

ARTÍCULO ORIGINAL

Biomarcadores pronósticos de gravedad del dengue

Luis Ángel Villar^{1,2,3}, Rosa Margarita Gélvez^{1,2,3}, Jairo Antonio Rodríguez^{3,4}, Doris Salgado^{3,4},
Beatriz Parra^{3,5}, Lyda Osorio^{3,6}, Irene Bosch⁷

¹ Centro de Investigaciones Epidemiológicas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

² Grupo de Epidemiología Clínica, Centro de Investigaciones Epidemiológicas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

³ Red AEDES: Abordando Áreas Endémicas del Dengue para el Estudio de su Severidad (sic.), Colombia.

⁴ Grupo de Parasitología y Medicina Tropical, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia

⁵ Grupo de Virus Emergentes y Enfermedad (VIREM), Universidad del Valle, Cali, Colombia

⁶ Grupo de Epidemiología y Salud Poblacional, Escuela de Salud Pública, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

⁷ Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA

Introducción. Las estrategias encaminadas a identificar tempranamente a los pacientes con dengue que pudieran evolucionar a la forma grave de la enfermedad, son escasas.

Objetivo. Evaluar la utilidad de los niveles séricos de algunos mediadores de la respuesta inmunitaria como biomarcadores tempranos de dengue grave.

Materiales y métodos. En un diseño de casos y controles anidado en una cohorte multicéntrica de la Red AEDES, se compararon los niveles de TNF α , ST2, TRAIL e IDO en muestras obtenidas durante la fase temprana de la enfermedad.

Resultados. Los niveles de ST2, TRAIL y TNF α fueron significativamente mayores en los pacientes que evolucionaron a dengue grave, comparados con los pacientes no complicados ($p < 0,0001$) [¿¿ Odds ratio (OR)=24,8, IC_{95%}=6,1-98,0; OR=18,0, IC_{95%}=4,6-69,1; OR=NC, IC_{95%}=NC, respectivamente??]. No se observaron diferencias en los niveles de IDO entre los pacientes con dengue grave y aquellos con dengue no grave ($p=1,0$; OR=1,0, IC_{95%}=0,2-6,1).

Conclusiones. En las primeras 96 horas de la infección por el virus del dengue, las cuantificaciones de ST2, TRAIL y TNF α contribuyen a predecir complicaciones de la enfermedad.

Palabras clave: dengue, permeabilidad capilar, inflamación, índice de gravedad de la enfermedad, citocinas, predicción, humanos.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.733>

Biomarkers for the prognosis of severe dengue

Introduction: There are very few strategies for the early detection of the patients who might develop the severe form of the illness.

Objective: To evaluate the utility of serum levels of some immune response mediators as early biomarkers for the severe dengue prognosis during the early phase of the illness.

Materials and methods: Using a case-control design nested in a multicenter cohort from the AEDES network (a Colombian multicenter study), we compared TNF α , ST2, TRAIL and IDO levels in samples which were obtained during the early phase of the illness.

Results: ST2, TRAIL and TNF α levels were higher in severe dengue patients compared with uncomplicated patients ($p < 0.0001$), as follows: OR=24.8, CI95%= 6.1- 98.0; OR=18.0, CI95%= 4.6-69.1; OR=NC, CI95%= NC, respectively. We did not find statistically significant differences between IDO levels in severe dengue and uncomplicated dengue ($p=1.000$, OR=1.0, CI95%= 0.2-6.1).

Conclusions: In the early phase of the dengue infection (96 hours), ST2, TRAIL and TNF α quantifications could contribute to the prediction of complications of the illness.

Contribución de los autores:

Luis Ángel Villar aportó el diseño del estudio, el análisis y la interpretación de los datos, la redacción y la revisión crítica del manuscrito.

Rosa Margarita Gélvez contribuyó en la recolección y obtención de los resultados, la interpretación de los datos y la redacción del manuscrito.

Jairo Antonio Rodríguez brindó soporte en la interpretación de datos y en la redacción del manuscrito.

Doris Salgado brindó soporte en la redacción del manuscrito.

Beatriz Parra contribuyó en la interpretación de los datos y la redacción del manuscrito.

Lyda Osorio aportó al análisis y la interpretación de los datos, y en la redacción del manuscrito.

Irene Bosch contribuyó en el análisis y la interpretación de los datos, y en la redacción del manuscrito.

Keywords: Dengue, capillary permeability, inflammation, severity of illness index, cytokines, forecasting, humans.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.733>

La incidencia de dengue ha aumentado enormemente en las últimas décadas; anualmente ocurre un estimado de 50 millones de infecciones por dengue y se estima que hasta 2.000 millones de personas se hallan en riesgo como residentes en áreas endémicas en múltiples países (1).

El espectro clínico de la infección por el virus del dengue varía desde una condición asintomática hasta la evolución a formas graves y la muerte. Las principales complicaciones son el choque, las hemorragias graves y el daño de órganos, principalmente el hígado, aunque el corazón o el encéfalo pueden también verse comprometidos (1,2).

En Colombia, la enfermedad es endemo-epidémica con picos ascendentes en la última década. En el 2010, el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) del Instituto Nacional de Salud notificó 157.203 casos (9.777 de dengue grave) y 271 muertes, para una letalidad de 2,2 % (2). Durante el 2011, a pesar de que el número de casos disminuyó (24.474 casos), la letalidad aumentó (3,75 %) (3).

A pesar de las implicaciones clínicas y de salud pública del dengue, en la actualidad no existe un tratamiento antiviral específico y solo la administración de líquidos intravenosos a los casos de mayor riesgo es la intervención que reduce la frecuencia de complicaciones y los casos fatales. El choque por dengue se produce debido a la grave disminución de la resistencia vascular, por pérdida de la integridad capilar, que conlleva a la extravasación de líquidos (4).

En los primeros días de la enfermedad, la identificación de los pacientes que posteriormente evolucionan hacia una complicación mayor (cerca del 10 %) es difícil, pues su cuadro clínico no difiere de la mayoría de los casos.

Aun cuando se desconocen en su conjunto los mecanismos que provocan el aumento de la permeabilidad vascular, se acepta el papel

determinante que en este proceso juega la respuesta inflamatoria ante la infección, en particular, distintas citocinas cuyos niveles séricos pueden detectarse desde etapas tempranas de la enfermedad (5).

El factor de necrosis tumoral alpha (FNT α) tiene diversos efectos sobre las células endoteliales, incluyendo el incremento de la inflamación, así como la estimulación de producción de quimiocinas (6). El FNT α es un producto de los monocitos, macrófagos y células T, el cual incrementa la permeabilidad vascular (7).

Otro miembro de la familia del TNF es el ligando inductor del factor de necrosis tumoral relacionado con la apoptosis (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*, TRAIL), también conocido como ligando Apo-2 o TNFSF10, que específicamente promueve la apoptosis de células cancerígenas (8). El TRAIL es una proteína de membrana de tipo II que se expresa en el endotelio, los leucocitos, los monocitos, los macrófagos, las células linfoides y los neutrófilos (9). Se encuentra principalmente en muchos tipos de células inmunitarias (macrófagos, células asesinas naturales, células T) y su expresión se eleva en presencia de un agente infeccioso (10).

El factor de necrosis tumoral gamma (FNT γ) es el más potente inductor de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima que ha estado implicada en la defensa antimicrobiana y en la regulación autoinmunitaria. *In vivo*, se han encontrado niveles séricos de IDO en casos de toxoplasmosis (11) e infecciones bacterianas (12,13). En la infección por el virus del dengue, se han reportado niveles elevados de IDO en células endoteliales infectadas por este virus (14).

La proteína 1 de tipo receptor de interleucina-1, llamada IL-1RL1 o proteína ST2, perteneciente a la familia de proteínas receptoras de interleucina-1, se ha encontrado en niveles elevados en pacientes con enfermedades autoinmunitarias (15), como asma (16), fibrosis pulmonar (17) e infecciones virales.

En el dengue, la extravasación de plasma ocurre frecuentemente entre los días cuarto y sexto después de iniciarse la fiebre, cuando la viremia ha disminuido, lo cual revela el rol de los mecanismos inmunopatogénicos del huésped en la enfermedad

Correspondencia:

Luis Ángel Villar, Carrera 32 N° 29-31, oficina 304, Centro de Investigaciones Epidemiológicas, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, La Aurora, Bucaramanga. Teléfono: (577) 634 4000; extensión, 3205; fax: (577) 634 5781 luisangelvillarc@gmail.com

Recibido: 03/05/12; aceptado: 07/03/13

(18). En este proceso participan varias citocinas, especialmente el FNT α , y la IL-1 y la IL-6 derivadas de mastocitos (19), las cuales desempeñan un papel en la inducción de la extravasación de plasma y el choque. El FNT α se encuentra en pacientes con dengue y su relación con la gravedad ha sido propuesta recientemente (20,21). Yadav, *et al.*, (22) en 1991, reportaron asociación entre los niveles de TNF α y el choque por dengue. Otro mediador de interés es el TRAIL, que regula la replicación de monocitos infectados con el virus del dengue, lo cual evidencia así su actividad antiviral (23). La liberación de TRAIL como respuesta a la infección por el virus del dengue, hace parte importante de la respuesta inflamatoria que esta induce.

De igual forma, en otros estudios se asocian los niveles de ST2 con la fiebre por dengue (5), con valores mayores en aquellos que sufren infección secundaria, lo cual sugiere una posible asociación con la gravedad de la enfermedad. Estos niveles se correlacionaron negativamente con el número de plaquetas y, positivamente, con el valor de las transaminasas séricas y la prolongación del tiempo de protrombina. Todo ello apoya la idea de que la ST2 podría ser un marcador temprano la gravedad del dengue.

Considerando la información anterior y que la forma grave del dengue se asocia a procesos inflamatorios que afectan la integridad endotelial y la permeabilidad vascular, es posible formular la hipótesis de que en los pacientes con fiebre por dengue, los niveles séricos de FNT α , TRAIL, IDO y ST2, determinados antes de la aparición de complicaciones, puedan predecir el curso clínico de la enfermedad. En el presente estudio se evalúa la utilidad de estos mediadores como marcadores tempranos de dengue grave.

Pacientes y métodos

Tipo y población de estudio

Se diseñó un estudio de casos y controles anidado en una cohorte multicéntrica de pacientes febriles por dengue, residentes en las poblaciones de Bucaramanga, Cali, Neiva y Palmira, ciudades colombianas endémicas para esta enfermedad. (24). Los casos, libres de signos de alarma o complicaciones atribuibles al dengue en el momento de la inclusión, fueron ingresados en los servicios ambulatorios de urgencias o consulta oportuna en las primeras 96 horas de iniciada la fiebre o en las primeras 24 horas de hospitalización bajo el diagnóstico de dengue.

Procedimientos clínicos y de diagnóstico de dengue

Después de la firma del consentimiento informado, se hizo la evaluación médica registrando los signos y síntomas, y se obtuvieron muestras sanguíneas para diagnóstico. El seguimiento médico de los pacientes incluidos fue diario por, al menos, ocho días a partir del inicio de la fiebre; se prolongó en aquellos casos que desarrollaron complicaciones o presencia de signos de alarma.

La infección por el virus del dengue se confirmó mediante la conversión de negativo a positivo o la cuadruplicación de los títulos de anticuerpos de la clase IgM específica para dengue, en sueros pareados de fase aguda y de convalecencia, la transcriptasa inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) cualitativa, ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para NS1, o la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Esta confirmación fue llevada a cabo por el grupo de trabajo en virus emergentes y enfermedad (VIREM), de la Universidad del Valle.

El estudio fue aprobado por los comités de ética de las instituciones participantes, miembros de la Red AEDES.

Con una relación de 1:1 (caso:control), se seleccionaron 30 pacientes de cada grupo, pareados por edad, sexo y horas de evolución de la fiebre. Los casos fueron los pacientes con dengue grave, es decir, aquellos que durante el seguimiento hubieran presentaron signos clínicos o radiológicos de derrame pleural, ascitis, hipotensión (presión arterial media menor de 70 mm de Hg o presión de pulso menor de 20 mm de Hg), acompañados de un recuento de plaquetas por debajo de 100.000/mm³, con manifestaciones hemorrágicas o sin ellas, alteraciones del sensorio o aumento del tamaño del hígado. Se consideraron controles los pacientes febriles con diagnóstico confirmado de dengue y dos o más de las siguientes manifestaciones: náuseas, vómitos, exantema, mialgias y artralgias, petequias o prueba del torniquete positiva o leucopenia; ninguno de ellos presentó signos de alarma o complicaciones durante el seguimiento (25).

Procedimientos de laboratorio

Las muestras sanguíneas recolectadas al ingreso al estudio se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos y el suero obtenido se dividió en alícuotas y posteriormente se almacenó a una temperatura de -70 °C hasta el día del análisis. Los niveles

de IDO se cuantificaron con el estuche comercial de ELISA (Uscn, Inc; Ref. E91547Hu), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los niveles de TNF α , TRAIL y ST2 se cuantificaron con estuches comerciales de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Ref. DTA00C, DTRL00, DST200), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Análisis estadístico

Se estimaron las medianas y rangos intercuartílicos para cada biomarcador. Las diferencias en la mediana de las concentraciones entre casos y controles, se evaluaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U. Se utilizaron curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para determinar en cada biomarcador el punto de corte que identifique

tempranamente, con una sensibilidad del 90 %, a los pacientes que presentaron complicaciones. Una vez determinado dicho punto de corte, estos valores se dicotomizaron para estimar su asociación (razón de momios, OR, e intervalo de confianza del 95 %) con dengue grave en tablas de contingencia para casos y controles apareados. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas con la prueba de χ^2 y un valor de $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo.

Resultados

Participaron en el estudio 60 pacientes con diagnóstico de dengue, de quienes el 63,3 % (38/60) eran hombres y el 36,7 % (22/60) mujeres. El rango de edad estuvo entre los 4 y 73 años, la

Cuadro 1. Características de la población de estudio

Variable	Grupo		Total	p
	Caso (n=30) n (%)	Control (n=30) n (%)		
Sexo				
Femenino	11 (36,7)	11 (36,7)	22 (36,7)	1,0
Masculino	19 (63,3)	19 (63,3)	38 (63,3)	
Edad (años)				
0-4	0 (0,0)	1 (3,3)	1 (1,7)	0,4
5-14	14 (46,7)	12 (40,0)	26 (43,3)	
15 y más	16 (53,3)	17 (56,7)	33 (55,0)	
Raza				
Mestiza	27 (90,0)	29 (96,7)	56 (93,3)	0,6
Blanca	3 (10,0)	1 (3,3)	4 (6,7)	
Horas de enfermedad				
96 o menos	26 (86,7)	21 (70,0)	47 (78,3)	0,1
Más de 96	4 (13,3)	9 (30,0)	13 (21,7)	
Tipo de cohorte				
Hospitalario	11 (36,7)	4 (13,3)	15 (25,0)	0,037
Ambulatorio	19 (63,3)	26 (86,7)	45 (75,0)	

Cuadro 2. Características clínicas de la población de estudio

Variable	Grupo		Total	p
	Caso (n=30) n (%)	Control (n=30) n (%)		
Fiebre (>38,5 °C) en el momento de la valoración	8 (26,7)	3 (10,0)	11 (18,3)	0,09
Vómito	13 (43,3)	21 (70,0)	34 (56,7)	0,03
Diarrea	8 (26,7)	11 (36,7)	19 (31,7)	0,4
Cefalea	28 (93,3)	27 (93,1)	55 (93,2)	0,9
Dolor retroocular	17 (56,7)	19 (65,5)	36 (61,0)	0,4
Mialgias	27 (90,0)	26 (89,7)	53 (89,8)	0,9
Sin deshidratación	11 (36,7)	26 (86,7)	37 (61,7)	0,000
Deshidratación de grado 1	13 (43,3)	4 (13,3)	17 (28,3)	
Deshidratación de grado 2	6 (20,0)	0 (0,0)	6 (10,0)	
Presión arterial media ≤ 70 mm Hg	14 (46,7)	0 (0,0)	14 (30,4)	0,001
Presión de pulso <20 mm de Hg	14 (46,7)	0 (0,0)	14 (23,3)	0,000

mayoría distribuidos entre los 15 años o más. El 93 % de los individuos tenía entre 48 y 96 horas de evolución de síntomas al momento de la inclusión. No hubo diferencias en edad, sexo y horas de evolución entre dengue grave y dengue no grave, pero, como era de esperarse, sí hubo una mayor proporción de casos (dengue grave) en la cohorte hospitalaria que en la ambulatoria (cuadro 1). La cefalea, las mialgias y el dolor retroocular fueron los síntomas más frecuentes. Los casos presentaron con mayor frecuencia deshidratación y signos de trastornos hemodinámicos (cuadro 2).

Los niveles de ST2, TRAIL y FNT α fueron significativamente más altos ($p < 0,0001$) en los pacientes que presentaron dengue grave, comparados con aquellos con dengue no grave: 1.274,7 pg/ml Vs. 651,5 pg/ml, 88,5 pg/ml Vs. 69,9 pg/ml y 92,6 pg/ml Vs. 61,64 pg/ml, respectivamente. El punto de corte para cada marcador se estableció en: 700 pg/ml para ST2, 75 pg/ml para TRAIL y 81

pg/ml para TNF α . Los valores de la sensibilidad y la especificidad arrojados por la cuantificación de ST2, fueron de 90 % y 73,3 %, respectivamente. No se observaron diferencias en los niveles de IDO entre los pacientes con dengue grave y aquellos con dengue no grave ($p=1,000$) (cuadros 3 y 4) (figura 1).

Discusión

El dengue es extensamente aceptado como una enfermedad inmunopatogénica (26). Desde esta perspectiva, la patogénesis del dengue puede explicarse por varias hipótesis implicadas en los factores inmunitarios, incluyendo: 1) aumento de la infección viral mediante anticuerpos de reacción cruzada, 2) activación de la memoria de células T de reacción cruzada, 3) acción de citocinas y 4) activación del complemento.

La teoría de la tormenta de citocinas propone que la producción no regulada de citocinas durante la

Cuadro 3. Concentraciones de biomarcadores en la población de estudio

Prueba bioquímica	Dengue grave	n	Mediana	(Q1 - Q3)	Mínimo	Máximo	p
IDO (ng/ml)	Sí	30	40,9	(13,9 - 110,8)	8,1	215,7	0,1
	No	30	24,3	(11,3 - 57,8)	9,5	218,6	
	Total	60	30,7	(12,3 - 96,6)	8,1	218,6	
TRAIL* (pg/ml)	Sí	30	88,55	12,21	68,1	110,5	< 0,0001
	No	30	69,93	7,69	56,3	85,7	
	Total	60	79,24	13,80	56,3	110,5	
TNF α * (pg/ml)	Sí	30	92,61	9,83	75,5	116,1	< 0,0001
	No	30	61,64	9,06	47,7	78,3	
	Total	60	77,13	18,22	47,7	116,1	
ST2 (pg/ml)	Sí	30	1274,7	(1231,9 - 1389,0)	653,3	1481,9	< 0,0001
	No	30	651,5	(596,9 - 704,0)	180,4	1374,7	
	Total	60	729,4	(650,1 - 1278,3)	180,4	1481,9	

* Por tener distribución normal, se reporta media y desviación estándar y valor de significación corresponde a la prueba t para comparación de medias

Cuadro 4. Asociación entre biomarcadores y dengue grave

Biomarcador		Dengue grave		Total	OR IC95%	p
		Sí (n=30)	No (n=30)			
ST2	>700	27 (90,0)	8 (26,7)	35 (58,3)	24,8 (6,1-98,0)	<0,0001
	≤700	3 (10,0)	22 (73,3)	25 (41,7)		
TRAIL	>75	27 (90,0)	10 (33,3)	37 (61,7)	18,0 (4,6-69,1)	<0,0001
	≤75	3 (10,0)	20 (66,7)	23 (38,3)		
TNF α	>81	28 (93,3)	0 (0,0)	28 (46,7)	*NC	<0,0001
	≤81	2 (6,7)	30 (100,0)	32 (53,3)		
IDO	>10	28 (93,3)	28 (93,3)	56 (93,3)	1,00 (0,2-6,1)	1,000
	≤10	2 (6,7)	2 (6,7)	4 (6,7)		

*NC: no calculable al haber una casilla sin elementos

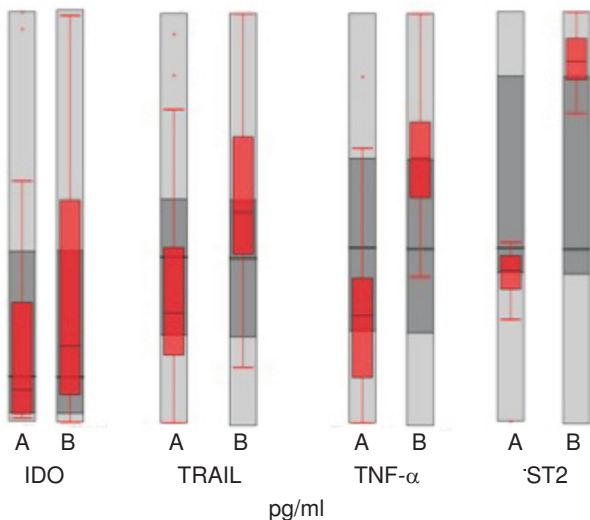


Figura 1. Los histogramas representan la dispersión de los valores de cuatro biomarcadores estudiados en 60 pacientes. En gris claro está representado el rango de valores de cada biomarcador estimados por ELISA, excepto para IDO, cuyo valor es derivado de la actividad enzimática por ensayo colorimétrico. Para IDO el rango fue de 8.07-218.62 pg/ml, para $TNF-\alpha$ fue de 47.66 a 116.09 pg/ml, para TRAIL fue de 56.34 a 110.48 pg/ml y para ST2 fue de 180.43 a 1481.86 pg/ml. Los histogramas en gris oscuro representan los valores del 50 % de los datos, la línea negra de corte representa el valor de la mediana. Los histogramas en rojo representan los valores para dengue no grave (A) y para dengue grave (B) las barras representan valores mínimos y máximos en cada uno de los grupos.

infección por dengue contribuye a la enfermedad. Se cree que estas citocinas son el producto de la activación masiva de células T (27). De acuerdo con el “pecado antigénico original” propuesto por Mongkolsapaya, *et al.*, (28), la expansión preferencial de células T de memoria de la infección primaria incrementa la afinidad de las células T de la infección actual, lo cual promueve la respuesta de citocinas que, en lugar de proteger al huésped, lo ponen en peligro. Sin embargo, esto no explica el desarrollo de dengue grave en niños con infección primaria. Se ha reportado regulación exagerada de los niveles de citocinas en pacientes menores de un año de edad con dengue (29), lo cual indica que la alteración de los perfiles de citocinas no está únicamente dirigida por las células mediadoras de respuesta inmunitaria.

Cabe la hipótesis de que el incremento de la respuesta de citocinas en niños con dengue se origine a partir de células del sistema inmunitario innato (dianas para la replicación inicial de dengue) y no de las células T; por ejemplo, los experimentos *in vitro* muestran que los monocitos y las células dendríticas pueden actuar como una fuente importante de citocinas durante la infección

por dengue (30,31). Chen, *et al.*, (32) propusieron un modelo de patogénesis de dengue en el cual la producción de citocinas por monocitos durante la fase temprana de la infección desencadena una cascada de sucesos que eventualmente conducen a un incremento de la respuesta de citocinas y aumentan la permeabilidad vascular.

Se ha demostrado que el FNT α activa células endoteliales y puede iniciar eventos que implican la disfunción de las mismas y, así, podría participar en algunas de las manifestaciones clínicas y de laboratorio observadas en pacientes con dengue hemorrágico y síndrome del choque del dengue; además, el FNT α se considera una molécula antiviral que puede tener importancia en la atenuación de la infección por el virus del dengue (33).

Houghton-Trivino y Salgado (34), en 2009, encontraron niveles altos de ST2 en sueros de pacientes con dengue grave, comparados con los de pacientes con dengue no grave y pacientes con enfermedad respiratoria aguda. Warke y Martín (23), en 2008, apoyaron la idea de que el interferón de tipo I, el cual es conocido como inhibidor del virus del dengue, puede inducir al TRAIL como parte de la respuesta contra esta infección. En modelos *in vivo* de ratones infectados con influenza y virus de la encefalomiocarditis, el TRAIL se ha relacionado estrechamente como agente antiviral (35). La eliminación del virus de la influenza fue prolongada en ratones inyectados con anticuerpos anti-TRAIL (36). En estudios previos se ha demostrado que se presentan concentraciones altas de IDO en casos de dengue, cuando se compara con otras causas del síndrome febril inespecífico; sin embargo, al comparar los niveles entre pacientes con dengue, sus resultados son inconclusos ya que han incluido una población insuficiente de casos de dengue grave (37).

En este estudio se observó un incremento significativo de los niveles de FNT α para la forma grave de la enfermedad, hallazgos ya descritos en la literatura científica (38,39). Los niveles de ST2 fueron más elevados en dengue grave comparados con dengue no grave; estos resultados sugieren que los niveles de ST2 podrían estar correlacionados con la gravedad del cuadro clínico. Los niveles de TRAIL fueron más altos en el grupo de pacientes con la forma grave de la enfermedad, lo que demuestra que es mediador de las funciones antivirales y, a su vez, permitió asociarlo con la complicación de la enfermedad.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IDO entre las dos presentaciones de la

enfermedad utilizando la ELISA, a diferencia de lo encontrado por Becerra, *et al.*, al medir la actividad enzimática de IDO en suero (37). En este estudio, la cuantificación de ST2, TRAIL y TNF α se hizo en la fase aguda de la enfermedad (menos de 96 horas de evolución); por ello, se podría argumentar que estos biomarcadores participan en la patogénesis temprana del dengue. Esto podría constituir una herramienta valiosa para la identificación de los grupos en riesgo de desarrollar la forma grave de la enfermedad. Estos hallazgos reafirman la idea de que la respuesta inflamatoria y la regulación de citocinas juegan un papel esencial en el desarrollo de la forma grave de la infección (40).

Estos resultados, si bien concuerdan con hallazgos previos, requieren ser validados en nuevos estudios de cohorte, con la inclusión de un mayor número de pacientes y eventos. También, se hace necesario determinar el tipo de infección (primaria o secundaria) para asociar esta variable con el posible aumento de mediadores de respuesta inmunitaria en la etapa temprana de la enfermedad. Con este estudio se pudo constatar que FNT α , ST2 y TRAIL están involucrados en la infección por dengue en la fase inicial de la enfermedad y parecieron ser un marcador de infección grave (factor predictor de gravedad), porque su comportamiento fue diferente en las dos formas clínicas. Es importante resaltar que los niveles séricos de FNT α estuvieron elevados más constantemente en la forma grave de la enfermedad, caso contrario al IDO, cuyos niveles fueron prácticamente iguales tanto en la forma grave como en la no grave. Para determinar el punto de corte que identificar tempranamente las complicaciones, se usaron curvas ROC (véase métodos).

En conclusión, en etapas tempranas de la infección por el virus del dengue, la cuantificación de ST2, TRAIL y TNF α es una promisoriosa herramienta para predecir complicaciones de la enfermedad. Estos hallazgos deben ser corroborados en futuros estudios para generalizar su valor pronóstico en el seguimiento clínico del dengue. Este estudio es el primero en relacionar valores de ST2, TRAIL y TNF α con la presentación grave del dengue.

Agradecimientos

Agradecemos a todo nuestro equipo y, en especial, a Janeth Flórez, Anyela Lozano, Luz Aída Rey, Diana Marín y Lucelly López, por su valioso soporte en las diferentes etapas del diseño de estudio, a Daniel Echeverri por el apoyo en el trabajo de

campo y a todas las instituciones de salud donde se realizó el estudio multicéntrico.

Conflicto de interés

Los autores declaramos que no existe conflicto de interés.

Financiación

Este estudio está anidado en la cohorte de pacientes del proyecto 1102-459-21561, cofinanciado por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología, Colciencias.

Grupos de investigación participantes en la Red AEDES:

Grupos de Epidemiología Clínica, Observatorio Epidemiológico de Enfermedades Cardiovasculares y Centro de Investigación en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas-CINTROP de la Universidad Industrial de Santander; Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas-CIDEIM; Asociación de Centros de Investigación y Desarrollo Tecnológico; Grupo de Enfermedades Tropicales de la Universidad del Norte; Grupo de Inmunovirología de la Universidad de Antioquia; Grupos Epidemiología y Salud Poblacional y Virus Emergentes y Enfermedad-VIREM de la Universidad del Valle; Grupo Parasitología y Medicina Tropical de la Universidad Surcolombiana; Grupo Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas y Grupo GIEPATI Investigación en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas de la Universidad de Pamplona; Universidad de Michigan e Instituto de Tecnología de la Johns Hopkins University.

Referencias

1. **Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud.** Dengue: guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Fecha de consulta: 20 de enero de 2012. Disponible en: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/ndeng31482.pdf>
2. **Padilla JC, Rojas DP, Sáenz R.** Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Primera edición. Bogotá; 2012. p. 18-32.
3. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín de Vigilancia de Dengue en Colombia. Grupo ETV. Boletín 6. Fecha de consulta: 23 de enero de 2012. Disponible en: http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/reliefweb_pdf/node-472915.pdf
4. **World Health Organization.** Dengue hemorrhagic fever diagnosis treatment and control. Fecha de consulta: 15 de enero de 2012. Disponible en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/print.html>

5. **Becerra A, Warke RV, de Bosch N, Rothman AL, Bosch I.** Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients. *USA. Cytokine.* 2008;41:114-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2007.11.001>
6. **Bradley JR.** TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214:149-60. <http://dx.doi.org/10.1002/path.2287>
7. **Gubler DJ.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:480-96.
8. **Huang Y, Sheikh MS.** TRAIL death receptors and cancer therapeutics. *Rev Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;224:284-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.007>
9. **Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al.** Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science.* 1997;277:818-21. <http://dx.doi.org/10.1126/science.277.5327.818>
10. **Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Okumura K.** TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci.* 2004;95:777-83. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb02181.x>
11. **Daubener W, Spors B, Hucke C, Adam R, Stins M, Kim KS, et al.** Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Infect Immun.* 2001;69:6527-31. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.10.6527-6531.2001>
12. **Obojes K, Andres O, Kim KS, Daubener W, Schneider J.** Indoleamine 2, 3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon. *J Virol.* 2005;79:7768-76. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.12.7768-7776.2005>
13. **Oberdörfer C, Adams O, MacKenzie CR, De Groot CJ, Däubener W.** Role of IDO activation in anti-microbial defense in human native astrocytes. *Rev Med Biol.* 2003;527;15-26.
14. **King NJ, Thomas SR.** Molecules in focus: Indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Biochem Cell Biol.* 2007;39:2167-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2007.01.004>
15. **Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, Minota S, Tominaga S.** Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases. *Rev Biochem Biophys Res Commun.* 2001;284:1104-8. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.5090>
16. **Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Ohno S, et al.** Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:277-81.
17. **Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, Sugiyama Y.** Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2002;32:1520-6. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2745.2002.01494.x>
18. **Long HT, Hibberd ML, Hien TT, Dung NM, van Ngoc T, Farrar J, et al.** Patterns of gene transcript abundance in the blood of children with severe or uncomplicated dengue highlight differences in disease evolution and host response to dengue virus infection. *J Infect Dis.* 2009;199:537-46. <http://dx.doi.org/10.1086/596507>
19. **King CA, Marshall JS, Alshurafa H, Anderson R.** Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. *J Virol.* 2000;74:7146-50.
20. **Rothman AL, Green S, Libraty DH, Ennis FA.** Dengue: Translating scientific progress into workable solutions. *Anti Infect Ther.* 2005;3:689-92.
21. **Kurane, I.** Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007;30:329-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2007.05.010>
22. **Yadav M, Kamath KR, Iyngkaran N, Sinniah M.** Dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome: Are they tumor necrosis factor-mediated disorders. *FEMS Microbiol Immunol.* 1991;4:45-9. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097\(91\)90062-F](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097(91)90062-F)
23. **Warke RV, Martin KJ, Giaya K, Shaw SK, Rothman AL, Bosch I.** TRAIL is a novel antiviral protein against dengue virus. *J Virol.* 2008;82:555-64. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01694-06>
24. **Organización Mundial de la Salud.** Dengue y dengue hemorrágico. Fecha de consulta: 23 de agosto de 2011. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>
25. **TDR/WHO.** Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Third edition. Geneva: WHO; 2009. p. 2.
26. **Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM.** A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38:172-80.
27. **Dong T, Moran E, Vinh Chau N, Simmons C, Luhn K, Peng Y, et al.** High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. *PLoS One.* 2007;2:e1192. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001192>
28. **Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al.** Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003;9:921-7. <http://dx.doi.org/10.1038/nm887>
29. **Chau TN, Quyen NT, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Dung NT, et al.** Dengue in Vietnamese infants-results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *Infect Dis.* 2008;198:516-24. <http://dx.doi.org/10.1086/590117>
30. **Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, et al.** Dengue hemorrhagic fever in infants: A study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis.* 2004;189:221-32. <http://dx.doi.org/10.1086/380762>
31. **Becerra A, Warke RV, Martin K, Khaja K, de Bosch N, Rothman AL, et al.** Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators *in vivo*. *Med Virol.* 2009;81:1403-11. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21538>
32. **Chen YC, Wang SY.** Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: Productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of

- lipopolysaccharide. *J Virol.* 2002;76:9877-87. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21538>
33. **Hober D, Nguyen TL, Shen L, Ha DQ, Huong VT, Benyoucef S, *et al.*** Tumor necrosis factor alpha levels in plasma and whole-blood culture in dengue-infected patients: Relationship between virus detection and pre-existing specific antibodies. *J Med Virol.* 1998;54:210-8. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199803\)54:3<210::AID-JMV12>3.0.CO;2-L](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199803)54:3<210::AID-JMV12>3.0.CO;2-L)
34. **Houghton TN, Salgado DM, Rodríguez JA.** Levels of soluble ST2 in serum associated with severity of dengue due to tumour necrosis factor alpha stimulation. *J Gen Virol.* 2010;91:697-706. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.012971-0>.
35. **Ishikawa EM, Nakazawa M, Yoshinari M, Minami M.** Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune response to influenza virus infection in mice. *J Virol.* 2005;79:7658-63. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.12.7658-7663.2005>
36. **Sato KT, Nakaoka N, Yamashita H, Yagita H, Kawasaki C, Morimoto M, *et al.*** TRAIL-transduced dendritic cells protect mice from acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *J Immunol.* 2005;174:4025-33.
37. **Becerra A, Warke RV, Xhaja K, Evans B, Evans J, Martin K, *et al.*** Increased activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in serum from acutely infected dengue patients linked to gamma interferon antiviral function. *J Gen Virol.* 2009;90:810-81. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.004416-0>.
38. **Kuno G, Bailey RE.** Cytokine responses to dengue infection among Puerto Rican patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89:179-82. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-0276199400200010>
39. **Vitarana T, de Silva H, Withana N, Gunasekera C.** Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Ceylon Med J.* 1991;36:63-5.
40. **Clyde K, Kyle JL, Harris E.** Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol.* 2006;80:11418-31. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01257-06>