

**ASOCIACIÓN ENTRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA SEVERIDAD DEL
DENGUE EN PACIENTES ADULTOS DEL ÁREA METROPOLITANA DE
BUCARAMANGA**

**ELSA MARINA ROJAS GARRIDO
RESIDENTE III AÑO MEDICINA INTERNA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
BUCARAMANGA**

2006

**GRUPO DE EPIDEMIOLOGIA CLINICA-UIS
(RECONOCIDO POR COLCIENCIAS)
ASOCIACIÓN ENTRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA SEVERIDAD DEL
DENGUE EN PACIENTES ADULTOS DEL ÁREA METROPOLITANA DE
BUCARAMANGA**

**ELSA MARINA ROJAS GARRIDO
RESIDENTE III AÑO MEDICINA INTERNA**

**Coordinador:
DR. LUIS ANGEL VILLAR CENTENO
MD. MSc, MICROBIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA
Grupo de Epidemiología Clínica-UIS - (Reconocido por Colciencias)**

**ASISTENTES:
Dra. RUTH MARTINEZ, Dr. FREDI DIAZ QUIJANO.**

**Estudio anidado en el proyecto
IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES TEMPRANOS DE
SEVERIDAD EN DENGUE
(No 1102-04-12919) Financiado por COLCIENCIAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
BUCARAMANGA**

2006

CONTENIDO

	Pág.
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	3
1.1 INTRODUCCION	3
1.2 VIRUS DENGUE	5
1.3 MODOS DE TRANSMISIÓN	6
1.4 CARACTERISTICAS CLINICAS	7
1.5 PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD Y SUS COMPLICACIONES	8
1.6 FACTORES DE RIESGO PARA FORMAS SEVERAS	11
1.7 ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDAD	12
1.7.1 Clasificación de antioxidantes por mecanismo de acción	14
1.7.2 Clasificación de antioxidantes por lugar de acción	14
1.7.3 Precursores de antioxidantes	14
1.8 ESTRES OXIDATIVO Y SEVERIDAD DE ENFERMEDAD	15
1.9 ESTRÉS OXIDATIVO, POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y DENGUE.	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
2.2 HIPÓTESIS	19
2.3 OBJETIVO GENERAL	19
2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19

3. METODOLOGÍA	21
3.1 DISEÑO	21
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	21
3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	21
3.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	22
3.5 TAMAÑO DE MUESTRA	23
3.6 VARIABLES Y SEGUIMIENTO	23
3.6.1 Variables clínicas	23
3.6.2 Variables de laboratorio	24
3.7 EVALUACIÓN INICIAL	28
3.8 EVENTOS DESENLACE	29
3.9 PROCESAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS DATOS	29
3.9.1 Almacenamiento de la información.	29
3.9.2 Almacenamiento de los datos	29
3.10 Análisis de los datos	30
4. ASPECTOS ETICOS DEL ESTUDIO	31
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSIÓN	40
7. CONCLUSIONES	47
8. RECOMENDACIONES	48
9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	49
ANEXOS	61

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de espectro clínico de Dengue por Organización Mundial de la Salud.	8
Tabla 2. Características clínicas de pacientes adultos con diagnóstico de dengue confirmado por el laboratorio.	32
Tabla 3. Incidencia de los desenlaces durante el seguimiento clínico.	33
Tabla 4. Manifestaciones clínicas en el total de pacientes con dengue incluidos y según el nivel de GP.	34
Tabla 5. Variables bioquímicas según el nivel de GP en pacientes con dengue.	35
Tabla 6. Análisis de variables continuas según el nivel de GP en pacientes con dengue.	35
Tabla 7. Variables asociadas de forma independiente a un nivel de GP >1200 U/L. Análisis de regresión logística.	36
Tabla 8. Manifestaciones clínicas en el total de pacientes con dengue incluidos y según el nivel de SOD.	37
Tabla 9. Análisis de las variables continuas según el nivel de SOD en pacientes con dengue.	38
Tabla 10. Variables asociadas con una mayor actividad de SOD en pacientes con dengue. Análisis de regresión logística.	39

RESUESPA

TÍTULO:

ASOCIACIÓN ENTRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA SEVERIDAD DEL DENGUE EN PACIENTES ADULTOS DEL ÁREA METROPOLITANA DE BUCARAMANGA*

AUTORA: ELSA MARINA ROJAS GARRIDO**

PALABRAS CLAVES: Dengue, estrés oxidativo, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, severidad, estudio de cohorte.

CONTENIDO: En la última década ha aumentado la incidencia y la severidad de la infección por dengue en Bucaramanga y su área metropolitana. Algunos estudios han demostrado la asociación entre características virales y de la respuesta inmune con el desarrollo de formas severas. Entre ellos, se considera al estrés oxidativo como un factor asociado a una peor evolución del dengue en vista de su papel pro-inflamatorio en otras enfermedades infecciosas. Sin embargo, en el contexto de dengue el estrés oxidativo no ha sido apropiadamente estudiado.

OBJETIVO: Evaluar durante la fase inicial de la infección por dengue la asociación de estrés oxidativo con la aparición de formas severas de la enfermedad.

METODOLOGÍA: Estudio observacional, analítico de cohorte de 164 pacientes agudamente enfermos por dengue, en quienes se cuantificó los niveles de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GP) durante los primeros 4 días de fiebre, y posteriormente sometidos a seguimiento clínico hasta la aparición de desenlaces adversos o resolución de la enfermedad.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES: Se encontraron alteraciones en estos dos biomarcadores durante las fases tempranas de la enfermedad. Los dos estuvieron asociados con la aparición de signos de extravasación plasmática. No se encontró asociación de los niveles de SOD y GP con trombocitopenia y alteraciones del perfil bioquímico. Este estudio sugiere la relación del estrés oxidativo con la patogenia de la infección por dengue. La cuantificación de SOD y GP tienen el potencial de convertirse marcadores pronósticos de choque en dengue.

* Trabajo de grado

** Facultad de Salud , Escuela de Medicina, Director Dr. Luis Angel Villar.

ABSTRACT

TITLE:

ASSOCIATION BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND DENGUE SEVERITY IN ADULT PATIENTS IN BUCARAMANGA AND ITS METROPOLITAN AREA*

AUTHOR: ELSA MARINA ROJAS GARRIDO**

KEY WORDS: Dengue, oxidative stress, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, severity, cohorts study.

CONTENT: During the last decade the incidence and severity of dengue illness have raised in Bucaramanga and its metropolitan area. Some studies have shown the link between viral characteristics and immune response with adverse outcomes. It has been suggested that oxidative stress could be associated to a worse evolution, since its pro-inflammatory role in other infectious diseases. Oxidative stress as a risk marker in Dengue has not been properly evaluated.

OBJECTIVE: To evaluate during early stage of dengue disease, the association of oxidative stress with the emergence of severe forms.

METHODS: Observational and analytic cohort study of 164 patients with dengue infection, whom plasmatic levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase were measured during the four first days of fever. They were followed until apparition of adverse outcomes or disease resolution.

RESULTS AND CONCLUSIONS: The two biomarkers evaluated were altered in the early stage of dengue illness. Both of them were associated with signs of increased vascular permeability. Levels of SOD and GP were analyzed as risk factors for thrombocytopenia and biochemical profile alterations but no association was found. The present study suggests the relationship of oxidative stress with the pathogenesis of dengue virus infection. Measurement of SOD and GP has the potential to become prognostic marker of dengue shock.

* Graduation Project

** Faculty of Health, Medicine school, Director Dr. Luis Angel Villar.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue es la infección por Arbovirus con mayor incidencia en el mundo (1,2). En Colombia, Santander ha sido uno de los departamentos más afectados desde la década anterior (3,4). Es una enfermedad de curso agudo que se presenta con un amplio espectro de manifestaciones desde las leves, no incapacitantes, hasta cuadros con mayor compromiso del estado general e incluso inestabilidad hemodinámica que genera un porcentaje variable de casos fatales. Estos últimos enmarcados en el contexto de la forma más severa que corresponde al choque por Dengue (1,2).

La patogenia de cada una de las manifestaciones observadas durante la evolución de la enfermedad ha sido motivo de múltiples estudios en diferentes áreas del mundo y con diferentes enfoques, que van desde aspectos básicos de la biología molecular del virus hasta aspectos relevantes en el escenario clínico, obteniéndose un importante acervo de información que ha servido de evidencia para ciertas intervenciones terapéuticas como la reposición de volumen intravascular temprano, al demostrarse que es el aumento de la permeabilidad capilar y la fuga de líquidos al espacio extravascular uno de los mecanismos centrales para ocurrencia de choque (5). Sin embargo, existen otra serie de complicaciones asociadas a diferentes órganos y sistemas que no logran ser explicadas y que por tanto adolecen de una terapéutica específica, lo que eventualmente mejoraría el curso de la enfermedad.

En la investigación sobre factores de riesgo para sufrir formas severas de dengue también se ha progresado, pero sigue siendo pobre la información

y está limitada a grupos poblacionales diferentes al nuestro por cuanto la aplicabilidad de sus conclusiones puede tener serios cuestionamientos.

Teniendo en cuenta que la identificación de los eventos moleculares tempranos que llevan a una determinada expresión clínica en el escenario de un paciente agudamente enfermo, es una herramienta esencial para establecer parámetros sobre pronóstico e intervención, se ha desarrollado este estudio de cohorte que intenta responder algunos interrogantes específicos sobre los eventos moleculares inherentes a estrés oxidativo en las fases iniciales de la infección y su relación con la expresión clínica del dengue. Este trabajo representa una aproximación novedosa en el conocimiento de la patogenia de la enfermedad y de la valoración de la severidad en el contexto de la población adulta de un área hiperendémica para Dengue en Colombia.

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1 INTRODUCCION

Las infecciones por Arbovirus representan una importante carga de morbilidad y mortalidad para los países en desarrollo (1-4,6). Sin embargo, es la fiebre por virus del Dengue en Colombia y específicamente en el departamento de Santander la que ha generado más atención durante la última década por su comportamiento endemo-epidémico con circulación simultánea de diferentes serotipos virales (D1, D2, D3 y D4) y una tendencia bianual o trianual (3,4,7,8). Según datos de la OPS, para el año 2001, la incidencia de dengue (clásico y hemorrágico) del área metropolitana de Bucaramanga supera cuatro veces las tasas de Colombia (140 por cien mil habitantes), Venezuela (153 por cien mil habitantes) y de la región de las Américas (126 por cien mil habitantes). Además, durante los años 2000-2004, se encontró una razón de un caso de dengue hemorrágico por aproximadamente tres casos de dengue clásico, cifra dramática teniendo en cuenta cálculos realizados en Asia que muestran una razón de 10 a 30 casos de dengue clásico por cada caso de dengue hemorrágico (9).

El virus RNA del Dengue pertenece a la familia Flaviviridae del género Flavivirus de los Arbovirus y su principal vector es el *Aedes aegypti* (10). Cuenta con 4 serotipos que comparten determinantes antigénicos, sin embargo, la inmunidad producida por la infección con cualquiera de ellos no confiere protección de larga duración y por el contrario se ha atribuido como un mecanismo de patogenicidad, hipótesis que se ha denominado bajo el término de “inmunopotenciación” (11,12).

La presentación clínica de la infección por virus del dengue abarca un amplio espectro, desde el cuadro febril con síntomas generales de carácter autolimitado del dengue clásico hasta el potencialmente letal del choque por dengue, que incluye importantes manifestaciones de fuga hídrica a partir del espacio intravascular y usualmente acompañado de marcadas manifestaciones hemorrágicas (13,14). Esta variedad en su presentación y evolución ha llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a crear una clasificación que de acuerdo a las descripciones de epidemias en todo el mundo se correlaciona con el pronóstico (15).

El arsenal terapéutico con que se cuenta para el manejo del paciente con fiebre hemorrágica por dengue está limitado a paliar los síntomas y específicamente para las formas severas sólo se hace un soporte de volumen hídrico teniendo en cuenta la fisiopatología y la evidencia de algunos ensayos clínicos (16-19). Sin embargo, no existe hasta la fecha un fármaco con indicación específica para evitar la evolución hacia formas severas o para manejo en las fases de mayor compromiso hemodinámico. De la misma forma, a pesar de numerosos intentos para desarrollar una vacuna que proteja contra todos los serotipos, hasta ahora no existe ninguna con efectividad aceptable y por tanto las acciones preventivas están enfocadas a la disminución de la infestación por el vector a través de la eliminación del criadero del Aedes (20).

Con la percepción objetiva de un aumento de la incidencia y la severidad en la región de Santander durante los últimos años, surgió la necesidad de realizar una adecuada caracterización del cuadro de dengue hemorrágico para la región, destacando la valoración de aspectos clínicos y paraclínicos inherentes a los pacientes los cuales eventualmente pudiesen identificar una subpoblación con una evolución diferencial de la enfermedad. La pertinencia de este estudio se hace más patente en la medida que muchos de los

aspectos de la infección se conocen por investigaciones realizadas en población pediátrica asiática (21-25), cuyas características sociodemográficas modifican de manera importante la validez externa de dichos estudios para la inferencia de sus resultados en el contexto de adultos colombianos. Este supuesto se hace evidente en aspectos de gran relevancia que al ser comparados muestran importantes diferencias, como es el caso de la mortalidad que es mucho más alta en dichas poblaciones que en la nuestra. Lo anterior soporta la necesidad de identificar los factores que determinan o modifican la evolución de la enfermedad y en este propósito es fundamental describir en primera instancia las características de los individuos afectados y la manera como dichas diferencias se manifiestan.

En este sentido, el objetivo central de este estudio es la caracterización del perfil bioquímico de estrés oxidativo en pacientes con dengue y la relación de este fenómeno fisiopatológico con las manifestaciones clínicas de la enfermedad como un nuevo abordaje para conectar las alteraciones bioquímicas celulares tempranas con variables clínicas definitorias de desenlace adverso en dengue en nuestra población.

1.2 VIRUS DENGUE

Los cuatro serotipos del virus Dengue son miembros de la familia *Flaviviridae*, que está constituida por al menos 60 virus transmitidos por artrópodos. Comparten características genómicas y determinantes antigénicos que dificultan la identificación por técnicas serológicas clásicas. Su estructura consiste en el genoma (cadena simple de RNA) y nucleocapside icosaédrica (10).

La replicación viral involucra los siguientes pasos: adhesión a la superficie celular, entrada al citoplasma, traducción de proteínas virales, replicación del

genoma viral, formación de viriones por encapsidación y finalmente liberación de la célula. Inicialmente, la adhesión del virión a las células es mediada por la glicoproteína mayor de la envoltura conocida como glicoproteína E. Este paso es crítico para la infectividad. A través de esta proteína el virión se adosa a receptores de las células, posiblemente los del tipo heparan sulfato. También lo hace a través de receptores por fracción Fc de anticuerpos a la proteína E. Este último fenómeno da sustento a la teoría de la potenciación de la replicación por presencia de anticuerpos no neutralizantes (26).

Se conoce poco sobre la replicación inicial del RNA, se presume que requiere una RNA polimerasa para su transformación. La estructura viral y las proteínas no estructurales se derivan de una poliproteína precursora gigante que posteriormente es escindida por un péptido proteolítico producido por el mismo virus. Estos fenómenos ocurren en regiones perinucleares de las células infectadas. La liberación del virus se da por exocitosis secretoria (27).

1.3 MODOS DE TRANSMISION

Los humanos, los primates y los mosquitos son los únicos hospederos naturales del virus del dengue. En 1931 se demostró que el virus puede ser transmitido de monos a monos y de monos a humanos. Aunque los monos no exhiben las formas clínicas de la enfermedad, este modelo se ha convertido en uno de los más convenientes para estudiar la respuesta inmune a las infecciones por flavivirus y a las vacunas. Los mosquitos que suelen ser los hospederos naturales son los miembros del género *Aedes*, particularmente *aegypti* y *albopictus*, especies ampliamente distribuidas en las regiones tropicales de todo el planeta (28).

1.4 CARACTERISTICAS CLINICAS

La primera descripción de la enfermedad se hace en 1780 por Benjamín Rush, quien la define con la expresión “fiebre rompehuesos”. El espectro de síntomas que definen dengue fue determinado después de cientos de observaciones hechas desde 1920 en infecciones naturales y experimentales. Aunque el cuadro sigue un patrón más o menos uniforme de acuerdo a lo que se describe a continuación, se han determinado variaciones asociadas a edad, estatus inmunológico del afectado y otros aspectos (29).

El período de incubación va de 3 a 15 días, usualmente 5 a 8 con aparición abrupta de fiebre asociada a cefalea y dolor retrocular. Durante las primeras 24 horas se puede observar un exantema macular que se decolora con la digitopresión, además hay una amplia gama de síntomas generales, gastrointestinales y del sistema linfático. En los casos típicos la fiebre persiste por 2 a 6 días terminando en crisis. También se pueden presentar síntomas respiratorios como tos, odinofagia y rinitis (1,30).

En los casos complicados de dengue como la variedad hemorrágica y el síndrome de choque por dengue, se desarrolla una serie de eventos luego de la desaparición de la fiebre, tales como alteraciones hematológicas, hemoconcentración, sangrado espontáneo y en el peor de los casos, inestabilidad hemodinámica con choque (31).

La clasificación propuesta por la OMS es ampliamente utilizada e incluye características clínicas y de perfil hematológico que se describen en la tabla 1 (32).

Tabla 1. Clasificación de espectro clínico de Dengue por Organización Mundial de la Salud.

CLASIFICACION		CARACTERÍSTICAS CLINICAS	PERFIL HEMATOOLÓGICO
Dengue clásico		Fiebre sin manifestaciones de hemorragia	No hemoconcentración, sin trombocitopenia
Dengue hemorrágico	Grado I	Fiebre, pulso normal, presión arterial normal, única manifestación hemorrágica: prueba de torniquete positiva	Plaquetas menos de 100000, <u>hemoconcentración con un aumento del 20% en el hematocrito</u> con respecto al previo o al de convalecencia.
	Grado II	Fiebre, pulso normal, presión arterial normal, manifestaciones hemorrágicas espontáneas	Plaquetas menos de 100000, <u>hemoconcentración con un aumento del 20%</u> en el hematocrito con respecto al previo o al de convalecencia.
	Grado III	Fiebre, pulso rápido y débil, presión arterial baja	Plaquetas menos de 100000, <u>hemoconcentración con un aumento del 20%</u> en el hematocrito con respecto al previo o al de convalecencia.
	Grado IV	Pulso indetectable, presión arterial indetectable	Plaquetas menos de 100000, <u>hemoconcentración con un aumento del 20%</u> en el hematocrito con respecto al previo o al de convalecencia.

1.5 PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD Y SUS COMPLICACIONES

Hay vacíos en el entendimiento de la patogénesis del dengue, porque aunque existen modelos animales, estos no reproducen la enfermedad a pesar de desarrollar una alta viremia. Por tanto lo que se conoce parte de la

información brindada por estudios epidemiológicos y experimentales en humanos (33).

El curso de la infección está caracterizado por eventos tempranos, diseminación y respuesta inmune con la subsiguiente depuración viral. Los eventos tempranos implican la entrada del virus a las células del sistema inmune, específicamente célula de Langerhans como blanco primario luego de la picadura del mosquito. A las 24 horas se puede detectar viriones en los nódulos linfáticos regionales (27). La diseminación ocurre a través de la viremia que se extiende hasta la desaparición de la fiebre. Las células diana en esta etapa son los monocitos, aunque también se ha detectado la presencia del virus en otras células (34). A través de la detección de antígenos intracelulares también se ha comprobado el compromiso de macrófagos y de las células de Kupffer en el hígado (35,36).

La respuesta inmune innata y adaptativa inducida por el virus del dengue juega un papel importante en la depuración de la viremia (37). La infección de los monocitos induce la producción de $\text{TNF } \alpha$, IL6, IL1b (38,39). La respuesta humoral se dirige inicialmente a determinantes específicos de serotipo, aunque existe un importante nivel de anticuerpos de reacción cruzada. Esta respuesta humoral media la neutralización de la infección, al igual que genera lisis celular mediada por complemento y bloqueo de adhesión viral a receptores celulares (40).

El componente celular de la respuesta inmune representado por los linfocitos CD4 Y CD8 también ejerce un importante efecto en el control de la infección a través de lisis de células infectadas y producción de citoquinas como interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa. Sin embargo, estas mismas sustancias parecen jugar un papel paradójico favoreciendo la

progresión de la enfermedad, al facilitar procesos relacionados con amplificación de la respuesta inmune (41,42).

Al igual que la cinética de la respuesta inmune, también se ha estudiado los fenómenos que determinan ciertas manifestaciones patofisiológicas propias de la infección. Uno de los más importantes es el síndrome de fuga capilar que resulta en una de las características cardinales del dengue hemorrágico. Por estudios de microscopia electrónica se sabe que se debe principalmente a una disfunción endotelial que suele ser transitoria, de resolución rápida y sin efectos residuales (43).

Se ha buscado los factores circulantes que inducen este aumento transitorio de la permeabilidad capilar, demostrándose que el factor de necrosis tumoral α , el interferón γ y la interleuquina 2 están implicados en este proceso (42,44). Incluso algunos de ellos se han propuesto como marcadores potenciales de severidad.

También existen fenómenos hematológicos como la leucopenia y trombocitopenia. Dichas citopenias se atribuyen a depresión de la hematopoyesis por efecto directo de la invasión del virus a las células madre. Sin embargo, lo último no explica del todo la trombocitopenia y hay estudios que evidencian disminución de la vida media de las plaquetas, lo que sugiere la presencia de anticuerpos dirigidos contra estas células o activación del complemento por presencia de complejos virus-anticuerpos adheridos a la superficie de las plaquetas (45).

A nivel hepático se ha demostrado un compromiso similar al ocasionado por el virus de la fiebre amarilla con necrosis hepatocelular y presencia de cuerpos de Councilman dada por infección directa del virus a estas células.

Sin embargo, el mecanismo íntimo que media la lesión se desconoce (46-48).

1.6 FACTORES DE RIESGO PARA FORMAS SEVERAS

Se han estudiado diferentes factores que influyen en la evolución del dengue hacia formas severas como dengue hemorrágico o choque, encontrándose una amplia gama de factores:

- a. Factores virales: Varios estudios prospectivos dan cuenta que la infección con el serotipo 2 confiere mayor riesgo para la aparición de la variedad hemorrágica, especialmente cepas inicialmente observadas en sudeste asiático las cuales ahora se encuentran diseminadas en todo el mundo (49).
- b. Exposición previa al virus del dengue: Los estudios epidemiológicos han sugerido que la infección secundaria determina un riesgo mayor para formas hemorrágicas y para choque comparadas con las infecciones primarias. Básicamente este hallazgo se debe a estudios epidemiológicos llevados a cabo en epidemias en Tailandia, Myanmar y Cuba (11,12).
- c. Edad: Estudios epidemiológicos también han sugerido que el riesgo de dengue hemorrágico declina con la edad. Sin embargo, esta no ha sido una observación uniforme (14).
- d. El estado nutricional: Dos estudios han mostrado la correlación negativa entre un buen estado nutricional y la ocurrencia de dengue hemorrágico y choque, siendo mayor el riesgo en niños bien nutridos que en

desnutridos. Esta asociación se ha atribuido a la supresión de la inmunidad celular en pacientes con mal estado nutricional (50, 51).

Además de lo anterior existen estudios que han intentado correlacionar niveles de marcadores bioquímicos como predictores de riesgo para formas severas. Sin embargo, el diseño de estos estudios no ha permitido generalizar estos resultados, pero ha sentado las bases para el desarrollo de otros estudios y el entendimiento de la enfermedad y su fisiopatogenia (22, 37, 40).

Al igual que en otras enfermedades infecciosas como la endocarditis bacteriana, apendicitis aguda, sarampión y otras fiebres hemorrágicas, el dengue muestra evidencia directa e indirecta de alteraciones bioquímicas y/o de reactantes de fase aguda, especialmente los relacionados con la alanina aminotransferasa (ALT), amilasas séricas, Lactato Deshidrogenasa (LDH), Creatin quinasa (CK), proteína C reactiva (PCR) que en diferentes diseños han mostrado la relación positiva entre valores altos y mayor severidad (21,22, 46,52). A lo anterior se agrega alteraciones en el perfil lipídico como niveles de colesterol y triglicéridos encontradas en estudios de corte transversal. (53) Este fenómeno puede explicarse por la oxidación lipídica que puede falsear los niveles de reales de estos lípidos dado que las pruebas no detectan formas oxidadas. Estos hallazgos dan pie a la exploración del estrés oxidativo dentro de la fisiopatogenia del dengue y el potencial uso como marcador de severidad.

1.7 ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDAD

La evolución del entendimiento de la fisiopatología y el manejo de las enfermedades agudas a través de los últimos años estableció que la producción de radicales libres era la base de muchas lesiones celulares y del

desencadenamiento de la disfunción orgánica múltiple a corto, mediano y largo plazo. A principios de los 80, los estudios se enfocaron en intentar explicar los mecanismos de producción de tales radicales o sustancias químicas inestables electrónicamente, a través de peroxidación lipídica y destrucción de membranas celulares como base del problema. Sin embargo el tiempo ha demostrado que implica una serie de eventos metabólicos más complejos que incluyen la peroxidación de proteínas que finalmente llevan a la disfunción de organelas celulares y disfunción de órganos en pacientes bajo estrés (54).

El balance de oxido-reducción depende de un delicado equilibrio entre el potencial antioxidante intracelular y extracelular y la actividad oxidativa propia del estrés. La producción de radicales libres o especies inestables que pueden reaccionar con moléculas lipídicas o proteicas constituye el paso inicial de disfunción a nivel celular que progresivamente se manifiesta con disfunción de órganos (55). Esta cascada de fenómenos puede ser reversible restituyendo la función normal a lípidos que integran la membrana y proteínas intracelulares y extracelulares por lo que de manera natural existen mecanismos antioxidantes que frenan y disminuyen la magnitud de este fenómeno (56, 57).

No existe a la fecha una manera exacta para determinar la actividad oxidativa y el poder del organismo para hacer frente a esta producción excesiva de especies moleculares inestables, sin embargo, se conocen una serie de moléculas a nivel extracelular e intracelular cuya cuantificación puede dar una panorámica de la actividad antioxidante particular en un momento determinado. De la misma forma los productos oxidados de tipo proteico o lipídico también pueden cuantificarse dando cuenta del impacto oxidativo. Esto se traduce hoy en la existencia de procedimientos y marcadores con un amplio uso en la investigación (58,59).

1.7.1 Clasificación de antioxidantes por mecanismo de acción:

- Agentes que remueven los radicales libres y otras especies reactivas en forma catalítica: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa.
- Moléculas que disminuyen la disponibilidad de pro-oxidantes como iones de hierro, cobre o hemo: transferrinas, haptoglobinas, metalotioninas.
- Agentes de bajo peso molecular que barren radicales libres y especies reactivas de nitrógeno: glutatión, vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina.

1.7.2 Clasificación de antioxidantes por lugar de acción:

- Extracelular hidrofílico: Vitamina C.
- Intramembranoso liposoluble: Vitamina E
- Intracitoplasmático: Selenio, sistemas enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa)
- Intracitosplasmático, intracelular e intramitocondrial: glutatión.

1.7.3 Precursores de antioxidantes. Glutamina, N acetylcisteína, S adenosil metionine.

Las anteriores son moléculas que ejercen actividad antioxidante directa e indirecta, los cuales pueden ser cuantificados en diferentes fluidos corporales o preparados celulares. Básicamente son aniones y productos proteicos y lipídicos oxidados.

1.8 ESTRES OXIDATIVO Y SEVERIDAD DE ENFERMEDAD

Existe evidencia que ha correlacionado los niveles de antioxidantes con la severidad o progresión de enfermedades infecciosas y no infecciosas, tanto de evolución aguda como de evolución crónica (60,61).

En la forma crónica de infección por virus de hepatitis C se ha encontrado niveles significativamente más bajos de glutatión en pacientes infectados y que concomitante son HIV + comparados con controles sanos o pacientes con hepatitis C sin HIV (62). Este hallazgo se ha correlacionado de manera significativa con la actividad de replicación viral y el grado de actividad inflamatoria a nivel hepático. Estas observaciones han generado la hipótesis que sugiere que la depleción de glutatión y en general una menor capacidad antioxidante son factores asociados a resistencia a terapia con interferón, favoreciendo la replicación viral. Lo anterior podría representar la base para terapia de reemplazo con glutatión. El estudio de estatus antioxidante (medición de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y metabolismo de glutatión en células mononucleares periféricas en pacientes con hepatitis C crónica también ha mostrado alteraciones a favor de una predominancia de actividad oxidativa que podría facilitar la cronicidad de la infección (63). Esta evidencia ha justificado la realización de ensayos clínicos asociando n-acetilcisteína a la terapia convencional con interferón, con resultados a favor de la combinación, al disminuir los marcadores de estrés oxidativo y evidenciar una mejoría clínica representada por la disminución en los niveles de transaminasas y actividad inflamatoria por biopsia hepática (64).

En estudios de corte transversal en pacientes con infección por virus de inmunodeficiencia humana se ha demostrado que la actividad de superóxido dismutasa está disminuida comparada con los controles, correlacionándose

dichos niveles con recuentos bajos de linfocitos CD4 y cargas virales más altas (65,66).

En estudios clínicos realizados en unidades de cuidado intensivo donde se evalúa los modelos de estados inflamatorios agudos como es la sepsis severa, (que comparte algunos aspectos fisiopatológicos con el choque por dengue) se ha demostrado que el nivel bajo de potencial antioxidante medido por método de Miller (producción del radical 3 etilbenzotiazoline, 6 ácido sulfónico) o cuantificación de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa) está significativamente asociado a la ocurrencia de mortalidad independientemente de otros factores ya conocidos como el índice de Apache (57, 61,67).

El exceso de radicales libres como el anión superóxido se ha relacionado igualmente con la ocurrencia de lesión celular en diferentes órganos en el contexto de una amplia gama de enfermedades. Los órganos comprometidos suelen ser riñón, pulmón, estómago, intestino, piel, corazón. La expresión clínica de cada uno de estos fenómenos es amplia e incluye apoptosis, disfunción de membrana, fenómenos hemorrágicos e inflamación (68).

En el contexto de la disfunción orgánica múltiple con choque refractario al uso de inotrópicos (situación similar a la que ocurre durante el choque por dengue), se ha encontrado la acción inhibitoria de los aniones superóxido sobre las catecolaminas endógenas, que eventualmente también tendría acción sobre las exógenas. Esta es una circunstancia que sin lugar a dudas merece ser explorada en el choque por dengue (55).

De la misma forma productos metabólicos electrónicamente inestables o también denominadas especies reactivas a oxígeno, se han relacionado con la inducción de citoquinas como Factor de Necrosis Tumoral alfa, IL 1B, IL6,

IL 8 a través de su acción como factor de activación génica del NF kappa B (69). Dicho gen se reconoce como un modulador central de respuesta en los eventos moleculares primarios de la respuesta inflamatoria en diferentes enfermedades (70). En dengue ya hay evidencia a partir de estudios in vitro que demuestran la activación de este gen en la infección por virus dengue 2 y se expresa con apoptosis de células neuronales humanas (71). Los aniones superóxido también inducen aumento de la adhesión de neutrófilos a través de la generación de quimiotácticos ya mencionados y la expresión de moléculas de adhesión como las ICAM. Estos eventos han podido bloquearse por medio del uso de análogos de superóxido dismutasa en modelos in vitro (72).

1.9 ESTRÉS OXIDATIVO, POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y DENGUE.

Son pocos los datos disponibles sobre estrés oxidativo en dengue. A nivel de investigación básica se conocen algunos estudios al respecto. En uno de ellos se demostró que el estrés oxidativo es un inductor de producción de interleukina 6 y RANTES (quimoquina que genera activación y reclutamiento de linfocitos T por antígenos expresados o secretados) a nivel sanguíneo y en las células hepáticas de pacientes infectados. Dicho proceso pudo revertirse de manera parcial con uso in vitro de antioxidantes como n-acetilcisteína, nitro l-arginina y ditiocarbamato pirrolidona (73). Otro estudio demostró in-vitro que virus dengue 2 induce la producción de un factor citotóxico a nivel de macrófagos, la expresión de esta molécula se traduce en aumento de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, radicales libres que pueden ser bloqueados por introducción de superóxido dismutasa al experimento (74).

A nivel clínico existen dos estudios, el primero de corte transversal realizado en población pediátrica de la India mostró diferencias significativas en los

niveles de triglicéridos, ASAT, ALAT, CK y Colesterol al comparar pacientes con dengue severo, dengue hemorrágico y dengue clásico (22). El colesterol mostró niveles más bajos en pacientes severamente enfermos con respecto a los controles, lo que puede ser un reflejo de la oxidación lipídica que impide que se puedan detectar las formas oxidadas con los métodos convencionales de medición de lípidos. En este estudio también se evaluó la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, enzimas que mostraron niveles significativamente más bajos en los pacientes muy enfermos comparado con controles sanos, sin discriminar diferencias entre los subgrupos de severidad en dengue. Sin embargo, el estudio no permite catalogar a estos marcadores bioquímicos como posibles factores de riesgo.

El segundo estudio corresponde a un estudio cubano, de corte transversal en el que se cuantificó en 22 pacientes con dengue los niveles de superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, actividad antioxidante total y malonaldehído. Los autores encuentran niveles más altos de malonaldehído y superóxido dismutasa en los pacientes afectados por dengue sin poder correlacionar estos hallazgos con severidad por el pequeño tamaño de muestra. Por esta primera exploración los investigadores consideran que un mayor nivel de estrés oxidativo puede estar relacionado en la patogénesis de la enfermedad (75).

De acuerdo a lo anterior, aunque la evaluación del estatus oxidativo es un terreno poco explorado en dengue, la evidencia obtenida a partir del estudio de estas vías metabólicas en otras patologías sugiere que este es un campo de investigación prometedor en el avance del conocimiento que actualmente se tiene sobre esta enfermedad. El balance oxidativo puede estar relacionado con la evolución de la infección y su cuantificación eventualmente puede ser un factor pronóstico y un indicador de severidad.

2. OBJETIVOS

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El estrés oxidativo en las fases tempranas de la infección por virus del dengue está asociado con la presentación de formas severas de la enfermedad?

2.2 HIPÓTESIS

Durante la fase inicial de la enfermedad, los pacientes infectados con virus dengue presentan alteraciones en los marcadores de estrés oxidativo, las cuales se relacionan con la presentación de formas severas entendidas como mayor frecuencia y severidad de manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia más profunda e inestabilidad hemodinámica.

2.3 OBJETIVO GENERAL

Identificar los pacientes adultos con síndrome febril por dengue atendidos en los servicios de urgencias de Bucaramanga y su área metropolitana y evaluar si el estrés oxidativo se asocia a la presentación de formas severas de enfermedad.

2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar en fases iniciales de la infección por dengue los niveles plasmáticos de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa como marcadores de estrés oxidativo.

- Establecer posible asociación entre los niveles de marcadores de estrés oxidativo y riesgo de sangrado.
- Evaluar probable asociación estrés oxidativo y presentación de alteraciones hemodinámicas y signos de extravasación plasmática.
- Explorar posible asociación entre estrés oxidativo y perfil de mediadores bioquímicos.

3. METODOLOGÍA

3.1 DISEÑO

Estudio de tipo observacional analítico de cohorte. (Este estudio se anidó en el estudio de cohorte denominado IDENTIFICACION DE MARCADORES TEMPRANOS DE SEVERIDAD EN DENGUE). Director del proyecto: Dr. Luis Ángel Villar Centeno, Código 1102-04-12919. Financiado por Colciencias.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

a) Población blanco: Pacientes con diagnóstico de síndrome febril atendidos en el servicio de urgencias en quienes el síndrome se atribuyó por clínica a una infección aguda por virus del dengue.

b) Población de estudio: Pacientes mayores de 12 años con síndrome febril atribuido clínicamente a dengue y confirmado a través de la seroconversión de anticuerpo IgM específicos contra dengue, o cuádruplicación del título de IgM en sueros pareados o aislamiento viral en suero agudo, quienes se encontraban entre los días 1 y 4 de enfermedad, sin signos de choque y fueron atendidos en los servicios de urgencias del hospital Ramón González Valencia ahora Universitario de Santander y centros de atención en salud del área Metropolitana de Bucaramanga.

3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes que acudieron a los servicios de urgencias de los niveles 2 y 3 de Bucaramanga y su área metropolitana y a quienes se les identificó un

síndrome febril cuya evolución era inferior a 4 días, teniendo como primera posibilidad diagnóstica etiológica la infección aguda por virus del dengue.

Los criterios de inclusión fueron:

- Paciente mayores de 12 años
- Historia de fiebre durante las últimas 96 horas
- Temperatura mayor a 38 grados
- Fiebre de causa no establecida
- Recuento de plaquetas inferior a $180000/\text{mm}^3$ y superior a $50000/\text{mm}^3$
- Consentimiento informado

3.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes de quienes no se logró obtener plasma para los respectivos análisis.
- Pacientes remitidos para el manejo de complicaciones derivadas de la enfermedad o quienes ya habían desarrollado choque o prechoque y estuviesen en fase de recuperación o con signos compatibles con este síndrome al momento de la evaluación inicial.
- Presencia de manifestaciones hemorrágicas mayores como equimosis, hematemesis, metrorragia, melena, rectorragia y púrpura.
- Otras enfermedades concomitantes como diabetes, insuficiencia suprarrenal, desordenes hematológicos, enfermedad tumoral, enfermedad cardíaca.

- También se excluyeron aquellos pacientes que en la primera valoración ya reunían todos los criterios de dengue hemorrágico (menos de 100.000 plaquetas/mm³, extravasación plasmática y alguna manifestación hemorrágica).

3.5 TAMAÑO DE MUESTRA

Se tomaron todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión para finalmente ensamblar una cohorte de 164 pacientes. Se capturaron pacientes desde abril del 2003 a Diciembre del 2004.

3.6 VARIABLES Y SEGUIMIENTO

3.6.1 Variables clínicas:

- Epidemiológicas: Edad, sexo, residencia como variable dicotómica (residente en Bucaramanga durante los dos últimos meses, residente fuera de Bucaramanga).
- Síntomas: Fiebre (registro en grados centígrados), cefalea, dolor retrocular, dolor faríngeo, osteomiasias, dolor abdominal (referido por el paciente, definiendo ubicación sobre esquema en dibujo de cuerpo humano, calidad de dolor, y cuantificación por escala comparativa análoga), diarrea (número de deposiciones y carácter de las mismas)
- Manifestaciones hemorrágicas: Cutáneas y de mucosas (petequias, equimosis, hematomas, gingivorragia, epistaxis), tracto digestivo (hematemesis, melenas, rectorragia). Las manifestaciones hemorrágicas se comprobarán por observación directa de excretas. Igualmente

hemorragia en tracto genito urinario (metrorragia, hematuria macroscópica).

- Prueba torniquete: Número de petequias en un área de 2.5 cm² luego de mantener por 5 minutos el manguito del tensiómetro insuflado al nivel del promedio entre la presión arterial sistólica y diastólica del paciente. Se calificó como positiva si había más de 20 petequias en el área descrita (OMS).
- Evaluación hemodinámica: Frecuencia cardiaca, tensión arterial, tensión arterial media (TAS+ 2TAD) / 3, hipotensión ortostática (disminución de 20 mmHg de la presión arterial sistólica y/o disminución de 10 mmHg de la presión arterial diastólica, medidas un minuto después de adquirir la posición erguida).
- Signos: edema de miembros inferiores que deja fóvea, hepatomegalia (a través de medición en centímetros sobre línea media claviclar derecha del borde hepático hasta reborde costal y medida en centímetros silueta hepática evaluada por matidez a la percusión luego de acuerdo entre dos examinadores), derrame pleural detectado por clínica (disminución del murmullo vesicular, matidez en bases pulmonares) y/o ecografía.
- Estado nutricional: peso, índice de masa corporal (peso/talla²).

3.6.2 Variables de laboratorio:

- **Toma de muestra de sangre.** Las muestras fueron tomadas por personal adecuadamente entrenado en condiciones óptimas para evitar molestias a los participantes y reducir al mínimo el riesgo de infección. El laboratorio encargado del procesamiento y análisis de Hematología y

Química sanguínea fue el Laboratorio de la Escuela de Bacteriología de la Facultad de Salud de la UIS, el cual está debidamente certificado por trabajar con adecuados estándares de calidad y sirve de referencia para otros laboratorios del oriente colombiano. Las pruebas de diagnóstico virológico fueron realizadas en el Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales CINTROP. De cada sujeto se obtuvo una muestra de 20 ml, utilizando técnica aséptica para recolectar una muestra de suero que se utilizó para estudios de química sanguínea (marcadores de inflamación hepática) y virología y luego una de sangre en tubos con citrato para realizar los marcadores de estrés oxidativo. Las muestras se centrifugaron y separaron en alícuotas que fueron almacenadas a -70 grados centígrados hasta el procesamiento. Hacia el 6 a 8 día de enfermedad, se obtuvo una segunda muestra de suero para la determinación de IgM para dengue en aras de confirmar el diagnóstico de infección por Dengue.

- **Estado de infección por virus del dengue.** La determinación del estado de infección por virus del dengue se hizo por detección de anticuerpos específicos contra el virus del Dengue de la clase IgM, a partir de una primera muestra de suero recolectada en la etapa inicial de la enfermedad (primeras 96 horas) y una segunda obtenida después del 7 día del inicio de la fiebre. Para el efecto se utilizó la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) siguiendo el protocolo originalmente descrito por Anzari y colaboradores (Anzari, MZ, Shope R, and Malik. Evaluation of vero cell lysate antigen for the ELISA of Flavivirus. J Clin Lab Anal 1993; 7:230-237); de acuerdo con éste, microplacas de 96 pozos (Titertek, Flow Laboratorios, McLean, VA) se sensibilizaron con 100 microlitros de anticuerpo contra cadena μ de Ig humana (Hyland Diagnostic, Garden Grove, CA) diluyendo 1:800 en tampón carbonato 6mM, pH 9.0 por 1 hora a 37 grados y luego fueron lavadas por 8 veces

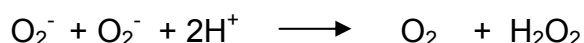
con PBS (pH 7.4) '0.05%, Tween 20. El suero (diluido 1:100 a 1:20000 en PBS 1% Tween) se adicionó a cada pozo en volumen de 50 μ L por duplicado y luego las placas se incubaron 1 hora a 37 grados para nuevamente ser lavadas y adicionadas a 50 μ L de antígeno, diluido según resultado de titulación. Después de 18 horas de incubación a 4 grados centígrados se adicionó 25 μ L del conjugado y previa incubación, la reacción se visualizó adicionando 100 μ L de substrato (o-phenylene diamine 0.5 mg/ml en H₂O2 3%)(Sigma St Louis, MO) diluido 1:300 tampón citrato 0.1 M pH 5 por 30 min, suspendiendo la reacción de color por adición de 50 μ L de H₂SO₄ 4 M por pozo; los valores de absorbancia fueron medidos a 492 nm con un espectofotómetro "Titer Tek Multiskan"(Dynatech Laboratories, Inc). Un suero fue considerado positivo cuando el valor detectado fue 2 veces el obtenido con controles negativos. Se definió infección aguda por virus dengue en aquellos casos en que existió seroconversión entre el primer y segundo suero (paso de IgM negativa a positiva o elevación cuádruple de la absorbancia).

Para aquellos pacientes en los que por alguna razón no fue posible obtener el segundo suero para detectar y cuantificar IgM contra virus Dengue, se realizó como prueba diagnóstica el cultivo del virus. Con los sueros se infectaron células de mosquito *Aedes albopictus* (clon C6/36) mantenidas en medio Leibovitz's (L-15. GIBCO, BRL) suplementado con suero bovino fetal (10%), triptosa fosfato (10%) y antibióticos (penicilina 100 UI/ml; estreptomycin 100 μ g/ml) (1%). Se adicionaron 100 μ l de suero a monocapas celulares crecidas en tubos de vidrio y luego los cultivos se centrifugaron a 2,000 rpm por 30 minutos y a temperatura ambiente. Después se adicionó 1 mililitro del medio de cultivo suplementado con 2% de suero bovino fetal y los cultivos se incubaron a 32°C por 8 días. La presencia del virus se determinó por inmunofluorescencia directa usando un anticuerpo policlonal anti-dengue

marcado con fluoresceína y luego el serotipo se identificó por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales específicos. Los anticuerpos fueron gentilmente donados por el CDC, Dengue Branch Puerto Rico.

- **Marcadores de estrés oxidativo:**

Superóxido dismutasa (SOD): esta enzima acelera la dismutación de un radical tóxico, el radical superóxido (O_2^-), producido durante un proceso oxidativo, en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Se utilizó el kit Randox, No SD125. Este método emplea Xantina oxidasa para formar radicales superóxido los cuales reaccionan con cloruro de 2- (4-yodofenil)-3- (4-nitrofenol).5. fenil tetrazolio para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la superóxido dismutasa por el grado de inhibición de esta reacción.

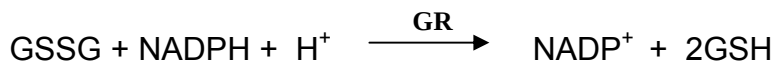
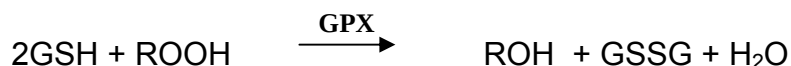


Las muestras de plasma con citrato de sodio al 3.2% fueron diluidas en la solución Tampón Fosfato pH de 7.0. Se realizó la lectura de las absorbancias a temperatura de 37°C y a una longitud de onda de 505 nm. Se determinó el porcentaje de inhibición para cada una de ellas.

La actividad de esta enzima se expresó como porcentaje de inhibición que resulta de la resta de los porcentajes de inhibición detectados para cada muestra y los determinados en un patrón estándar.

Glutación peroxidasa (GP): cataliza la oxidación del Glutación (GSH) por el hidroperóxido de cumeno. El Glutacion oxidado (GSSG) en presencia de Glutación Reductasa (GR) y NADPH es inmediatamente convertido en su forma reducida con una oxidación de NADPH en $NADP^+$.

Principio de la reacción:



Para la medición de la actividad de esta enzima se utilizó el kit Randox RS505. Las muestras de plasma con citrato de sodio 3.2% se diluyeron con la solución proporcionada en el kit. Se realizó la lectura a una temperatura de 37°C y a una longitud de onda de 340 nm. La concentración de Glutation Peroxidasa se expresó en U/L.

- **Otras pruebas bioquímicas.** Los niveles de AST y ALT se determinaron siguiendo métodos previamente descritos y estandarizados (Métodos de Análisis Enzimático 3 Ed. Vol 3 de 1983, pag 416-433). La LDH se determinó utilizando el método recomendado por la sociedad Escandinava para la Química Clínica y Fisiología Clínica (J Clin Lab Invest 1974; 33:291-306). Los niveles de colesterol y triglicéridos se determinaron por métodos enzimáticos utilizando reactivos de la casa comercial Human.

3.7 EVALUACIÓN INICIAL

Los pacientes firmaron un consentimiento informado como prerequisite para poder ser incluidos en el estudio (ver anexo No.1), se les llenó una ficha que incluía datos socio-demográficos, patologías asociadas, examen físico inicial y medicamentos de uso previo (Anexo No 2). La evaluación inicial fue realizada por médicos con entrenamiento y experiencia en investigación clínica en dengue (Dra. Ruth Martínez y Dr. Fredi Díaz). Estos mismos

investigadores se encargaron de la obtención de las muestras de sangre, al igual que del seguimiento clínico hasta la ocurrencia de los desenlaces.

3.8 EVENTOS DESENLACE

Los eventos de desenlace del estudio fueron:

- Trombocitopenia: recuento de plaquetas inferior a 100.000 /mm³.
- Sangrados: prueba de torniquete, hemorragias mayores.
- Signos de extravasación de plasma: Derrame pleural, ascitis, hipoalbuminemia o viraje del hematocrito mayor del 20%.
- Dengue Hemorrágico (DH): infección por dengue con manifestaciones hemorrágicas y signos de extravasación de plasma.

3.9 PROCESAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS DATOS

3.9.1 Almacenamiento de la información. Para la recolección de la información se llenó un cuestionario de ingreso, que incluyó datos de identificación e información clínica obtenida por los médicos a cargo del estudio. En un formato estándar se obtuvo información clínica diaria desde la inclusión al estudio hasta al menos el séptimo día a partir del inicio de la fiebre o hasta la recuperación del paciente.

3.9.2 Almacenamiento de los datos. Se hizo doble digitación en una Base de Datos Access XP, 2002. Se compararon las dos bases en el programa Epi Info 6.04d y se corrieron las inconsistencias encontradas.

3.10 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para todas la variables sociodemográficas y clínicas contempladas, se realizó un análisis descriptivo, mostrando la distribución de frecuencias. En el caso de las variables continuas se determinaron las medias y desviaciones estándar y para las variables categóricas se estimaron las proporciones.

Para comparar las características clínicas y demográficas según los resultados obtenidos en los niveles SOD y GP, se emplearon como puntos de corte de estas enzimas, los promedios del total de pacientes estudiados. En el análisis bivariado se emplearon las pruebas T de *Student* y Chi cuadrado, para la evaluación de las variables continuas y categóricas, respectivamente. Cada asociación se expresó en términos de Odds Ratio (OR), con su correspondiente Intervalo de Confianza del 95%, y se determinó el valor de p en cada caso.

Análisis multivariado: Todas las asociaciones encontradas en el análisis bivariado con una $p < 0,20$, fueron evaluadas en un modelo de regresión logística para determinar cuales características clínicas o demográficas estaban asociadas de forma independiente a los niveles de cada enzima (GP o SOD). Se consideraron como asociaciones estadísticamente significativas aquellas con una $p < 0,05$.

En el análisis de datos se empleó el programa estadístico STATA versión 5.0.

4. ASPECTOS ETICOS DEL ESTUDIO

De acuerdo al artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio es de carácter observacional, sin intervención en pacientes. El riesgo para los pacientes incluidos correspondió solo al derivado de la toma de muestras de sangre, lo que hace parte del manejo usual de estos pacientes. En consecuencia, el estudio califica en categoría 7 definida en la mencionada resolución como “investigación de riesgo mínimo”.

Por tal razón se solicitó la firma de un consentimiento informado (Ver anexo A).

5. RESULTADOS

Durante el periodo del estudio se captaron 164 pacientes con dengue cuya edad promedio fue 29,3 años, con una desviación estándar de 16,23 años. Se observó un leve predominio del género femenino, representando el 53,05% del total (87/164). Al momento del ingreso, el tiempo de evolución del síndrome febril agudo fue en promedio de 73,52 horas (IC 95%: 70,6 – 76,44), condición que se mostró acompañada principalmente de cefalea, mialgias, artralgias, escalofrío e hiporexia, síntomas que se presentaron en más del 80% de los casos (Tabla 2).

Tabla 2. Características clínicas de pacientes adultos con diagnóstico de dengue confirmado por el laboratorio.

Variable	TOTAL n=161 (%)
Sexo Masculino n (%)	75 (46,6)
Edad Media $\pm$ DE	29,23 $\pm$ 16,23
Cefalea	151 (93,8)
Dolor retroocular	111 (68,9)
Mialgias	149 (92,6)
Artralgias	133 (82,6)
Escalofrío	154 (95,7)
Hiporexia	145 (90,0)
Odinofagia	69 (42,9)
Tos	62 (47)
Rinorrea	50 (38,2)
Exantema	61 (45,5)
Vómito	44 (27,3)
Diarrea	48 (29,8)
Dolor abdominal	84 (52,2)
Fiebre (T. $\geq$ 38 °C)	20 (12,4)
Deshidratación	68 (56,4)
Eritema facial	100 (62,1)

La evaluación clínica diaria permitió documentar en el grupo estudiado, que 142 (86,59%) pacientes presentaron alguna manifestación hemorrágica, 41 (25%) desarrollaron trombocitopenia (<100.000 plaquetas/ μL) y 28 (17,07) mostraron algún signo de extravasación plasmática. Del total, 12 pacientes reunieron estos criterios de severidad configurando el síndrome de dengue hemorrágico (Incidencia=7,32%) (Tabla 3).

Tabla 3. Incidencia de los desenlaces durante el seguimiento clínico.

Desenlace	TOTAL n = 161 (%)
Hemorragias espontáneas	142 (86,59)
Viraje de Hematocrito $\geq 20\%$	25 (15,5)
Trombocitopenia	41 (24,8)
Extravasación plasmática	28 (17,07)
Dengue hemorrágico	12 (7,32)

En relación con las pruebas de estrés oxidativo, se midió la enzima Glutación Peroxidasa (GP) en 161 pacientes con dengue. Los niveles de este marcador de estrés oxidativo no se asociaron con los signos de severidad de la enfermedad ($p>0.2$, para todas las variables) (Tabla 4).

Tampoco hubo asociación alguna entre la GP y la mayoría de los marcadores bioquímicos evaluados, entre los que se cuentan, las transaminasas hepáticas, el colesterol y las lipoproteínas de alta y baja densidad (Tabla 5). Como hallazgo interesante, niveles relativamente altos de GP se asociaron a valores bajos de triglicéridos séricos. Cuando la GP estuvo por encima de 1200 U/L, los triglicéridos oscilaron alrededor de los 115 mg/dL (IC95%: 102 – 127), los cuales fueron significativamente menores

que los hallados con valores inferiores de GP (140 mg/dL; IC95%: 119 – 162; p=0,04).

Tabla 4. Manifestaciones clínicas en el total de pacientes con dengue incluidos y según el nivel de GP.

Variable	TOTAL (n=161)	GP >1200 U/L (n=82)	GP <1200 U/L (n=79)	Valor p
Sexo Masculino n (%)	75 (46,6)	33 (40,2)	42 (53,2)	0,10
Edad Media ± DE	29,23 ± 16,23	27,2 ± 14,32	31,34 ± 17,85	0,11
Cefalea	151 (93,8)	80 (97,6)	71 (89,9)	0,04
Dolor retroocular	111 (68,9)	59 (72)	52 (65,8)	0,40
Mialgias	149 (92,6)	78 (95,1)	71 (89,9)	0,20
Artralgias	133 (82,6)	73 (89,0)	60 (76)	0,03
Escalofrío	154 (95,7)	78 (95,1)	76 (96,2)	0,74
Hiporexia	145 (90,0)	73 (89,0)	72 (91,1)	0,65
Odinofagia	69 (42,9)	34 (41,5)	35 (44,3)	0,72
Tos	62 (47)	30 (39,5)	32 (57,1)	0,04
Rinorrea	50 (38,2)	29 (38,7)	21 (37,5)	0,89
Exantema	61 (45,5)	38 (50)	23 (39,7)	0,23
Vómito	44 (27,3)	24 (29,3)	20 (25,3)	0,57
Diarrea	48 (29,8)	22 (26,8)	26 (32,9)	0,40
Dolor abdominal	84 (52,2)	45 (54,9)	39 (49,4)	0,48
Fiebre (T. ≥38 °C)	20 (12,4)	6 (7,3)	14 (17,7)	0,045
Deshidratación	68 (56,4)	37 (48,7)	31 (56,4)	0,39
Eritema facial	100 (62,1)	53 (64,6)	47 (59,5)	0,51
Prueba torniquete	76 (47,5)	45 (54,9)	31 (39,7)	0,06
Hemorragias espontáneas	24 (14,9)	14 (17,1)	10 (12,7)	0,43
Viraje de Hto ≥ 20%	25 (15,5)	14 (17,1)	11 (13,9)	0,58
Trombocitopenia	40 (24,8)	24 (29,3)	16 (20,3)	0,19
DH	12 (7,45)	4 (4,88)	8 (10,13)	0,20

Tabla 5. Variables bioquímicas según el nivel de GP en pacientes con dengue.

	GP>1200 U/L (n=82)	IC 95 %	GP <1200 U/L (n=78)	IC 95 %	Valor p
AST	99,71	79,63 - 119,78	107,6	87,36 - 127,83	0,58
ALT	77,81	60,56 - 95,06	85	63,87 - 106,13	0,60
Colesterol	142,7	133,95 - 151,45	149,10	140,42 - 157,78	0,30
HDL	36,79	34,36 - 39,21	35,73	33,65 - 37,80	0,51
LDL	83,32	75,9 - 90,74	85,48	78,02 - 92,95	0,68
Triglicéridos	114,57	101,87 - 127,28	140,43	119,18 - 161,67	0,04

Cuando se compararon las manifestaciones clínicas de los pacientes con dengue, de acuerdo a los niveles de GP, se observó que los pacientes con más de 1200 U/L de GP presentaban una mayor frecuencia de cefalea ($p=0,04$) y artralgias ($p=0,03$); una menor frecuencia de tos ($p=0,04$) y fiebre al examen físico ($p<0,05$); una frecuencia cardiaca superior ($p=0,0006$) y una presión arterial sistólica (PAS) significativamente inferior ($p=0,009$) (Tablas 4 y 6).

Tabla 6. Análisis de variables continuas según el nivel de GP en pacientes con dengue.

Variable	GP>1200 (n=82)	IC 95 %	GP<1200 (n=79)	IC 95 %	Valor p
Peso	59,80	56,81 - 62,8	61,58	57,67 - 65,49	0,47
F. respiratoria	19,06	18,42 - 19,7	18,9	18,01 - 19,79	0,77
Temperatura	36,87	36,66 - 37,08	36,63	36,40 - 36,87	0,14
FC	84,95	81,8 - 88,11	77,53	74,75 - 80,31	0,0006
PAS	113,61	110,82 - 116,4	119,87	116,09-123,66	0,009
PAD	71,5	69,34 - 73,66	73,05	70,78 - 75,32	0,33
Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{L}$	143,6	129,72 - 157,5	148,8	132,02-165,57	0,64

Estos hallazgos fueron evaluados en un análisis de regresión logística que incluyó las variables asociadas con los niveles de GP (con $p < 0,20$), entre las que se cuentan la edad y el género. En este modelo se observó que la tos, la fiebre y la frecuencia cardíaca en decúbito, estuvieron asociadas de forma independiente al resultado de esta prueba (Tabla 7).

Tabla 7. Variables asociadas de forma independiente a un nivel de GP >1200 U/L. Análisis de regresión logística.*

Variable	OR	IC 95%		Valor p
Género	0,89	0,36	2,15	0,79
Edad	0,99	0,96	1,02	0,60
Cefalea	1,32	0,12	14,21	0,82
Artralgias	2,69	0,83	8,74	0,10
Tos	0,37	0,16	0,85	0,02
Fiebre ($T^{\circ} \geq 38^{\circ}C$)	0,16	0,04	0,75	0,02
FC †	1,53	1,10	2,12	0,01
PAS ‡	0,74	0,54	1,02	0,07
Triglicéridos	1,00	0,99	1,00	0,22
Prueba Torniquete	1,70	0,74	3,92	0,21
Trombocitopenia §	1,26	0,46	3,45	0,65

* Se incluyeron todas las variables con $p < 0,20$ en el análisis bivariado.

† Se muestra la asociación con cada aumento de 10 Latidos/minuto en la frecuencia cardíaca.

‡ Se muestra la asociación con cada aumento de 10 mm Hg en la presión arterial sistólica.

§ Recuento de plaquetas $\leq 100.000 /\mu L$.

La enzima Superóxido Dismutasa (SOD) fue cuantificada en suero de fase aguda de 157 pacientes. En el análisis bivariado se observó una mayor incidencia de extravasación plasmática en los pacientes con mayores valores de SOD (% inhibición > -100). Sin embargo, cuando se evaluaron los otros criterios de severidad, las manifestaciones clínicas y de los hallazgos de

laboratorio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas relacionadas con los niveles de SOD (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Manifestaciones clínicas en el total de pacientes con dengue incluidos y según el nivel de SOD.

Variable	TOTAL (n=157)	SOD >-100 (n=102)	SOD <-100 (n=55)	Valor p
Sexo Masculino - N (%)	74 (47,13)	49 (48,04)	25 (45,45)	0,76
Edad Media $\pm$ DE	30,11 $\pm$ 16,15	28,22 $\pm$ 14,66	33,64 $\pm$ 18,22	0,04
Cefalea	149 (94,9)	96 (94,12)	53 (96,36)	0,54
Dolor retroocular	109 (69,43)	71 (69,61)	38 (69,09)	0,95
Mialgias	147 (93,63)	97 (95,1)	50 (90,91)	0,31
Artralgias	132 (84,08)	88 (86,27)	44 (80)	0,31
Escalofrío	151 (96,18)	98 (96,08)	53 (96,36)	0,93
hiporexia	140 (89,17)	94 (92,16)	46 (83,64)	0,10
Odinofagia	67 (42,68)	43 (42,16)	24 (43,64)	0,86
Tos	60 (46,51)	41 (50)	19 (40,43)	0,29
Rinorrea	49 (38,28)	29 (35,37)	20 (43,48)	0,36
Exantema	60 (46,15)	40 (47,62)	20 (43,48)	0,65
Vómito	44 (28,03)	33 (32,35)	11 (20)	0,10
Diarrea	47 (29,94)	28 (27,45)	19 (34,55)	0,35
Dolor abdominal	81 (51,59)	52 (50,98)	29 (52,73)	0,83
Fiebre (>38C°)	20 (12,74)	13 (12,75)	7 (12,73)	0,997
Deshidratación	68 (52,71)	48 (57,14)	45 (44,44)	0,17
Eritema facial	98 (62,42)	67 (65,69)	31 (56,36)	0,25
Prueba torniquete	75 (48,08)	50 (49,02)	25 (46,30)	0,75
Hemorragias espontáneas	25 (15,92)	16 (15,69)	9 (16,36)	0,91
Extravasación plasmática *	28 (17,83)	23 (22,55)	5 (9,09)	0,04
Viraje de Hto >20	25 (15,92)	20 (19,61)	5 (9,09)	0,09
Viraje de Hto >10	86 (54,78)	63 (61,76)	23 (41,82)	0,02
Trombocitopenia	41 (26,11)	26 (25,49)	15 (27,27)	0,81
DH	12 (7,64)	8 (7,84)	4 (7,27)	0,90

* Extravasación plasmática definida como la presencia de alguno de los siguientes signos:

Derrame pleural, ascitis, albuminemia o viraje del hematocrito mayor del 20%.

Tabla 9. Análisis de las variables continuas según el nivel de SOD en pacientes con dengue

Variable	SOD >-100 (n=102)	IC 95 %	SOD <-100 (n=55)	IC 95 %	Valor p
Peso	62,08	59,12 - 65,04	62,34	58,71 - 65,97	0,92
F. respiratoria	19,17	18,49 - 19,85	18,62	17,68 - 19,56	0,35
Temperatura	36,85	36,65 - 37,05	36,63	36,34 - 36,91	0,20
FC	83,33	80,58 - 86,08	78,75	74,78 - 82,71	0,056
PAS	117,7	114,69 - 120,7	115,8	111,91 - 119,69	0,45
PAD	72,22	70,29 - 74,14	72,2	69,38 - 75,02	0,99
Plaquetas x10 ³ /μL	145,1	130,61 - 159,59	143,18	126,94 - 159,42	0,87
AST	102,57	84,20 - 120,93	104,95	81,01 - 128,88	0,88
ALT	78,29	60,66 - 95,92	89,7	67,42 - 111,97	0,44
Colesterol	144,36	136,77 - 151,96	149,65	138,03 - 161,28	0,43
HDL	36,47	34,49 - 38,44	35,96	33,05 - 38,87	0,77
LDL	82,35	75,84 - 88,85	88,35	78,54 - 98,15	0,30
Triglicéridos	129,55	112,15 - 146,95	126,55	110,84 - 142,26	0,82

La asociación entre SOD y extravasación plasmática también fue evaluada en un análisis multivariado de regresión logística, incluyendo la variable género, edad y aquellas con $p < 0,20$ en el análisis bivariado. En este modelo se evidenció que la extravasación plasmática se asoció a una mayor actividad de la SOD, independientemente de las demás variables consideradas (Tabla 10).

Tabla 10. Variables asociadas con una mayor actividad de SOD en pacientes con dengue. Análisis de regresión logística.

Variable	OR	IC 95%		Valor p
Genero	1,20	0,51	2,78	0,68
Edad	0,98	0,95	1,00	0,07
Extravasación de plasma	6,90	1,45	32,9	0,02
FC	1,25	0,92	1,70	0,16
Deshidratación	1,29	0,58	2,88	0,53
Vómito	0,84	0,32	2,17	0,71
Hiporexia	5,03	1,34	18,96	0,02

6. DISCUSION

Durante el periodo del estudio se captaron 164 pacientes con dengue cuya edad promedio fue 29,3 años, con una desviación estándar de 16,3 años. El promedio observado concuerda con lo descrito en otras series de adultos de Latinoamérica y Asia. Este primer factor sugiere que el grupo de edad afectado por el dengue no difiere de manera importante en la población estudiada con respecto a otras zonas lo cual favorece la validez externa del estudio para extrapolar los resultados en poblaciones adultas diferentes a la de Bucaramanga. La diferencia en cuanto género no fue importante y los hallazgos pueden extrapolarse tanto a hombres como mujeres (13,14, 76).

De acuerdo con los criterios de inclusión diseñados para captar pacientes en fases tempranas de la enfermedad, se logró un inicio de seguimiento en promedio a partir del tercer día del síndrome febril, lo cual representa un período temprano de acuerdo al conocimiento que se tiene sobre la fisiopatología de la infección. Teniendo en cuenta que se excluyeron los pacientes con DH u otras complicaciones propias del dengue, los marcadores clínicos y paraclínicos se evaluaron antes del desarrollo de formas severas y por ende representan variables factibles a considerar en un modelo pronóstico. Sin embargo, dada la baja incidencia de dengue hemorrágico (7,32%) en esta cohorte, el estudio no tuvo poder suficiente para evaluar una asociación entre este desenlace en particular y los marcadores de estrés oxidativo.

Al momento del ingreso, el síndrome febril se acompañó principalmente de cefalea, mialgias, artralgias, escalofrío e hiporexia, síntomas que se presentaron en más del 80% de los casos. Estos hallazgos concuerdan con

lo observado en otras descripciones de Latinoamérica, lo que sugiere que el espectro clínico del dengue en nuestra región no tiene una característica particular que la haga diferente por lo menos para las fases iniciales con respecto a lo observado en otras zonas geográficas del continente (14,77, 78).

La evaluación clínica diaria permitió documentar que en el grupo estudiado, 142 (86,59%) pacientes presentaron alguna manifestación hemorrágica. Las manifestaciones hemorrágicas tradicionalmente se han utilizado en el contexto de infección por dengue para hacer clasificación de severidad, sin que ellas diferencien dengue clásico de dengue hemorrágico por cuanto en ambos escenarios, éstas se dan con la misma frecuencia (79). La incidencia de manifestaciones hemorrágicas en este estudio es similar a la de otras series y concuerda con lo previamente señalado en que pacientes con estas manifestaciones no mostraron una mayor severidad (80). Las manifestaciones hemorrágicas de dengue se han atribuido a diferentes factores entre ellos trombocitopenia y alteración en factores hemostáticos séricos, los cuales eventualmente pueden actuar de manera sinérgica (79-82). Sin embargo, aún existe controversia sobre cual es el factor que juega el papel más importante y cuál es el mecanismo fisiopatológico que lo facilita. De hecho algunos estudios han señalado que el factor que más contribuye a los fenómenos hemorrágicos es la activación endotelial inicial que subsecuentemente activa plaquetas y, a partir de allí, toda la cascada que se expresa en coagulación-sangrado tal como ocurre en púrpura trombocitopénica trombótica (45,90,91). Visto de esta forma, se recomienda que los estudios se dirijan a valorar el efecto que tiene el virus sobre la célula endotelial como fenómeno inicial de la fisiopatología de la hemorragia en dengue.

Al valorar la asociación entre SOD y GP y la presentación de manifestaciones hemorrágicas, no se encontró relación entre los niveles de estas enzimas y la ocurrencia de sangrado espontáneo, aunque hubo una mayor frecuencia (no estadísticamente significativa) de prueba de torniquete positiva con GP > 1200 U/ml 54,9% vs 39,7% con $p=0.06$. Dado que la prueba de torniquete es una forma de valorar indirectamente la fragilidad capilar y por ende disfunción endotelial, se podría inferir (aun con esa débil asociación) que el aumento de GP puede ser un mecanismo de defensa a nivel endotelial ante la injuria que impone virus Dengue. Una limitante para encontrar clara diferencia es que la medición plasmática de GP refleja parte de los mecanismos antioxidantes extracelulares pero es probable que si la medición se hiciera a nivel tisular (contenido intracelular) como en mucosa del tracto digestivo la asociación sería más evidente (sitio anatómico frecuentemente relacionado con sangrado). De hecho modelos murinos de infección bacteriana de mucosa gástrica han mostrado el efecto que tiene el estrés oxidativo para inducir disrupción y sangrado, lo cual puede ser revertido con antioxidantes como glutatión (83).

En el espectro clínico de dengue también se observa una importante disminución del recuento de plaquetas que se ha atribuido a falla en la maduración de megacariocitos, destrucción de plaquetas por el mismo virus o por activación de complemento ante presencia de antígenos virales en la superficie plaquetaria y a coagulación intravascular diseminada (31).

En esta cohorte se identificó que 41 pacientes (25%) desarrollaron trombocitopenia (<100.000 plaquetas/ μ L). En razón que el estrés oxidativo es un mecanismo lesivo para las membranas celulares, lo cual también puede explicar la disminución de plaquetas, se evaluó esta asociación con los niveles de SOD y GP sin encontrarse una asociación que fuese estadísticamente significativa. Sin embargo, para este fenómeno también es

probable que si se evaluarán las enzimas antioxidantes a nivel celular, en este caso en plaquetas el resultado podría ser diferente. Este fenómeno no se ha estudiado específicamente en dengue aunque sí hay evidencia en otras infecciones que fortifican el concepto que la peroxidación lipídica de la membrana plaquetaria está implicada en la reducción del número de plaquetas (84).

La mayoría de estudios sobre factores pronósticos y marcadores de severidad en infección por dengue tienen en cuenta el recuento de plaquetas (80,93). Sin embargo, este abordaje es muy limitado por cuanto es probable que más que un descenso numérico, sean los trastornos funcionales los que estén más implicados en modificar las expresiones clínicas de la enfermedad y por ende la evolución. Una alternativa para posteriores estudios es correlacionar pruebas de función plaquetaria con marcadores de estrés oxidativo, entre ellas agregometría y expresión de P- selectina. Es factible que en fases tempranas se ponga en evidencia activación plaquetaria asociada a un perfil de mayor estrés oxidativo lo cual sería modificable con ciertas intervenciones.

En esta cohorte, 28 pacientes (17,07%) mostraron algún signo de extravasación plasmática. Esta condición es la que asociada a otros criterios define dengue hemorrágico de acuerdo a la clasificación de OMS. La fisiopatología de la extravasación plasmática en dengue aún no se conoce muy bien, sin embargo se han implicado varios mecanismos que parecen tener una vía final común expresada como activación de endotelio (37). Recientemente, Avirutnan et al. publicaron un estudio que evalúa e integra las diferentes hipótesis que han surgido desde 1973. Estos autores encuentran que NS1 (proteína mayor no estructural de virus Dengue) de manera directa o asociada a las membranas activa complemento, fenómeno que desencadena la elevación de los niveles de la fracción terminal SC5b-9

los cuales se correlacionan con la severidad de la enfermedad. Los investigadores proponen que la activación masiva del complemento ocurre en sitios de extravasación plasmática y que la cuantificación de ellos podría ayudar a predecir que individuos están más propensos a desarrollar choque por dengue (85).

En vista que modelos in vitro han probado que la activación de complemento puede ocurrir por actividad oxidativa en membrana, es plausible que en Dengue ocurra algo similar y que de manera análoga la cuantificación de marcadores de estrés pueda predecir la ocurrencia de choque como consecuencia de la activación de complemento (86).

En la cohorte de pacientes estudiada se encontró que la presencia de signos de extravasación plasmática estuvo asociada con una mayor actividad de SOD, lo cual se hizo evidente en análisis bivariado ($p=0.04$) y corroborado en regresión logística en la que se observó que la presencia de una alta actividad plasmática de SOD confería un riesgo 5,90 veces mayor de tener extravasación plasmática ($p=0.02$). Esta asociación sugiere que en fases tempranas de la infección por dengue se desencadena una importante actividad antioxidante a nivel intravascular. Una limitante es que este estudio no está diseñado para aclarar si la elevación de la enzima antioxidante corresponde a una respuesta a la lesión endotelial ocasionada por el virus o es un epifenómeno de todas las alteraciones que se producen en otras células como plaquetas, eritrocitos, hepatocitos y leucocitos. Para Glutación Peroxidasa no se observó asociación con respecto a la variable extravasación plasmática. La explicación a estas diferencias puede darse por una distribución diferencial de las enzimas en diferentes grupos celulares. Se sabe que aunque las dos enzimas son comunes a muchas células es claro que SOD predomina en eritrocitos y pared vascular donde regula la disponibilidad de óxido nítrico al barrer anión superóxido (87). Igualmente,

se ha demostrado que SOD disminuye la permeabilidad vascular producida por el factor activador plaquetario mecanismo que también contribuye en dengue a favorecer la extravasación de volumen (88,92).

De otro lado se ha probado que el anión superóxido emerge en respuesta a infección por virus dengue-2 en cultivos celulares, por lo que se podría asumir que hasta cierto punto esta vía antioxidante en endotelio es específica durante la infección por dengue (71).

La fuga de volumen endocapilar se refleja en variaciones hemodinámicas que pueden cuantificarse a través de métodos de uso cotidiano en el terreno clínico, entre ellos frecuencia cardiaca y tensión arterial. Aunque la GP no se relacionó con las medidas de extravasación de plasma, el estudio mostró relación directa entre la actividad de esta enzima y la frecuencia cardiaca e inversa con tensión arterial sistólica en el modelo univariado, lo cual fue estadísticamente significativo en el modelo de regresión logística para frecuencia cardiaca. Esta observación apunta a que GP también puede jugar un papel importante en el ajuste antioxidante que se hace durante las fases iniciales de la enfermedad y que eventualmente el estrés oxidativo también esté relacionado con la fisiopatogenia del escape de volumen intravascular. Se sabe que aunque el choque refractario a líquidos es un fenómeno de corta duración, la tendencia a mayor permeabilidad capilar se da durante toda la evolución de la infección (antes, durante defervescencia y aún durante los días posteriores) (89). Con lo anterior es válido considerar que las alteraciones hemodinámicas y las diferencias en cuanto a niveles de actividad antioxidante se dan en fases tempranas y las dos pueden estar relacionadas, lo cual soportaría el uso de enfoques terapéuticos dirigidos a modular la respuesta oxidante para prevenir el choque.

Como hallazgo interesante, niveles relativamente altos de GP se asociaron a valores bajos de triglicéridos séricos. Cuando la GP estuvo por encima de 1200 U/L, los triglicéridos oscilaron alrededor de los 115 mg/dL (IC95%: 102 – 127), los cuales fueron significativamente menores que los hallados con valores inferiores de GP (140 mg/dL; IC95%: 119 – 162; $p=0,04$). Esta correlación negativa es coherente con los resultados de otros estudios, cuyos autores sugieren que un elevado estrés oxidativo, generado tras la infección por dengue, originaría una depleción de los lípidos séricos por acción de los radicales libres (22,53).

Los anteriores hallazgos sugieren que el estrés oxidativo es un trastorno metabólico celular que ocurre durante las fases iniciales de la infección, lo cual está acorde con el único estudio publicado en el 2004 sobre marcadores de estrés oxidativo y dengue, en el que sólo se incluyeron 22 pacientes y en el que se mostró actividad alta de SOD y marcadores de peroxidación lipídica en pacientes con dengue (75).

Este estudio confirma desde una nueva óptica que el disbalance oxidativo está implicado en la progresión de la infección hacia dengue hemorrágico y choque, probablemente como un reflejo de la actividad inflamatoria a nivel de endotelio. El diseño de este estudio tiene como principal fortaleza con respecto a los previos que las variables relacionadas con estrés oxidativo se midieron antes de desarrollarse los desenlaces de severidad lo cual confiere a las asociaciones observadas la naturaleza de potenciales marcadores pronósticos por lo menos en lo que respecta al desenlace de fuga capilar que finalmente es el que se traduce en choque.

7. CONCLUSIONES

Aunque otros estudios han evaluado los cambios de los marcadores de estrés oxidativo relacionados con dengue, este trabajo es el primero que establece relaciones entre dos representantes importantes de estos marcadores y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Este estudio valora las asociaciones en fases tempranas de la infección lo cual ha sido una falencia en los estudios previos y representa un nuevo enfoque que eventualmente conducirá a nuevos estudios en el área básica y clínica.

Estrés oxidativo representa un desequilibrio metabólico celular que está presente en infección por virus dengue en estadios tempranos y probablemente juega un papel importante en la fisiopatogenia de la enfermedad. Este estudio permitió demostrar que los niveles plasmáticos de enzimas antioxidantes se alteran en fases tempranas de la enfermedad lo cual probablemente representa una respuesta compensadora a la injuria que impone el virus. Los niveles plasmáticos elevados de SOD y GP se relacionan con presencia de indicadores directos e indirectos de fuga capilar lo cual aporta un precedente importante sobre el potencial papel predictor de severidad en dengue de estos biomarcadores, específicamente en lo que concierne a los fenómenos de extravasación plasmática como evento central en patogénesis de dengue.

8. RECOMENDACIONES

Para próximos estudios sería conveniente complementar la medición de SOD y GP con contenido eritrocitario dado que las pruebas están mejor estandarizadas en estas células.

En el avance del conocimiento sobre los fenómenos de estrés oxidativo en el escenario clínico es imperativo que se realicen estudios de niveles basales de biomarcadores relacionados con dicha función en población sana colombiana, ya que la falencia de esta información limita conclusiones de trabajos realizados en nuestro medio.

Aportaría mayor información al conocimiento del papel de estrés oxidativo en dengue la medición de marcadores de oxidación como malonaldehído, productos de peroxidación lipídica y actividad antioxidante total. Igualmente sería valioso obtener información sobre los niveles intracelulares de dichas sustancias en tejidos específicos, al igual que la descripción de la cinética de estos biomarcadores durante toda la evolución de la enfermedad. Es probable que la evaluación dinámica de los mismos establezca un punto de quiebre donde los valores marquen diferencia sobre el comportamiento ulterior de la enfermedad en lo que respecta a otros desenlaces como sangrados o choque. Las diferencias observadas en las enzimas antioxidantes también se pueden dar por el contenido dietario de Manganeso y Selenio en la población estudiada. Ya que estos elementos traza son difíciles de cuantificar, próximos estudios deberían complementar la información inicial con datos de nutrición que permitan estimar el contenido en alimentos y detectar posibles sujetos con deficiencia que llevaría a niveles bajos de enzimas antioxidantes.

9. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Gubler D and Clark G. Dengue/Dengue Hemorrhagic fever: The Emergence of a Global Health Problem. *Emerging Infectious Diseases* 1995; 1:55-57.
2. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: Guías para su prevención y control. Washington, DC. Publicación científica 548, p 110. 1995.
3. Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud. Comportamiento por regiones del dengue en el 2001. Boletín Epidemiológico Semanal, SIVIGILA. Semana epidemiológica No. 02. Enero 06 a 12 de 2002. Disponible en: www.col.ops-oms.org/sivigila/2002/BOLE02_02.htm
4. Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vectores 2003-2004. Boletín Epidemiológico Semanal, SIVIGILA. Semana epidemiológica No. 08. Febrero 22 - 28 de 2004. Disponible en: www.col.ops-oms.org/sivigila/2004/bole08_04.htm
5. Bethell DB, Gamble J, Pham PL, Nguyen MD, Tran TH, Ha TH, et al. Noninvasive measurement of microvascular leakage in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 2001;32:243-53

6. Ramírez-Ronda C, García CD. Dengue in the Western Hemisphere. Infectious Diseases Clinics of North America 1994; 8: 107-29.
7. Villar LA, Machado C, et al. Fiebre hemorrágica dengue: descripción de un brote en Barrancabermeja (Santander). Memorias Primer Congreso Colombiano de Infectología, Bogotá, 1992: pag 42.
8. Villar LA, Hernández H et al. Aspectos Clínicos Epidemiológicos de un brote de Dengue Hemorrágico en Santander, Colombia (1991-1992). Memorias VI Congreso Panamericano de Infectología, Viña del Mar, Chile, 1993: Pág 63.
9. Rey J, Rodríguez L. Enfermedades de Transmisión Vectorial en Santander.2005. Disponible en www.bucaramanga.gov.co/docs/CIRCULARES
10. Henchal EA, Putnak R. The Dengue Viruses. Clinical Microbiological Reviews 1990; 3: 376-96.
11. Morens D. Antibody dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. Clinical Infectious Diseases 1994; 19: 500-512.
12. Guzman M, Kouri G, Bravo J. Sequential infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome during the 1981 dengue hemorrhagic Cuban epidemic. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991;86:367.

13. Villar L, Convers S, Harker A, Martínez R, Méndez C, Gómez J. Clinical characteristics associated with dengue hemorrhagic fever in a South American population. Abstract 40 th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy ICAAC, Toronto, Canada, Septiembre 2000, p 257.
14. Guzmán M, Kourí G. Dengue: an update. *Lancet Infectious Diseases* 2001;2:33-42.
15. Guzman M, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *Journal of Clinical Virology* 2003;27:1-13.
16. Lei Hy. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J. Biomed. Sci* 2001; 8: 377-88.
17. Dung NM, Day N et al. Fluid replacement in Dengue Shock Syndrome: a randomized, double blind comparison of four intravenous fluid regimens. *Clinical Infectious Diseases* 1999; 29: 787-94.
18. Wills B, Dung N, Loan H et al. Comparison of three fluid solutions for resuscitation in Dengue Shock Syndrome. *N. Engl. J. Med* 2005; 35:877-889.
19. Nhan N, Xuan C, Kneen R. et al. Acute management of dengue shock syndrome: A randomized double-blind comparison of 4 intravenous fluid regimens in the first hour. *Clinical Infectious Diseases* 2001;32:204-13.
20. Zhou H, Deem M. Sculpting the immunological response to dengue fever by polytopic vaccination. *Vaccine* 2006;24:2451-2459.

21. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S et al. Early Clinical and Laboratory Indicators of Acute Dengue Illness. *J Infect Dis* 1997; 176:313-21.
22. Ray G, Kumar V, Kappor AK et al. Status of antioxidants and other biochemical abnormalities in children with dengue fever. *J Trop Pediatr* 1999; 45:4-7.
23. Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1999; 180: 1429-35.
24. Gibananda R, Vivendra K. Status of antioxidants and other biochemical abnormalities in children with Dengue Fever. *Journal of Tropical Pediatrics* 1999; 45: 4-7.
25. Thanh C, Thi N, Kneen R. Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the world health organization classification system helpful?. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2004;70:172-179.
26. Halstead S, Heinz F, Barret A, Roehrig J. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis. *Vaccine* 2005;23:849-856.
27. Mukhopadhyay S, Kuhn R, Rossmann M. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology* 2005;3:13-22.
28. Domingo C, Gascón J. Dengue y otras fiebres hemorrágicas virales. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin* 2005;23:615-626.

29. González G, Méndez A. Dengue, espectro clínico. Tribuna médica 1999;5:203-218.
30. Méndez A, González G. Dengue haemorrhagic fever in children: ten years of clinical experience. Biomédica 2003;23:180-193.
31. Bhamarapravati N. Hemostatic Defects in Dengue Hemorrhagic Fever. Reviews of Infectious Diseases 1999; 2 : Supp 4: s826-829.
32. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. BMJ 2002;324:1563-1566.
33. Monath TP. Early Indicators in Acute Dengue Infection. The Lancet 1997; 350: 1719-20.
34. Vaughn D, Green S, Kalayanarooj S et al. Dengue in the Early Febrile Phase: Viremia and Antibody Responses. Journal of Infectious Diseases 1997; 176: 322-30.
35. Nguyen TL, Nguyen TH, Tieu NT. The impact of dengue hemorrhagic fever on liver function. Res Virol 1997; 148: 273-77.
36. Alvarez ME, Ramirez-Ronda CH. Dengue and hepatic failure. Am J Med 1985; 79: 670-74.
37. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. J Infect Dis 1999; 179: 755-62.

38. Hober D, Poli L, Roblin B, et al. Serum levels of Tumor Necrosis Factor alpha ($TNF\alpha$), interleukin6 (IL 6) and interleukin 1b in dengue infected patients. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 324-31.
39. Raghupathy R, Chatuvedi UC, Al Sayer H, et al. Elevated levels of IL 8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 1998; 56: 280-85.
40. Thein S, Aaskov J, Thein M et al. Changes in levels of anti-dengue virus IgG subclasses in patients with disease of varying severity. *Journal of Medical Virology* 1993;40:102-106.
41. Betherill DB, Flobbe k, Cao XT, et al. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1998; 177: 778-82.
42. Iyngkaran N, Yadav M et al. Augmented inflammatory cytokines in primary dengue infection progressing to shock. *Singapore Med J* 1995; 36:218-221.
43. Misra A, Mukerjee R, Chaturvedi U. Release of Reactive Oxygen Intermediates by Dengue Virus-Induced Macrophage Cytotoxin. *Int.J.Exp.Path* 1996;77:237-242.
44. Valero N, Espina L, Añez G. et al. Short report: Increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. *Am.J.Trop.Med.Hyg* 2002;66:762-764.
45. Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting M. et al. Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. *Am.J.Trop.Med.Hyg* 2001;65:S40-47.

46. Wang LY, Chang WY, LU SN, Chen TP. Sequential changes of serum transaminase and abdominal sonography in patients with suspected dengue fever. *Kao Hsiung I Hsueh Tsa Chih* 1990; 6: 483-9.
47. Kuo CH, Tai DI, Chang Chien CS et al. Liver biochemical test and dengue fever. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47: 265-70.
48. Alvarez ME, Ramirez-Ronda CH. Dengue and hepatic failure. *Am J Med* 1985; 79: 670-74.
49. Morens D, Nyven M, Chu M, Halstead S. Growth of Dengue type 2 virus isolates in human peripheral blood leucocytes correlates with severe and mild dengue disease. *Am.J.Trop.Med. Hyg* 1991;45:644-651.
50. Thiasyakorn U, Nimmannitya S. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. *Clin. Infect. Dis* 1993;16:295-297.
51. Hung N, Lan N, Lei H et al. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am.J.Trop.Med.Hyg* 2005;72:370-374.
52. Olaison L, Hogevis H, Aletig K. Fever, C –Reactive Protein, and Other acute phase reactants during treatment of infective endocarditis. *Arch Intern Med* 1997; 157: 885-92.
53. Van Gorp, Suharti C, Mairuhu A. et al. Changes in the plasma lipid profile as a potential predictor of clinical outcome in dengue hemorrhagic fever. *Clinical Infectious Diseases* 2002;34:1150-1153.

54. Vega J, Diaz J, Serrano E. Plasma redox status relates to severity in critically ill patients. *Critical Care Medicine* 2000;28:1812-1814.
55. Vega J, Díaz J, Serrano E. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Critical Care Medicine* 2002; 30: 41-49.
56. Rotstein O. Endocrine and metabolic dysfunction syndromes in the critically ill. Oxidants and antioxidant therapy. *Critical Care Clinics* 2001;17:73-79.
57. Cowley H, Bacon P et al. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: A comparison of survivor and nonsurvivors. *Crit Care Med* 1996; 24: 1179-1183.
58. Diaz J, Serrano E, Acosta F, Carbonell L. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. *Clinical Chemistry* 1998; 44:2215-2217.
59. Pryor WA. Measurement of oxidative stress status in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993;2:289-92.
60. Blankenberg S, Rupprecht H, Blekel C. et al. Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med* 2003;349:1605-1613.
61. Salvemini D, Cuzzocrea S. Therapeutic potential of superoxide dismutase mimetics as therapeutic agents in critical care medicine. *Critical Care Medicine* 2003;31: 31-40

62. Barbaro G. Hepatic glutathione deficiency in chronic hepatitis C: quantitative evaluation in patients who are HIV positive and HIV negative and correlations with plasmatic and lymphocytic concentrations and with the activity of the liver disease. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:2569-73.
63. Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K. Et al. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3071-3076.
64. Neri S. Association of alpha interferon and acetylcysteine in patients with chronic C hepatitis. *Panminerva Med* 2000; 42: 187-92.
65. Treintinger A. Decreased antioxidant defence in individuals infected by the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 454-9.
66. Elbim C. Redox and activation status of monocytes from human immunodeficiency virus infected patients: relationship with viral load. *J Virol* 1999; 73: 4561-6.
67. Larrondo H, Leon D. Estrés Oxidativo y Sepsis. *Rev Cubana Invest Biomed* 2000; 19:199-201.
68. Kazuhiko K, Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. *Hepatology Research* 2006;34:65-73.
69. Sozzani S, Bosisio D, Mantovani A, Ghezzi P. Linking stress, oxidation and the chemokine system. *Eur. J. Immunol* 2005;35:3095-98.
70. Schwarz K. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radical Biology & Medicine* 1996;21:641-9.

71. Tsrong J, Born C, Shiou H et al. Potential Dengue Virus Triggered Apoptotic Pathway in Human Neuroblastoma Cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF κ B are sequentially involved. *Journal of Virology* 2000; 74: 8680-91.
72. Terada L. Oxidative stress and endothelial activation. *Critical Care Medicine* 2002; 30: 61-72.
73. Lin YL. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue 2 virus infected human liver cells. *Virology* 2000; 276: 114-26.
74. Misra A, Mukerjee R, Chaturvedi U. Release of reactive oxygen intermediates by dengue virus 2-induced macrophage cytotoxin. *Int.J.Exp.Path* 1996;77:237-42.
75. Gil L, Martínez G, Tápanes R, Guzman G et al. Oxidative Stress in Adult Dengue Patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2004; 71:652-7.
76. Convers S, Harker A, Martínez R, Méndez C, Villar L, Rojas EM. Clínica gastrointestinal y su asociación con la severidad en Dengue. *Revista Colombiana de Infectología Infectio* 2001; 5: 21-30.
77. Reynes J, Laurent A, Deubel V et al. The first epidemic of dengue hemorrhagic fever in French Guiana. *Am.J.Trop.Med.Hyg* 1994:545-53.
78. Gubler D, Clark G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. Disponible en: www.medscape.com.

79. Mairuhu AT, Gillavry MR, Setiati TE et al. Is clinical outcome of dengue-virus infections influenced by coagulation and fibrinolysis? A critical review of the evidence. *Lancet Infectious Diseases* 2003;3:33-41.
80. Villar LA, Diaz F, Martinez R, Mendez C, Harker A. Identificación de marcadores de severidad en Dengue. *Infectio* 2002; 2:120.
81. Ocazonez R, Villar L. Determination of the sensibility of the hematocrit and thrombocytopenia deviation values as markers of infection by dengue virus. Abstract XVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Cartagena de Indias, Colombia, Agosto 20-25, 2000. Pág 44.
82. Harker A, Convers S, Martínez R, Méndez C, Gómez J, Villar L. Are the platelets a severity indicator in patients with dengue hemorrhagic fever?. Abstract XVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Cartagena de Indias, Colombia, Agosto 20-25, 2000. Pág 44.
83. Hung Ch, Wang P. Gastric oxidative stress and hemorrhagic ulcer in *Salmonella typhimurium*-infected rats. *European Journal of Pharmacology* 2004;491:61-68.
84. Erel O, Vural H, Aksoy N et al. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. *Clinical Biochemistry* 2001;341-344.
85. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and Complement. *The Journal of Infectious Diseases* 2006;193:1078-88.

86. Collar Ch, Vakeva A, Morrissey M et al. Complement activation after oxidative stress. Role of the Lectin Complement Pathway. *Am.J.Pathol* 2000;156:1549-56.
87. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U et al. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002;55:239-49.
88. Zhang Y, Gu Y, Lucas M et al. Antioxidant Superoxide Dismutase attenuates increased endothelial permeability induced by platelet-activating factor. *J.Soc.Gynecol.Invest* 2003;10:5-10.
89. Bethell D, Gamble J, Phu P et al. Noninvasive Measurement of Microvascular Leakage in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Infectious Diseases* 2001;32:243-53.
90. Monalida R. Prothrombin time and partial thromboplastin time as a predictor of bleeding in patients with dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993; 24 Suppl 1:141-3.
91. Lin C., Lei H, Shiau A et al. Endothelial Cell Apoptosis Induced by Antibodies Against Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Via Production of Nitric Oxide. *The Journal of Immunology* 2002; 169:657-64.
92. Chen L, Lei H, Liu C. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am.J.Trop.Med.Hyg* 2006;74:142-7.
93. Diaz-Quijano FA, Villar-Centeno LA, Martínez-Vega RA. Complicaciones asociadas a la trombocitopenia profunda en pacientes con dengue. *Rev Med Chile* 2006;134:167-73.

ANEXOS

ANEXO A. CONSENTIMIENTO INFORMADO PROYECTO IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES TEMPRANOS DE SEVERIDAD EN DENGUE CIE-UIS COLCIENCIAS

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

Propósito del estudio

El Centro de Investigaciones Epidemiológicas de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander (CIE- UIS) está conduciendo un estudio para entender porqué algunas personas con Dengue desarrollan Dengue Hemorrágico.

Todas las personas tienen en su sangre proteínas que normalmente aumentan cuando la persona sufre una infección. Estas proteínas se llaman marcadores de inflamación y están aumentadas en algunas personas que sufren Dengue Hemorrágico. Sin embargo, nosotros no sabemos si los niveles de los marcadores de inflamación se elevan antes de la aparición del Dengue Hemorrágico, con suficiente anticipación como para que estos puedan identificar desde el principio del Dengue a aquellas personas que van a enfermar más. Igual ocurre con una serie de hallazgos del examen de sangre, de la historia clínica y el examen físico. Si nosotros encontramos que algunos hallazgos y/o los niveles altos de marcadores de inflamación en la sangre preceden al Dengue Hemorrágico, entonces tendríamos una mejor forma de identificar a las personas que están a riesgo de tener una enfermedad muy grave o morir por Dengue y esto nos ayudaría para darles el tratamiento que evite el desarrollo de estas complicaciones.

Nosotros vamos a comparar registros clínicos y de laboratorio de pacientes con dengue clásico y dengue hemorrágico tomados en las primeras horas de la enfermedad cuando aún no se conocía como iba a evolucionar el paciente. Esto nos ayudará a entender si los hallazgos registrados nos permiten predecir quienes tienen mayor riesgo de sufrir Dengue Hemorrágico.

Quiénes pueden participar

Aproximadamente 1000 personas mayores de 2 años, serán incluidas en el estudio. Ud. está siendo invitado a participar en él y ser seguido por la semana siguiente para conocer la evolución final de su enfermedad. Si Ud. tiene historia de un enfermedades del corazón, diabetes, cáncer, enfermedades de la sangre, como leucemia, u otra enfermedad crónica que le hace tomar medicamentos que reducen la respuesta inflamatoria (Esteroides por Artritis Reumatoidea, por ejemplo), Ud. no puede participar en el estudio.

Procedimientos del estudio

Una vez hayamos verificado que Ud. 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 mediremos su estatura, su peso, se le tomará el perímetro de su cintura. Le tomaremos una muestra de sangre de 40 ml (4 cucharadas) en varios tubos. La muestra de sangre se le tomará de una vena en su antebrazo, con equipo nuevo, estéril y no reusable, a fin de evitar el riesgo de infección, la muestra será usada para

medir sus niveles de marcadores de inflamación. Una porción de esta muestra será almacenada y podría ser usada en el futuro para otras pruebas, incluyendo pruebas genéticas. Se realizarán visitas diarias en su casa para ver la evolución de la enfermedad. Al octavo día de la enfermedad se le tomará una nueva muestra de sangre para corroborar la infección por el virus dengue que será llevada al laboratorio de virología de la universidad. También se tomará un control diario de muestra de sangre de un dedo en un tubo muy pequeño con el fin de observar si hay algún cambio importante en ese examen que implique que Ud. deba ser remitido al Centro de Salud de donde fue captado para valoración por urgencias. Si durante la visita el médico encuentra algún hallazgo pulmonar importante se le realizará un Radiografía de tórax o una ecografía del pulmón.

Confidencialidad

Nosotros haremos todos los esfuerzos razonables para proteger su privacidad. A Ud. se le asignará un número de código y su nombre será borrado de todas las formas de recolección de datos. Sólo los investigadores tendrán acceso al archivo en el cual se vincula su nombre con su número de código. Los datos colectados en este estudio serán usados sólo para los fines del estudio. Los resultados del estudio se presentarán en la forma de promedios y porcentajes y Ud. no será identificado de forma individual en ningún caso. Si su muestra de sangre almacenada es usada para futuras pruebas, estas pruebas serán anónimas y tendrán que ser aprobadas por un Comité de Ética de Investigación en Sujetos Humanos.

Riesgos y beneficios

Los riesgos para su salud derivados de este estudio son mínimos. Tomar una muestra de sangre resulta en dolor ligero y transitorio y en una pequeña probabilidad de infección, y algunas personas pueden desarrollar un hematoma o morado (una pequeña cantidad de sangre debajo de la piel), que desaparece aproximadamente en una semana. Sin embargo, los resultados de este estudio nos podrían ayudar a entender mejor y a prevenir el desarrollo del dengue, Ud. y personas como Ud. podrían beneficiarse de su participación.

Nosotros no le daremos los resultados de sus pruebas de marcadores de inflamación por dos razones. Primero, porque no es claro que significado tienen valores altos o bajos de estos marcadores en personas con fiebre de < de 4 días como Ud. Por lo tanto, esta información sería de poco uso para su cuidado clínico. Segundo, porque el propósito de este estudio es desarrollar conocimiento sobre el dengue, no proveer información clínica para Ud.

Costos y compensación

Ud. no recibirá pago alguno por su participación en este estudio, pero todas las pruebas se le harán de forma gratuita.

Derecho a rehusar o a abandonar el estudio

Ud. debe estar consciente de que su participación en este estudio es completamente voluntaria. Aún después de dar su aceptación para participar, Ud. tendrá el derecho de retirarse del estudio o de negarse a contestar una pregunta o de proveer una muestra de sangre en el momento en que Ud. así lo desee. Más aun, si Ud. decide no participar en el estudio o si Ud. se niega a seguir participando, Ud. recibirá la misma atención y los mismos beneficios que Ud. hubiese recibido si nunca se le hubiese invitado a participar.

Preguntas

Por favor, siéntase en la libertad de hacerme cualquier pregunta si hay algo que no haya entendido. Si Ud. tiene alguna pregunta adicional acerca del estudio más adelante, Ud. puede contactar al Dr. Luis Angel Villar Centeno en el teléfono 6345781. Si Ud. tiene alguna pregunta acerca de sus derechos como participante en este estudio, Ud. 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, Ud. 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. Ud. está de acuerdo en:

- | Si | No | |
|--------------------------|--------------------------|---|
| ☐ | ☐ | Dejar que le tomen la presión arterial, el peso y la talla |
| ☐ | ☐ | Contestar a las preguntas de una entrevista verbal |
| ☐ | ☐ | Dar muestra de sangre |
| ☐ | ☐ | Permitir que su muestra de sangre sea almacenada y usada en estudios futuros, incluyendo pruebas genéticas. |

¿Acepta Ud. participar en este estudio voluntariamente? Si ☐ No ☐

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

Nombre del participante: _____

Fecha

Firma del participante

Nombre del padre o madre: _____

Cédula de ciudadanía: _____

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.

Nombre del investigador: _____

Firma del investigador

**ANEXO B. INSTRUMENTO DE DATOS CLINICOS BASALES III
PROYECTO IDENTIFICACION DE MARCADORES PRONOSTICOS DE
SEVERIDAD EN DENGUE CIE-UIS COLCIENCIAS**

I. DATOS DE IDENTIFICACION

1. Código

2. Nombres

3. Apellidos

4. Edad: años

5. Fecha de nacimiento día Mes año

6. Lugar de residencia actual	Dirección	Barrio	Municipio
-------------------------------	-----------	--------	-----------

7. Número Telefónico:

8. Género: F=0 M=1 ☐

9. Estado Reproductivo: No embarazada=1, Embarazada=2, Puerperio=3, Menopausia=4, Prepúber=5, No palica=999 ☐

10. Raza: Negra=1, Mestiza=2, Blanca=3, Asiatica=4 ☐

11. Sitio de captación:

12. Seguridad Social: Subsidiado=1, Contributivo=2, Vinculado=3, Particular=4 ☐

II. DATOS CRONOLOGICOS

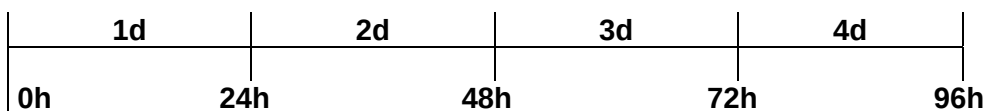
13. Fecha de inicio de fiebre Día Mes Año : Hora

14. Fecha ingreso al estudio Día Mes Año : Hora

15. Horas desde el inicio de la Fiebre: horas

16. Fecha toma de muestra basal Día Mes Año : Hora

17. Día de enfermedad al ingresar al estudio



18. Seguimiento

Hasta: Día Mes Año

19. Visitó zona endémica de Malaria en los últimos 30 días:

No=0

Si=1

☐

III. USO DE MEDICAMENTOS AL INGRESAR AL ESTUDIO

20. Registrar en la celda correspondiente el (los) nombre del medicamento que este tomando el paciente, así como su presentación, dosis diaria y por cuantos días los ha tomado.

Nombre del medicamento (genérico)	Presentación (mg o gm)	Vía Admon.	Dosis (tab/día)	Días de uso

Vía de admon: 1=V.O, 2=I.V, 3=I.M, 4=Otro

IV. COOMORBILIDAD

21. Registre en la celda la enfermedad que refiera el paciente, que haya sido diagnosticada por médico.

V. SINTOMAS

Registre en la celda correspondiente 1 si el paciente presentó el síntoma.

A. SINTOMAS GENERALES

22. ¿Durante la enfermedad ha tenido fiebre?

Si=1

No=0

☐

23. ¿Durante la enfermedad ha tenido dolor de cabeza?

Si=1, No=0,
NE=888

☐

24. ¿Durante la enfermedad ha tenido sensación dolorosa detrás de los ojos o al movilizarlos?	Si=1, No=0, NE=888	
25. ¿Durante la enfermedad ha sentido dolor en los músculos?	Si=1, No=0, NE=888	
26. ¿Durante la enfermedad ha sentido dolor en las articulaciones?	Si=1, No=0, NE=888	
27. ¿Durante la enfermedad ha sentido escalofríos?	Si=1, No=0, NE=888	
28. ¿Durante la enfermedad ha sentido disminución o pérdida de las ganas de comer?	Si=1 No=0	
29. ¿Durante la enfermedad ha sentido dolor o ardor en la garganta espontaneo o al deglutir (pasar - ingerir) los alimentos?	Si=1, No=0, NE=888	
30. ¿Durante la enfermedad ha tenido tos?	Si=1 No=0	
31. ¿Durante la enfermedad ha tenido secreción por la nariz (mocos) u obstrucción nasal (sensación de tapazón)?	Si=1 No=0	
32. ¿Durante la enfermedad ha sentido dolor o ardor en la piel?	Si=1, No=0, NE=888	
33. ¿Durante la enfermedad la piel se le ha puesto de color rojo?	Si=1 No=0	
34. ¿Durante la enfermedad ha sentido picazón en el cuerpo?	Si=1, No=0, NE=888	
35. ¿Durante la enfermedad se le han inflamados los genitales?	Si=1, No=0, NA=999	
B. SINTOMAS GASTROINTESTINALES		
36. ¿Durante la enfermedad ha tenido ganas de vomitar?	Si=1, No=0, NE=888	
37. ¿Durante la enfermedad ha tenido vómito?	Si=1 No=0	

— —

No Aplica=999

38. ¿Cuántas veces vomitó en la últimas 24/h?

39. ¿Durante la enfermedad ha tenido deposiciones líquidas (diarrea)? Si=1 No=0

40. ¿Cuántas veces presentó diarrea en las últimas 24/h? ____ No Aplica=999

41. ¿Durante la enfermedad ha tenido disminución en la frecuencia de las deposiciones? Si=1 No=0

42. ¿Desde hace cuántos días no hace deposición? ____ No Aplica=999

43. ¿Durante la enfermedad ha sentido dolor en el abdomen? Si=1, No=0, NE=888

44. ¿De qué tipo ha sido el dolor? Cólico=1, Punzada=2, Ardor=3, Otro=4, NE=888, NA=999

45. ¿Cómo era el dolor intermitente o constante? Intermitente=1, Constante=2, NE=888, NA=999

46. ¿En donde sintió más dolor?: utilizar el gráfico para ubicarlo: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
Si el dolor es en bases pulmonares registrar 11 si es derecho o 12 si es izquierdo. NE=888, NA=999

C. SINTOMAS RELACIONADOS CON HIPOTENSION

47. ¿Durante la enfermedad ha tenido visión borrosa al ponerse de pie? Si=1, No=0, NE=888

48. ¿Durante la enfermedad al ponerse de pie ha sentido mareo (que el mundo gire o que usted se va a caer)? Si=1, No=0, NE=888

49. ¿Durante la enfermedad ha visto luces o estrellitas al ponerse de pie o al moverse? Si=1, No=0, NE=888

D. SINTOMAS HEMORRAGICOS

50. ¿Durante la enfermedad ha tenido sangrado de las encías espontáneamente? Si=1 No=0

51. ¿Durante la enfermedad le han sangrado las encías al cepillarse los dientes o al comer? Si=1 No=0

52. ¿Durante la enfermedad ha sangrado por la nariz sin realizar esfuerzo (espontáneamente)? Si=1 No=0 ☐
53. ¿Durante la enfermedad ha sangrado por la nariz al realizar esfuerzo (estornudar, sonarse)? Si=1 No=0 ☐
54. ¿Durante la enfermedad ha tenido vómito con sangre o vómito oscuro como en cuncho de café? Si=1 No=0 ☐
55. ¿Durante la enfermedad ha tenido deposición negra, alquitranada , pegajosa o pastosa, con olor fétido? Si=1 No=0 ☐
56. ¿Durante la enfermedad ha tenido deposición con sangre fresca (roja) o ha sangrado por el ano? Si=1 No=0 ☐
57. ¿Durante la enfermedad ha visto sangre en la orina? Si=1 No=0 ☐
58. ¿La enfermedad le ha ocasionado sangrado vaginal en tiempo fuera de su periodo menstrual normal? Si=1, No=0, NA=999 ☐
59. Si la paciente tiene en el momento la menstruación:
¿Con la enfermedad le ha aumentado el sangrado a tal punto que implica cambio de toalla o tampón cada hora o ha prolongado su menstruación por más de 7 días? Si=1, No=0, NA=999 ☐
60. ¿Durante la enfermedad ha tenido otras manifestaciones Hemorrágicas como sangrado por el oído o en el ojo? Si=1 No=0 ☐
61. Si el paciente contestó SI en la anterior pregunta especifique, ¿Cuál manifestación? _____ NA=999
- E. SINTOMAS NEUROLÓGICOS**
62. ¿Durante la enfermedad ha presentado convulsiones, movimiento de las extremidades, incoordinados, involuntarios y sueño posterior? Si=1 No=0 ☐
63. ¿Durante la enfermedad se ha tornado somnoliento, es decir se duerme frecuentemente, pero es fácilmente despertado? Si=1 No=0 ☐

64. ¿Durante la enfermedad el paciente se ha tornado irritable (agresivo) o llora fácilmente es decir ha cambiado su comportamiento? Si=1 No=0 ☐

VI. DATOS DE EXAMEN CLÍNICO

A. SIGNOS GENERALES

65. Talla: _____. Cm.

66. Peso : _____. Kg.

67. F.Respiratoria ____ /mt.

68. Oximetría de pulso: ____ %
NE=888

69. T° axilar digital: _____. °C

70. Fiebre (T°>38°C)

Si=1 No=0

71. Deshidratación:

Si=1 No=0

72. Grado de Deshidratación:
NA=999

Grado I=1, Grado II=2, Grado III=3,

73. Paciente irritable

Si=1 No=0

74. Alteración de la conciencia:

No=0, somnolencia=1, estupor=2 y coma
=3

75. Eritema facial

Si=1 No=0

76. Inyección conjuntival

Si=1 No=0

B. SIGNOS CARDIOVASCULARES

77. Piel fría y pálida

Si=1 No=0

78. Cianosis peribucal

Si=1 No=0

79. Cianosis ungueal

Si=1 No=0

80. Frecuencia cardiaca 30s antes de ponerse de pie: ____ /mt

81. Frecuencia cardiaca 15s después de ponerse de pie: ____ /mt

82. Frecuencia cardiaca Índice 30/15: ____

83. PA decúbito supino: Sistólica ____ Diastólica ____ mmHg

84. PA supino digital: Sistólica ____ Diastólica ____ mmHg

85. PA media: ____ mmHg 86. Presión de pulso: ____ mmHg

87. Hipotensión:

Si=1 No=0

88. Hipotensión ortostática:

Si=1 No=0

C. SIGNOS DE EXTRAVASACION DE PLASMA

89. Edema parpebral

Si=1 No=0

90. Fascies abotagadas

Si=1 No=0

Signos de derrame pleural

91. Matidez basal	Si=1	No=0	
92. Ausencia frémito táctil basal	Si=1	No=0	
93. Disminución murmullo vesicular basal	Si=1	No=0	
94. Signos derrame pericárdico (RsCs velados o disminuidos)	Si=1	No=0	

95. Perímetro abdominal: __ __ __. __ Cm.**Signos de ascítis**

96. Matidez cambiante	Si=1, No=0, NE=888	
97. Onda ascítica	Si=1, No=0, NE=888	
98. Hidrocele (en niños):	Si=1, No=0, NA=999	
99. Edema miembros inferiores:	Si=1 No=0	
100. Grado del edema de MMII:	Grado I=1, Grado II=2, Grado III=3, NA=999	

D. SIGNOS GASTROINTESTINALES**101. Proyección hepática:** __ __ . __ Cm**102. Hígado por debajo de reja costal** __ __ . __ Cm**derecha:**

103. Hepatomegalia:	Si=1	No=0	
104. Dolor abdominal a la palpación	Si=1	No=0	
Signos irritación peritoneal			
105. Blumberg	Si=1	No=0	
106. Contractura abdominal localizada	Si=1	No=0	
107. Abdomen en Tabla	Si=1	No=0	
108. Localización del sitio de mayor dolor:	1, 2, 3, 4, 5, 6,7, 8, 9,10,		
NA=999			
109. Extensión del dolor Abdominal :Adb.superior=1, medio=2, inferior=3, generalizado=4,NA=999			

Localización del dolor abdominal: señalar en el gráfico con una X el sitio de localización del dolor abdominal durante la realización del examen físico.

1,2 y 3= Abdomen superior
 4,5 y 6= Abdomen medio
 7,8 y 9= Adomen inferior

E. SIGNOS HEMORRAGICOS

110. Prueba de torniquete	Positivo=1	Negativo=0	
111. Número de petequias en 2.5cm ²	___	Valor Máx.= 60	
112. Tiempo de tolerancia del torniquete	___.	min.	
113. Gingivorragia	Si=1	No=0	
114. Epistaxis	Si=1	No=0	
115. Petequias	Si=1	No=0	
116. Extensión de las petequias (regla de los ___ % nueve)	No aplica=999		
117. Equímosis	Si=1	No=0	
118. Extensión de las Equimosis (regla de los ___ % nueve)	No aplica=999		
119. Exantema	Si=1	No=0	
120. Hematemesis	Si=1	No=0	
121. Melenas	Si=1	No=0	
122. Rectorragia	Si=1	No=0	
123. Hematuria macro	Si=1	No=0	
124. Metrorragia	Si=1, No=0, NA=999		
125. Menorragia	Si=1, No=0, NA=999		
126. Púrpura	Si=1	No=0	
127. Otro hallazgo hemorrágico al examen físico	Si=1	No=0	
128 ¿Cuál hallazgo? _____	No aplica=999		

VII. IMPRESIÓN DIAGNOSTICA CLINICA

129. Según la evaluación clínica: ¿el paciente tiene signos de choque?	Si=1	No=0	
130. Según la evaluación clínica ¿el paciente presenta D. Hemorrágico?	Si=1	No=0	

Si una de las dos respuestas anteriores es **AFIRMATIVA (SI)** se deberá remitir al paciente al sitio de captura

131. ¿Fue necesario remitir al paciente al Centro de referencia?	Si=1	No=0	
--	------	------	----------------------

VIII. DATOS DE LABORATORIO

A. Ayudas Diagnósticas

132. ¿Se le solicitó Rx de tórax al paciente?	Si=1	No=0	
---	------	------	----------------------

B. Muestra de sangre

Cuadro hemático		1	2	3	4
Fecha					
133. Hemoglobina					
134. Hematocrito					
135. Índice Hto/Hb					
Leucocitos	136. Total				
	137. Linfocitos				
	138. Polimorfos				
	139. Monocitos				
	140.L. reactivos				
141. Plaquetas					