

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL, SUPERÓXIDO
DISMUTASA Y GLUTATIÓN PEROXIDASA COMO PREDICTORES DE
GRAVEDAD EN PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL AGUDO POR DENGUE**

ANYELA YULIANA LOZANO PARRA

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

2015

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL, SUPERÓXIDO
DISMUTASA Y GLUTATIÓN PEROXIDASA COMO PREDICTORES DE
GRAVEDAD EN PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL AGUDO POR DENGUE**

ANYELA YULIANA LOZANO PARRA

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

Director:

MD, MSC. LUIS ÁNGEL VILLAR CENTENO

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

2015

DEDICATORIA

A Dios por permitirme cumplir este logro.

A mi familia:

A mis padres quienes hicieron todo en la vida
para que yo pudiera lograr mis sueños.

A mis hermanos por su compañía y amor.

A mi esposo Oscar Fernando por ser mi
compañero de vida, brindarme su gran amor,
paciencia y apoyo incondicional

Anyela

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial al doctor Luis Ángel Villar que, como tutor de esta tesis, me ha orientado, apoyado y corregido en mi labor científica.

Al Dr. Víctor Mauricio Herrera, por sus valiosas asesorías epidemiológicas en este trabajo.

Al Grupo de Epidemiología Clínica

A todas mis compañeras del CIE, Isis, Luz Aida, Carolina, Lina, Janeth, Margarita que me han acompañado a lo largo de este proyecto. Gracias por su amistad y cariño.

A mi abuelita Rosa María por ser un ejemplo de fortaleza y su apoyo incondicional.

A mis evaluadores: Lyda Osorio y Jairo Rodríguez.

Y a todas aquellas personas que colaboraron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	22
3 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	23
3.1 HISTORIA NATURAL.....	23
3.1.1 Virus	23
3.1.2 Ciclo de transmisión	24
3.2 CURSO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD.....	24
3.2.1 Fase Febril	25
3.2.2 Fase Crítica	25
3.2.3 Fase de Convalecencia o Recuperación	26
3.3 DIAGNÓSTICO EN DENGUE	27
3.3.1 Diagnóstico de laboratorio.....	27
3.3.2 Diagnóstico Clínico.....	29
3.4 PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD	32
3.5 RESPUESTA INMUNE.....	33
3.6 ESTRÉS OXIDATIVO.....	35
3.6.1 Generalidades.....	35
3.6.2 Mecanismos de generación de estrés oxidativo en dengue	36
3.6.3 Antecedentes en Dengue	38
3.7 BIOMARCADORES DE PREDICCIÓN DENGUE GRAVE.....	40
3.8 MODELOS CLÍNICOS DE PREDICCIÓN DE GRAVEDAD EN DENGUE	41
4 OBJETIVOS	43
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43

5	JUSTIFICACIÓN	44
6	HIPÓTESIS	47
7	METODOLOGÍA.....	48
7.1	TIPO DE ESTUDIO	48
7.2	POBLACIÓN.....	48
7.3	DEFINICIONES	49
7.3.1	Caso.....	49
7.3.2	Control.....	50
7.3.3	Infección Confirmada por dengue	50
7.3.4	Infección probable por dengue.....	50
7.4	CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	51
7.4.1	Para la cohorte AEDES.....	51
7.4.2	Para el estudio de casos y controles.....	51
7.5	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	51
7.5.1	Para la cohorte AEDES.....	51
7.5.2	Para el estudio de casos y controles.....	52
7.6	TAMAÑO DE MUESTRA.....	52
7.7	VARIABLES.....	53
7.7.1	Variables Independientes	53
7.7.2	Variable Dependiente o de resultado	53
7.7.3	Potenciales variables de confusión	54
7.7.4	Otras posibles variables asociadas	54
7.8	MUESTREO	55
7.9	ESPÉCIMEN DE ANÁLISIS	55
7.10	MEDICIÓN	55
7.10.1	Determinación Superóxido dismutasa.....	56
7.10.2	Determinación de Capacidad antioxidante total	57
7.10.3	Determinación Glutación peroxidasa	59
7.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
8	CONSIDERACIONES ÉTICAS VIGENTES.....	63

9	PRESUPUESTO	66
10	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	67
11	TRAYECTORIA DEL GRUPO	68
12	RESULTADOS	69
12.1	ANÁLISIS CASOS Y CONTROLES DE DENGUE SEGÚN SU GRAVEDAD	70
12.2	ANÁLISIS DE DESENLACES INTERMEDIOS	76
13	DISCUSIÓN.....	79
13.1	HALLAZGOS PRINCIPALES	79
13.2	OTROS HALLAZGOS	81
13.3	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	82
13.4	FORTALEZAS DEL ESTUDIO	83
14	CONCLUSIONES.....	85
15	ESTRATEGIAS DE COMUNICACIÓN	86
	BIBLIOGRAFÍA.....	87
	ANEXOS	96

LISTADO DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Curso clínico de la enfermedad por dengue	25
Figura 2. Línea de tiempo de las infecciones primarias y secundarias por el virus del dengue y los métodos de diagnóstico que se pueden usar para detectar la infección.....	28
Figura 3. Diagrama de clasificación de casos de dengue y niveles de gravedad ..	30
Figura 4. Inmunopatogénesis del dengue grave.	34
Figura 5. Cascada de citoquinas inducida por el virus dengue	35
Figura 6. Curva de Calibración Actividad SOD. Absorbancia en función de la concentración de la SOD (U/ml)	57
Figura 7. Curva de Calibración Capacidad Antioxidante. Absorbancia en función de la concentración de Trolox (mM).....	58
Figura 8. Modelo de una curva de actividad enzimática de GPX.....	60
Figura 9. Flujograma de selección de sujetos de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión del estudio en la Cohorte AEDES.	69
Figura 10. Concentración CAT, SOD y la actividad de GPx en casos de dengue grave y dengue no grave	73
Figura 11. Evolución del recuento de plaquetas (con transformación logarítmica) en los pacientes con infección por dengue durante su seguimiento	78

LISTADO DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Centros de captación de los participantes de la Cohorte AEDES	49
Cuadro 2. Características demográficas y clínicas al momento de ingreso al estudio de acuerdo a la severidad	71
Cuadro 3. Resultados de los indicadores de estrés oxidativo realizados en fase aguda de la enfermedad por dengue	73
Cuadro 4. Asociación de CAT, SOD y GPX con la gravedad de la enfermedad por dengue	75
Cuadro 5. Análisis de curva ROC (AUC) del modelo de predicción de gravedad de dengue y los indicadores de estrés oxidativo.	76
Cuadro 6. Diferencias en la línea de base para desenlaces intermedios de acuerdo a la concentración de CAT	77
Cuadro 7. Diferencias en la línea de base para desenlaces intermedios de acuerdo a la concentración de SOD	77
Cuadro 8. Diferencias en la línea de base para desenlaces intermedios de acuerdo a la actividad de GPx	77

LISTADO DE ANEXOS

	pág.
ANEXO 1. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.	97
ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO AEDES	108
ANEXO 3. PRESUPUESTO	113

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL, SUPERÓXIDO DISMUTASA Y GLUTATIÓN PEROXIDASA COMO PREDICTORES DE GRAVEDAD EN PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL AGUDO POR DENGUE*

AUTOR: ANYELA LOZANO PARRA†

PALABRAS CLAVE: Dengue, estrés oxidativo, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, capacidad antioxidante total.

Introducción: La infección por dengue ha sido asociada a la inducción de estrés oxidativo; sin embargo, desconocemos si este es predictor de sus complicaciones.

Objetivo: Evaluar el comportamiento de indicadores de estrés oxidativo en pacientes con síndrome febril agudo por dengue como predictor de su gravedad.

Metodología: Estudio de casos y controles anidado en la cohorte AEDES. Incluimos pacientes febriles captados ambulatoriamente, con diagnóstico confirmado de dengue (RT-PCR o ELISA NS1 positiva en muestra única o seroconversión/cuadruplicación de títulos IgM o IgG en muestras pareadas). Los casos fueron pacientes que desarrollaron hemorragia mayor o hipotensión arterial durante el seguimiento. Determinamos actividad de la glutatión peroxidasa (GPx: n[casos]=44; n[controles]=88), concentración de superóxido dismutasa (SOD: n[casos]=27; n[controles]=31) y concentración de capacidad antioxidante total (CAT: n[casos]=27; n[controles]=32) en sueros obtenidos 48-96 horas del inicio de síntomas. Estimamos ORs para los cuartiles de cada marcador, ajustando por edad, género, horas de fiebre y tipo de infección en modelos de regresión logística múltiple.

Resultados: Evaluamos 132 pacientes (edad media: 25,2 años, 49,2% mujeres) con actividad promedio de GPx de 131,8 ($\pm 23,0$) mmol/min/ml, concentración de SOD de 6,6 ($\pm 1,9$) U/ml y concentración de CAT de 2,0 ($\pm 0,7$) mM. En el análisis multivariado, los ORs asociados al segundo, tercer y cuarto cuartil de GPx fueron 1,19 (IC95%: 0,43-3,29), 0,49 (IC95%: 0,15-1,56) y 0,94 (IC95%: 0,31-2,90), respectivamente. Los ORs correspondientes a los mismos cuartiles de concentración de SOD fueron 2,50 (IC95%: 0,50-12,7), 2,58 (IC95%: 0,45-14,8) y 6,59 (IC95%: 1,07-40,4), y para CAT fueron 5,26 (IC95%: 0,93-29,7), 5,06 (IC95%: 1,02-25,1) y 4,87 (IC95%: 0,92-25,7).

Conclusiones: Observamos un gradiente no estadísticamente significativo entre respuesta enzimática antioxidante y probabilidad de complicaciones. Este hallazgo requiere confirmación en estudios que cuenten con muestras de mayor tamaño.

* Proyecto de grado

† Facultad de Salud. Departamento de Ciencia Básicas. Director: Luis Ángel Villar Centeno

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF TOTAL ANTIOXIDANT STATUS, SUPEROXIDE DISMUTASE AND GLUTATHIONE PEROXIDASE AS SEVERITY PREDICTORS IN PATIENTS WITH ACUTE DENGUE FEVER †

AUTHOR: ANYELA LOZANO PARRA §

KEYWORDS: Dengue, oxidative stress, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, total antioxidant status

Introduction: Dengue infection has been associated with oxidative stress induction. However, we ignore if oxidative stress is a predictive biomarker of severe dengue.

Objective: To evaluate the behavior of oxidative stress indicators in patients with acute dengue fever as a severity predictor.

Methods: A case–control study nested within the AEDES cohort. We include febrile patients recruited in ambulatory healthcare services, with diagnosis confirmed (RT-PCR or ELISA NS1 positive in single sample or seroconversion/four-fold increase in IgM or IgG levels in paired sera). The cases were patients that developed major hemorrhage or arterial hypotension during the follow up. We measured glutathione peroxidase activity (GPx: n[cases]=44; n[controls]=88), superoxide dismutase concentration (SOD: n[cases]=27; n[controls]=31) and total antioxidant status (TAS: n[cases]=27; n[controls]=32) in serums obtained between 48-96 hours of symptoms onset. We estimated ORs for the quartiles of each marker, adjusted for age, gender, hours of fever and infection type with multiple logistic regression models.

Results: We evaluated 132 patients (middle age: 25,2 years old, 49,2% women) with 131,8 (\pm 23,0) mmol/min/ml of GPx activity average, 6,6 (\pm 1,9) U/ml of SOD concentration average and 2,0 (\pm 0,7)mM of TAS concentration average. In the multivariate analysis, the ORs associated with the second, third and fourth quartile of GPx were 1,19 (IC95%: 0,43-3,29), 0,49 (IC95%: 0,15-1,56) and 0,94 (IC95%: 0,31-2,90), respectively. Corresponding ORs to the same concentration quartile of SOD were 2,50 (IC95%: 0,50-12,7), 2,58 (IC95%: 0,45-14,8) and 6,59 (IC95%: 1,07-40,4), and for TAS were 5,26 (IC95%: 0,93-29,7), 5,06 (IC95%: 1,02-25,1) and 4,87 (IC95%: 0,92-25,7).

Conclusions: We observed a gradient not statistically significant between the enzymatic antioxidant response and the probability of complications. This finding requires confirmation in studies that have larger sample sizes.

† Proyecto de grado

§ Facultad de Salud. Departamento de Ciencia Básicas. Director: Luis Ángel Villar Centeno

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad viral aguda transmitida por la picadura de mosquitos *Aedes aegypti*, que constituye hoy la arbovirosis más importante a nivel mundial en términos de morbilidad, mortalidad e impacto económico (1). Siendo endémica en más de 100 países en áreas tropicales y subtropicales del mundo (1). Según la Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), en América durante los últimos 10 años se quintuplicaron los casos incidentes (2003-2013) (2), en donde cerca de 500 millones de personas viven en riesgo de contraer dengue. Colombia, es uno de los países del cono sur que más reporta casos de dengue, junto con Brasil y Venezuela (3).

Clínicamente, en la mayoría de los casos, la enfermedad cursa como un cuadro febril (duración de 7 a 10 días). Cerca del 15% de los casos sintomáticos evolucionan hacia formas graves de la enfermedad, de los cuales, hasta un 5% pueden llegar a tener un desenlace fatal (1, 4, 5); si se realiza un manejo adecuado y oportuno de la enfermedad, este valor se podría disminuir a menos del 1% (1, 4, 5). El tratamiento recomendado por la OMS es de tipo sintomático; por lo tanto, la prevención de la evolución de la enfermedad hacia formas graves depende de lo riguroso sea el seguimiento clínico. Luego, es necesario identificar posibles predictores de severidad de fase aguda, que sirvan como herramienta para los médicos tratantes en la identificación de aquellos sujetos que se complicarán y los que no lo harán.

La medición de indicadores de estrés oxidativo en la enfermedad por dengue, podría ser considerada en cuatro posibles categorías: biomarcador pronóstico de

gravedad en fase aguda, un posible blanco terapéutico, biomarcador diagnóstico de la infección o un biomarcador que contribuye al conocimiento de la patogenia de la enfermedad (6). En esta investigación, evaluamos el rol de biomarcador pronóstico de gravedad, de los indicadores glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y capacidad antioxidante total.

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue es una arbovirosis que ha incrementado drásticamente su incidencia en las últimas décadas (1). Asociada a una creciente concentración de la población en áreas urbanas, la adaptación de su vector *Aedes aegypti* a mayores alturas, la incidencia y expansión de esta infección por arbovirus hacia nuevas regiones del trópico y área subtropical del mundo, la infección ha adquirido dimensiones imprevisibles (1). Hoy la Organización Mundial de la Salud, estima que cerca de un 40% de la población mundial corre el riesgo de contraer la enfermedad (1); siendo endémica en más de 100 países en África, las Américas, Mediterráneo oriental, Asia suroriental y Pacífico occidental (5). En Colombia, 23'932.381 millones de personas están en riesgo de infectarse (7). Durante el 2010, periodo de mayor epidemia en el país (7), se reportó al Sistema Nacional de Vigilancia (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud 157.203 casos de Dengue, de los cuales, 9.482 fueron considerados casos graves de la enfermedad, con 217 muertes atribuibles a ella; como resultado, la letalidad (2,28%) aumentó 7,5 veces respecto al año anterior (8). Del mismo modo, durante el 2014, se notificaron 47.946 casos de dengue confirmados, de ellos 46.139 son casos dengue y 1.807 son dengue grave, con 88 muertes confirmadas por dengue; el 78% de estos reportes, son generados por 12 departamentos, siendo Santander, Valle del Cauca, Norte de Santander y Tolima los departamentos que más reportan (9). Lo anterior, indica el alto nivel de transmisión en diferentes regiones del país.

La carga de la enfermedad en las áreas endémicas es muy elevada. En América, durante el periodo 2000-2007, los costos directos e indirectos ascendieron a 2,1 millones de dólares, con una pérdida de 72.277 años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) (10). Los costos directos e indirectos durante el periodo

2003 a 2007 en Colombia, se ubicaron entre 35 y 82 millones de dólares (11). En Bucaramanga durante los años 2006 y 2009, se reportó una pérdida de 1.377 AVAD por cada 100.000 personas (12).

La enfermedad puede cursar en forma asintomática o expresarse con un amplio espectro clínico que incluye formas no graves (cuadro febril leve de 7 a 10 días, acompañado de cefalea, mialgias, artralgias y dolor retroocular) y formas graves, llegándose a presentar desenlaces fatales (1). Ante la ausencia de una terapia antirretroviral específica, el tratamiento de esta enfermedad es exclusivamente sintomático; sin embargo, la administración oportuna de líquidos intravenosos, antipiréticos y un seguimiento clínico cercano en los pacientes con mayor riesgo de complicaciones puede llegar a reducir la mortalidad (5). Existe la necesidad de identificar herramientas que orienten tempranamente al personal de salud, en la caracterización de los enfermos con mayor riesgo de evolucionar hacia formas graves; con el fin de priorizar su atención y brindar un cuidado específico y oportuno. Una de estas herramientas podrían ser algunos marcadores biológicos clínicamente útiles, con características de reproducibilidad, complejidad técnica alcanzable, y costos razonables (13).

En consecuencia a la respuesta de fase aguda en la infección, se genera un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (incluyendo el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxil (OH^\bullet)), además de, alteraciones en los mecanismos de defensa antioxidante (las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa) (14). El desbalance en la producción de agentes oxidantes y la defensa antioxidante provoca un fenómeno llamado “estrés oxidativo”. Este desequilibrio, contribuye a la patogenia de una amplia gama de enfermedades, incluyendo las infecciones virales. Estudios in vitro y en pacientes sugieren que el estrés oxidativo podría

tener un papel importante en la patogénesis de la infección por dengue (15-30); e inclusive, estar relacionada la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) con el riesgo de presentar la disfunción vascular (17-22).

En la fase inicial de la infección, los linfocitos T CD4 infectados inducen la producción de la citoquina *hCF*, encargada de activar a los macrófagos y células endoteliales para que sinteticen radicales de oxígeno mediante la vía de la NADPH oxidasa (31-33); lo que provoca, el inicio la ruta apoptótica de las células endoteliales y la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-8 e INF- α) e histamina; para finalmente, traducirse en el incremento de la permeabilidad vascular en los pacientes infectados (31). La hemoconcentración, hipoproteinemia, efusión pleural y ascitis son signos clínicos que evidencian los efectos de esta alteración sobre la condición clínica del paciente con dengue (34).

Investigaciones previas han sugerido alteraciones en la actividad oxidativa durante la infección por el virus dengue. *Gil et al.*, en pacientes adultos con dengue reportan reducción en la actividad de la GPx y aumento en la actividad de la SOD respecto a controles sanos; la capacidad antioxidante total (CAT) durante los primeros días de la enfermedad no muestra diferencia alguna al compararlos con controles sanos, sin embargo, si aumenta significativamente al séptimo día de la enfermedad ($p < 0,05$) (23). *Ray et al.*, al evaluar el estado antioxidante en niños con dengue, reportaron incremento en los niveles de superóxido dismutasa (SOD) y disminución de la glutatión peroxidasa (GPx) al compararlos con controles no febriles ($p < 0,005$) (24). *Klassen et al.*, determinaron la CAT y vitaminas en pacientes con dengue, encontrando niveles más bajos de CAT en comparación con controles sanos (25).

Considerando la posible relación entre las alteraciones en el balance oxidativo y los cambios en la permeabilidad vascular (sintomatología característica en pacientes con dengue grave) y los indicios de que las enzimas antioxidantes y la capacidad antioxidante total podrían sufrir cambios durante la infección, es plausible, la evaluación de estos marcadores de estrés oxidativo durante la fase temprana de la enfermedad, con el fin de ayudar a reconocer aquellos pacientes que se van a complicar, reduciendo los desenlaces graves asociados a esta patología.

2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Son los niveles altos de capacidad antioxidante total, superóxido dismutasa y bajos de glutatión peroxidasa en pacientes con dengue predictores tempranos de su gravedad?

3 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 HISTORIA NATURAL

3.1.1 Virus

El Virus Dengue (VDEN) es miembro de la familia *Flaviviridae*, un grupo de virus envueltos, icosaédrico, con un genoma constituido por ARN de cadena sencilla y polaridad positiva. El VDEN tiene 4 serotipos (VDEN 1, VDEN 2, VDEN3 y VDEN 4) los cuales exhiben características antigénicas y serológicas diferentes; a su vez, dentro de un mismo serotipo existen variantes genéticas relacionadas con la virulencia y la procedencia geográfica de la cepa (35). El genoma de los flavivirus tiene una longitud aproximada de 11.000 nucleótidos, y da lugar a 3 proteínas estructurales (proteína E de envoltura, prM de membrana y la proteína C de cápside) y a 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) (36).

El ingreso del virus a la célula blanco se puede dar por al menos dos mecanismos: por la unión de la proteína E a receptores celulares específicos o por la formación de complejos virus-anticuerpos no neutralizantes de tipo IgG (producidos por una infección previa por un serotipo diferente), que se unen a receptores de la fracción *Fc* presentes en la superficie de los macrófagos o monocitos. Una vez fusionado, el virus entra a las células por medio de la formación de endosomas (35, 37). La consecuente maduración de la vesícula endosomal, hace que la nucleocápside sea liberada al citoplasma. Allí, se inicia el proceso de replicación y traducción en el área perinuclear, para sintetizar las nuevas cadenas de RNA viral y las proteínas necesarias para el ensamblaje de nuevos viriones (38). Cuando está

formada la partícula inmadura en el retículo endoplásmico, esta se traslada al aparato de Golgi para continuar con su maduración y finalmente ser liberado para infectar nuevas células por exocitosis (38).

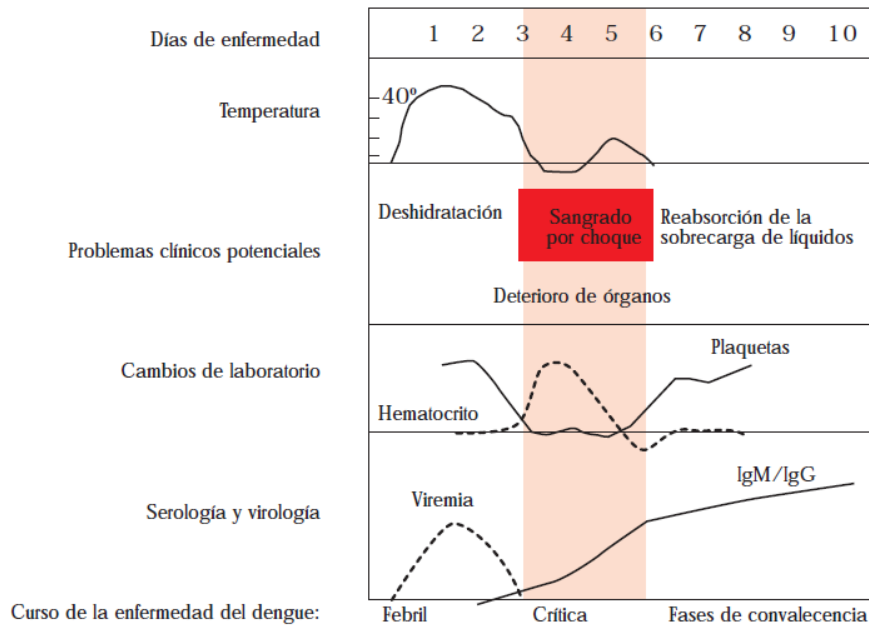
3.1.2 Ciclo de transmisión

La infección por el virus dengue es una arbovirosis. El VDEN es transmitido a los humanos, utilizando como vector principal al mosquito *Aedes aegypti* (36). Los mosquitos adquieren el virus por medio de la picadura de un huésped virémico. Después de un periodo de incubación de 8 a 12 días, el mosquito es capaz de transmitir el virus a un huésped susceptible como un ser humano (1, 5, 36). En los humanos picados por un mosquito infectado, los signos y síntomas tardan en aparecer de 4 a 7 días (rango de 3 a 14 días) (1).

3.2 CURSO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD

La Infección por el virus del dengue en los seres humanos es clínicamente de amplio espectro, va desde un cuadro asintomático, pasando por una enfermedad febril inaparente hasta la forma grave, pudiendo causar la muerte. Según la Guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el curso clínico de la enfermedad tiene tres fases principales (ver Figura 1) (5).

Figura 1. Curso clínico de la enfermedad por dengue



Fuente: OMS. Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2009. Adapted from WCL Yo, 1980 by Hung NT, Lurn LCS, Tan LH

3.2.1 Fase Febril

Generalmente, los pacientes desarrollan fiebre alta y repentina; este período febril agudo dura de 2 a 7 días y suele acompañarse de rubor facial, eritema de la piel, dolor corporal generalizado, mialgias, artralgias, cefalea y dolor retroocular. Las manifestaciones clínicas de esta etapa temprana, pueden ser difíciles de distinguir de otras enfermedades febriles agudas.

3.2.2 Fase Crítica

Se presenta cerca de la desaparición de la fiebre, ocurre por lo general en los primeros 3 a 7 días de la enfermedad. Puede aumentar la permeabilidad capilar

paralelamente con los niveles del hematocrito, lo cual se asocia con hemorragias de la mucosa nasal (epistaxis) y de las encías (gingivorragia), así como, con sangrado vaginal en mujeres en edad fértil (metrorragia o hipermenorrea). En este punto, los pacientes sin un gran aumento de la permeabilidad capilar mejoran; mientras, que aquellos con mayor permeabilidad capilar pueden empeorar como resultado de la pérdida de volumen plasmático. El derrame pleural y la ascitis pueden ser clínicamente detectables en función del grado de pérdida de plasma y del volumen de líquidos administrados. El aumento del hematocrito, así como el estrechamiento de la presión arterial diferencial, o presión de pulso, y la caída de la presión arterial media, reflejan la intensidad de la extravasación de plasma. El choque ocurre cuando un volumen crítico de plasma se pierde por extravasación, que casi siempre es precedido por los signos de alarma.

Cuando se produce el choque, la temperatura corporal puede estar por debajo de lo normal. Si el período de choque es prolongado o recurrente, se deriva la hipoperfusión de órganos, que da como resultado su deterioro progresivo, acidosis metabólica y coagulopatía de consumo. Las hemorragias en esta fase se presentan principalmente en el aparato digestivo (hematemesis, melena), pero pueden hacerlo en el pulmón o en el sistema nervioso central. El compromiso grave de diferentes órganos, como la hepatitis grave, la encefalitis, la miocarditis y la hemorragia profusa, también puede desarrollarse sin extravasación evidente de plasma o choque.

3.2.3 Fase de Convalecencia o Recuperación

Cuando el paciente sobrevive a la fase crítica (la cual no excede las 48 a 72 horas), pasa a la fase de recuperación, que es cuando tiene lugar una reabsorción gradual del líquido extravasado, el cual regresa del compartimiento extravascular

al intravascular. Hay una mejoría del estado general, se recupera el apetito, mejoran los síntomas gastrointestinales se estabiliza el estado hemodinámico, y se incrementa la diuresis. También, puede dar lugar a edema pulmonar o insuficiencia cardíaca congestiva.

3.3 DIAGNÓSTICO EN DENGUE

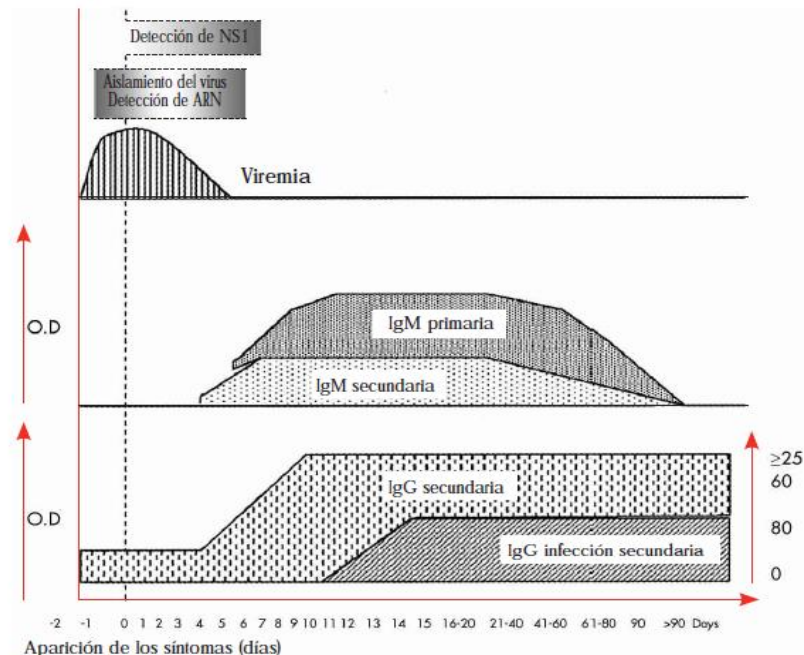
3.3.1 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico confirmatorio de la infección por dengue, se basa en pruebas de laboratorio directas e indirectas. Las pruebas directas detectan: a) virus circulante por medio de aislamiento viral, b) determinación del ARN viral por RT-PCR o antígeno viral NS1 por ELISA; y las técnicas indirectas, detectan anticuerpos específicos tipo IgG e IgM por ELISA de captura (5, 36). Las más empleadas en la práctica clínica para diagnóstico de dengue son las serológicas, debido a su alta sensibilidad y especificidad, su relativa facilidad técnica y disponibilidad; los cuales, detectan una elevación en sueros pareados de la concentración de anticuerpos contra el virus. En contraste, las pruebas de aislamiento viral y RT-PCR, requieren de una infraestructura compleja, reactivos de alto costo y personal entrenado. Por otro lado, la sensibilidad de estas pruebas es ampliamente influenciada por el momento de la enfermedad en que la muestra sanguínea sea extraída para la realización del diagnóstico de laboratorio y por el tipo de infección primaria o secundaria (34).

El virus puede ser detectable en los primeros 4 a 5 días de la enfermedad en el plasma, células sanguíneas circulantes y otros tejidos. En infección primaria, los anticuerpos de tipo IgM son detectables entre los días 5 a 10, alcanzando su pico

máximo dos semanas después de la aparición de los síntomas; enseguida empiezan a declinar hasta niveles no detectables durante dos a tres meses. Los títulos de anticuerpos IgG, aparecen al final de la primera semana de enfermedad, siendo detectables por varios meses, incluso de por vida (39). En infección secundaria, los títulos de anticuerpos aparecen rápidamente, exhibiendo reactividad cruzada con varios flavivirus. El anticuerpo IgG es predominante, siendo altos sus niveles aun en la fase aguda. Los primeros niveles de IgM se detectan en la etapa de convalecencia y son más bajos en comparación con la infección primaria (ver figura 2).

Figura 2. Línea de tiempo de las infecciones primarias y secundarias por el virus del dengue y los métodos de diagnóstico que se pueden usar para detectar la infección



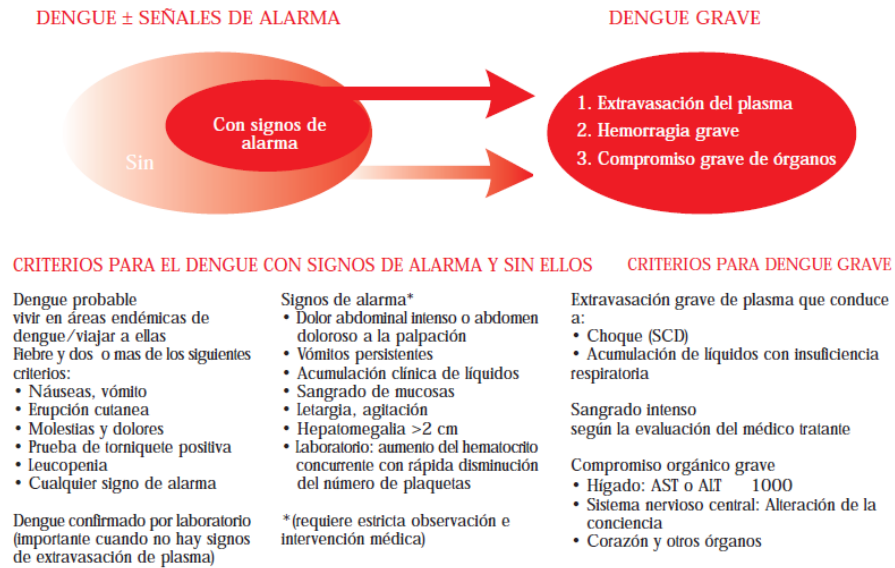
Fuente: OMS. Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2009. Adapted from WCL Yo, 1980 by Hung NT, Lurn LCS, Tan LH

Según la recomendación de la OMS, se considera un caso confirmado por laboratorio de dengue cuando existe un aislamiento viral positivo, una RT-PCR positiva, un viraje de negativo a positivo de anticuerpos IgM/IgG o cuadruplicación de los títulos de anticuerpos IgM/IgG en sueros pareados de fase aguda y convaleciente (5, 40).

3.3.2 Diagnóstico Clínico

Inicialmente, la recomendación de la OMS fue clasificar la enfermedad del dengue como: fiebre por dengue (FD) y dengue hemorrágico (FDH I, II, III y IV), siendo los grados III y IV el síndrome de choque por dengue (SCD) (39). El diagnóstico clínico con esta definición de caso, presenta dificultad para clasificar los FDH, dado a la baja sensibilidad para identificarlos correctamente (41-46). Ante el incremento de casos graves reportados y la necesidad de proveer a los clínicos, herramientas que les permitiera clasificar correctamente estos pacientes, la OMS considero evaluar una nueva definición. En el 2009, basados en los resultados del estudio DENCO (estudio con casi 2000 pacientes con infección por dengue confirmada realizado en ocho países), se recomendó clasificar los casos de dengue de acuerdo a los niveles de gravedad en; dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave (ver figura 3) (5). Uno de los estudios, que realizo la comparación de la sensibilidad para identificar correctamente los casos complicados de la enfermedad, muestra que la definición de FDH/SCD y dengue grave, tiene sensibilidad de 39.0% y 92.1%, respectivamente, en la identificación de aquellos pacientes que requieren ser ingresados a UCI, ventilación, administración de drogas inotrópicas o presentan falla orgánica. Lo cual muestra que, la definición del 2009 de la OMS es mucho más sensible para detectar los casos complicados que la definición de 1997 (42).

Figura 3. Diagrama de clasificación de casos de dengue y niveles de gravedad



Fuente: Organización Mundial de la salud. Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2009

Dengue sin signos de alarma: Paciente que presenta una enfermedad febril aguda de hasta siete días, acompañada de 2 o más de los siguientes síntomas: náuseas, vómitos, exantema, mialgias y artralgias, petequias o test positivo del torniquete, leucopenia, y que además tenga antecedente de desplazamiento (hasta 15 días antes del inicio de síntomas) o que resida en un área endémica de dengue.

Dengue con signos de alarma: Los signos de alarma son el resultado de un incremento de la permeabilidad capilar y marcan el inicio de la fase crítica. Entre ellos se incluye: a) Dolor abdominal intenso abdomen doloroso al momento de la palpación; Dolor reflejo asociado a una gran cantidad de líquido extravasado hacia las zonas perarrenales y perirrenales, que irrita los plexos nerviosos presentes en

la región retroperitoneal. Asimismo, es un efecto de la extravasación de líquido en la pared de la vesícula biliar y las asas intestinales. b) Vómito persistente: definido por tres o más episodios en 24 horas, impidiendo una adecuada hidratación oral y contribuyen a la hipovolemia. c) Acumulación clínica de líquidos: derrame pleural y ascitis diagnosticados clínicamente, por la presencia matidez basal, ausencia de frémito táctil basal, disminución del murmullo vesicular basal, matidez cambiante u onda ascítica. c) Sangrado de mucosas: documentado por epistaxis (espontánea o no espontánea) o gingivorragia (espontánea o no espontánea). d) Hepatomegalia: palpación del hígado por debajo de la reja costal derecha de más de 2 centímetros. e) Somnolencia y/o irritabilidad según evaluación clínica

Dengue Grave: Las formas graves de dengue se definen por uno o más de los siguientes criterios: a) choque por extravasación del plasma y/o acumulación de líquido con dificultad respiratoria, y/o b) sangrado grave, y/o c) compromiso grave de órganos. Se considera que el paciente está en choque por extravasación de plasma, si la presión de pulso (diferencia entre las presiones sistólica y diastólica) es igual o menos de 20 mm Hg, o la presión arterial media está por debajo de 70 mm Hg o si hay signos de perfusión capilar (extremidades frías, llenado capilar lento o pulso rápido y débil). La acumulación de fluidos serosos en pulmón suficientes para causar disnea. El sangrado grave según evaluación clínica documentada por hematemesis, melenas, hematoquecia o hematuria. Esta manifestación de gravedad puede generarse por factores vasculares, desequilibrio entre coagulación y fibrinólisis, y trombocitopenia. Compromiso grave de órganos: en pacientes con dengue grave puede presentarse miocarditis, encefalitis, hepatitis (transaminasas >1.000 U/mL, colecistitis alitiásica, insuficiencia renal aguda, y afección de otros órganos, incluso en ausencia de extravasación grave del plasma o choque. Este compromiso serio de órganos es por sí solo criterio de dengue grave.

3.4 PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD

La patogénesis integral del dengue grave aún no ha sido establecida claramente. Existen dos hipótesis principales que considerando la evidencia que las soporta, podrían explicar las complicaciones de la enfermedad.

La primera y más aceptada, es conocida como la hipótesis de la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA). Ésta, se fundamenta en la asociación entre infección secundaria con un serotipo heterólogo (una exposición previa a un serotipo diferente al que causa ahora la infección) y la enfermedad grave; y por el riesgo que presentan, los infantes nacidos de madres inmunizadas contra el dengue durante el primer año de vida (34, 47 - 50). En la infección por un serotipo de dengue (infección primaria), la respuesta inmune le confiere al paciente protección permanente específica para el respectivo serotipo (inmunidad homotípica) y transitoria por unos meses para los demás serotipos (inmunidad heterotípica) (51, 52). En la infección secundaria, los anticuerpos heterólogos preexistentes no alcanzan niveles de neutralización del virus infectante suficientes para controlar la infección (36, 50, 53). Por el contrario, se adhieren a los epítopes de la superficie del virus heterólogo, formando un complejo virus-anticuerpo, que une a los receptores Fc- γ presentes en la membrana celular de los monocitos/macrófagos y células endoteliales, incrementando el número de células infectadas, la replicación viral y la activación de linfocitos T de memoria; así como, la consecuente cascada de citoquinas proinflamatorias (interferón- γ (IFN- γ), interleuquina-2 (IL-2), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)) y mediadores vasoactivos que aumentan la permeabilidad vascular (54 - 57).

La segunda hipótesis, está relacionada con la virulencia del virus. Puesto que algunas cepas que muestran una mayor virulencia y son asociadas con las formas

graves de la enfermedad (58). El riesgo de desarrollar dengue grave, es mayor en las infecciones secundarias con el virus del dengue de serotipo 2 en comparación con los otros serotipos; además, se han encontrado diferencias estructurales entre las diversas cepas de dengue no grave y dengue grave (49, 52).

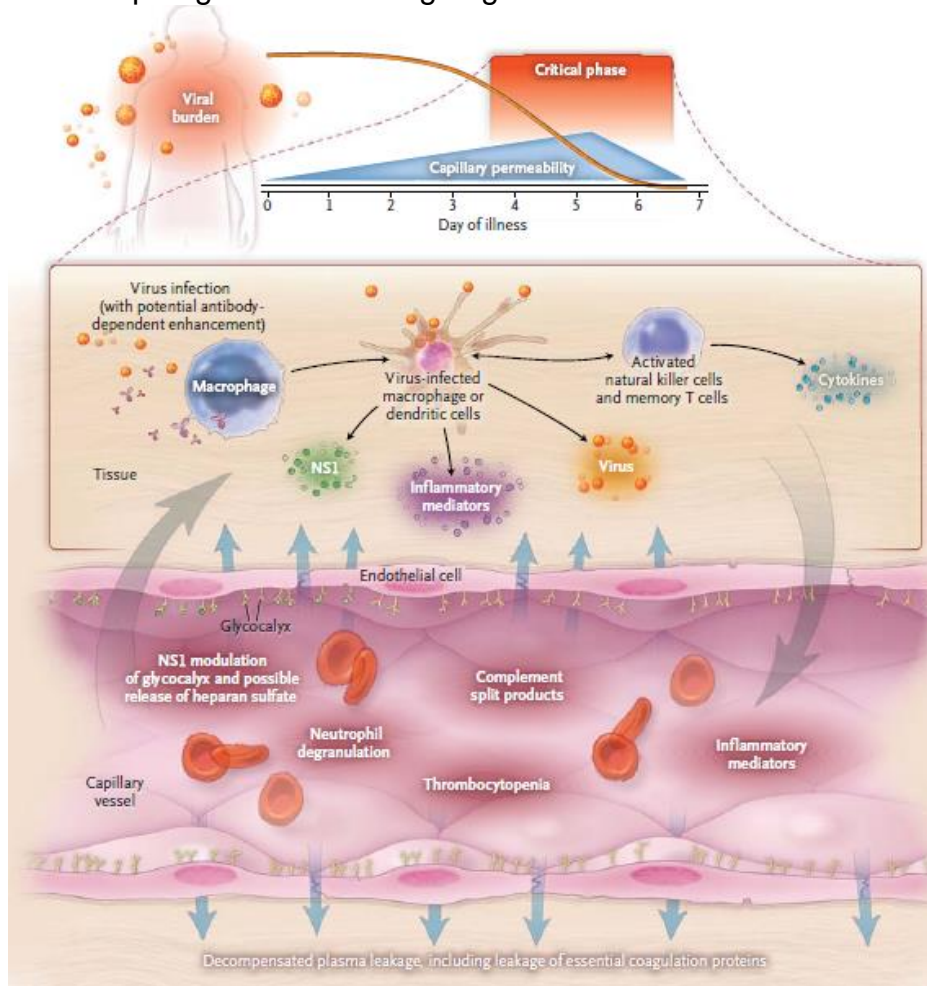
3.5 RESPUESTA INMUNE

En la infección por VDEN, las principales células diana son los monocitos, los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, aunque in vitro se ha reportado que infecta células endoteliales (38). Durante la infección primaria, la célula infectada induce la liberación de INF- γ e INF- β , para controlar la infección. Igualmente, mediante la presentación antigénica se activan linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, los cuales, inducen la liberación de citoquinas de tipo anti-inflamatorio o pro-inflamatorio (38, 59). En la infección secundaria, la ADA genera una expansión masiva en la producción de linfocitos T CD4⁺ de memoria, sensibilizados en una infección previa (serotipo heterólogo), para que proliferen y exacerben la producción de citoquinas tales como IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TNF- α , así como la lisis de los monocitos infectados (35, 57). El resultado de la liberación de estas citoquinas, es la activación de toda una cascada de citoquinas proinflamatorias, las cuales serían responsables de estimular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los fagocitos y las células endoteliales mediante el estallido respiratorio, y por ende el incremento en la permeabilidad vascular generada en dengue grave (22, 32, 33, 54) (ver figura 4 y 5)

La respuesta los linfocitos T CD4⁺ puede ser de tipo Th1, liberando principalmente IFN- γ , IL-2, y TNF- α , citoquinas responsables de la respuesta inflamatoria mediada por células, hipersensibilidad retardada, daño tisular en infecciones e

enfermedades autoinmunes; o puede ser de tipo Th2, secretando las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e IL-13, asociadas con la producción de anticuerpos por los linfocitos B (31). Se ha reportado, que en pacientes con dengue no grave la respuesta predominante es de tipo Th1 (66%); en contraste, la respuesta Th2 se encuentra en el 71% de pacientes con dengue grave. Las citoquinas IFN- γ y la IL-10, son involucradas en la regulación del cambio de respuesta de Th1 a Th2, siendo los macrófagos principalmente afectados por el perfil de citoquinas presentes a su alrededor (59).

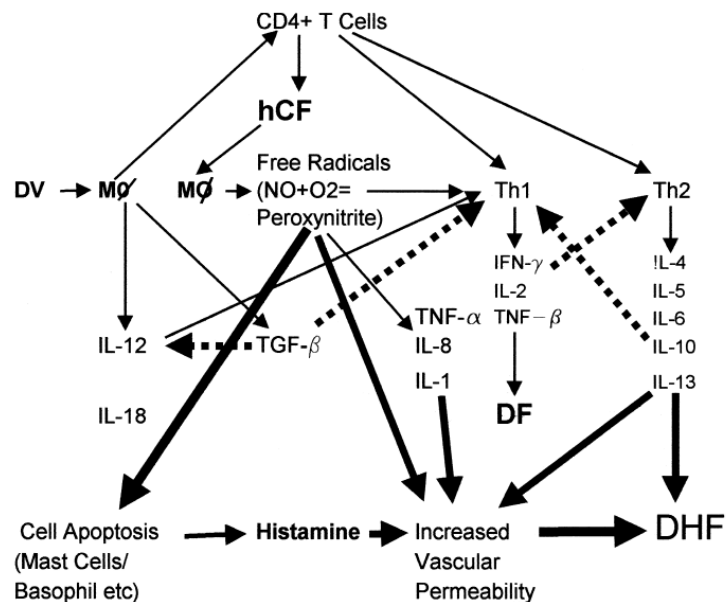
Figura 4. Inmunopatogénesis del dengue grave.



Fuente: SIMMONS et al. Dengue. N Engl J Med, 2012

La activación del complemento, también parece jugar un papel importante en la alteración de la permeabilidad vascular (56). Esta activación, es generada por reconocimiento de la proteína estructural NS1 del virus por la fracción C5a (56, 60).

Figura 5. Cascada de citoquinas inducida por el virus dengue



Fuente: Chaturvedi et al. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000

3.6 ESTRÉS OXIDATIVO

3.6.1 Generalidades

A partir de los 50s se sugirió por primera vez que los niveles séricos de las reactivas de oxígeno (anión superóxido O_2^- , peróxido de hidrogeno H_2O_2 y radical hidroxil OH^\bullet) pudiesen estar asociados a enfermedad (61). En los últimos años, este concepto ha sido incorporado al pensamiento clínico y es motivo de estudio

en patologías crónicas y de etiología infecciosa. Hoy se conoce que frente a la agresión biológica existe en nuestro organismo una respuesta de primera línea, de naturaleza antioxidante constituida por enzimas y eliminadores de radicales, dirigida a preservar los tejidos y el endotelio vascular. Las moléculas más relevantes en esta respuesta, son las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa (14). El desbalance en la producción de agentes oxidantes y la defensa antioxidante provoca un fenómeno llamado “estrés oxidativo”, que conduce a cambios fisiológicos y bioquímicos, provocando el deterioro y muerte celular. El estrés oxidativo, se origina o bien por la deficiencia de la respuesta antioxidante protectora o por incremento sérico de agentes oxidantes cuya alta reactividad induce: peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, ruptura del ADN y degradación proteica (14).

3.6.2 Mecanismos de generación de estrés oxidativo en dengue

En la respuesta de fase aguda en la infección por dengue, las células infectadas inducen la producción de INF- γ , para controlar la infección; simultáneo a este proceso, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados secretan citoquinas de tipo proinflamatorio (IL-1, IL-8 e TNF- α) (50, 59). Estas citoquinas, inducen la estimulación de neutrófilos y fagocitos para destruir el patógeno y la activación de la vía NADPH oxidasa, por fosforilación de sus componentes (efecto de los mediadores secundarios intracitoplasmáticos PI3K y PKC) (33). La síntesis del anión superóxido O₂⁻, se da por activación de esta vía.

En respuesta a la producción del radical de oxígeno, la enzima SOD cataliza la reacción para transformar los O₂⁻ circulantes a H₂O₂. Seguido a esto, las enzimas GPx y catalasa de manera independiente convierten H₂O₂ a H₂O (33, 62). De no darse la respuesta antioxidante normal, el H₂O₂ podría reaccionar con O₂⁻ para

formar el radical hidroxil OH^\bullet (por la reacción de Fenton), una de las especies ROS más reactiva (62). Por otra parte, el óxido nítrico (ON) sintetizado en el endotelio, puede inducir la producción de suficientes cantidades de O_2^- para superar la acción de la SOD (63). El ON reacciona rápidamente con O_2^- para generar el radical peroxinitrilo (ONOO^-), el cual interactúa junto con el OH^\bullet para atacar los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos causando disfunción en las células del endotelio (23, 24, 29, 64).

A continuación describiré las enzimas de mayor interés que actúan en la barrera antioxidante para controlar los niveles de especies reactivas de oxígeno y un sistema que involucra a todas las moléculas antioxidantes llamado capacidad antioxidante total.

La superóxido dismutasa, es una enzima que cataliza la dismutación del anión superóxido a una molécula de peróxido de hidrogeno y por lo tanto forma parte crucial del mecanismo de defensa antioxidante celular (32,33). Se han caracterizado tres tipos de SODs de acuerdo a su metal contenido en (Cu/Zn)-SOD citosólica, MnSOD mitocondrial y FeSOD extracelular. La función de la superóxido dismutasa (SOD) es acelerar la dismutación del radical superóxido (O_2^-), produciendo durante un proceso oxidativo energético, peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (32,33).

La enzima Glutación peroxidasa (GPx), cataliza la reducción de hidroperóxidos, incluyendo peróxidos de hidrógeno, por la reducción del glutatión y funciona para proteger a la célula del daño oxidativo (32). Con la excepción de fosfolípido hidroperóxido de GPx, un monómero, todas las enzimas GPx son tetrámeras de cuatro subunidades idénticas. Cada subunidad contiene una selenocisteína en el

sitio activo que participa directamente en la reducción de dos electrones del sustrato peróxido. La enzima utiliza glutatión como el último donador de electrones para regenerar la forma reducida de la selenocisteína (33).

El sistema antioxidante de los organismos vivos incluye enzimas tales como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa; macromoléculas tales como albúmina, ceruloplasmina, y la ferritina, y una gran variedad de moléculas pequeñas, incluyendo el ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, glutatión reducido, ácido úrico y bilirrubina. La suma de los antioxidantes endógenos y los derivados de los alimentos representa la actividad antioxidante total en el fluido extracelular (32,33). Por lo tanto, la capacidad antioxidante total (CAT) puede dar información biológica más relevante en comparación con la obtenida por la medición de los componentes individuales, ya que considera que el efecto acumulativo de todos los antioxidantes presentes en el plasma y los fluidos corporales.

3.6.3 Antecedentes en Dengue

Durante los últimos años se ha sugerido la posible asociación entre estrés oxidativo y dengue (23-30). *Gil et al.*, reportaron en 22 pacientes adultos con dengue, no diferencias en la capacidad antioxidante total (CAT), niveles significativamente más altos de Potencial de peroxidación (PP), Malonaldehído (MDA) y enzima superóxido dismutasa (SOD) y niveles más bajos de la de glutatión peroxidasa (GPx) e hidroperóxidos totales en los pacientes con dengue al compararlos con los controles sanos (23). Un estudio que evaluó esta asociación en 66 pacientes pediátricos con dengue, reportó incremento en los niveles de superóxido dismutasa (SOD) ($26,86 \pm 8,13$ versus $2,31 \pm 0,97$; $p < 0,005$) y disminución de la glutatión peroxidasa (GPx) ($0,45 \pm 0,16$ versus $2,54 \pm 1,31$;

$p < 0,005$) al compararlos con controles no febriles ($p < 0,005$) (24). *Klassen et al.*, determinaron la CAT y glutatión en 9 sueros de pacientes con dengue, encontrando niveles más bajos en comparación con controles sanos solo para el glutatión (25). En una cohorte en pacientes con dengue conducida por nuestro grupo, una mayor frecuencia de cambios hemodinámicos (elevación de la frecuencia cardíaca) y sangrado espontáneo se observó en aquellos con niveles elevados de GPx (31).

Por otra parte, estudios enfocados en la determinación de los metabolitos resultantes de la oxidación de las proteínas y lípidos en pacientes con dengue, soportan la idea de que el estrés oxidativo podría asociarse a la gravedad de la enfermedad (26-29). *Soundravally et al.*, exploran las alteraciones del estrés oxidativo, mediante la oxidación de proteínas en plasma en 86 pacientes con dengue, reportando niveles significativamente más altos de carbonilos proteicos en suero (PCOs) y grupos sulfidrilo (DTNB) en pacientes con FDH/SCD al compararlos con controles sanos. Sumado a esto, al comparar los niveles de estos metabolitos en los diferentes niveles de gravedad, se observa diferencias con concentraciones altas de PCOs y bajas de PESH entre FDH/SCD y FD ($P < 0.001$) (26); sugieren para la predicción de SCD, el valor de 6.13 nmol/mg de PCOs con una sensibilidad y especificidad de 81% y 71.9% (27). Los niveles de CAT tienden a ser más bajos en pacientes con SCD al compararlos con FDH y FD (28). *Sheet et al.*, compara en 28 adultos con dengue los niveles de productos de ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs), F2-isoprostanos (F2-IsoPs), y productos de la oxidación de colesterol (COPs) durante la fase febril, defervescencia y convalecencia de la infección, reportando niveles más altos de HETEs en la fase febril al compararlos con la convalecencia (29).

3.7 BIOMARCADORES DE PREDICCIÓN DENGUE GRAVE

Existe una gran fuente de información que evalúa marcadores de predicción de la gravedad en dengue. A continuación se mencionan algunos, junto con sus resultados.

Kalayanarooj et al., encontraron en muestras de niños, de 72 horas de enfermedad por dengue niveles plasmáticos de AST mayores en los casos de dengue grave en comparación con dengue no grave (45).

Bozza et al., evalúan 17 citoquinas en 59 de casos de dengue confirmado (muestras tomadas entre los días 7 a 10), reportando un incremento significativo de IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-13, IL-7 y GM-CSF, en pacientes con dengue grave al compararlo con dengue no grave. En contraste, aumentaron los niveles de MIP-1 β en los pacientes con dengue no grave, comportándose como un marcador de buen pronóstico. (46)

Houghton-Triviño et al., hallaron en 38 pacientes niveles más altos de sST2 suero, TNF- α , IL-8 e IL-10 en los casos de dengue graves en comparación con los pacientes con dengue no grave y los controles sanos. (64)

Villar-Centeno et al., en 125 casos con dengue grave y 120 controles con dengue no grave, sugieren una asociación de los niveles de PCR, LDH y albúmina con la gravedad de la enfermedad ($p < 0,001$) (65). Asimismo, en 30 casos con dengue grave y 30 controles con dengue no grave, encuentran niveles de ST2, TRAIL y

TNF α significativamente mayores en dengue grave, comparados con los pacientes no complicados ($p < 0,0001$) (66)

Malavige et al., evaluaron los niveles séricos de IL-10 en 259 de los cuales (40 dengue grave) durante los días 4-5 de enfermedad. Los pacientes fueron seguidos hasta el momento de salida de hospitalización, en sus resultados reportan que la IL-10 se asocia con la enfermedad grave ($p = 0.001$), se correlaciona con niveles de transaminasa AST (Spearman's $R = 0.16$, $p = 0.01$) (67).

Los anteriores estudios, proponen moléculas como marcadores predictores de gravedad. Durante la ejecución, existen diferencias en el momento de la toma de muestras, variables empleadas para definición de caso, tamaño de muestras en algunos casos pequeños y enfoque de análisis dispares entre ellos. Se consideran de mayor importancia, aquellos que realizaron las mediciones en las primeras horas de la enfermedad, antes de que se presenten manifestaciones características de gravedad ya que se trata de estudios para evaluar biomarcadores de predicción de gravedad.

3.8 MODELOS CLÍNICOS DE PREDICCIÓN DE GRAVEDAD EN DENGUE

Se realizó una búsqueda en Pubmed con los términos “clinical model prediction dengue”, encontrándose los siguientes artículos de interés para nuestra investigación:

Brasier et al., en el modelo de regresión logística, sugieren que el aumento de las concentraciones de IL-10 se asocian con una mayor probabilidad de dengue grave, mientras que una disminución del conteo de plaquetas y linfocitos se asocian con una mayor probabilidad de dengue grave. Al evaluar la probabilidad de discriminar entre un caso de dengue no grave y dengue grave, obtuvieron un área bajo la curva ROC de 0,9615, mostrando un buen comportamiento del modelo de regresión logística para este conjunto de datos (68).

Huy Nt et al., proponen en su modelo de predicción de choque por dengue la inclusión de las variables, día de admisión, purpura/equimosis, efusión pleural/ascitis, bajo recuento de plaquetas y presión de pulso estrecha, con un área bajo la curva (AUC) de 0,73, sensibilidad de 68,3% y especificidad de 68,2% (69).

Para la cohorte AEDES, se ha establecido un modelo clínico de predicción de gravedad, en el que se incluyen las variables, dolor abdominal, vomito persistente, acumulación clínica de líquidos, hemorragia menor, hepatomegalia, somnolencia e irritabilidad [AUC=0,61 IC95%: 0,56 - 0,66, p=0.385]. Al incluir en el modelo la variables deshidratación, presión arterial media, náusea y dolor retroocular, la probabilidad de predecir el desenlace de la enfermedad aumenta [AUC=0,71 IC95%: 0,66 - 0,76, p=0.401] (Villar LA. Comunicación personal).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el valor de los indicadores de estrés oxidativo en pacientes con dengue como predictores de su gravedad.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar los niveles de capacidad antioxidante total, superóxido dismutasa y la actividad de glutatión peroxidasa, en pacientes con dengue durante las primeras horas de inicio de síntomas (48 a 96 horas).
2. Estimar la asociación entre los niveles de los indicadores de estrés oxidativo observados en fase aguda de la infección por dengue y el curso clínico de la enfermedad.
3. Establecer la contribución que hace al modelo clínico de predicción de gravedad en dengue, la inclusión de capacidad antioxidante total, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa como variables independientes.
4. Evaluar la asociación entre los niveles de los indicadores de estrés oxidativo observados tempranamente y marcadores intermedios de gravedad en dengue.

5 JUSTIFICACIÓN

Aproximadamente 2,5 billones de personas residen en áreas con alto riesgo de infección por dengue (5). La OMS calcula que ocurren 50 millones de casos de dengue anualmente en el mundo (1). Durante el 2010, se presentó el mayor brote de dengue en América con 1.8 millones de casos notificados (44.656 de estos graves), de los cuales el 65% se concentraron en el cono sur; durante este año, 1.167 personas fallecieron por complicaciones de la enfermedad (70). En Colombia, el 75% del territorio nacional registra transmisión endémica urbana de dengue (620 municipios) donde existe una población a riesgo de 23'932.381 personas, concentrándose el 80% de la carga de la enfermedad en 100 municipios (7).

Clínicamente, la enfermedad cursa como un cuadro febril leve, acompañado de cefalea, mialgias, artralgias y dolor retroocular, que aunque autolimitado, tiene una duración de 7 a 10 días. No obstante, el 15% de los casos evoluciona hacia formas graves de la enfermedad, llegándose a presentar hasta un 5% de desenlaces fatales (1, 4, 5).

Ante la ausencia de la terapia antiviral específica, el tratamiento de la enfermedad es sintomático; sin embargo, la administración de líquidos intravenosos, antipiréticos y un seguimiento clínico cercano en los pacientes con mayor riesgo de complicaciones puede llegar a reducir la mortalidad. No obstante, establecer de forma temprana cuales pacientes son los sujetos que tienen mayor riesgo de complicación, resulta difícil para los clínicos tratantes, pues no se disponen de suficientes herramientas tempranas de diagnóstico que permitan realizar esta

clasificación. La búsqueda de éstas, es una prioridad para la investigación aplicada en salud. Un posible abordaje en esta investigación es la evaluación del stress oxidativo en el dengue.

Durante los últimos años se ha sugerido la asociación entre estrés oxidativo y dengue (23-30). Un estudio conducido con 22 pacientes adultos reportó niveles de superóxido dismutasa (SOD) y la capacidad antioxidante total (CAT) significativamente más altos y glutatión peroxidasa (GPx) más bajos en los pacientes con dengue al compararlos con los controles sanos (23). Asimismo, un estudio que evaluó en pacientes pediátricos con dengue esta los niveles de enzimas antioxidantes, reportó niveles de GPx y SOD anormales en el 96% y 94% de los casos respectivamente al compararlos con los controles sanos (24). *Klassen et al.*, determinaron la CAT en 9 sueros de pacientes con dengue, encontrando niveles más bajos en comparación con controles sanos (25). En una cohorte en pacientes con dengue, una mayor frecuencia de cambios hemodinámicos (elevación de la frecuencia cardiaca) y sangrado espontáneo se observó en aquellos con niveles elevados de GPx (30). Por otra parte, estudios enfocados en la determinación de los metabolitos resultantes de la oxidación de las proteínas y lípidos en pacientes con dengue soportan la idea de que el estrés oxidativo podría asociarse a la gravedad de la enfermedad (26-29).

Si bien existe evidencia que indica la posible asociación de la actividad oxidativa con gravedad en dengue, los resultados de estos estudios no son concluyentes, pues han sido realizados en muestras de pacientes tomadas en diferentes momentos de la enfermedad, la edad poblacional es variable, los criterios usados para diagnóstico de infección son no uniformes, han empleado la clasificación de WHO 1997, la cual exhibe una baja sensibilidad para detectar casos de dengue grave. Por esta razón, existe la necesidad de caracterizar adecuadamente las alteraciones de la actividad

oxidativa que se presentan durante las primeras horas del síndrome febril por dengue.

En este escenario, las alternativas disponibles para la evaluación del estrés oxidativo en los pacientes son, la determinación de antioxidantes compuestos, como la Capacidad antioxidante total (CAT) y las vitaminas; la medición de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa y la glutatión reductasa; o la evaluación de metabolitos intermediarios de la degradación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

La presente propuesta está dirigida a evaluar la posible asociación del dengue y su gravedad con alteraciones en la actividad antioxidante, mediante la medición de la concentración de capacidad antioxidante total, superóxido dismutasa y la actividad de glutatión peroxidasa; dado que, son la primera línea de defensa en nuestro organismo para atacar las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por los fagocitos en la fase aguda de la infección. De confirmarse esta hipótesis, la realización de un ensayo clínico a mayor escala que evalúe eficacia y seguridad de antioxidantes en esta enfermedad sería biológicamente plausible. Para conocer el plus de la medición de estos indicadores, lo mejor es utilizar muestras de una población cuyo estudio ya arroje un modelo clínico de predicción, como el caso de la Cohorte AEDES.

6 HIPÓTESIS

H₁: En pacientes con síndrome febril agudo por dengue los niveles de capacidad antioxidante total, superóxido dismutasa y la actividad de glutatión peroxidasa se comportan como predictores tempranos de su gravedad.

H₀: En pacientes con síndrome febril agudo por dengue los niveles de capacidad antioxidante total, superóxido dismutasa y la actividad de glutatión peroxidasa no se comportan como predictores tempranos de su gravedad.

7 METODOLOGÍA

7.1 TIPO DE ESTUDIO

Se evaluó la hipótesis mediante un diseño de estudio de casos y controles anidado en una cohorte. Para ello se utilizaron fuentes de información secundaria y muestras biológicas (información clínica y de laboratorio obtenida en la primera consulta y durante el seguimiento de la cohorte) recolectadas en el estudio Multicéntrico AEDES**.

7.2 POBLACIÓN

La población blanco para este estudio fue la información clínica y muestras biológicas de pacientes febriles sin foco aparente después del examen físico; los cuales fueron captados, durante el periodo comprendido entre 2009 y 2011, residentes en ciudades con alta frecuencia de enfermedad por dengue en Colombia (Bucaramanga, Piedecuesta, Floridablanca, Palmira y Barranquilla), las cuales exhibieron tasas de incidencias promedio entre 147,3 y 559,9 x 100.000 habitantes durante la última década (7). En el cuadro 1, se puede observar los centros de captación y los niveles de atención en los que se realizó el reclutamiento de los sujetos para la cohorte AEDES.

** El estudio Multicéntrico "AEDES", Abordando Áreas Endémicas del Dengue para el Estudio de su Severidad, es una cohorte prospectiva de pacientes ambulatorios y hospitalarios captados durante las primeras horas de la enfermedad, realizada en áreas de alta endemicidad de dengue en el país (Bucaramanga y su área metropolitana, Neiva, Cali, Palmira y Barranquilla), en el periodo comprendido entre el mayo 2009 y abril 2011; financiado por Colciencias (1102-459-21561).

Cuadro 1. Centros de captación de los participantes de la Cohorte AEDES

Ciudad	Nivel de atención	Centro
Barranquilla	I	Centro de Salud Hospital del Norte
	III	Hospital Pediátrico de Barranquilla
Bucaramanga y su área metropolitana	II	Hospital San Juan de Dios de Floridablanca
	III y IV	Clínica Materno Infantil San Luis
	III y IV	Fundación Oftalmológica Carlos Ardila Lulle
	I	Hospital Local de Piedecuesta
	I	Hospital Local del Norte
Palmira	III y IV	Hospital Universitario de Santander.
	I	Hospital Raúl Orejuela Bueno de Palmira

7.3 DEFINICIONES

7.3.1 Caso

Pacientes con síndrome febril agudo por dengue confirmado/probable, que durante el seguimiento presentaron hipotensión (previamente definida en la base para la cohorte AEDES) por al menos uno de los siguientes criterios: 1) Taquicardia para la edad (71) y presión de pulso <20 mm Hg; 2) presión arterial media disminuida para la edad (71); 3) presión arterial sistólica disminuida para la edad en cualquier momento del seguimiento (71)) o sangrado mayor (definido por la presencia de hematemesis o melenas). La alteración de órganos, no fue incluida como variable para definir caso, según el informe de la OMS, este compromiso requiere de definiciones más precisas, la cuales están en proceso de construcción (71).

7.3.2 Control

Pacientes con síndrome febril agudo por dengue confirmado/probable, que no presentan los signos de alarma considerados por la OMS (5) al momento de ingresar al estudio, ni durante el seguimiento. Entre estos signos clínicos se incluyeron acumulación clínica de líquidos, hepatomegalia, vomito persistente y hemorragia menor.

7.3.3 Infección Confirmada por dengue

Se consideró infección confirmada por dengue, aquellos sujetos con reporte de seroconversión (de negativo a positivo) o aumento mayor a 4 veces de los títulos de IgM o IgG en muestras pareadas mediante la prueba de Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o resultados en muestra basal para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) positiva o prueba ELISA para la proteína NS1 positiva en muestra basal.

7.3.4 Infección probable por dengue

Se consideró una infección por dengue probable en pacientes que presentara reporte de una prueba de ELISA para IgM positiva en cualquier momento del seguimiento.

7.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

7.4.1 Para la cohorte AEDES

Los criterios de inclusión establecidos para la captación de la información clínica y muestras biológicas en la cohorte AEDES fueron los siguientes: pacientes con 5 o más años con síndrome febril agudo entre 48 horas y 96 horas de evolución, sin foco aparente después del examen físico, con recuento plaquetario $>50.000\text{mm}^3$ y con al menos dos de las siguientes manifestaciones: cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgias, exantema, manifestaciones hemorrágicas menores y leucopenia ($<5000/\text{mm}^3$), según definición operativa de la OMS de caso sospechoso de dengue (5).

7.4.2 Para el estudio de casos y controles

En este estudio, se incluyeron aquellos sujetos que al verificar la base de información recolectada en la cohorte, cumplieron con los siguientes criterios: presentar un cuadro febril temprano (es decir, entre 48 a 96 horas de inicio de síntomas), mayores de 5 años, con manejo clínico ambulatorio e infección por virus dengue confirmada/probable.

7.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

7.5.1 Para la cohorte AEDES

Se excluyeron en la cohorte AEDES aquellos pacientes cuyo sitio de residencia impidió completar el seguimiento requerido por el estudio. Presentar antecedente

de cáncer, SIDA, enfermedades del colágeno, insuficiencia renal crónica, falla cardiaca congestiva o trastornos hematológicos o reporte de ingesta en los últimos ocho días de corticoides.

7.5.2 Para el estudio de casos y controles

En esta propuesta se excluyeron aquellos sujetos que en la información clínica se evidenciara la presencia de hemorragias mayores (melena, hematuria, hematemesis, hematoquecia) y/o signos clínicos de extravasación plasmática (derrame pleural, ascitis o hipotensión) al momento del examen basal. Además, aquellos sujetos que no contaban con sueros de línea de base almacenados a -80°C para realizar la medición de CAT, SOD y GPx.

Nota: como en nuestra investigación se pretendía evaluar el rol de marcador de predicción de estrés oxidativo, solo consideramos la inclusión de sujetos que fueron captados de manera ambulatoria, antes de las 96 horas de inicio de fiebre, que en la primera consulta no se evidenciara signos característicos de la evolución a la gravedad del dengue .

7.6 TAMAÑO DE MUESTRA

Para la estimación del tamaño de muestra, se tomaron los datos previos de niveles de glutatión peroxidasa en 22 pacientes adultos con dengue (23). Se calculó un tamaño de muestra de 44 casos y 88 controles, teniendo en cuenta una diferencia absoluta de medias del 20% en los dos grupos para GPx (24,04 U/ml vs 28,85 U/ml, DE±9.20) con un poder de 80%, un alpha 0.5 de doble cola, en

relación 1:2 de casos frente a grupo control, utilizando el programa estadístico Stata SE, versión 12.1.

Para la determinación de la concentración de SOD y CAT, contamos con un número (n) disponible de casos confirmados y probables más bajo (n=59), puesto que, por fallas técnicas de los reactivos las mediciones se realizaron en diferente momento y durante la ejecución del proyecto se realizó un panel de discusión para hacer revisión del diagnóstico de laboratorio (excluyendo casos febriles indeterminados, los cuales habían sido considerados inicialmente como probables), afectando el tamaño de muestra por disponibilidad de los sueros. Finalmente, el poder para la evaluación de estos dos indicadores se disminuyó a un 43,3% (alpha de 0,05).

7.7 VARIABLES

7.7.1 Variables Independientes

Se tomaron los datos obtenidos de la realización de las pruebas para determinar los niveles de capacidad antioxidante total, superóxido dismutasa y la actividad de glutatión peroxidasa en los sueros de los casos y los controles.

7.7.2 Variable Dependiente o de resultado

Para evaluar la asociación de los indicadores de estrés oxidativo y la progresión de la enfermedad, se consideró como variable dependiente la gravedad del dengue: esta variable se precisó teniendo en cuenta, la presencia de sangrado

mayor (definida por la presencia de melena, hematuria) durante el seguimiento o hipotensión (definida como presión arterial media inferior para la edad (71) o presión de pulso inferior a 20 mm Hg o presión sistólica menor para la edad en cualquier momento del seguimiento (71)). No se consideró la alteración de órganos para definir esta variable, de acuerdo al informe de la OMS (72).

En el análisis de desenlaces intermedios (objetivo 4) se consideraron como variables dependientes la transformación logarítmica del recuento mínimo de plaquetas, hematocrito mínimo, presión arterial media y presión de pulso.

7.7.3 Potenciales variables de confusión

Se consideraron como posibles variables confusoras, edad, género, horas de evolución de la enfermedad y tipo de infección (primaria o secundaria)^{††}; estas variables se han asociado con la severidad de la enfermedad.

7.7.4 Otras posibles variables asociadas

Se consideraron cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgia, escalofrío, hiporexia o anorexia, tos, rinorrea u obstrucción nasal, odinofagia, prurito, náuseas, vómito, diarrea, astenia, deshidratación, exantema, temperatura, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, presión arterial media <70mmHg, presión de pulso <20mmHg, talla, peso, recuento de leucocitos basal, recuento de plaquetas basal, albumina y proteína C reactiva.

^{††} La variable tipo de infección se definió, mediante la detección de títulos de anticuerpos IgG por ELISA de captura en muestra aguda. Aquellos sujetos que presentaron títulos de anticuerpos IgG superiores punto de corte establecido para la prueba, fueron considerados como una infección secundaria activa.

Ver definición de variables en el Anexo 1. Operacionalización de las variables.

7.8 MUESTREO

Previo a la selección de los sujetos, se creó una base con aquellos códigos identificadores que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión mencionados anteriormente para este estudio. Enseguida, se realizó una auditoria de la calidad de los datos, en la que se permitió corregir algunas inconsistencias en esta base. Posteriormente, se realizó la selección de los casos y los controles mediante muestreo aleatorio simple hasta completar el tamaño de muestra planteado anteriormente, utilizando el programa estadístico Stata SE, versión 12.1.

7.9 ESPÉCIMEN DE ANÁLISIS

Sueros humanos tomados en la primera valoración (entre 48 y 96 horas de inicio de síntomas) de la cohorte de pacientes, almacenados a -80°C desde su toma hasta el momento de realizar los ensayos (muestras que no han sufrido proceso de descongelación) en la seroteca del Grupo Epidemiología Clínica.

7.10 MEDICIÓN

Para la medición de la capacidad antioxidante total, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, se emplearon estuches de la casa comercial Cayman

Chemical (Nº catalogo 703102 para GPx, 706002 para SOD y 709001 para CAT, producidos en U.S.A.). Las pruebas fueron realizadas en el espectrofotómetro lector de microplaca Thermo Scientific Multiskan® Spectrum, con filtro de luz UV, ubicado en el laboratorio del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP). Previo a su montaje, los sueros fueron extraídos del ultracongelador (-80°C), para someterlos a un proceso de descongelamiento gradual (temperatura de -20°C, 4°C y por último 25°C).

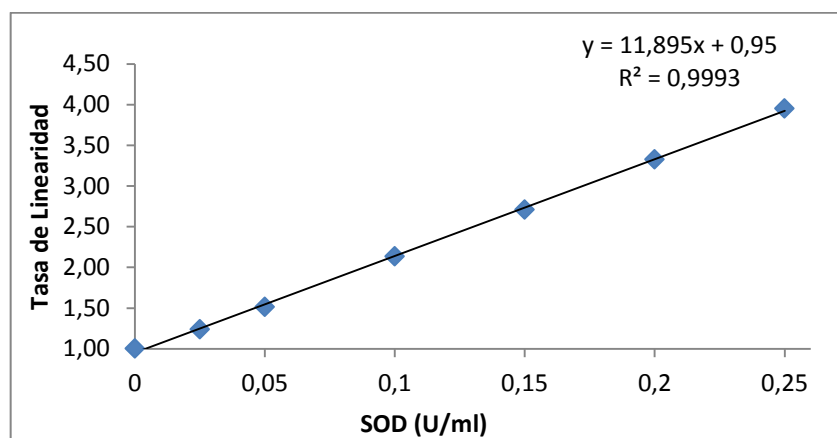
7.10.1 Determinación Superóxido dismutasa.

La determinación de SOD se realizó según el protocolo de *Sun et al.* (73). En el que se emplea una xantina oxidasa para generar radicales superóxido, los cuales van a reaccionar con la sal de tetrazolio (oxidada) para formar el colorante formazan (sal reducida). Midiéndose la actividad de SOD por el grado de inhibición de esta reacción. Se definió una unidad de SOD como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% del valor de la reducción de la sal de tetrazolio, bajo las condiciones del análisis. El ensayo detecta los tres tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y FeSOD).

Procedimiento: se pipeteo en cada pozo 200µl de radical detector (solución de sal de tetrazolio) y 10µl de muestra diluida (1:5). Para iniciar la reacción se agregó 20µl de Xantina oxidasa a los pozos en uso. A continuación, se agitó la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente. El ensayo se realizó por duplicado, leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 450nm, con la temperatura óptima de 25°C. El rango de detección de este ensayo es de 0.025-0.25 U/ml, cuando se obtuvieron valores extremos, se repitió la prueba con una dilución apropiada.

Curva de Calibración y cálculo de resultados: Para cuantificar la enzima presente en las muestras, se realizó una curva patrón con una solución de SOD (Cu/Zn) bovina diluida con la solución tampón de muestra (50mM Tris-HCl, pH 8.0) en 7 diferentes concentraciones (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 U/ml) (ver Figura 6). El cálculo de los resultados se realizó utilizando las formulas sugeridas por la casa comercial para esta prueba.

Figura 6. Curva de Calibración Actividad SOD. Absorbancia en función de la concentración de la SOD (U/ml)



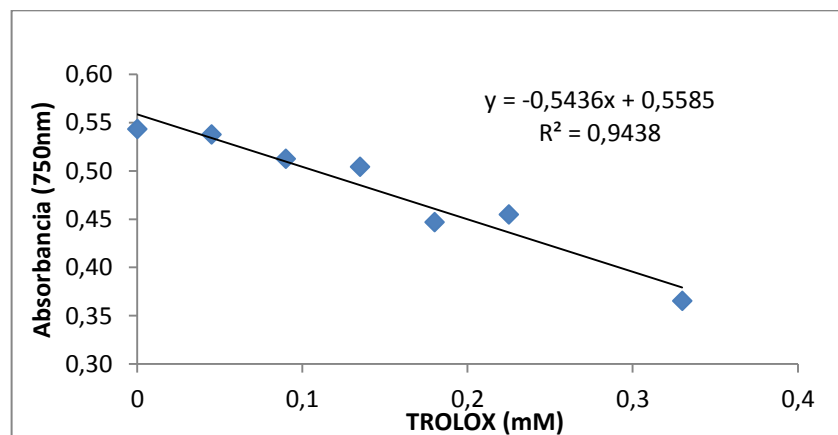
7.10.2 Determinación de Capacidad antioxidante total

El kit de Cayman se basa en la capacidad de los antioxidantes en la muestra para inhibir la oxidación de ABTS[®] (2,2'-azino-di-[3-sulfonato de etilbenzotiazolina]) a ABTS^{®+} por la Metmioglobina (una peroxidasa) y H₂O₂. La cantidad de ABTS^{®+} producida puede ser cuantificada por lectura de la absorbancia a 750nm. La capacidad de los antioxidantes en la muestra para prevenir la oxidación de ABTS se compara con la de Trolox, un análogo de tocoferol soluble en agua, y es cuantificada como equivalente milimolar de Trolox.

Procedimiento: se sirvieron 10 µl del control/muestra diluida (1:20), junto con 10 µl de Metmioglobina y 150 µl de cromógeno en cada pozo. Para iniciar la reacción se agregó tan pronto como fue posible (dentro de un minuto) 40µl de peróxido de hidrogeno. Enseguida, se llevó la placa a agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente. El ensayo se realizó por duplicado, leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 750nm, con temperatura óptima de 25°C. Esta prueba tiene un rango de detección de 0.044-0.330 mM, cuando se obtuvieron valores por fuera de este rango, se repitió con la dilución apropiada.

Curva de Calibración y cálculo de resultados: Para la medición de la capacidad antioxidante total presente en las muestras, se realizó una curva patrón con una solución de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,3,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilico) diluida con la solución tampón de ensayo (fosfato de potasio 5 mM, pH 7.4, que contiene cloruro de sodio 0,9% y 0,1% de glucosa) en 7 diferentes concentraciones (0, 0.045, 0.090, 0.135, 0.18, 0.225, 0.330) (ver figura 7). El cálculo de los resultados se realizó utilizando las formulas sugeridas por la casa comercial para esta prueba.

Figura 7. Curva de Calibración Capacidad Antioxidante. Absorbancia en función de la concentración de Trolox (mM)



7.10.3 Determinación Glutación peroxidasa

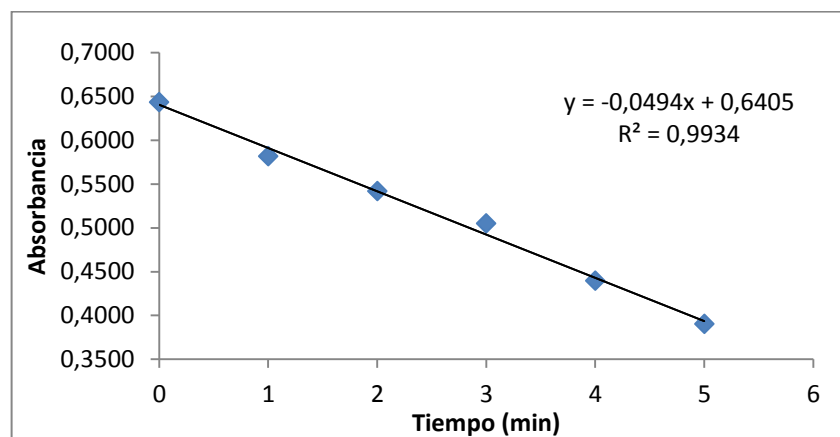
El protocolo del kit de glutación peroxidasa de Cayman está basado en el método *Plagia and Valentine* (74), el cual mide indirectamente la actividad de GPx por una reacción acoplada con glutación reductasa (GR). La Glutación peroxidasa (GPx) cataliza la oxidación del glutación (GSH) por hidroperóxido de cumeno. En presencia de glutación reductasa (GR) y NADPH el glutación oxidado (GSSH) se convierte inmediatamente en la forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH a NADP⁺. La oxidación de NADPH a NADP⁺ se acompaña de una disminución en la absorbancia a 340 nm. La tasa de disminución en el A₃₄₀ es directamente proporcional a la actividad de GPx en la muestra. Una unidad de GPx, está definida como la cantidad de enzima que puede causar la oxidación de 1.0 nmol de NADPH a NADP⁺ por minuto a 25°C.

Procedimiento: se sirvieron 120 µl y 100 µl de solución tampón para ensayo para el blanco y para controles/muestras diluidas (1:2), respectivamente. Adicionando 50 µl de co-sustrato de GPx (NADPH, glutación y glutación reductasa). Se agregó 20 µl de muestra o control según corresponda, excepto en el pozo del blanco. Para iniciar la reacción se adicionaron 20µl de hidroperóxido de cumeno a los pozos en uso, tomando el tiempo preciso de inicio de la reacción tan rápido como sea posible, agitando la placa cuidadosamente por pocos segundos. El ensayo se realizó por duplicado, leyendo la absorbancia una vez cada minuto a 340nm hasta obtener 6 puntos (0, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos). El rango de detección de esta prueba es de 50-344 nmol/min/ml, cuando se obtuvieron valores por fuera de este rango, se repitió la prueba con la dilución apropiada. Nota: la absorbancia inicial de las muestras y el control debía ser entre 0.5 y 1.2.

Calculo de resultados: se determinó el cambio en la absorbancia por minuto. Para calcular la pendiente (tasa) de la porción lineal de la curva se graficaron los valores de las absorbancias para cada muestra en función del tiempo (ver figura 8). Enseguida, se determinó la tasa de reacción de $\Delta A_{340}/\text{min}$ de las muestras y los controles. Finalmente, se usó la siguiente fórmula para calcular la actividad de la GPx.

$$\text{Actividad GPx} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{0.00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.19\text{ml}}{0.02\text{ml}} \times F \text{ de dil. muestras} = \text{nmol/min/ml}$$

Figura 8. Modelo de una curva de actividad enzimática de GPX.



7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Realizamos descripción estadística de los datos, con estimación de medias (desviaciones estándar) y conteos (proporciones) para variables continuas y discretas, respectivamente. Evaluamos la presunción de distribución normal para las variables continuas mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Describimos aquellas

variables que no seguían dicha distribución mediante medianas (rango intercuartílico) y alternativamente fueron transformadas a la escala logarítmica.

Evaluamos diferencias entre casos y controles mediante pruebas t de Student para variables continuas con distribución normal o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para aquellas con distribución no normal. En el caso de variables independientes discretas, empleamos la prueba χ^2 o la prueba exacta de Fisher cuando el conteo esperado de alguna celda en las tablas de contingencia era inferior a 5.

Adicionalmente, implementamos el método de regresión logística para estimar la fuerza de la asociación entre las variables independientes de interés, es decir, las relacionadas con el estado antioxidante de los pacientes en la línea de base, y la condición de caso o control. Estimamos odds ratios (ORs) e intervalos de confianza del 95% (IC95%) para los cuartiles de la distribución de los marcadores del estado antioxidante, tomando como referencia el primer cuartil (C1) sin ajuste (Modelo 1), ajustando por edad, género, horas de fiebre al momento del ingreso del paciente al estudio y tipo de infección (Modelo 2) e incluyendo las variables del modelo de predicción de gravedad establecido para la Cohorte AEDES (Modelo 3)^{††}.

Finalmente, conducimos un análisis considerando como variable dependiente desenlaces intermedios, específicamente, el cambio en el recuento de plaquetas, el hematocrito o la presión arterial media y de pulso durante el periodo de

^{††} El modelo clínico de predicción de severidad para la cohorte AEDES, incluye las variables dolor abdominal, vomito persistente, acumulación clínica de líquidos, hemorragia menor, hepatomegalia, somnolencia e irritabilidad, deshidratación, presión arterial media, náusea y dolor retroocular.

seguimiento. Para este fin, dicotomizamos cada uno de los marcadores de estado antioxidante empleando como punto de corte sus medianas. Mediante regresión lineal múltiple, implementando estimación de varianza robusta para corregir por la utilización de múltiples observaciones por individuo, evaluamos separadamente para cada desenlace intermedio, si su nivel medio o tasa de cambio difería según el estado o respuesta antioxidante en la línea de base ajustando por las covariables edad, género y horas de fiebre al momento del ingreso al estudio. Formalmente, determinamos si el cambio (lineal o no lineal) de cada desenlace intermedio durante el seguimiento fue o no diferente entre los niveles de concentración de cada indicador de la respuesta antioxidante mediante la evaluación de interacciones entre dichos niveles y las tasa de cambio del desenlace.

Para todas las pruebas de hipótesis consideramos un nivel de significancia estadística del 5% ($p < 0.05$) a dos colas. Los análisis fueron conducidos en el programa estadístico Stata SE, versión 12.1.

8 CONSIDERACIONES ÉTICAS VIGENTES

Esta investigación se encuentra anidada al estudio AEDES (Códigos 1102-459-21561), por lo tanto la información clínica y muestras biológicas son secundarias. Además, los pacientes permitieron en el consentimiento informado que las muestras de sangre fueran almacenadas y usadas en estudios de factores bioquímicos asociados a la gravedad de la enfermedad (Anexo 2). Por consiguiente, no se requirió recolectar nueva información, ni muestras sanguíneas adicionales.

Para resguardar el anonimato de los pacientes que participaran en esta investigación, se manejarán códigos identificadores propios de cada en la selección de los sueros y en el análisis de los resultados, manteniendo la confidencialidad de su información personal. En ningún momento se revelarán datos personales como nombre, número de documento de identidad o fecha de nacimiento. La historia clínica que será revisada de los pacientes participantes, tendrá el mismo trato que determina la ley Colombiana para las instituciones de salud, considerando que se trata de un documento privado, obligatorio y sometido a reserva.

El estudio Multicéntrico AEDES es un estudio de carácter observacional, en el cual se tomaron muestras de sangre a los pacientes. De acuerdo a la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el estudio calificó como una "Investigación de riesgo mínimo".

Basados en la última actualización (2009) del libro “Principles of biomedical ethics” de Beauchamp y Childress analizamos los 4 principios éticos en lo referente a este estudio:

- **Autonomía:** Este principio no aplica, ya que es un estudio observacional, sin intervención de pacientes; por ello no se afecta desde ningún punto de vista la dignidad del sujeto.
- **Beneficencia:** No aplica directamente a los pacientes, debido a que la información clínica y muestras biológicas de los pacientes a evaluar en el estudio, están disponibles en el banco de muestras biológicas y las bases de datos que administra el grupo de Epidemiología Clínica, de la Universidad Industrial de Santander, por lo que la información generada, no es relevante para el manejo clínico en el momento de obtenerse los resultados, ni en caso de que llegasen a sufrir un nuevo episodio de dengue. Pero sí aplica y se cumple este principio ya que hará todo el bien a la población que se encuentra en riesgo de enfermar o morir por dengue, ya que contribuirá con nueva información que permitirá la toma de decisiones clínicas que aseguren un mejor abordaje del paciente con dengue.
- **No maleficencia:** Como hemos aclarado anteriormente al no haber ninguna intervención en pacientes, no causa daño a los demás. Se cumple el principio prioritario *primun non nocere* (lo primero es no hacer daño).
- **Justicia:** Al no involucrar manejo de pacientes, el principio de justicia no aplica al referirse a la obligación de igualdad en los tratamientos y, en lo que respecta al estado, a la equitativa distribución de recursos para la sanidad, los hospitales, etc.

Pero sí aplica y se cumple al referirse de que uno de los productos esperados será generar conocimiento y herramientas en salud pública.

Esta investigación fue previamente aprobada por el Comité de ética de la Universidad Industrial de Santander (Código de aprobación 7083 P11.02)

9 PRESUPUESTO

Este estudio se realizó con información obtenida en el proyecto AEDES, por esta razón solo se incluyeron los gastos generados por: pago de honorarios estudiante de maestría (durante 5 semestres), el costo de los estuches comerciales de los marcadores de estrés oxidativo, costo de una publicación científica, y gastos administrativos para papelería, transportes, material fungible necesarios para el desarrollo de este estudio. Asimismo, la contrapartida en especie de la universidad en equipos de oficina y laboratorio, bases de datos de la biblioteca, software para el análisis de los datos y apoyo para participación en un evento académico internacional, para la socialización de los resultados. (Ver Anexo 3)

10 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

N° Actividad	Actividad	2014												
		Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sept	Oct	Nov	Dic	
1	Elaboración de la propuesta con observaciones de evaluadores													
2	Aprobación de comité de ética													
3	Control de Calidad de la base de datos													
4	Selección de los casos y los controles													
5	Extracción de muestras de la seroteca													
6	Análisis de Laboratorio													
7	Análisis y discusión de los resultados obtenidos.													
8	Divulgación de resultados													
9	Informe Final													

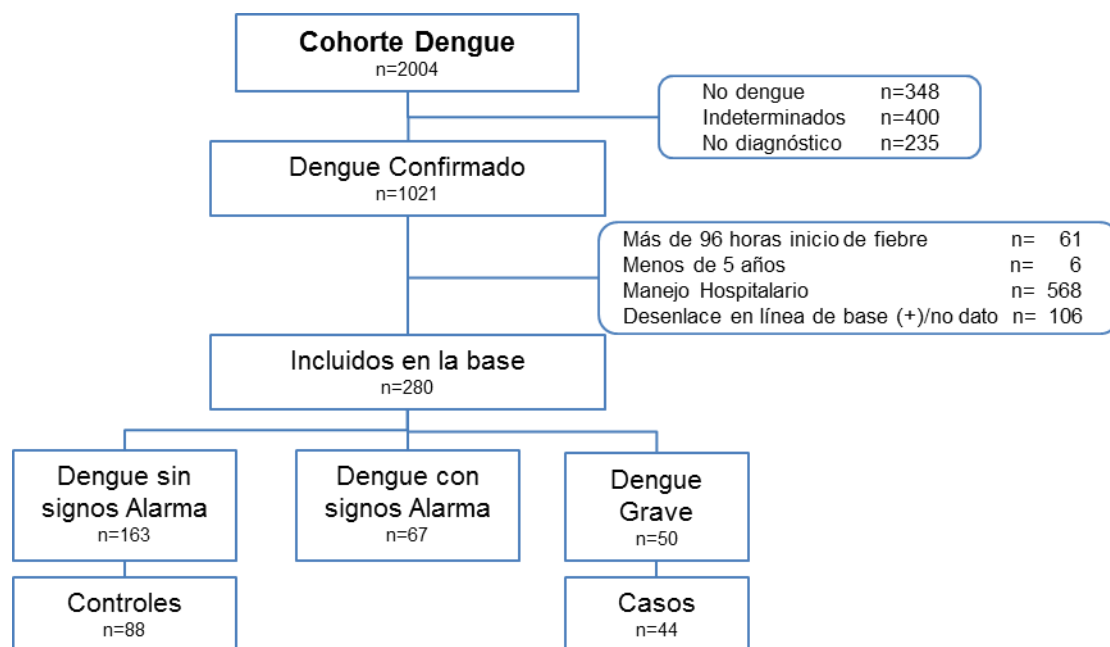
11 TRAYECTORIA DEL GRUPO

El grupo de Epidemiología Clínica está adscrito al Centro de Investigación Epidemiológica (CIE) de la UIS, clasificado por COLCIENCIAS en la categoría de reconocido B. Ha recibido financiación de esta institución para adelantar estudios en el tema de dengue y Síndrome febril Agudo en 5 ocasiones. Entre ellos, los proyectos *"Identificación de Marcadores Tempranos de Severidad en Dengue"* (1102-04-12919), *"Validación de una Definición Clínica de Dengue y Evaluación de su Utilidad para Identificar Tempranamente las Condiciones Asociadas a Hospitalización"* (1102-04-18205), *Etiología y caracterización clínica del síndrome febril agudo inespecífico en un área urbana colombiana endémica de dengue* (1102-343-19192), *El estudio Multicéntrico "AEDES", Abordando Áreas Endémicas del Dengue para el Estudio de su Severidad* (1102-459-21561) y *Factores De Riesgo Asociados A Mortalidad Por Dengue En Adultos Y Niños Durante Una Epidemia En Áreas Endémicas De Colombia* (110-2569-34490) (en curso). Cuenta con la financiación del International Vaccine Institute "IVI", para el proyecto *"Burden of dengue infection in children and adults of Piedecuesta, Santander, Colombia"* (en curso) y con la financiación del fondo de ciencia y tecnología del Sistema General de Regalías de Colombia para el Programa *"Desarrollo Investigación aplicada para contribuir a un modelo efectivo y sostenible de intervención del dengue en Santander, Casanare y Valle del Cauca"* (en curso). El tutor (Luis Ángel Villar) ha participado en los estudios mencionados. De igual forma, de los resultados de estos proyectos se han generado varias publicaciones nacionales e internacionales sobre el área.

12 RESULTADOS

La cohorte AEDES reclutó un total de 2.004 pacientes febriles, de los cuales 1.021 tuvieron pruebas de laboratorio positivas para infección por dengue (Figura 9). Al considerar los criterios de inclusión, 280 paciente eran mayores de 5 años de edad, captados de manera ambulatoria, entre 48 y 96 horas de inicio de síntomas. Al asignar la clasificación de acuerdo a la definición de caso, 163 fueron controles de dengue no grave y 50 casos de dengue grave, con un grupo intermedio de 67 sujetos (presencia de signos de alarma durante el seguimiento). Se incluyeron 132 sujetos en esta investigación. Realizándose la medición de actividad de GPx en 88 controles y 44 casos, y la medición de concentraciones de CAT y SOD en 32 controles y 27 casos.

Figura 9. Flujograma de selección de sujetos de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión del estudio en la Cohorte AEDES.



En el análisis de desenlaces intermedios, se incluyeron los 132 sujetos con pruebas de GPX, todos tenían datos de presión arterial media (PAM) y presión de pulso (PP) y solo 70 contaban con datos de plaquetas y hematocrito. De los 59 sujetos con CAT y SOD, todos contaban información de PAM y PP y solo 36 con plaquetas y 37 de hematocrito.

12.1 ANÁLISIS CASOS Y CONTROLES DE DENGUE SEGÚN SU GRAVEDAD

La media de la edad de los participantes en la muestra fue 25,2 años, con una mayor contribución de pacientes menores de 15 años en el grupo de casos (43,2 vs. 27,3%, $p=0.066$; Cuadro 2). No observamos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución por género, horas de enfermedad o tipo de infección. Las variables clínicas y de laboratorio evaluadas durante la primera consulta al ingreso de la cohorte muestran una distribución homogénea entre los casos y los controles, excepto: prurito (22,7% vs 43,2%, $p=0,021$), deshidratación (36,4% vs 7,8%, $p=0,000$), presión arterial sistólica (106,5 mmHg vs 113,1 mmHg, $p=0,003$), presión arterial diastólica (66,5 mmHg vs 70,3 mmHg, $p=0,014$), presión arterial media (79,8 mmHg vs 84,6 mmHg, $p=0,005$), peso (47,2 Kg vs 55,6 Kg, $p=0,022$) y la albumina (4,3mm/dl vs 5,0mg/dl, $p=0,002$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características demográficas y clínicas al momento de ingreso al estudio de acuerdo a la severidad

Variable	Casos (n=44)	Controles (n=88)	Total	p
Género femenino	23 (52,2)*	42 (47,7)	65 (49,2)	0,622
Edad (5-14 años)	19 (43,2)	24 (27,3)	43 (32,6)	0,066
Horas de enfermedad				
48 horas	5 (11,4)	18 (20,4)	23 (17,4)	0,389
72 horas	19 (43,2)	31 (35,2)	50(38,8)	
96 horas	20 (45,4)	39 (44,3)	59 (44,4)	
Infección Primaria	21 (50)	44 (52,4)	65 (51,9)	0,802
Síntomas				
Cefalea	39 (88,6)	83 (94,3)	122 (92,4)	0,205
Dolor retroocular	30 (68,2)	67 (76,1)	97 (73,5)	0,329
Mialgias	41 (93,2)	85 (96,6)	126 (95,4)	0,400
Artralgia	30 (68,2)	71 (80,7)	101 (76,5)	0,110
Escalofrió	41 (93,2)	81 (92,0)	122 (92,4)	0,559
Hiporexia/Anorexia	10 (22,7)	23 (26,1)	33 (25,0)	0,670
Tos	32 (72,7)	58 (65,9)	90 (68,2)	0,428
Rinorrea	16 (36,4)	22 (25,0)	38 (28,8)	0,174
Odinofagia	12 (27,2)	28 (31,8)	40 (30,3)	0,592
Prurito	10 (22,7)	38 (43,2)	48 (36,4)	0,021
Nauseas	27 (61,4)	54 (60,4)	81 (61,4)	1,000
Vómito	15 (34,1)	21 (23,8)	36 (27,8)	0,214
Diarrea	12 (27,3)	28 (32,8)	40 (30,3)	0,592
Astenia	20 (45,4)	42 (47,7)	62 (46,9)	0,362
Deshidratación	16 (36,4)	7 (7,8)	23 (17,4)	0,000
Exantema	13 (29,5)	31 (35,2)	44 (33,3)	0,514

* Los valores en las celdas se representan en conteos (proporciones).

Cuadro 2. Continuación

Variable	Casos (n=44)	Controles (n=88)	Total	p
Signos[†]				
Temperatura (°C)	36,9±0,9 [†]	36,8±0,9	36,8±0,9	0,382
FR (Resp/min)	18,2±3,1	18,7±2,4	18,5±2,6	0,084
FC (Lat/min)	82,0±14,4	79,9±12,1	80,7±12,9	0,610
PAS (mm Hg)	106,5±10,7	113,1±11,9	110,9±11,9	0,003
PAD (mm Hg)	66,5±8,4	70,3±7,7	69,0±8,1	0,014
PAM (≥70 mm Hg)*	6(13,6)	2(2,3)	8(6,1)	0,010
PP (≥20 mm Hg)*	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	-
Talla (cm)	153±16,7	158,0±18,0	156,4±17,7	0,113
Peso (Kg)	47,2±16,3	55,6±19,1	52,8±18,6	0,022
Análisis de laboratorio[†]				
Leucocitos/mm	3.375±1.037	3.425±1.209	3.407±1.076	0,984
Plaquetas/mm ³	138.960±47.261	146.255±44.709	143.650±45.431	0,524
Albumina (mg/dl)	4,3±0,4	5,0±0,4	4,7±0,5	0,002
PCR (mg/dl)	16,4±12,6	13,0±13,4	14,6±12,9	0,407

[†] Valores en las celdas representan medias (desviación estándar). * Los valores en las celdas se representan en conteos (proporciones). FR: frecuencia respiratoria. RC: frecuencia cardiaca. PAS: presión arterial sistólica. PAD: presión arterial diastólica. PAM: presión arterial media. PP: presión de pulso. PCR: proteína C reactiva.

Entre 48 y 96 horas de inicio de síntomas por dengue, se observa mayor concentración en suero de CAT (2,1 mM vs 1,7 mM) y SOD (6,7 U/ml vs 5,9 U/ml), en el grupo de dengue grave comparado con los niveles del grupo control ; estas diferencias, exhiben una probabilidad marginal de ser estadísticamente

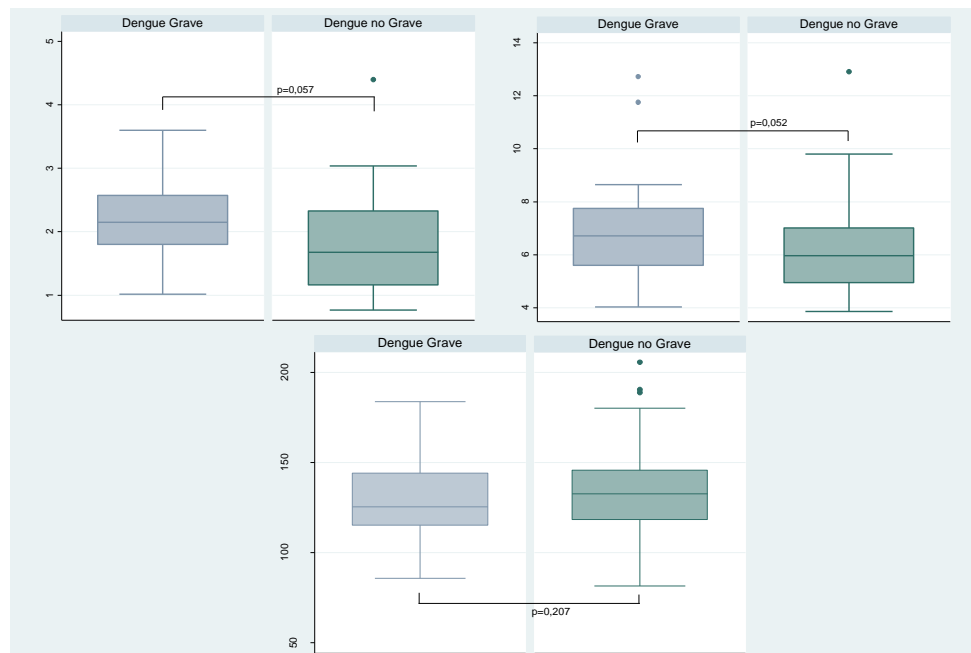
significativas ($p=0,057$ y $p=0,052$, respectivamente). La actividad de la enzima GPx, no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados (125,4 mmol/min/ml vs 132,7 mmol/min/ml, $p=0,207$) (cuadro 3) (figura 10).

Cuadro 3. Resultados de los indicadores de estrés oxidativo realizados en fase aguda de la enfermedad por dengue

Variable	Dengue grave	Dengue no grave	Total	<i>p</i>
CAT*	2,1 (1,8-2,6) [†]	1,7 (1,2-2,3)	2,0 (1,3-2,4)	0,057
SOD*	6,7 (5,6–7,7)	5,9 (4,9-7,0)	6,3 (5,3-7,3)	0,052
GPx [†]	125,4 (115,3-144,1)	132,7 (118,3–145,8)	131,2 (117,7–145,6)	0,207

*Dengue grave (n=27) y dengue no grave (n=32). [†]Dengue grave (n=44) y dengue no grave (n=88). [‡]Los valores en las celdas se representan en medianas (C1-C3).

Figura 10. Concentración CAT, SOD y la actividad de GPx en casos de dengue grave y dengue no grave



Al evaluar la fuerza de asociación entre los marcadores indicadores de estrés oxidativo y el desenlace dengue grave, se observó que los odds ratio (OR) asociados al segundo, tercer y cuarto cuartil de CAT ajustados por edad, género, horas de fiebre al ingreso y tipo de infección (Modelo 2) fueron 5,26 (IC95%: 0,93-29,7), 5,06 (IC95%: 1,02-25,1) y 4,87 (IC95%: 0,92-25,7). Los ORs correspondientes a los mismos cuartiles de concentración de SOD fueron 2,50 (IC95%: 0,50-12,7), 2,58 (IC95%: 0,45-14,8) y 6,59 (IC95%: 1,07-40,4), y para GPx 1,19 (IC95%: 0,43-3,29), 0,49 (IC95%: 0,15-1,56) y 0,94 (IC95%: 0,31-2,90) (ver cuadro 4).

Cuando se incluyeron como variables de ajuste las consideradas en el modelo de predicción de gravedad de la cohorte AEDES (modelo 3, cuadro 4), se observó para el cuartil 3 (2,23mM) de CAT un OR de 7,40 (IC95%: 1,25-43,5).

En la evaluación de la contribución que hace al modelo clínico de predicción de gravedad de la cohorte AEDES la inclusión de los indicadores de estrés oxidativo, se obtiene para el modelo base (132 sujetos) un área bajo la curva (AUC) de 0,74 con intervalo de confianza del 95% entre 0,65 y 0,83. Además, al introducir de manera independiente cada indicador de estrés oxidativo se obtuvieron las siguientes AUC (95%): 0,80 (0,69 - 0,92), 0,77 (0,65 - 0,90) y 0,76 (0,67 - 0,85), para CAT, SOD y GPx, respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 4. Asociación de CAT, SOD y GPX con la gravedad de la enfermedad por dengue

Indicador	Modelo 1* OR (IC95%)	Modelo 2[†] OR (IC95%)	Modelo 3[‡] OR (IC95%)
CAT (mM)			
C1 (1,13)	1,00	1,00	1,00
C2 (1,81)	4,08 (0,86-19,4)	5,26 (0,93-29,7)	5,33 (0,85-33,4)
C3 (2,23)	5,25 (1,15-23,9)	5,06 (1,02-25,1)	7,40 (1,25-43,5)
C4 (3,17)	4,08 (0,86-19,4)	4,87 (0,92-25,7)	4,96 (0,85-28,9)
SOD (U/ml)			
C1 (4,77)	1,00	1,00	1,00
C2 (5,93)	2,63 (0,57-11,9)	2,50 (0,50-12,7)	3,41 (0,59-19,7)
C3 (6,90)	3,42 (0,75-15,7)	2,58 (0,45-14,8)	2,53 (0,42-15,5)
C4 (10,1)	4,80 (0,98-23,5)	6,59 (1,07-40,4)	4,41 (0,68-28,5)
GPx (mM/min/ml)			
C1 (104,5)	1,00	1,00	1,00
C2 (125,6)	1,18 (0,45-3,11)	1,19 (0,43-3,29)	1,26 (0,42-3,76)
C3 (139,2)	0,47 (0,16-1,39)	0,49 (0,15-1,56)	0,51 (0,15-1,77)
C4 (161,8)	0,81 (0,29-2,23)	0,94 (0,31-2,90)	0,86 (0,25-2,96)

*Datos crudos. [†] Ajustando por edad, género, horas de fiebre al ingreso y tipo de infección. [‡] Incluye en ajuste modelo de predicción severidad cohorte AEDES.

Cuadro 5. Análisis de curva ROC (AUC) del modelo de predicción de gravedad de dengue y los indicadores de estrés oxidativo.

Modelo de Predicción	AUC (IC95%)
Base (n=132)*	0,74 (0,65 - 0,83)
CAT (n=59)	0,80 (0,69 - 0,92)
SOD (n=59)	0,77 (0,65 - 0,90)
GPx (n=132)	0,76 (0,67 - 0,85)

*Ajuste por modelo de predicción de gravedad de la cohorte AEDES (información de primera consulta de las variables: edad, horas de enfermedad en la inclusión, náusea, dolor retroocular, deshidratación y presión arterial media)

12.2 ANÁLISIS DE DESENLACES INTERMEDIOS

Para el análisis de desenlaces intermedios, se dicotomizaron las variables concentración CAT, SOD y actividad enzimática de GPx, de acuerdo a sus medianas (2,1 mM, 6,4 U/ml y 131,9 mmol/min/ml, respectivamente).

Evaluamos las diferencias entre las variables de desenlace intermedio (plaquetas mínimas, hematocrito máximo, presión arterial media y presión de pulso) de acuerdo a la concentración de CAT, SOD y la actividad GPx dicotomizados, encontrando una menor cantidad de plaquetas en el grupo con $CAT \geq 2,1 \text{ mM}$, en comparación con el grupo con $CAT < 2,1 \text{ mM}$, siendo la diferencia estadísticamente significativa (valor $p=0,026$) (Cuadro 6). Las demás variables evaluadas no mostraron diferencias entre los grupos evaluados ($p > 0,05$), aunque se observa leve tendencia a hemoconcentración, hipotensión para GPx y SOD (Cuadro 7, 8).

Cuadro 6. Diferencias en la línea de base para desenlaces intermedios de acuerdo a la concentración de CAT

Variable	n	CAT <2,1	n	CAT ≥2,1	Total	Valor p
Log (Plaquetas)	21	11,9±0,23	15	11,6±0,59	11,8±0,44	0,026
Hematocrito	21	40,1±4,07	16	42,3±3,70	41,0±4,02	0,097
PAM	33	82,7±9,45	26	83,7±8,94	83,1±9,16	0,685
PP	33	41,1±7,27	26	43,2±10,66	42±8,91	0,366

* Valores en las celdas representan medias (desviación estándar).

Cuadro 7. Diferencias en la línea de base para desenlaces intermedios de acuerdo a la concentración de SOD

Variable	n	SOD <6,4	n	SOD ≥6,4	Total	Valor p
Log (Plaquetas)	23	11,8±0,35	13	11,8±0,57	11,8±0,44	0,619
Hematocrito	24	40,8±4,07	13	41,5±4,06	41,0±4,02	0,661
PAM	40	84,1±9,24	19	81,2±8,94	83,1±9,16	0,270
PP	40	42,2 ±9,53	19	41,6±7,65	42±8,91	0,805

* Valores en las celdas representan medias (desviación estándar).

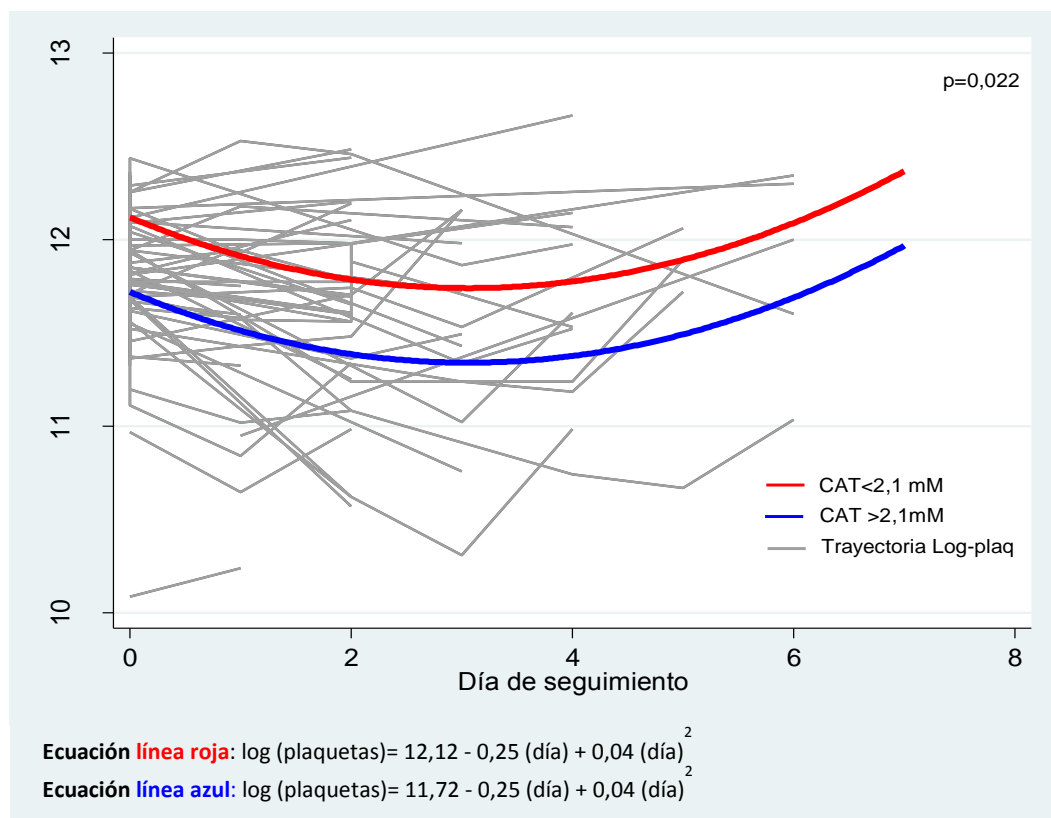
Cuadro 8. Diferencias en la línea de base para desenlaces intermedios de acuerdo a la actividad de GPx

Variable	n	GPx <131,9	n	GPx ≥131,9	Total	Valor p
Log (Plaquetas)	39	11,8±0,40	31	11,8±0,32	11,8±0,37	0,190
Hematocrito	39	40,3±3,52	31	41,6±4,06	40,9±3,79	0,160
PAM	71	82,2±8,44	61	83,9±8,63	82,9±8,63	0,265
PP	71	41,3 ±8,75	61	42,6±8,99	41,9±8,86	0,377

* Valores en las celdas representan medias (desviación estándar).

En general, el conteo de plaquetas disminuyó durante los primeros 2 a 3 días de seguimiento para luego incrementar. Observamos que los pacientes con concentración de $CAT \geq 2,1$ mM tuvieron menor logaritmo del conteo de plaquetas tanto en la línea de base como durante el seguimiento (línea azul), comparados con quienes tuvieron concentraciones de $CAT < 2,1$ mM (línea roja). La diferencia media en el logaritmo entre los grupos evaluados de 0.4 unidades (aproximadamente 60.498 plaquetas/ mm^3). Esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,022$) y se mantiene constante a lo largo del todo el seguimiento, ajustando por edad, género y horas de fiebre al ingreso de estudio. (Ver figura 11).

Figura 11. Evolución del recuento de plaquetas (con transformación logarítmica) en los pacientes con infección por dengue durante su seguimiento



13 DISCUSIÓN

13.1 HALLAZGOS PRINCIPALES

Dado que el tratamiento de la enfermedad por Dengue es de naturaleza sintomático, es necesaria la búsqueda de biomarcadores que permita al clínico identificar tempranamente cuando un paciente evolucionará a dengue grave. Lo anterior es especialmente significativo, si consideramos que en la historia natural de la enfermedad la presencia de los signos de alarma coincide con la desaparición de la fiebre (fase crítica) (5). En los últimos años, se ha evaluado el rol de biomarcador pronóstico de algunas citoquinas y marcadores bioquímicos (64 - 69, 75, 76) e inclusive algunas publicaciones de nuestro grupo han mostrado resultados prometedores sobre este tema; sin embargo, la determinación de estas aún no ha sido incluidas en el manejo clínico del paciente. Posiblemente, por su alto costo y nivel de complejidad para la realización, la falta de estudios que evalúen su reproducibilidad y tiempos prolongados para la obtención de los resultados (13, 77). En este trabajo de investigación, se abordó la evaluación de la concentración de capacidad antioxidante total (CAT), y las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) como posibles predictores de la gravedad en la infección por dengue en una cohorte de pacientes captados de manera ambulatoria, durante las primeras horas de inicio de síntomas.

El estrés oxidativo parece jugar un papel importante en la patogénesis del dengue. En la respuesta de fase aguda de la infección, la liberación de la cascada de citoquinas proinflamatorias desencadena la activación de la vía de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (31, 50, 59, 33). Ante el aumento de radicales de oxígeno libre y el desbalance de la actividad en la defensa antioxidante, coexisten reacciones entre los diferentes tipos de radicales, de

manera que se forman especies reactivas con mayor potencial para afectar las células endoteliales. El H_2O_2 podría reaccionar con O_2^- para formar el radical hidroxil (OH^\bullet), y el ON con el O_2^- para generar el radical peroxinitrilo (ONOO^-); estos dos compuestos, interactúan en conjunto para atacar potentemente los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos causando disfunción en las células del endotelio, lo cual conllevaría a un incremento en la permeabilidad vascular característico de la forma grave del dengue (23, 24, 29, 62-64).

Observamos mayor concentración de superóxido dismutasa y CAT y menor actividad de la glutatión peroxidasa en los casos versus los controles, siendo esta diferencia no es estadísticamente significativa. Como posible explicación a este fenómeno, planteamos que la SOD se consuma en las primeras horas de enfermedad, debido a su gasto en la transformación de O_2^- circulantes a H_2O_2 y a que, el óxido nítrico sintetizado en el endotelio ejerce un efecto regulador negativo sobre su actividad (62, 63). Simultáneamente, los componentes de la capacidad antioxidante en conjunto tienden a disminuirse durante la infección y su progresión a dengue grave. En respuesta la respuesta inflamatoria sistémica se ha demostrado un descenso de los niveles de ácido ascórbico, beta- caroteno y el alfa-tocoferol y en general los niveles de CAT disminuyen probablemente por mayor consumo de antioxidantes, que no es compensado por un mayor aumento en los niveles de ácido úrico plasmático y glutatión peroxidasa (25, 62). Asimismo, niveles bajos de albumina han sido asociados con la progresión a la forma grave del dengue (24, 26, 65, 76).

Observamos un gradiente de ORs entre los diferentes cuartiles de distribución de la concentración de SOD (Modelo 2. Cuadro 4); siendo mayor el riesgo de evolucionar a dengue grave para los sujetos con concentración $>10,1\text{U/ml}$, que los sujetos con concentraciones distribuidas en el segundo y tercer cuartil (6,59 vs

2,58 y 2,50), no obstante, se carece de poder estadístico (IC95% muy amplios). Por otro lado, para la concentración de CAT se observamos resultados promisorios, donde para el cuartil tres se obtiene un OR de 7,40 (IC95%:1,25 - 43,5; Modelo 3. Cuadro 4); lo cual nos indicaría, que CAT podría funcionar como un marcador predictor de gravedad por dengue.

En la valoración de la contribución que hace al modelo de predicción de gravedad en dengue establecido para la cohorte AEDES, la inclusión de CAT, SOD y GPx como variables independientes, encontramos que los IC95% de los modelos que incluyen de manera independiente cada indicador antioxidante se superponen con el modelo base (Cuadro 5), lo que indicaría que no existe evidencia en favor de la inclusión de los marcadores para mejorar la capacidad de discriminación (predicción) del evento hipotensión/hemorragia (dengue grave) durante la fase aguda de la enfermedad.

En la descripción de la población de este estudio, se observa una tendencia a la hipotensión en los casos (variables PAS, PAD y PAM). Lo anterior, se podría atribuir principalmente, a que hay una mayor población infantil en los casos (43,2% para casos y 27,3% para controles). Igualmente, para la definición de hipotensión se tomaron valores de referencia para población pediátrica (5-14 años) diferentes a la población adulta (73).

13.2 OTROS HALLAZGOS

En la exploración de los desenlaces intermedios mencionados anteriormente, encontramos que existe un menor recuento de plaquetas en el grupo con mayor

concentración de CAT ($\geq 2,1$ mM), en comparación con el grupo que tienen menos concentración ($p=0,026$) en la línea de base. Asimismo, la trayectoria de la transformación logarítmica del recuento, presenta un comportamiento cuadrático a través de los días de seguimiento del estudio, iniciando con una tendencia al descenso, continuado de un incremento (ver figura 11). Los dos grupos evaluados, exhiben una diferencia en la trayectoria de aproximadamente 60.498 plaquetas/mm³; diferencia que se mantiene constante durante el seguimiento.

Es posible que durante la respuesta de fase aguda, el incremento de ROS incite la agregación y activación plaquetaria; y que esta activación, contribuya a la estimulación de la liberación de más ROS y al reclutamiento de citoquinas inflamatorias y leucocitos al endotelio dañado (78 - 80). Además, la exposición prolongada de las plaquetas a altas concentraciones de ROS, induciría el inicio de su apoptosis (81). Por otra parte, desde el punto de vista de la fisiopatogenia de la enfermedad por dengue, el recuento bajo de plaquetas ha sido asociado con la presencia de manifestaciones hemorrágicas leves y sangrados mayores características de los casos de dengue grave (hematuria, hematemesis, hematoquecia, melenas) (82-85).

13.3 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Si bien, esta es la investigación que evalúa estrés oxidativo en dengue con mayor tamaño de muestra reportada en la literatura, los resultados de los indicadores CAT y SOD no son precisos, pues los intervalos de confianza en las estimaciones de fuerza de asociación fueron muy amplios.

La ausencia de datos del serotipo causante del cuadro febril, se considera una limitante en el momento de evaluar la asociación de los marcadores de severidad en los casos y los controles, por los que existe evidencia de que el serotipo se asocia con la gravedad de la enfermedad por dengue.

La inclusión de casos de dengue probable, puesto que no tenemos la certeza de que los casos de dengue probable fueran casos de dengue confirmados. No obstante, si consideramos que los sujetos fueron captados durante un periodo epidémico, la probabilidad pre-test de las pruebas de diagnóstico, así sea con resultado probable, se hace alto.

La definición de casos de acuerdo al punto de corte fijado por la mediana de CAT, introduce un posible sesgo de clasificación, debido a que existe la posibilidad que esta clasificación se mezclen los sujetos con dengue grave y dengue no grave en el análisis de desenlaces intermedios, lo cual podría restarle validez a las conclusiones de los resultados para estos desenlaces.

13.4 FORTALEZAS DEL ESTUDIO

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que se conduce en Colombia buscando evaluar el predictor de gravedad en dengue del estrés oxidativo. Además, de ser el primero en realizarse definiendo los casos y los controles de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud, recomendada en el 2009, la cual presenta una mayor sensibilidad para identificar correctamente los pacientes con complicaciones.

El diseño de casos y controles anidado a una cohorte seleccionado para evaluar nuestra hipótesis, nos permitió contar con información clínica sólida recolectada durante la ejecución del estudio Multicéntrico “AEDES”, de pacientes que fueron seguidos durante la enfermedad hasta su recuperación por personal vinculado directamente por el estudio en los diferentes centros de captación, controlando la posibilidad de sesgar la clasificación de los casos de dengue grave y los controles de dengue no grave.

Además, durante la ejecución de las pruebas de laboratorio se obtuvieron índices de correlación superiores a 0,9 entre las absorbancias de los patrones de calibración y las concentraciones o actividades enzimática, lo cual reflejan la calidad de las mediciones para los tres indicadores de estrés oxidativo.

14 CONCLUSIONES

Se observa un gradiente no estadísticamente significativo entre respuesta enzimática antioxidante (SOD y CAT) y probabilidad de complicaciones.

Los indicadores de estrés oxidativo evaluados no contribuyen al modelo de predicción clínico de gravedad establecido en la cohorte AEDES.

Existe una relación entre la concentración de CAT y un recuento de plaquetas más bajo durante la fase aguda de la enfermedad.

Estos hallazgos requieren confirmación en estudios que cuenten con muestras de mayor tamaño.

15 ESTRATEGIAS DE COMUNICACIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se socializaran mediante las siguientes estrategias:

- Presentación del trabajo en el VIII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, a realizar en La Habana, Cuba durante los días 14 al 16 de Octubre del 2014.
- Presentación del trabajo en la Universidad (sustentación de tesis) con invitación a la comunidad universitaria (04 diciembre del 2014).

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Dengue and dengue severe. Factsheet No 117. Revised September 2013. Geneva, World Health Organization, 2013
2. OPS/OMS. Los casos de dengue en las Américas se quintuplicaron en diez años, según nuevos datos de la OPS/OMS. Washington, D.C., 29 de mayo de 2014.
3. SAN MARTÍN JL, BRATHWAITE O, ZAMBRANO B, SOLÓRZANO JO, BOUCKENOOGHE A, et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Trop Med Hyg.* 2010 Jan;82(1):128-35.
4. GUZMÁN MG, HALSTEAD SB, ARTSOB H, BUCHY P, FARRAR J, GUBLER DJ, *et al.* Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Dec;8(12 Suppl):S7-16.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES (TDR). Dengue Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2009.
6. BRAUNWALD, E. Biomarkers in Heart Failure. *N Engl J Med* 2008; 358:2148-2159
7. PADILLA JC, ROJAS DP, SÁENZ-GOMEZ R. Dengue en Colombia. Epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. ©Los autores, 2012. Primera edición. ISBN 978-958-46-0661-7
8. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Boletín de Vigilancia Epidemia por Dengue en Colombia. Boletín 48: Enero 7 de 2011.
9. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica número 53 de 2014 (28 dic.-03 ene 2015).
10. SHEPARD DS, COUDEVILLE L, HALASA YA, ZAMBRANO B, DAYAN GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.*

2011 Feb;84(2):200-7.

11. ALVIS N. Impacto económico del dengue en Colombia, 2003-2007. *Infectio.* 2008;12(Supl.1):7-9.
12. TIGA-LOZA D.C., VILLAR-CENTENO L.A., MARTÍNEZ-VEGA R.A.. Discapacidad en dengue y su relación con severidad. *Salud UIS* 2011; 43(1): 49-55.
13. MORROW DA., DE LEMOS JA. Benchmarks for the Assessment of Novel Cardiovascular Biomarkers. *Circulation* 2007, 115:949-952
14. FULBERT JC, CALS MJ. Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms. *PatholBiol* 1992;40:66-77.
15. LIN, YL.; LIU, CC.; CHUANG, JI., et al. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology* 276: 114–126; 2000.
16. CHARNSILPA W, TAKHAMPUNYA R, ENDY TP, MAMMEN JR MP, LIBRATY DH, UBOL S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. *J. Med. Virol.* 77:89–95; 2005.
17. IRANI K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. *Circ Res* 2000; 87: 179–183.
18. JONES SA, O'DONNELL VB, WOOD JD, BROUGHTON JP, HUGHES EJ, JONES OT. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996 Oct; 271(4 Pt 2):H1626-34.
19. LI AE, ITO H, ROVIRA II, KIM KS, TAKEDA K, YU ZY, et al. A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ Res.* 1999 Aug 20; 85(4):304-10.
20. DESHPANDE SS, ANGKEOW P, HUANG J, OZAKI M, IRANI K. Rac1 inhibits TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 2000 Sep; 14(12):1705-14.
21. BARAJAS-ESPINOSA A, BASYE A, JESSE E, YAN H, QUAN D, CHEN CA. Redox activation of DUSP4 by N-acetylcysteine protects endothelial cells from Cd(2+)-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2014 Sep;74:188-99.

22. SONG P, ZOU MH. Redox regulation of endothelial cell fate. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Sep; 71(17):3219-39.
23. GIL L., MARTÍNEZ G., TÁPANES R., CASTRO O. Oxidative stress in adult dengue patients *am. j. trop. med. hyg.*, 71(5), 2004, pp. 652–657
24. RAY, G.; KUMAR, V.; KAPOOR, A. K.; DUTTA, A. K.; BATRA, S. Status of antioxidants and other biochemical abnormalities in children with dengue fever. *J. Trop. Pediatr.* 45: 4–7; 1999.
25. KLASSEN, P.; BIESALSKI, H. K.; MAZARIEGOS, M.; SOLOMONS, N. W.; FURST, P. Classic dengue fever affects levels of circulating antioxidants. *Nutrition* 20:542–547; 2004.
26. RAJENDIRAN S, LAKSHAMANAPPA HS, ZACHARIAH B, NAMBIAR S. Desialylation of plasma proteins in severe dengue infection: possible role of oxidative stress. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Sep;79(3):372-7.
27. SOUNDRAVALLY R, SANKAR P, HOTI SL, SELVARAJ N, BOBBY Z, SRIDHAR MG. Oxidative stress induced changes in plasma protein can be a predictor of imminent severe dengue infection. *Acta Trop.* 2008 Jun;106(3):156-61.
28. SOUNDRAVALLY R, SANKAR P, BOBBY Z, HOTI SL. Oxidative stress in severe dengue viral infection: association of thrombocytopenia with lipid peroxidation. *Platelets.* 2008 Sep;19(6):447-54.
29. SEET RC, LEE CY, LIM EC, QUEK AM, YEO LL, HUANG SH, et al. Oxidative damage in dengue fever. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug 15;47(4):375-80.
30. ROJAS E. M. and others. Correlación entre los niveles de glutatión peroxidasa, un marcador de estrés oxidativo, y la presentación clínica del dengue. *RevMéd Chile* 2007; 135: 743-750
31. CHATURVEDI UC, AGARWAL R, ELBISHBISHI EA, MUSTAFA AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000 Jul;28(3):183-8.
32. GARCÍA TRIANA BE, SALDAÑA BERNABEU A., GARCÍA PIÑEIRO JC., Y BASTARRECHEA MILIÁN M. NADPH-oxidasa fagocítica: componentes,

- ensamblaje y mecanismo de acción. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001;20(1):59-63
33. ARANGO RINCÓN JC., GÁMEZ DÍAZ LY, LÓPEZ QUINTEROJA. Sistema NADPH oxidasa: nuevos retos y perspectivas. *Iatreia* Vol. 23 (4): 362-372, Diciembre 2010 – Febrero 2011
 34. SIMMONS CP, FARRAR JJ, VINH CHAU N AND WILLS B. Dengue. *Current Concepts N Engl J Med* 2012;366:1423-32.
 35. HENCHAL EA, PUTNAK JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990 Oct;3(4):376-96.
 36. GUBLER, DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Jul; 11(3):480-96.
 37. ROTHMAN, ALAN L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 2004 April 1; 113(7): 946–951.
 38. VELANDIA ML, CASTELLANOS JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infect.* 2011 Mar; 15(1): 33-43.
 39. WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 1997.
 40. ALEXANDER N, BALMASEDA A, COELHO IC, DIMAANO E, HIEN TT, HUNG NT, et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. World Health Organization (WHO-TDR) supported DENCO Study Group. *Trop Med Int Health.* 2011 Aug;16(8):936-48
 41. DEEN JL, HARRIS E, WILLS B, BALMASEDA A, HAMMOND SN, ROCHA C, et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet.* 2006;368:170–3.
 42. NARVAEZ F, GUTIERREZ G, PÉREZ MA, ELIZONDO D, NUÑEZ A, BALMASEDA A, HARRIS E. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Nov;5(11):e1397
 43. LIMA F, CRODA M, MUNIZ D, GOMES I, SOARES K, CARDOSO M, et al.

- Evaluation of the traditional and revised world health organization classifications of dengue cases in Brazil. *Clinics* vol.68 no.10 São Paulo 2013
44. BANDYOPADHYAY S, LUM LC, KROEGER A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health*. 2006 Aug;11(8):1238-55.
 45. KALAYANAROOJ S, VAUGHN DW, NIMMANNITYA S, GREEN S, SUNTAYAKORN S, KUNENTRASAI N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis*. 1997 Aug;176(2):313-21)
 46. BOZZA FA, CRUZ OG, ZAGNE SM, AZEREDO EL, NOGUEIRA RM, ASSIS EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis*. 2008 Jun 25;8:86
 47. HALSTEAD SB, YAMARAT C. Recent Epidemics of Hemorrhagic Fever in Thailand: Observations Related to Pathogenesis of a “New” Dengue Disease. *Am J Public Health Nations Health*. 1965 September; 55(9): 1386–1395.
 48. SANGKAWIBHA N, ROJANASUPHOT S, AHANDRIK S, VIRIYAPONGSE S, JATANASEN S, SALITUL V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol*. 1984 Nov;120(5):653-69.
 49. HALSTEAD SB, NIMMANNITYA S, COHEN SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med*. 1970 Apr;42(5):311-28.
 50. YACoub S, MONGKOLSAPAYA J, SCREATON G. The pathogenesis of dengue. *Curr Opin Infect Dis*. 2013 Jun;26(3):284-9.
 51. RIGAU-PÉREZ JG, CLARK GG, GUBLER DJ, REITER P, SANDERS EJ, VORNDAM AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1998 Sep 19;352(9132):971-7.
 52. LEI H, YEH T, LIU H, LIN Y, CHEN S, LIU C. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci*. 2001;8:377-88
 53. HALSTEAD, SB. Dengue hemorrhagic fever: two infections and antibody

- dependent enhancement, a brief history and personal memoir. *Rev Cubana Med Trop.* 2002;54(3):171-79
54. CORRALES-AGUILAR E, HUN-OPFER L. Nuevas perspectivas sobre la patogénesis del dengue. *Acta méd. costarric.* 2012, vol.54, n.2, pp. 75-85
 55. GUZMAN MG, ALVAREZ M, HALSTEAD SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol.* 2013 Jul;158(7):1445-59.
 56. KOLITHA HS, "Pathogenesis of Dengue Haemorrhagic Fever and Its Impact on Case Management," *ISRN Infectious Diseases*, vol. 2013, Article ID 571646, 6 pages, 2013.
 57. PANG T, CARDOSA MJ, GUZMAN MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol.* 2007 Jan;85(1):43-5. Epub 2006 Nov 28.
 58. PANDEY. BD, IGARASHI, A. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. *Microbiol Immunol* 2000; 44(3): 179–88
 59. CHATURVEDI UC. Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever. *Indian J Med Res.* 2009 Jan;129(1):1-3.
 60. AVIRUTNAN P, PUNYADEE N, NOISAKRAN S, KOMOLTRI C, THIEMMECA S, AUETHAVORNANAN K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 2006 Apr 15;193(8):1078-88. Epub 2006 Mar 9.
 61. GERSHMAN R. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 1954; 119:623-6.
 62. EVEREKLIOGLU C, ER H, DOGANAY S, CEKMEN M, TURKOZ Y, OTLU B, OZEROL E. Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. *Doc Ophthalmol.* 2003 Mar;106(2):129-36.
 63. ANDRESEN HM, REGUEIRA HT, LEIGHTON F. Estrés oxidativo en el

- paciente crítico. Rev. méd. Chile. 2006 Mayo ; 134(5): 649-656.
64. HOUGHTON-TRIVIÑO N, SALGADO DM, RODRÍGUEZ JA, BOSCH I, CASTELLANOS JE. Levels of soluble ST2 in serum associated with severity of dengue due to tumour necrosis factor alpha stimulation. J Gen Virol. 2010 Mar;91(Pt 3):697-706
 65. VILLAR-CENTENO LA, LOZANO-PARRA A, SALGADO-GARCÍA D, HERRÁN OF. Alteraciones bioquímicas como marcadores predictores de gravedad en pacientes con fiebre por dengue. Biomédica 2013;33(Supl.1):63-9)
 66. VILLAR LA, GÉLVEZ RM, RODRÍGUEZ JA, SALGADO D, PARRA B, OSORIO L, et al. Biomarcadores pronósticos de severidad del dengue. Biomédica. 2013;33(Supl.1).
 67. MALAVIGE GN, GOMES L, ALLES L, CHANG T, SALIMI M, FERNANDO S, et al. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. BMC Infect Dis. 2013 Jul 24;13(1):341
 68. BRASIER AR, JU H, GARCIA J, SPRATT HM, VICTOR SS, et al. A three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. Am J Trop Med Hyg. 2012 Feb;86(2):341-8.
 69. HUY NT, THAO NT, HA TT, LAN NT, NGA PT, THUY TT, et al. Development of clinical decision rules to predict recurrent shock in dengue. Crit Care. 2013 Dec 2;17(6):R280.
 70. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Alerta Epidemiológica: Actualización la situación de Dengue en las Américas. Publicado 02 de febrero de 2011. Disponible en: http://bvs.insp.mx/local/File/2011_02_febrero_brote_dengue.pdf. Consultado 27 de febrero de 2014.
 71. GOLDSTEIN B, GIROIR B., RandolphA. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. Pediatr Crit Care Med 2005 Vol. 6, No. 1, pág., 4.

72. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards. Methods and development. Geneva. 2006
73. SUN Y, OBERLEY LW, LI Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988 Mar;34(3):497-500.
74. PAGLIA DE, VALENTINE WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967 Jul;70(1):158-69.
75. BECERRA A, WARKE RV, DE BOSCH N, ROTHMAN AL, BOSCH I. Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients. *Cytokine*. 2008 Feb;41(2):114-20. doi: 10.1016/j.cyto.2007.11.001. Epub 2008 Jan 28.
76. VILLAR-CENTENO LA, DÍAZ-QUIJANO FA, MARTÍNEZ-VEGA RA. Biochemical alterations as markers of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Mar;78(3):370-4.
77. POOLE-SMITH BK, GILBERT A, GONZALEZ AL, BELTRAN M, TOMASHEK KM, et al. Discovery and characterization of potential prognostic biomarkers for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Dec;91(6):1218-26. doi: 10.4269/ajtmh.14-0193. Epub 2014 Oct 27.
78. ESSEX DW, LI M. Redox control of platelet aggregation. *Biochemistry*. 2003 Jan 14;42(1):129-36.
79. JONES DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Oct;295(4):C849-68.
80. DIXON JT, GOZAL E, ROBERTS AM. Platelet-mediated vascular dysfunction during acute lung injury. *Arch Physiol Biochem*. 2012 May;118(2):72-82.
81. RAKESH KS, JAGADISH S, VINAYAKA AC, HEMSHEKHAR M, PAUL M, THUSHARA RM, et al. A New Ibuprofen Derivative Inhibits Platelet Aggregation and ROS Mediated Platelet Apoptosis. *PLoS One*. 2014 Sep 19;9(9):e107182.
82. DÍAZ-QUIJANO FA, MARTÍNEZ-VEGA RA, VILLAR-CENTENO LA. Early predictors of haemorrhage in acute febrile syndrome patients from

Bucaramanga, Colombia: a dengue endemic area. Singapore Med J. 2008 Jun;49(6):480-2).

- 83.** DÍAZ-QUIJANO FA, MARTÍNEZ-VEGA RA, VILLAR-CENTENO LA. Predictors of spontaneous bleeding in patients with acute febrile syndrome from a dengue endemic area. J Clin Virol. 2010 Sep;49(1):11-5.
- 84.** CHAMNANCHANUNT S, KANAGARAJ D, THANACHARTWET V, DESAKORN V, ROJNUCKARIN P. Early predictors of clinically significant bleeding in adults with dengue infection. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2012 Jul;43(4):890-9
- 85.** GARCÍA S, MORALES R, HUNTER RF. Dengue fever with thrombocytopenia: studies towards defining vulnerability of bleeding. Bol Asoc Med P R. 1995 Jan-Feb;87(1-2):2-7.

ANEXOS

ANEXO 1. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.

Variables Independientes

Nombre de la Variable	Tipo de Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de Medición	Obj
Superóxido dismutasa	Cuantitativa continua	Concentración de la enzima SOD medida en los sueros agudos	Se registrara el valor en U/mL	Razón	1, 2, 3, 4
Capacidad antioxidante total.	Cuantitativa continua	Concentración antioxidante total medida en sueros agudos	Se registrara el valor en mM	Razón	1, 2, 3, 4
Glutación peroxidasa	Cuantitativa continua	Actividad de la enzima GPx en medida en sueros agudos	Se registrara el valor en nmol/min/ml	Razón	1, 2, 3, 4

Variables Dependientes o de desenlace

Nombre de la Variable	Tipo de Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de Medición	Obj
Dengue grave	Cualitativa	Nueva clasificación de la gravedad de la enfermedad de acuerdo a los criterios de la OMS	Pacientes que durante el seguimiento hipotensión (definida por al menos uno de los siguientes criterios: taquicardia para la edad y presión de pulso <20 mm Hg; presión arterial media disminuida para la edad; presión arterial sistólica disminuida para la edad en cualquier momento del seguimiento) o sangrado mayor (definido por la presencia de hematemesis o melenas). No se considerara compromiso de órganos para definir esta variable.	Nominal	2, 3

Recuento mínimo de plaquetas	Cuantitativa continua	Cantidad de plaquetas medidos en la muestras de sangre de un paciente en el momento de ingreso al estudio	Se tomara la transformación logarítmica del recuento de plaquetas por mm^3 registrado.	Razón	4
Hematocrito máximo	Cuantitativa continua	Porcentaje del volumen total de la sangre compuesta por glóbulos rojos	Se registrara el hematocrito en %	Razón	4
Presión arterial media	Cuantitativa continua	Se calculó con la formula $(\text{PAD} + (\text{PAS} - \text{PAD})/3)$ en el momento de ingreso al estudio	Se registró la presión arterial media en mmHg	Razón	4
Presión de pulso	Cuantitativa continua	Diferencia entre la PAS y la PAD en el momento de ingreso al estudio	Se registró la presión de pulso en mmHg	Razón	4

Potenciales variables de confusión:

Nombre de la Variable	Tipo de Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de Medición	Obj
Edad	Cuantitativa continua	Años de vida a partir del día de nacimiento	Número de años cumplidos hasta el momento de ingreso al estudio AEDES	Razón	2, 3, 4
Género	Cualitativa Dicotómica	Género de nacimiento de cada persona	Femenino: si es mujer Masculino: si es hombre	Nominal	2, 3, 4
Horas de enfermedad	Cuantitativa continua	Horas de evolución de la enfermedad actual, contadas a partir de la hora del inicio de la fiebre hasta la hora de ingreso al estudio	Conteo de horas de enfermedad, a partir de la hora y día reportados en la fecha de inicio de fiebre, hasta la hora y día de la fecha de ingreso al estudio. Hasta con un decimal.	Razón	2, 3, 4
Tipo de infección	Cualitativa Dicotómica	Tipo de infección al momento de ingreso al estudio	Primaria: tiene resultado IgG negativa. Secundaria: tiene resultado IgG positivo.	Nominal	2, 3, 4

Otras variables asociadas

Nombre de la Variable	Tipo de Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de Medición	Obj
Cefalea	Cualitativa Dicotómica	Dolor de cabeza	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha tenido dolor de cabeza?	Nominal	2, 3
Dolor retro-ocular Registrará como no evaluable (NE).	Cualitativa Dicotómica	Dolor constante detrás de los ojos o al movilizar los mismo	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha tenido dolor detrás de los ojos o al movilizarlos? Se registrara la respuesta del paciente o acudiente (SI o NO)	Nominal	2, 3
Mialgias	Cualitativa Dicotómica	Dolor muscular	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha sentido dolor en los músculos?	Nominal	2, 3
Artralgia	Cualitativa Dicotómica	Dolor en las articulaciones	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha sentido dolor en las articulaciones (o en las "coyunturas"?)	Nominal	2, 3
Escalofrío	Cualitativa Dicotómica	Episodio de temblores junto con palidez y sensación de frío	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha tenido escalofríos?	Nominal	2, 3

Hiporexia/ anorexia	Cualitativa Dicotómica	Disminución o pérdida de las ganas de comer	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha sentido disminución o pérdida de las ganas de comer o está comiendo muy poco?	Nominal	2, 3
Tos	Cualitativa Dicotómica	Reflejo que consiste en la expulsión violenta del aire de los pulmones tras la inspiración profunda, y el cierre de la glotis	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha tenido tos? Se registrará la respuesta del paciente o acudiente	Nominal	2, 3
Rinorrea/ Obstrucción nasal	Cualitativa Dicotómica	Secreción nasal y obstrucción nasal	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha tenido secreción por la nariz (mocos) y obstrucción nasal (sensación de tapazón)?	Nominal	2, 3
Odinofagia	Cualitativa Dicotómica	Dolor o ardor en la garganta	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha sentido dolor o ardor en la garganta espontáneo o al deglutir (pasar – ingerir) los alimentos?	Nominal	2, 3

Prurito	Cualitativa Dicotómica	Picazón en el cuerpo	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha sentido picazón en el cuerpo	Nominal	2, 3
Náuseas	Cualitativa Dicotómica	Tener ganas de vomitar	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha tenido ganas de vomitar?	Nominal	2, 3
Vómito	Cualitativa Dicotómica	Expulsión violenta del contenido gástrico por la boca	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha tenido vómito?	Nominal	2, 3
Diarrea	Cualitativa Dicotómica	Deposiciones líquidas o aumento en la frecuencia de la deposición	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha tenido diarrea (deposiciones líquidas o aumento de su frecuencia)?	Nominal	2, 3
Astenia	Cualitativa Dicotómica	Sensación de debilidad para moverse o para realizar labores cotidianas	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad ha sentido la sensación de debilidad para moverse o para realizar las labores cotidianas?	Nominal	2, 3

Deshidratación	Cualitativa Dicotómica	Alteración de agua y sales minerales en el plasma de un cuerpo	Se registró Si: cuando el paciente presento algún grado de deshidratación	Nominal	2, 3
Exantema	Cualitativa Dicotómica	Coloración roja de la piel, que desaparece a la digito-presión	Pregunta: ¿Durante esta enfermedad la piel se le ha puesto de color rojo la piel o se ha brotado?	Nominal	2, 3
Temperatura	Cuantitativa	Temperatura axilar tomada con termómetro en el momento de ingreso al estudio	Se registró la temperatura en grados centígrados	Razón	2, 3
Frecuencia respiratoria	Cuantitativa	Recuento de respiraciones por minuto en el momento de ingreso al estudio	Se registró la frecuencia respiratoria en respiraciones/minuto	Razón	2, 3
Frecuencia cardíaca	Cuantitativa	Recuento de frecuencia cardíaca por minuto en el momento de ingreso al estudio	Se registró la frecuencia cardíaca en latidos/minuto	Razón	2, 3

Presión arterial sistólica	Cuantitativa	Valor máximo de la tensión arterial en sístole en el momento de ingreso al estudio	Se registró la presión arterial sistólica en mmHg	Razón	2, 3
Presión arterial diastólica	Cuantitativa	Valor mínimo de la tensión arterial cuando el corazón está en diástole o entre latidos cardíacos en el momento de ingreso al estudio.	Se registró la presión arterial diastólica en mmHg	Razón	2, 3
Presión arterial media <70mmHg	Cuantitativa dicotomica	Se calculará con la formula $(PAD + (PAS - PAD)/3)$ en el momento de ingreso al estudio	Si: PAM <70mm Hg No: PAM >70mm Hg	Nominal	2, 3
Presión de pulso <20mmHg	Cuantitativa	Diferencia entre la PAS y la PAD en el momento de ingreso al estudio	Si: PP <20mm Hg No: PP >20mm Hg	Razón	2, 3

Talla	Cuantitativa	Medición de la longitud del cuerpo desde la planta de los pies hasta el vértice de la cabeza en el momento de ingreso al estudio	Se registró la talla en centímetros	Razón	2, 3
Peso	Cuantitativa	Medición de la masa corporal del individuo en el momento de ingreso al estudio.	Se registró el peso en kilogramos	Razón	2, 3
Recuento de leucocitos Basal	Cuantitativa	Cantidad de leucocitos medidos en la muestra de sangre de un paciente en el momento de ingreso al estudio	Se registró el recuento de leucocitos totales del CH como células por mm ³	Razón	2, 3
Recuento de plaquetas Basal	Cuantitativa	Cantidad de plaquetas medidos en la muestras de sangre de un paciente en el momento de ingreso al estudio	Se registrará el recuento de plaquetas por mm ³	Razón	2, 3

Albumina	Cuantitativa	Concentración de albumina medida en sueros agudos	Se registró la concentración de albumina en mg/dl	Razón	2, 3
Proteína C reactiva	Cuantitativa	Concentración de proteína C reactiva medida en sueros agudos	Se registró la concentración de proteína C reactiva en mg/l	Razón	2, 3

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO AEDES

Estudio “AEDES”: Abordando Áreas Endémicas del Dengue para el Estudio de su Severidad UIS, UNIVALLE, UNINORTE, SURCOLOMBIANA, UTMB, UMMS, USP COLCIENCIAS (V2)

CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

Propósito del estudio

La Fiebre tiene diferentes causas y en nuestro medio el virus del dengue es una de sus principales causas. El dengue es una enfermedad que presenta síntomas y signos muy variados, esto hace que la enfermedad se clasifique como dengue clásico o dengue hemorrágico. Sin embargo, existen otros compromisos generados por el virus, como la inflamación del Hígado (hepatitis), del cerebro (encefalitis) entre otros, que aunque son menos frecuentes son complicaciones importantes. Adicionalmente, algunos síntomas, signos, o proteínas de la sangre de las personas pueden estar relacionados con el Dengue Hemorrágico o con las otras complicaciones, conocer cuáles características podrían servir para identificar tempranamente las personas que se encuentran en riesgo de sufrir dengue grave, orientarían al personal de salud para realizar un manejo priorizado.

Con el fin de conocer cuál es la frecuencia de las manifestaciones severas de dengue e investigar características de los pacientes que predigan severidad, los Grupos de Investigación de las diferentes ciudades de Colombia (Barranquilla, Bucaramanga, Buga, Cali y Neiva), en asociación con las Universidades de Texas, Massachussets y Sao Paulo, estamos desarrollando este estudio en el que se evaluarán 2000 personas y usted ha sido invitado a participar.

Quiénes pueden participar

Personas con fiebre a quienes el médico les sospecha que tengan dengue y que residan en las ciudades mencionadas. Usted está siendo invitado a participar porque presenta estas condiciones. Usted deberá estar dispuesto a ser entrevistado y examinado durante la próxima semana para conocer como sigue de su enfermedad. Si tiene historia de enfermedades tales como, cáncer, leucemia, VIH positivo o alguna enfermedad autoinmune como Artritis Reumatoidea, usted

no puede participar en el estudio. En ese caso nosotros le aconsejaremos sobre dónde y qué tan pronto debe buscar asistencia médica.

Procedimientos del estudio

Una vez verifiquemos que Usted es elegible para el estudio, nosotros le haremos algunas preguntas sobre la evolución de su enfermedad, como por ejemplo días de fiebre, síntomas y uso de medicamentos. Luego se le realizará un examen físico completo, que incluye una prueba de torniquete (similar a la toma de la presión arterial). Hoy se le tomará una muestra de sangre en una vena de su antebrazo (16ml 3 cucharadas en mayores de 10 años, 12ml en niños entre los 9 y 2 años y 6ml en menores de un año). La muestra de sangre será usada para realizar un cuadro hemático, pruebas de la coagulación, medir enzimas del hígado, del músculo, entre otras y hacer el diagnóstico de la causa de su fiebre. Posteriormente, usted será valorado diariamente en la institución de salud, en su casa o donde nos lo indique, al menos hasta el sexto día después del inicio de la fiebre o hasta que su condición clínica lo requiera. En el caso que sea hospitalizado este procedimiento se realizará por el equipo de salud del estudio en el sitio donde se encuentre. Además, se realizará un último control 15 días después del inicio de la enfermedad y se tomará una última muestra de sangre (igual cantidad a la que le tomaremos hoy), que será utilizada para confirmar la infección por dengue. En total el tiempo de participación en el estudio en promedio es de 2 semanas.

Confidencialidad

Toda la información obtenida será maneja por los investigadores protegiendo su privacidad; a usted se le asignará un código y su nombre será borrado de las bases de datos, sólo los investigadores tendrán acceso al 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.

Riesgos y beneficios

Los riesgos de este estudio incluyen que al tomar la muestra de sangre se produzca un dolor transitorio, con una probabilidad mínima de infección y algunas personas pueden desarrollar un “morado” o hematoma pequeño (pequeña cantidad de sangre debajo de la piel), que desaparece en una semana. La toma de sangre se realizará por personal capacitado y con equipo nuevo, estéril y no reutilizable, para evitar el riesgo de infección. Usted se beneficiará directamente de la participación al tener los resultados de los exámenes de sangre que se le van a realizar y el seguimiento médico. Además, esperamos que su participación beneficie a otras personas con dengue y a futuro poder conocer que complicaciones por dengue se están presentando en nuestro país y que características se asocian a estas complicaciones.

En el caso en que se con nueva información sobre el dengue con la cuál usted se pueda beneficiar esta le será informada.

Costo y compensación

Su participación en este estudio no le generará ningún gasto. Todas las valoraciones médicas realizadas y las pruebas sanguíneas serán gratuitas, al igual que las visitas domiciliarias hechas por el personal de salud del estudio. Usted no recibirá pago alguno por su participación en el estudio.

Nosotros le daremos los resultados de su cuadro hemático pero no los datos de las pruebas enzimáticas porque no es claro que significado tienen valores altos o bajos de estos marcadores en la infección que usted tiene.

Derecho a Rehusar o Abandonar el estudio

Usted debe saber que su participación en el estudio es totalmente voluntaria. En caso de no aceptar participar en él, la conducta de su médico y del equipo de salud no se modificará y se le brindará la misma atención ofrecidas a otros pacientes que tienen su misma condición. Aún después de aceptar participar usted tendrá el derecho de retirarse del estudio o de negarse a contestar una pregunta o de proveer una muestra de sangre en el momento que usted lo desee.

Preguntas

Por favor, siéntase en la libertad de hacerme cualquier pregunta si hay algo que no haya quedado claro. Además, si Usted tiene alguna pregunta adicional acerca del estudio más adelante, Usted puede contactar al Dr. Luis Ángel Villar Centeno (Investigador principal) al teléfono 3003949888, a la médica Ruth Aralí Martínez o a la enfermera Janeth Flores al teléfono (7) 6345781 de Bucaramanga, o al teléfono 6344000 ext. 3204 – 3205 o la dirección carrera 32 # 29-31 oficina 304, Centro de Investigaciones Epidemiológicas, Facultad de Salud UIS. Si Usted tiene alguna pregunta acerca de sus derechos como participante en este estudio, Usted puede contactar al Comité de Ética en 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 un sujeto de investigación en este estudio.

Usted está de acuerdo en:

Si No Contestar a las preguntas de una entrevista verbal

Si No Dejar que le tomen la presión arterial, peso, talla y le realicen un examen físico

- Si No Dar muestra de sangre, para realizar cuadro hemático, pruebas de diagnóstico para dengue, otras pruebas relacionadas con el estudio.
- Si No Permitir la realización de un último control médico después de los 15 días del inicio de la fiebre
- Si No En caso de ser necesario permitir la realización de una ecografía, una radiografía de tórax, un electrocardiograma, o una tomografía del cerebro, o pruebas oftalmológicas.
- Si No Permitir que en su muestra de sangre se midan proteínas del hígado, del páncreas, del músculo y otras sustancias inflamatorias.
- Si No Permitir que su muestra de sangre sea almacenada y usada en estudios de factores bioquímicos asociados a la severidad de la enfermedad.
- Si No Permitir que su muestra de sangre sea almacenada y usada en otros estudios futuros, incluyendo pruebas genéticas.
- Si No En caso de fallecimiento durante la enfermedad febril permitir la realización de un autopsia científica con el fin de esclarecer la causa de la muerte

¿Acepta Usted participar en este estudio voluntariamente? Sí No

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

Nombre del participante: _____ del _____
 Cédula: _____
 Fecha _____ Firma del participante

Nombre del padre o madre: _____
 Cédula de ciudadanía: _____ Firma

Nombre del Testigo: _____ Relación: _____
 Cédula: _____
 Dirección: _____ Firma _____

Nombre del Testigo: _____ Relación: _____

Cédula: _____
Dirección: _____ Firma _____

Declaración del investigador

Yo certifico que le he explicado a esta persona esta investigación, y que esta persona entiende la naturaleza y propósito del estudio y los posibles riesgos y beneficios asociados con su participación en el mismo. Todas las preguntas que esta persona ha hecho le han sido contestadas en forma adecuada.

Nombre del investigador: _____ Firma: _____

Versión 2. Aprobada por Comité de Ética de la UIS. Agosto 24 de 2009.

ANEXO 3. PRESUPUESTO

Ítem	Rubros	Fuentes			TOTAL
		Entidad Financiadora	Contrapartida UIS		
			Efectivo	Especie	
1.	Personal	\$ 34.500.000	\$ 0	\$ 0	\$ 34.500.000
2.	Salidas De Campo	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 0
3.	Equipos	\$ 0	\$ 0	\$ 8.400.000	\$ 8.400.000
4.	Materiales	\$ 19.400.000	\$ 0	\$ 0	\$ 19.400.000
5.	Bibliografía	\$ 0	\$ 0	\$ 2.000.000	\$ 2.000.000
6.	Servicios Técnicos	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 0
7.	Publicaciones	\$ 1.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 1.000.000
8.	Eventos Académicos	\$ 0	\$ 0	\$ 3.696.000	\$ 3.696.000
9.	Software	\$ 0	\$ 0	\$ 1.000.000	\$ 1.000.000
10.	Gastos Administrativos	\$ 250.000	\$ 0	\$ 0	\$ 250.000
TOTAL		\$ 55.150.000	\$ 0	\$ 15.096.000	\$ 70.246.000