1999;179:755–762
35. Sreaton G, Mongkolsapaya J. T cell responses and dengue haemorrhagic fever. En: Novartis Found Symp. 2006;277:164-71
36. Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of viral infections. En: Curr Opin Immunol. 2005 Oct; 17(5):510-6.
37. Chaturvedi UC, Shrivastava R, Tripathi RK, Nagar R. Dengue virus-specific suppressor T cells: current perspectives. En: FEMS Immunol Med Microbiol. 2007 Aug; 50(3):285-99.
38. Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, et al. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. En: J Virol. 2001 April; 75(8): 3501–3508.
39. Ho LJ, Wang JJ, Shaio MF, Kao CL, et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. En: J Immunol. 2001 Feb 1;166(3):1499-1506.
40. Welsh RM, Selin LK, Szomolanyi-Tsuda E. Immunological memory to viral infections. En: Annu Rev Immunol. 2004;22:711-43
41. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production,

- complement activation, and apoptosis. En: J Immunol. 1998 Dec 1; 161(11):6338-46.
42. King CA, Anderson R, Marshall JS. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. En: J Virol. 2002 August; 76(16): 8408–8419.
43. Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. En: Indian J Med Res. 2006 Jan;123(1):25-30
44. Juffrie M, van Der Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. En: Infect Immun. 2000 February; 68(2): 702–707.
45. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. En: Am J Trop Med Hyg. 2000 Jul-Aug;63(1-2):71-5.
46. Lin YW, Wang KJ, Lei HY, Lin YS, et al. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. En: J Virol. 2002 Dec; 76(23):12242-9.
47. Restrepo BN, Ramirez RE, Arboleda M, Alvarez G, Ospina M, Diaz FJ. Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection. En: Am J Trop Med Hyg. 2008 Nov;79(5):673-7.
48. Restrepo BN, Isaza DM, Salazar CL, Ramírez R, Ospina M, Alvarez LG. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. En: Rev Soc Bras Med Trop. 2008 Jan-Feb;41(1):6-10

49. Suharti C, van Gorp EC, Dolmans WM, et al. Cytokine patterns during dengue shock syndrome. En: European Cytokine Network. 2003 Jul-Sep;14(3):172-177.
50. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. En: J Immunol. 1998 Dec 1; 161(11):6338-46.
51. Cardier JE, Mariño E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, Rothman AL. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. En: Cytokine. 2005 Jun 21; 30(6):359-65.
52. Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). En: Immunol Cell Biol. 2007 Jan;85(1):43-45.
53. Avila-Aguero ML, Avila-Aguero CR, Um SL, et al. Systemic host inflammatory and coagulation response in the Dengue virus primo-infection. En: Cytokine. 2004 Sep 21;27(6):173-179
54. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. En: BMC Infectious Diseases 2008, 8:86 1186/1471-2334-8-86
55. Keuter M, Dharmana E, Gasem MH, van der Ven-Jongekrijg J, Djokomoeljanto R, Dolmans WM, et al. En: Pattern of proinflammatory cytokines and inhibitors during typhoid fever. J Infect Dis 1994; 1306-1311.

56. Sauerwein R, Gallati H, Van der Meer JWM (1994) Patterns of proinflammatory cytokines and inhibitors during Typhoid Fever. En: J Infect Dis 169: 1306–1311.
57. Catharina Suharti, Eric C. M. van Gorp, Wil M. V. et al. Cytokine patterns during dengue shock syndrome. En: European Cytokine Network. Volume 14, Numéro 3, 172-7, July 2003.
58. Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, Day NP, et al. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. En: J Infect Dis. 1998 Mar; 177(3):778-82.
59. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. En: J Med Virol. 1998 Nov; 56(3):280-285.
60. Luzia MO Pinto, Solange A Oliveira*, Elzinandes LA Braga, Rita MR Nogueira, Claire F Kubelka. Increased Pro-inflammatory Cytokines (TNF-a and IL-6) and Anti-inflammatory Compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian Patients during Exanthematic Dengue Fever. En: Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94(3): 387- 394, May/Jun. 1999
61. Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Lin YS. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. En: J Immunol. 2005 Jan 1; 174(1):395-403.
62. Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, Yu CC, Chang HH. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1

- cause thrombocytopenia and mortality in mice. En: J Thromb Haemost. 2007 Nov; 5(11):2291-9.
63. Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. En: FEMS Immunol Med Microbiol. 2000 Jul; 28(3):183-8.
64. Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano EM, et al. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. En: Clin Exp Immunol. 2004 Nov; 138(2):299-303.
65. Oishi K, Inoue S, Cinco MT, et al. Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. En: J Med Virol. 2003 Oct; 71(2):259-64.
66. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. En: J Med Virol. 2001 Feb;63(2):143-9
67. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. En: PLoS Pathog. 2007 Nov;3(11):e183
68. Chen LC, Lei HY, Liu CC, et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. En: Am. J. Trop. Med. Hyg., 74(1), 2006, pp. 142-147
69. Imrie A, Meeks J, Gurary A et al. Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and

previously encountered serotypes. En: J Virol. 2007 Sep;81(18):10081-91. Epub 2007 Jul 11.

70. Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, Foster GR, Jacobs M. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. En: J Virol. 2005 May; 79(9): 5414–5420.
71. Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. En: Clin Exp Immunol. 2006 Feb; 143(2):345-56.
72. Tanner L, Schreiber M, Low JG, Ong A, et al. Decision tree algorithms predict the diagnosis and outcome of dengue Fever in the early phase of illness. En: PLoS Negl Trop Dis. 2008 March; 2(3): e196.
73. Vaughn DW, Nisalak A, Kalayanarooj S, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. En: J Clin Microbiol. 1998 January; 36(1): 234–238.
74. Ludert JE, Mosso C, Ceballos-Olvera I, del Angel RM. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. En: Virol J. 2008 Apr 25; 5:51.
75. Barkham TM, Chung YK, Tang KF, Ooi EE. The performance of RT-PCR compared with a rapid serological assay for acute dengue fever in a diagnostic laboratory. En: Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006 Feb; 100(2):142-148.

76. Organización Panamericana de la Salud. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: Guías para su prevención y control. Washington, D.C. Publicación Científica 548, p 110. 1995.
77. Alejandria M. Dengue haemorrhagic fever or dengue shock syndrome in children. En: BMJ Clin Evid 2007;08:917
78. Dung NM, Day NP, Tam DT, Loan HT, et al. Fluid replacement in dengue shock syndrome: a randomized, double-blind comparison of four intravenous-fluid regimens. En: Clin Infect Dis. 1999;29:787-94.
79. Ngo NT, Cao XT, Kneen R, et al. Acute management of dengue shock syndrome: a randomized double-blind comparison of 4 intravenous fluid regimens in the first hour. En: Clin Infect Dis. 2001. 15; 32:204-13.
80. Sumarmo. The role of steroids in dengue shock syndrome. En: Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1987; 18:383-9.
81. Wills BA, Nguyen MD, Ha TL, et al. Comparison of three fluid solutions for resuscitation in dengue shock syndrome. En: N Engl J Med. 2005. 1; 353:877-89.
82. Gupta B., Lalchandama K. Molecular mechanisms of glucocorticoid action. Review Article. En: CURRENT SCIENCE, VOL.83, NO.9,10 November 2002
83. Snijdewint F.G.M.; Kapsenberg M.L.; Wauben-Penris P.J.J.; Bos J.D. Corticosteroids class-dependently inhibit in vitro Th1- and Th2-type cytokine production. En: Immunopharmacology, Volume 29, Issue 2, March 1995, Pages 93-101

84. Tischner D, Reichardt HM. Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. En: Mol Cell Endocrinol. 2007 Sep 15;275(1-2):62-70.
85. Miura M, Kohno K, Ohki H, et al. Effects of methylprednisolone pulse on cytokine levels in Kawasaki disease patients unresponsive to intravenous immunoglobulin. En: Eur J Pediatr. 2008 Oct; 167(10):1119-23.
86. Gómez S., Gutierrez A.M., Valenzuela E. Corticoids: 60 Years Later a Pending Subject. Artículo de revisión. En: Rev. Cienc. Salud. Bogotá (Colombia) 5 (3): 58-69, septiembre-diciembre de 2007
87. Senaka Rajapakse. Corticosteroids in the treatment of dengue illness. REVIEW. En: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (2009) 103, 122—126
88. Munoz C, Carlet J, Fitting C, et al. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. En: J Clin Invest. 1991 November; 88(5): 1747–1754.
89. Frankenberger M, Häussinger K, Ziegler-Heitbrock L. Liposomal methylprednisolone differentially regulates the expression of TNF and IL-10 in human alveolar macrophages. En: Int Immunopharmacol. 2005 Feb;5(2):289-99.
90. Mackworth-Young CG, Walport MJ, Hughes GR. Thrombocytopenia in a case of systemic lupus erythematosus: repeated administration of 'pulse' methyl prednisolone. En: Br J Rheumatol. 1984 Nov;23(4):298-300.

91. Umland SP, Schleimer RP, Johnston SL. Review of the Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Glucocorticoids for Use in Asthma. En: *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* (2002) 15, 35–50
92. Tassniyom S, Vasanawathana S, Chirawatkul A. Failure of high dose methylprednisolone in established dengue shock syndrome: A placebo-controlled, double-blind study. En: *Pediatrics* 1993; 92:111.
93. Medin CL, Rothman AL. Cell type-specific mechanisms of interleukin-8 induction by dengue virus and differential response to drug treatment. En: *J Infect Dis* 2006; 193:1070-7.
94. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 10 Edición. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A. 2003. p. 1680.
95. De Flora S, Grassi C, Carati L. Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term N-acetylcysteine treatment. En: *Eur Respir J*. 1997; 10:1535-41.
96. Martinez RA, Diaz FA, Villar LA. Evaluation of the World Health Organization clinical definition of dengue. En: *Biomedica*. 2005 Sep; 25(3):412-416.
97. Blacksell SD, Doust JA, Newton PN, et al. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of rapid immunochromatographic assays for the detection of dengue virus IgM antibodies during acute infection. En: *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006 Aug;100(8):775-84.

98. Martínez RA, Díaz FA, Villar LA. Evaluación de una prueba de Inmunocromatografía para el diagnóstico temprano del Dengue. En: Infectio 2006 (resumen).
99. Kurt AN, Aygun AD, Godekmerdan A, Kurt A, Dogan Y, Yilmaz E. Serum IL-1beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis. En: Mediators Inflamm. 2007;2007:31397
100. Messer J, Eyer D, et al. Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. En: J Pediatr. 1996 Oct;129(4):574-80.
101. Martin H, Olander B, Norman M. Reactive hyperemia and interleukin 6, Interleukin 8, and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. En: Pediatrics. 2001 Oct; 108(4):E61.

Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ACLARAR LA CAUSA DEL SINDROME FEBRIL AGUDO. Universidad Industrial de Santander – COLCIENCIAS

Antes de que usted decida si va a participar en este estudio, es importante que Usted entienda lo que se hará en el estudio, de manera que Usted tenga la información necesaria para tomar esa decisión. Esto quiere decir que Usted es libre de escoger si participa o no.

Propósito de la toma de las muestras

El dengue presenta síntomas parecidos a otras enfermedades que también causan fiebre, por esta razón el Grupo de Epidemiología Clínica, adscrito al Centro de Investigaciones Epidemiológicas de la Universidad Industrial de Santander (CIE-UIS), le tomará una muestra de sangre para realizar un cuadro hemático (con conteo de las plaquetas) y una prueba de diagnóstico rápido para dengue, con el fin de saber si es el dengue el causante de su Fiebre. Sin embargo, Si la prueba para dengue es negativa una parte de la muestra de sangre se almacenará, para realizar estudios adicionales que permitan conocer si existen otras causas de su enfermedad actual (Fiebre Aguda) y estudiar otros factores asociados.

Quienes pueden participar

Usted ha sido seleccionado para participar en el estudio dado que cumple con los criterios que previamente establecieron los investigadores para poder ingresar. Estos son: ser mayor de 5 años, tener un cuadro febril menor de cinco días sugestivo de dengue y no tener una enfermedad tumoral. En total participarán en el estudio 1252 pacientes.

Confidencialidad

A sus muestras se le asignará un código, sólo los investigadores tendrán acceso al archivo en el cual se vincula su nombre al código de sus muestras. Los datos del estudio se presentarán en forma de promedios y porcentajes y en ningún caso se usarán nombres propios.

Procedimiento, riesgos, beneficios y costo

El médico le realizará unas preguntas y un examen físico completo. Las muestras de sangre serán tomadas con material desechable no reutilizable (1 tubo lila de 4ml y 2 tubos rojos de 6 ml). El riesgo es que al tomar la muestra de sangre se produzca dolor, además puede existir una probabilidad de infección y algunas personas pueden desarrollar un morado (sangre debajo de la piel), que desaparece en aproximadamente una semana. El médico que lo visitó le informará el resultado por vía telefónica de su cuadro hemático (plaquetas); si la prueba para dengue fue negativa se le darán recomendaciones sobre su enfermedad. Si fue **positiva**, el médico le ofrecerá la posibilidad de ingresar a otro estudio que incluye seguimiento de su enfermedad. Su aceptación nos podrá ayudar a conocer otras causas de fiebre diferentes a dengue que pueden tratarse. Usted no recibirá dinero por su participación, pero todos los exámenes y la valoración por el médico serán costeados por el proyecto.

Derecho a Rehusar

Usted debe saber que su aceptación es totalmente voluntaria. Si no acepta, la conducta de su médico y del equipo de salud no se modificará y se le brindará la misma atención ofrecida a otros pacientes que tienen su misma enfermedad. Así mismo, Si Usted acepta en cualquier momento puede retirar su consentimiento y puede contactar a los investigadores para que sus muestras no sean almacenadas.

Preguntas

Por favor, siéntase en la libertad de hacerme cualquier pregunta si hay algo que no haya entendido. También, si más adelante usted tiene alguna duda adicional acerca del estudio, puede contactar a la médico Ruth Aralí Martínez Vega (Coordinadora del proyecto) en el teléfono 6345781 o 6344000 ext. 3205. Si tiene alguna pregunta acerca de sus derechos puede contactar al Comité de Ética de la UIS a los teléfonos 6456325 o 6343125.

Declaración del participante

Al firmar este documento, Usted está aceptando que entiende la información que se le ha dado y que está de acuerdo en:

Si	No	Permitir que se le tome una muestra de sangre para la realización de un cuadro Hemático (con recuento de plaquetas) y una prueba de diagnóstico rápido de dengue.
-----------	-----------	---

Si	No	Permitir que su muestra de sangre sea almacenada y usada para buscar otros agentes causales de la Fiebre y estudiar otros factores clínicos o bioquímicos asociados
-----------	-----------	---

Si	No	Aceptaría usted que los investigadores lo contactaran nuevamente para informarlo sobre resultados de las pruebas que se realicen posteriormente.
-----------	-----------	--

Si Usted ha aceptado por favor escriba su nombre y firma. Si el paciente es un menor de edad (menor de 18 años) deberá además firmar uno de los padres.

Firma del participante

Nombre del participante:

Cédula o T.I.:

Fecha:

--	--	--

Firma del acudiente:

Cédula:

Nombre del padre o madre

Declaración del investigador

Yo certifico que le he explicado al paciente sobre esta investigación, y que él entiende el propósito del estudio y los posibles riesgos y beneficios asociados con su participación. Todas las preguntas que esta persona ha hecho se le han contestado.

Nombre del investigador:

Firma:

Anexo 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER-COLCIENCIAS ENSAYO CLÍNICO: EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA METILPREDNISOLONA Y LA N-ACETILCISTEÍNA PARA DISMINUIR LA SEVERIDAD EN DENGUE

Antes de que usted decida si va a participar en este ensayo clínico, es importante que entienda lo que se hará en el estudio, de manera que Usted tenga la información necesaria para tomar esa decisión. Este documento contiene información acerca de la investigación; una vez Usted entienda de lo que se trata, si Usted quiere participar en él se le solicitará que firme este documento. Esto quiere decir que Usted es libre de escoger si participa o no.

Propósito del estudio

El dengue es una infección viral transmitida por los mosquitos. Este virus produce fiebre cuya severidad puede ser variable en cada individuo por razones que aún no se conocen. En un esfuerzo por mejorar nuestro conocimiento sobre esta enfermedad y desarrollar formas más efectivas para controlarla, el grupo de Investigación de Epidemiología Clínica adscrito a la Universidad Industrial de Santander y con la financiación de COLCIENCIAS está llevando a cabo un estudio sobre la presencia de factores que favorecen el desarrollo de esta enfermedad y su tratamiento.

El tratamiento actual para el dengue consiste en la administración de analgésico-antipirético (Acetaminofén, para disminuir el dolor y la fiebre), aumento del consumo de líquido, reposo y vigilancia médica, es decir no se conoce un tratamiento específico para el dengue. Por lo anterior este estudio desea evaluar la eficacia (el efecto) y la seguridad de los fármacos metilprednisolona y N-

acetilcisteína en el tratamiento de pacientes con dengue y de esta forma conocer si estos medicamentos pueden disminuir: la severidad de la enfermedad, los síntomas y los días de trabajo o estudio perdidos.

Quienes pueden participar

Usted ha sido seleccionado para participar en el estudio dado que cumple con los criterios que previamente establecieron los investigadores para poder ingresar. Estos son: ser mayor de 5 años, tener un cuadro febril sugestivo de dengue, con disminución de leucocitos (células de defensa) o plaquetas o tener una prueba rápida en sangre positiva para infección por virus del Dengue. En total participarán en el estudio 400 pacientes.

Procedimiento del estudio

Si Usted acepta participar, el médico lo visitará diariamente hasta que Usted cumpla 8 días de haber iniciado la fiebre y le realizará una entrevista, le medirá el peso, la talla, la tensión y le hará un examen físico completo. Además le tomará una muestra de sangre (un tubo lila de 4ml y 1 tubo rojo de 6ml). En el caso que sea hospitalizado por la enfermedad, el seguimiento por el equipo del estudio se realizará en el sitio donde usted se encuentre. Además, se le contactará telefónicamente después del 10 día para verificar la ausencia de síntomas y se le visitará en su domicilio para un último control 15 días después del inicio de la enfermedad.

Si Usted acepta participar, será distribuido de forma aleatoria (al azar) en uno de los grupos. Usted recibirá como tratamiento metilprednisolona (tabletas) y N-acetilcisteína (sobres) de forma oral o recibirá tabletas y sobres sin fármaco activo (placebo), o una combinación de uno de los fármacos con un placebo según el grupo al cual Usted fue asignado, pero esto sólo será conocido por un investigador

del estudio, es decir ni Usted ni el médico, la enfermera o el personal de salud que lo visite sabrá cual de los dos tratamientos está recibiendo.

Las muestras de sangre se utilizarán para realizar diariamente un cuadro hemático con recuento de plaquetas y para determinar si el virus del dengue es el causante de sus síntomas, si éste ha alterado la función del hígado, del riñón o del músculo y para medir otras sustancias que se aumentan por la infección del virus. Los resultados del cuadro hemático se le informarán diariamente. Debido a que los otros exámenes no se realizan inmediatamente porque aún no se conoce su utilidad clínica, estos resultados no le serán entregados. Sin embargo, si usted desea saberlos puede comunicarse posteriormente a los teléfonos que se encuentran más adelante.

Confidencialidad

Toda la información obtenida será manejada por los investigadores protegiendo su privacidad, a Usted se le asignará un código y su nombre será borrado de los archivos de datos, sólo los investigadores tendrán acceso al único archivo en el cual se vincula su nombre con su código, los datos del estudio se presentarán en forma de promedios y porcentajes y Usted no será identificado de forma individual en ningún caso. Si sus muestras de sangre almacenadas son usadas para futuras pruebas, estas serán anónimas y tendrán que ser aprobadas por un Comité de Ética de Investigación en Sujetos Humanos.

Riesgos y beneficios

Los riesgos de este estudio incluyen que al tomar la muestra de sangre se produzca un dolor transitorio, con una baja probabilidad de infección y algunas personas pueden desarrollar un morado o hematoma (sangre debajo de la piel), que desaparece aproximadamente en una semana. En cuanto a la administración de los fármacos, éstos son seguros y han sido utilizados en múltiples

enfermedades como urticaria, alergias, en los pacientes con tos, asma y otras enfermedades pulmonares. Sin embargo, existe riesgo de que se disminuya su tensión arterial, o de hacer alergia al fármaco, o de que usted presente algún sangrado digestivo (que se puede también deber directamente al dengue), en cualquiera de los casos existen instrucciones claras del manejo que recibirá por parte del personal que le esté administrando el medicamento.

Considerando lo que se conoce hasta ahora de estos medicamentos, esperamos que le generen más beneficios que riesgos. Adicionalmente, su participación en este estudio nos podrá ayudar a entender mejor la enfermedad y conocer si estos dos medicamentos disminuyen la severidad (el Dengue Hemorrágico), los síntomas y la incapacidad generada por el dengue, con lo cual Usted y personas como Usted podrán beneficiarse de su participación.

Costo y compensación

Usted no recibirá pago alguno por su participación en el estudio, pero todas las pruebas y los medicamentos administrados serán gratuitos, al igual que las visitas hechas por el personal de salud del estudio. Si debido a su evolución clínica es necesario hospitalizarlo, se ha establecido con la institución donde usted consultó inicialmente que se le brindará allí el manejo médico intrahospitalario que usted requiera.

Derecho a Rehusar o abandonar el estudio

Usted debe estar consciente que su participación en el estudio es totalmente voluntaria. En caso de no aceptar participar la conducta de su médico tratante y de todo el equipo de salud no se modificará y se le brindará las mismas terapias ofrecidas a otros pacientes que tienen su misma condición. Aún después de aceptar participar Usted tendrá el derecho a retirarse del estudio o de negarse a

contestar una pregunta o a dar una muestra de sangre en el momento que Usted lo desee.

Preguntas

Por favor, siéntase en la libertad de hacerle cualquier pregunta al personal que lo está entrevistando si hay algo que **NO** entendió. Si tiene alguna pregunta adicional sobre el estudio más adelante, Usted puede contactar a la Dra. Ruth Aralí Martínez (Coordinadora del estudio) al teléfono 6345781 o al 6344000 extensión 3205. Si Usted tiene alguna pregunta acerca de sus derechos como participante en este estudio puede contactar al comité de Ética de la Facultad de Salud de la UIS a los teléfonos 6456325 o 6343125.

Declaración del participante

Nosotros le entregaremos una copia de este documento. Al firmar este, Usted está aceptando que entiende la información que se le ha dado y que está de acuerdo en participar como sujeto de investigación en este estudio.

¿Acepta Usted participar en este estudio voluntariamente? Si No

Si su respuesta es afirmativa por favor especifique a continuación con lo que está de acuerdo:

Si	No	Contestar a las preguntas de una entrevista de manera veraz y permitir que le tomen la presión arterial, peso, talla y le realicen un examen físico.
----	----	--

Si	No	Dar muestra de sangre para realizar un cuadro hemático y las pruebas mencionadas.
----	----	---

Si	No	Permitir que su muestra de sangre sea almacenada y usada en estudios futuros incluyendo pruebas genéticas.
----	----	--

Si	No	Permitir que le sea administrado de forma oral los medicamentos (sobres y tabletas)
----	----	---

Si	No	Aceptar que se realice un seguimiento telefónico después del 10 día de Enfermedad.
----	----	--

Si	No	Después de 15 días de la fiebre, en la fase de recuperación, recibir una última visita de control en la que se tomará la última muestra de sangre.
----	----	--

Si	No	Aceptaría ser contactado de nuevo para informarle sobre resultados de las pruebas realizadas posteriormente.
----	----	--

Si Usted ha aceptado participar, por favor escriba su nombre y firme en el espacio de más abajo. Si el paciente es un menor de edad (menor de 18 años) deberá además firmar uno de los padres.

Firma del participante

Nombre del participante:

Cédula o T.I.:

Fecha:

--	--	--

Firma del acudiente:

Cédula:

Nombre del padre o madre

Firma del testigo:

Cédula:

Nombre del testigo

Dirección:

Relación:

Firma del testigo:

Cédula:

Nombre del testigo

Dirección:

Relación:

Declaración del investigador

Yo certifico que le he explicado al paciente sobre esta investigación, y que él entiende el propósito del estudio y los posibles riesgos y beneficios asociados con su participación. Todas las preguntas que esta persona ha hecho se le han contestado.

Nombre del investigador:

Firma:

Anexo 3. ACTA 34 DE NOVIEMBRE DE 2005. EL SUSCRITO SECRETARIO EJECUTIVO DE LA SALA ESPECIALIZADA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS DE LA COMISIÓN REVISORA

En atención a que en Acta No. 34 del 23 de noviembre de 2005, se tienen unos conceptos y recomendaciones a solicitudes por parte de usuarios y que mediante Resolución No. 2006000015 del 05 de Enero de 2006, la Dirección General del INVIMA en uso de las facultades legales que el Decreto 1290 de 1994, el Decreto 123 de 1995 y el Decreto 000936 de 1996 le otorgan, adopta los siguientes numerales del acta en referencia

2.11.20 REFERENCIA: Protocolo 11020416433

Interesado: Universidad Industrial de Santander

Radicado: 5034033 del 18 de octubre de 2005

"Evaluación de la eficacia y seguridad de la Metilprednísolona y la N- acetilcisteina para disminuir la severidad del Dengue".

El interesado solicita a la Comisión Revisora revisión y aprobación del protocolo de la referencia.

CONCEPTO: Revisada la información enviada por el interesado la Comisión Revisora acepta el protocolo.

Dada en Bogotá., D.C a los cinco (5) días del mes de Enero de 2006.

JUDITH DEL CARMEN MESTRE ARELLANO

Subdirectora de Medicamentos y Productos Biológicos

**Secretaria Ejecutiva de la Comisión Revisora Sala Especializada de
Medicamentos**

Disponible en: <http://www.invima.gov.co/version1/>

Anexo 4. Definición operativa de las variables

Nombre	Definición conceptual	Tipo de variable	Definición operacional
Edad	Años de vida a partir del día de nacimiento	Razón	
Género	Género de nacimiento de cada persona	Dicotómica	Masculino :1 Femenino: 0
Día de enfermedad	Número de días calculados a partir de la fecha de inicio de fiebre hasta la fecha de ingreso al estudio	Razón	
Dengue confirmado	Diagnóstico de la enfermedad por serología, aislamiento viral, RT-PCR, Panbio	Dicotómica	Dengue: 1 Síndrome Febril Agudo: 0
Tratamiento	Intervención administrada al paciente en el estudio	Nominal	MTP + Placebo NAC Placebo MTP+ Placebo NAC
Fiebre	Sensación de elevación de la temperatura o medición de la temperatura a nivel axilar mayor o igual a 38° C	Categórica	Si No
Recuento de leucocitos	Cantidad de glóbulos blancos medidos en la muestra de sangre de un paciente en un momento determinado	Continua	
Recuento de plaquetas	Cantidad de plaquetas medidas la muestra de sangre de un paciente en un momento determinado	Continua	
Niveles de	Concentración de IL-1 β medida en	Continua	

IL-1 β Basal	la muestra tomada al ingreso al estudio		
Niveles de IL-6 Basal	Concentración de IL- 6 medida en la muestra tomada al ingreso al estudio	Continua	
Niveles de IL- 8 Basal	Concentración de IL- 8 medida en la muestra tomada al ingreso al estudio	Continua	
Niveles de TNF- α Basal	Concentración de TNF- α medida en la muestra tomada al ingreso al estudio	Continua	
Niveles de IL-6 post intervención	Concentración de IL- 6 medida en la muestra 48 ó 72h posterior a recibir la intervención	Continua	
Niveles de TNF- α post intervención	Concentración de TNF- α medida en la muestra 48 ó 72h posterior a recibir la intervención	Continua	

PARA USO DEL PERSONAL DEL LABORATORIO:

Rto. plaquetas	
-----------------------	--

Rto. Leucocitos	
------------------------	--

PANBIO TEST ¿Se hizo la prueba?

Si

No

Resultado	Cont	IgM	Intensidad IgM			IgG	Intensidad IgG		
			1	2	3		1	2	3
Positivo									
Negativo									