

CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LA LINFOPOYETINA DEL ESTROMA
TIMICO (TSLP) EN NIÑOS ENTRE LOS 1 Y 14 AÑOS INFECTADOS POR
VIRUS DENGUE EN FASE AGUDA Y DE CONVALECENCIA EN EL HOSPITAL
UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO DE NEIVA ENTRE
ENERO DE 2009 Y DICIEMBRE DE 2010

JHONNY KEY MUÑOZ MUÑOZ
GERMÁN DAVID PASTRANA CEFERINO

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA MEDICINA
NEIVA - HUILA
2012

CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LA LINFOPOYETINA DEL ESTROMA
TIMICO (TSLP) EN NIÑOS ENTRE LOS 1 Y 14 AÑOS INFECTADOS POR
VIRUS DENGUE EN FASE AGUDA Y DE CONVALECENCIA EN EL HOSPITAL
UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO DE NEIVA ENTRE
ENERO DE 2009 Y DICIEMBRE DE 2010

JHONNY KEY MUÑOZ MUÑOZ
GERMÁN DAVID PASTRANA CEFERINO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Médico.

Asesor
GILBERTO MAURICIO ASTAIZA
Md. Ph.D(C) Especialista en Epidemiología

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA MEDICINA
NEIVA-HUILA
2012

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Neiva, Enero del 2012

DEDICATORIA

A Dios, por haber sembrado en nosotros la vocación de servir.

A nuestras familias, por proveernos el apoyo, fortalecer nuestro ser y soñar
con nosotros este ideal.

A nuestros docentes, por compartir con nosotros la riqueza del
conocimiento construido a lo largo de la experiencia y motivar el deseo de
servir a la humanidad con nuestras habilidades y saberes.

**JHONNY KEY
GERMÁN DAVID**

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos:

A los pacientes que participaron voluntariamente en este estudio.

A la Institución Educativa Ángel María Paredes de Neiva.

Al personal del servicio de Pediatría del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva y al semillero de investigación SINEDIR por su apoyo al estudio.

A todos mil gracias.....

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. ANTECEDENTES	15
2. DESCRIPCIÓN Y FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	18
3. JUSTIFICACION	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. MARCO TEORICO	24
6. HIPÓTESIS	40
7. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	41
8. DISEÑO METODOLOGICO	43
8.1 TIPO DE ESTUDIO	43
8.2 UBICACIÓN DEL ESTUDIO	43
8.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO	43
8.3.1 Población	43
8.3.2 Muestra	44
8.3.3 Muestreo	44
8.4 TECNICAS	44
8.5 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS	45
8.6 PLAN DE TABULACION Y ANALISIS DE DATOS	47

		Pág.
9.	CONSIDERACIONES ETICAS	48
10.	RESULTADOS	49
11.	DISCUSIÓN	55
12.	CONCLUSIONES	58
13.	RECOMENDACIONES	59
	BIBLIOGRAFIA	60
	ANEXOS	67

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Signos de alarma de dengue	30
Tabla 2 Signos de choque	31

LISTA DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1	Operacionalización de variables	41
Cuadro 2	Características sociodemográficas	49
Cuadro 3	Concentraciones plasmáticas de TSLP	50

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Comparación de las concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados con VD, sanos y atópicos	51
Figura 2	Concentración plasmática de TSLP en niños infectados por VD en fase aguda y convaleciente de la infección	52
Figura 3	Ausencia de relación entre los niveles de TSLP y el conteo de plaquetas circulantes	53

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A Consentimiento Informado	68
Anexo B Artículo de Investigación	69

RESUMEN

La linfopoyetina estromal tímica (TSLP) es una citoquina recientemente descrita que juega un papel clave en la fisiopatología de enfermedades alérgicas y parasitarias. La TSLP, luego de ser producida por el epitelio en respuesta a diferentes estímulos, entre ellos algunos componentes bacterianos y virales, induce a que células dendríticas locales se condicionen a generar una respuesta de linfocitos Th2. En el dengue, una enfermedad viral febril endémica en Colombia, un predominante perfil de citoquinas Th2 ha sido descrito en los niños que presentan formas severas y potencialmente letales de la enfermedad.

Aquí se determinaron por técnica de ELISA, las concentraciones plasmáticas de TSLP en niños con dengue en fase aguda y convaleciente de la enfermedad, comparándolos con los niveles presentes en niños sanos y atópicos como control. Los resultados indican que no hay diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de TSLP entre los niños sanos y los niños infectados con dengue en fase aguda. Sin embargo, una disminución significativa fue encontrada en los niños infectados entre la etapa aguda y convaleciente de la infección. Cuando se compararon los niveles de TSLP con el número de plaquetas, un conocido marcador de severidad en el dengue, no hubo relación.

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el TSLP plasmático podría no estar implicado directamente en la fisiopatología de la infección por virus dengue.

Otros factores de polarización de linfocitos T locales y sistémicos deberían ser evaluados.

Palabras claves. Virus dengue (VD), Linfopoyetina estromal tímica (TSLP), linfocitos T (LT), Th2, ELISA.

ABSTRACT

Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) is a recently described cytokine involved in the physiopathogenesis of allergic and parasitary diseases. After delivery for epithelial cells in response to microbial components, the TSLP modulates the function of dendritic cells to promote a Th2 lymphocyte response. In dengue, a viral febrile disease endemic in Colombia, a predominant Th2 cytokine pattern has been described in severely illness children.

Here, we determined by ELISA the plasma concentration of TSLP in healthy and acute-convalescent dengue infected children using atopic children as control. Level of plasma TSLP between healthy and acutely dengue infected children was not different and just atopic children showed significant higher levels of TSLP. An significant decrease in plasmatic TSLP was noted between the acute and convalescent phase of the dengue infection. The thrombocytopenia, a marker of dengue severity did not correlate with levels of TSLP.

Our results suggest that plasma TSLP could not be involved in the pathogenesis of dengue infection in children and other biomarkers should be explored.

Keywords. Dengue Virus (DV), Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), T lymphocytes (LT), Th2, ELISA.

INTRODUCCION

La Linfopoyetina del estroma tímico (TSLP) es un citocina recientemente descrita, miembro de la familia de citoquinas hematopoyéticas en las que se incluye la interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-7 entre otras y que ha sido detallada ampliamente en modelos de enfermedades alérgicas como el asma bronquial y la dermatitis atópica¹. El TSLP, luego de ser inducido por diferentes estímulos como algunos componentes de patógenos, entre los que se encuentran algunos virus, tiene una acción principalmente sobre las células dendríticas (CD), educándolas de tal forma que estas células con posterioridad actuarán sobre los linfocitos T CD4+ vírgenes, induciendo una polarización hacia los linfocitos Th2 (del inglés T helper), con la subsecuente liberación de IL-4, IL-5 e IL-13. Siendo los virus inductores de la producción de TSLP, y éste ultimo una citocina que induce fuertemente el perfil Th2, despierta especial interés averiguar sobre la posibilidad de que esta molécula pueda estar implicada en la fisiopatología de la infección por virus dengue (VD), teniendo en cuenta que en el 70% de pacientes con formas severas de dengue, presentan picos de concentración plasmática de interleucinas tipo Th2 entre el cuarto y el octavo día de iniciado los síntomas.

El dengue es una enfermedad ocasionada por un virus RNA de cadena sencilla, icosaédrico, de la familia Flaviviridae, que afecta a personas de todos los grupos de edades y representa la arbovirosis más común en el mundo. La infección tiene un amplio espectro clínico de enfermedad que va desde las formas asintomáticas e inaparentes hasta cuadros graves de choque y falla multiorgánica. Esta enfermedad se encuentra virtualmente en todas las áreas tropicales y se estima que causa anualmente 100 millones de casos nuevos de los cuales 25.000 son letales².

El objetivo de este estudio es determinar la concentración plasmáticas de TSLP en niños, inducido por la infección natural por VD, en fase aguda y de convalecencia de la enfermedad y determinar si existe asociación entre estas y las manifestaciones clínicas de severidad, usando la técnica de ELISA para realizar las mediciones de TSLP en plasma de voluntarios y establecer diferencias significativas entre las concentraciones plasmáticas de TSLP entre niños sanos y niños infectados con VD.

1. ANTECEDENTES

Múltiples modelos experimentales han estudiado la función en la activación de células T efectoras y la consecuente producción de citoquinas que definen de manera importante el curso de la enfermedad en la infección por VD³.

Un estudio realizado en 117 pacientes, con distintos grados de enfermedad, durante un brote epidémico ocurrido en 1996 en la ciudad de Lucknow, India, evaluó la concentración de citoquinas tipo Th1 (IFN- γ) y citoquinas Th2 (IL-4), entre otras, en las muestras de suero de éstos pacientes para correlacionarlas posteriormente con el grado y duración de la enfermedad. En este estudio se encontró que las concentraciones en suero de IFN- γ e IL-2 fueron altas en las formas leves de la enfermedad, mientras que en las formas más graves y severas de la infección las concentraciones de IL-4, IL-6 e IL-10 fueron máximas. Además las concentraciones de TNF- α fueron altas en todos los casos de enfermedad por VD, comparados con los controles sanos. Las concentraciones de TNF- α e IFN- γ se incrementaron en las etapas iniciales de la enfermedad mientras que las concentraciones de IL-4, IL-6 e IL-10 tendían a incrementarse durante el cuarto al octavo día del inicio de los síntomas. El hallazgo más significativo en éste estudio fue la predominante respuesta tipo Th1 observada en el 66% de los pacientes con formas leves de la enfermedad, mientras que en los pacientes con formas severas se observó que el 71% tuvieron una respuesta inmune con predominio de citoquinas tipo Th2⁴. Esto indica el importante papel que desempeñan los linfocitos Th2 en la patogénesis y manifestaciones clínicas de la infección por VD. Resultados similares se han reportado en estudios in vitro en cultivos con leucocitos humanos de sangre periférica infectados con VD⁵.

La infección por virus dengue y su asociación con la expresión de citocinas proinflamatorias y la respuesta Th2 mediada por la infección⁶, que condicionan la patogénesis de la enfermedad, han sido objeto de múltiples estudios, donde se ha establecido la relación de la expresión de citocinas pro inflamatorias en la historia natural de la infección por virus dengue como Interferon-gamma (IFN-gamma), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa), interleucina 6 (IL-6)⁷⁻⁹. También se ha estudiado la posible influencia de éstas en las células dendríticas durante la infección¹⁰.

Otras moléculas como la IL-10, la proteína inflamatoria del macrófago 1- α (MIP-1 α), proteína cofactor de membrana-1 (MCP-1), IL-8, ST-2 y MIP-1 β son estudiadas como posibles factores asociados a la infección por virus dengue y la severidad de la enfermedad¹¹⁻¹⁵.

Además de la posible interacción en la infección con virus dengue, citocinas y quimocinas como CXCL-9, 10 y 11 y metaloproteinasas (MMP) como la MMP-9, que podrían estar relacionadas con los cuadros severos¹⁶⁻¹⁷, se ha estudiado la influencia de los receptores tipo toll 2 y 4 y el antígeno leucocitario humano DR (HLA-DR) tanto en los cuadros leves y severos de la infección¹⁸.

El estudio de nuevas citocinas en dengue, representan un primer paso en el descubrimiento de los mecanismos moleculares que interactúan en la infección por virus dengue; una de estas moléculas es la linfopoyetina estroma tímico (TSLP por sus siglas en ingles), descrita desde 1994, como una molécula involucrada con el desarrollo de células B murinas de estroma tímico in vitro¹⁹⁻²⁰; con una función importante en la diferenciación de células de linaje B B220/IgM+ y una estrecha relación con la IL-7, debido a que utiliza la cadena alfa del receptor de la IL-7 para su señalización²¹; la TSLP fue posteriormente descrita en seres humanos como una citocina hemopoyetica, principalmente expresada por células mieloides que la maduración de células dendríticas CD11c+, una fuerte expresión de moléculas coestimuladoras y la proliferación de células T CD4+ vírgenes²². La TSLP es expresada por diferentes tipos de células, principalmente por las células epiteliales, quienes juegan un papel importante en la respuesta inmune mediada por linfocitos Th2; se demostró además la posible función de la TSLP en la iniciación de la inflamación alérgica, debido a que induce la expresión de citocinas proalérgicas como IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α , mientras regula la expresión de la IL-10 y el IFN- γ ²³.

La TSLP ha sido objeto de estudio en múltiples modelos experimentales, principalmente alérgicos pero también parasitarios, relacionados con su función en la activación de células dendríticas que median una respuesta inmune Th2 y en la inducción de citocinas proalérgicas que podrían representar un blanco terapéutico de estas enfermedades²⁴⁻²⁵.

En 2005 se describió la función del TSLP como mediador de la inflamación en un modelo de asma, induciendo una marcada respuesta inmune Th2 y proliferación de linfocitos T CD4+ en la respuesta a antígenos en modelos estudiados en ratones, knockout para la porción alfa del receptor de la TSLP, se pudo evidenciar la deficiente respuesta alérgica en el pulmón a los antígenos inhalados, demostrando con esto el importante papel de esta molécula como orquestador de la polarización Th2 en la atopía²⁶.

En 2006, en un modelo de dermatitis atópica, se establece la relación directa entre la expresión de TSLP y la patogénesis de esta enfermedad in vivo, y se comienza

a dilucidar los diferentes mecanismos moleculares que culminan en la inducción de una respuesta inflamatoria mediada por la TSLP²⁷⁻²⁸.

Se ha estudiado la intervención del TSLP en la patogénesis en modelos de artritis inflamatoria²⁹; enfermedades intestinales inflamatorias en modelos con infección por helmintos, colitis³⁰ y en la respuesta IgE³¹.

Actualmente la dirección de la investigación en TSLP se halla principalmente en su función como mediador en respuestas alérgicas y como regulador de la barrera inmune en modelos intestinales e infecciosos³²⁻³⁴.

El papel del TSLP en la respuesta inmune frente a agentes virales no ha sido ampliamente investigado, pero en algunos modelos virales la TSLP ha demostrado jugar un posible papel como mediador inflamatorio acarreado una respuesta inmune Th2 con la subsecuente producción de IL-4, IL-5, IL-13 y TNF-alfa, mediada en primera instancia por la activación de células dendríticas mieloides³⁵⁻³⁸.

La asociación entre la TSLP y la infección por virus dengue (VD), no ha sido investigada hasta el momento y representa un nuevo terreno de exploración, pero basados en los resultados obtenidos en modelos virales con virus RNA de cadena sencilla como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que demuestran que el TSLP, es un potente mediador en la patogénesis de la infección y representa un puente para el desarrollo de la infección por virus en células epiteliales de simios y su diseminación sistémica³⁶, se espera hallar una relación en la expresión de TSLP y la infección por VD.

2. DESCRIPCIÓN Y FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El dengue es una enfermedad transmitida por el vector *Aedes Aegypti*; provocada por el virus dengue, virus RNA de cadena sencilla, icosaédrico, de la familia *Flaviviridae*, del cual se conocen 4 serotipos, la infección por virus dengue produce una enfermedad de amplio espectro clínico incluyendo desde cuadros asintomáticos hasta cuadros graves, que pueden conducir a la muerte. Entre las formas graves podemos encontrar sobreinfecciones, hepatitis, insuficiencia hepática, insuficiencia renal aguda, síndrome hemolítico urémico, encefalopatía, miocarditis, hemorragias severas y choque.

A nivel mundial el dengue representa un gran problema de salud en regiones de clima tropical y subtropical de todo el mundo, principalmente en zonas urbanas y semiurbanas, donde el 40% de la población mundial, es decir, unos 2,5 mil millones de personas corren el riesgo de contraer la enfermedad y la OMS calcula que anualmente se presentan 50 millones de casos de dengue en todo el mundo. La enfermedad es endémica en más de 100 países de África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental, donde las dos últimas son las regiones más afectadas por la enfermedad. Antes de 1970 sólo nueve países habían sufrido epidemias de Dengue Hemorrágico, cifra que en 1995 se había multiplicado por más de cuatro lo que indica que la incidencia del dengue ha aumentado extraordinariamente en todo el mundo en los últimos decenios.

Cada año se producen unas 500.000 hospitalizaciones por Dengue hemorrágico, donde la gran proporción de los pacientes son población pediátrica y aproximadamente un 2,5% de los afectados mueren a causa de esta. Sin tratamiento adecuado, las tasas de letalidad del Dengue Hemorrágico pueden superar el 20%, pero con la ampliación del acceso a atención médica prestada por profesionales con conocimientos sobre el Dengue, ésta puede reducir la tasa de mortalidad a menos del 1%.

Sólo en 2007 se notificaron más de 890 000 casos en las Américas, de los cuales 26 000 de Dengue Hemorrágico y en medida que la enfermedad se propaga a nuevas zonas, no sólo aumenta el número de casos, sino que se presentan brotes explosivos de la enfermedad, como Venezuela, donde se notificaron más de 80.000 casos, entre ellos más de 6.000 de DH para el año 2007.

En las Américas, hasta la semana epidemiológica 45 del año 2009 se reportaron 853.468 casos de dengue en la región, incluyendo 20.832 casos de dengue

hemorrágico y formas complicadas de dengue, con 326 muertes, para una tasa de letalidad regional de 1,56%.

En lo que va del 2011, hasta la semana epidemiológica 6, se han presentado un total de 32274 casos de dengue, de los cuales 786 corresponden a dengue grave.

La gran propagación del dengue es atribuida a la expansión de la distribución geográfica de los cuatro serotipos del virus dengue y sus vectores, dentro de los cuales el más importante es el *Aedes Aegypti*, especie predominantemente urbana; el aumento rápido de las poblaciones urbanas de los mosquitos está incrementando el número de personas en contacto con este vector, especialmente en las zonas favorables para la reproducción de los mosquitos, como aquellas en las que es frecuente el almacenamiento doméstico de agua y no se dispone de servicios adecuados de eliminación de residuos sólidos.

En los últimos años, *Aedes albopictus*, un vector secundario del dengue en Asia, se ha establecido en los Estados Unidos de América, varios países de América Latina y el Caribe, y algunas zonas de Europa y África. Su rápida propagación geográfica se atribuye en gran parte al comercio internacional de neumáticos usados, que constituyen un lugar de cría para este vector⁴⁰.

En Colombia el dengue representa un problema prioritario en salud pública debido a múltiples factores, entre ellos, la intensa transmisión viral, el comportamiento de ciclos epidémicos cada vez más cortos, el aumento en la frecuencia de dengue hemorrágico y formas graves de la enfermedad, la circulación simultánea de los cuatro serotipos, la infestación por *Aedes Aegypti* en más del 90% del territorio nacional que está situado por debajo de los 2.200 m.s.n.m. y la presencia de numerosos asentamientos en zonas urbanas como consecuencia de la violencia en el país. Todo esto pone en riesgo a aproximadamente 25 millones de personas que habitan en zonas urbanas donde se transmite ésta enfermedad⁴¹.

Los departamentos que históricamente han tenido mayor transmisión de dengue en el país son: Atlántico, Santander, Norte de Santander, Valle del Cauca, Antioquia, Tolima, Huila, Casanare y Cundinamarca, entre ellos se distribuye más del 60% de los casos notificados anualmente en lo que ha transcurrido del presente siglo.

De esta forma, el dengue es una de las patologías infecciosas con mayor impacto en Colombia; hasta la semana epidemiológica 3 de 2010, se han notificado al Sistema de Vigilancia Nacional (SIVIGILA), 2.092 casos probables de dengue y 366 casos de dengue grave, de los cuales los departamentos con más casos de dengue notificados durante el año son: Huila, Valle del Cauca, Norte de Santander, Tolima y Santander, donde los grupos de edad más afectados son los menores de 14 años (52%)⁴⁰.

Para la semana epidemiológica 5 del presente año, luego de la fuerte ola invernal que requirió una intensificación de la vigilancia, en Colombia se presentaron 4018 casos, de los cuales 217 casos (5%) son dengue grave y de los cuales se ha confirmado 13 muertes.

El Huila es uno de los departamentos endémicos para dengue donde se encuentran los cuatro serotipos del virus e históricamente es uno de los departamentos con mayor incidencia de casos a nivel nacional con una incidencia para el año 2008 de 46,5 casos por 100.000 habitantes, y la presencia de un aumento de número de casos en los últimos años, que durante el 2006 se notificaron 2011 casos, en 2007 se notificaron 2922 casos y en 2008 se presentaron 2130 casos, lo cual ubica al Huila en un periodo endémico-epidémico, donde municipios como Neiva con una tasa de incidencia de 76,3 casos por 100.000 habitantes y una tasa de 53,2 por 100.000 habitantes para dengue hemorrágico, Palermo con un tasa de 69,7 por 100.000 habitantes y Garzón con 89,3 casos por 100.000 habitantes durante el 2008, como los municipios principales para la transmisión de la infección, seguido de municipios como Campoalegre, Gigante y Tarqui, donde el grupo etéreo más susceptible, es la población pediátrica entre los 0 y 10 años, de los cuales la edad poblacional de menores de 5 años son los más afectados; seguidos por el grupo de los 11 a 20 años; con los cuales se ha generado un porcentaje de hospitalizaciones para dengue clásico de 36,3% y dengue hemorrágico de 78% para el año 2008⁴².

Además, en el Huila el 27% de los municipios presentan un alto riesgo de transmisión de dengue debido al alto índice de infestación por el vector *Aedes Aegypti*, que para el año 2008 fue del 8% y donde el principal reservorio fueron los depósitos de agua domésticos.

Por lo tanto el dengue constituye un evento cuya vigilancia, prevención y control, revisten especial interés en la salud pública del país. La mortalidad por dengue es evitable en el 98% de los casos y está estrechamente relacionada con la calidad en la atención del paciente.

Actualmente se han dilucidado algunos de los mecanismos por los cuales la infección por VD puede provocar una enfermedad severa, entre los que destacan la disregulación de la inmunidad mediada por células que inducirían una respuesta Th2, con el aumento de producción de mediadores inflamatorios, la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) y la activación del complemento⁴³.

Una molécula fuertemente involucrada en la proliferación y polarización de linfocitos T CD4+ vírgenes hacia un perfil Th2 (IL-4, IL-13), que producen además IL-5 y TNF- α es la linfopoyetina del estroma tímico o TSLP (por sus siglas en inglés)⁴⁴.

Algunos estímulos disparan la producción de TSLP por parte de las células involucradas en este proceso entre las que destacan algunas citoquinas, como el Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), el Interferon- γ (IFN- γ), la IL-1 β , IL-4, IL-13 y el Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β), componentes bacterianos, como el ácido lipoteicoico, lipopolisacárido (LPS) y peptidoglicanos, y algunos virus como el Rinovirus⁴⁵.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente es de especial interés resaltar como en las formas severas del dengue existe una polarización en la respuesta inmune tipo Th2 y como este perfil inmunológico puede estar involucrado de manera importante en la fisiopatología de la enfermedad definiendo su presentación clínica y las posibles complicaciones durante dicho evento.

Además la investigación en torno a los distintos componentes que son determinantes en la inmunopatogénesis del dengue, abre la posibilidad de novedosas y efectivas formas de intervención que están dirigidas primeramente a evitar y prevenir las complicaciones y formas graves de esta enfermedad.

De lo anterior surge la pregunta. ¿Produce el VD un aumento en las concentraciones plasmáticas de TSLP en pacientes infectados por VD, presentando diferencias entre la fase aguda de la enfermedad comparada con la fase de convalecencia, y está relacionada con las formas severas de la enfermedad?

3. JUSTIFICACION

Primeramente debemos tener en cuenta que Colombia como país endémico, la infección con virus dengue representa un problema de salud pública nacional, departamental y local, debido a que es una de las enfermedades transmitidas por vectores de mayor impacto en salud por el riesgo de contagio y graves desenlaces; que económicamente genera anualmente gastos muy elevados debido a su alta incidencia y para la cual solo se cuenta con un tratamiento enfocado al control de los síntomas de la enfermedad.

En segunda instancia, cabe resaltar que uno de los eventos que cobra especial interés en la fisiopatología del dengue es la polarización Th2 que se presenta en la gran mayoría, el 71%, de los pacientes que hacen formas graves de la enfermedad, y siendo la TSLP una molécula fuertemente involucrada en este proceso, se hace necesario el estudio de elementos, como la TSLP, que posiblemente intervienen de manera significativa en la historia natural de la infección por virus dengue. Todo esto representa un nuevo horizonte de investigación con miras al desarrollo de formas efectivas de prevención de las formas severas y el desarrollo de nuevos tratamientos.

Para finalizar, teniendo en cuenta las razones anteriormente señaladas, debido a la posible influencia de la TSLP en la inmunopatogénesis de la infección por virus dengue, representaría un posible blanco terapéutico y un punto de partida para la modificación de los factores que determinan la infección, con el desarrollo de vacunas o tratamientos basados en esta citoquina, actuando así en la patogénesis de la enfermedad.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración plasmática de TSLP en niños con edades entre los 1 y 14 años, infectados naturalmente con virus dengue (VD) y su relación con la severidad clínica de la enfermedad, que asistan al servicio de pediatría del Hospital Universitario de Neiva Hernando Moncaleano Perdomo, en el periodo comprendido entre enero 2009 y diciembre de 2010.

Los resultados de este trabajo pueden arrojar importantes luces sobre los procesos fisiopatológicos involucrados en la respuesta inmunológica frente a la infección por el virus dengue, además de que representarían un posible medida paraclínica, en la infección por virus dengue, siendo éste un posible factor predictor de la severidad de la enfermedad en los pacientes.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar las características sociodemográficas de los niños infectados con VD.

Identificar las concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados con VD y en niños sanos.

Identificar diferencias en las concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados con VD y niños sanos.

Establecer si se presentan diferencias en la concentración de TSLP entre la fase aguda y la convaleciente de la infección por VD.

Determinar si hay relación entre la concentración de TSLP plasmático en los pacientes infectados por VD y las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

5. MARCO TEORICO

El dengue es una enfermedad viral febril aguda, endémico-epidémica, transmitida por la picadura de hembras de mosquitos del género Aedes, principalmente por Aedes Aegypti, que constituye hoy la arbovirosis más importante a nivel mundial en términos de morbilidad, mortalidad e impacto económico.

El agente etiológico es el virus dengue, del que existen cuatro serotipos diferentes (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4), los cuales circulan de manera simultánea en nuestro país, miembros del género Flavivirus (familia Flaviviridae), los cuales se caracterizan por tener una capsida icosaédrica rodeada por una membrana lipídica o envoltura, con un diámetro aproximado de 50 nm. En su interior contiene como genoma una molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de 10.7 Kb. El genoma viral presenta la estructura “cap” en el extremo 5´ y carece de poli(A) en el extremo 3´ terminal. El único marco de lectura abierto está flanqueado por dos regiones no traducidas (RNT), y codifica a las tres proteínas estructurales: la proteína de la envoltura E, la proteína asociada a la membrana M, y la proteína de la capsida C, y a las siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5)⁴⁶

El dengue es ocasionado por cualquiera de los cuatro serotipos de virus, cada uno de los distintos serotipos tiene la particularidad de no provocar inmunidad cruzada, lo cual significa que una persona puede infectarse y enfermar hasta cuatro veces diferentes por dengue. Su período de incubación oscila entre 3 y 14 días con un promedio de 7⁴⁷.

Para que en un lugar haya transmisión de la enfermedad debe estar presente de manera simultánea: el virus, el vector y el huésped susceptible.

Etapas Clínicas de la enfermedad

El dengue es una enfermedad con un amplio espectro de presentación clínica que incluye desde cuadros inaparentes o asintomáticos hasta cuadros graves, como insuficiencia hepática, encefalopatía, miocarditis, hemorragias severas y choque, que pueden conducir de manera rápida a la muerte, por lo tanto debe ser siempre vista como una sola enfermedad que puede evolucionar de múltiples formas.

El espectro clínico del dengue tan variado explica la diversidad de cuadros clínicos que podemos encontrar en una población durante una epidemia, pues algunos pacientes (la mayoría) estarán con sintomatología leve y erróneamente ni siquiera buscarán atención médica; otros tendrán síntomas inespecíficos y otros estarán muy afectados, con gran postración y quizás con una evolución desfavorable, deterioro clínico y muerte; a veces en pocas horas⁴⁸.

Cada uno de los cuatro virus del dengue puede producir cualquier cuadro clínico mencionado previamente. También existen las formas clínicas que por no ser tan frecuentes se les llama “atípicas” que resultan de la afectación especialmente intensa de un órgano o sistema: encefalopatía, miocardiopatía o hepatopatía por dengue, así como la afectación renal con insuficiencia renal aguda y otras que también se asocian a mortalidad⁴⁹.

El dengue es una enfermedad muy dinámica que a pesar de su corta duración (no mayor a una semana en casi el 90% de los casos). Su expresión puede modificarse con el paso de los días y puede también agravarse de manera súbita; por lo cual el enfermo necesita que el médico realice seguimiento, preferentemente en forma diaria.

El curso de la enfermedad del dengue tiene tres etapas clínicas:

- Etapa febril; la única para la inmensa mayoría de los enfermos.
- Etapa crítica.
- Etapa de recuperación.

La etapa febril: es variable en su duración y se asocia a la presencia del virus en sangre (viremia). Como en otras enfermedades, la evolución hacia la curación pasa por la caída de la fiebre y durante la misma el enfermo va a tener sudoración, astenia o algún grado de decaimiento, toda esta sintomatología es transitoria.

La caída de la fiebre se asocia al momento en que el paciente se agrava, y la defervescencia (transición de la etapa febril a la etapa afebril), anuncia el inicio de la etapa crítica de la enfermedad.

La etapa crítica coincide con la extravasación de plasma y su manifestación más grave es el choque, que se evidencia con frialdad de la piel, pulso débil, taquicardia e hipotensión. A veces, con grandes hemorragias digestivas asociadas, así como alteraciones hepáticas y quizás de otros órganos. El hematocrito se eleva en ésta etapa y las plaquetas que ya venían descendiendo alcanzan sus valores más bajos.

La etapa de recuperación se caracteriza sencillamente por la normalización de los distintos parámetros alterados durante las etapas previas de la enfermedad, esto incluye la reabsorción de líquidos, el descenso en el hematocrito y la corrección de la leucopenia, trombocitopenia y las pruebas de funcionalidad hepática⁵⁰.

Cuadro Clínico

Generalmente la primera manifestación clínica es la fiebre de intensidad variable, aunque puede ser antecedida por diversos pródromos. La fiebre se asocia a cefalea, dolor retroocular, astenia, anorexia y nauseas, artralgias y mialgias, que es el cuadro conocido como dengue sin signos de alarma.

En los niños, es frecuente que la fiebre sea la única manifestación clínica o que la fiebre este asociada a síntomas digestivos bastante inespecíficos. La fiebre puede durar de 2 a 7 días y asociarse a trastornos del gusto bastante característicos. Puede haber eritema faríngeo, aunque otros síntomas y signos del aparato respiratorio no son frecuentes ni importantes. Puede existir dolor abdominal discreto y diarreas, esto último más frecuente en los pacientes menores de dos años y en los adultos⁵¹.

Secuencia de los signos clínicos en el diagnóstico de las formas clínicas del dengue.

Identificar la secuencia de las manifestaciones clínicas y de laboratorio es muy importante para diferenciar el dengue de otra enfermedad que pudiera tener alteraciones semejantes pero en distinto orden de presentación y además, constituye la única posibilidad de detectar precozmente cual es el paciente de dengue que puede evolucionar o está ya evolucionando hacia la forma clínica grave como dengue hemorrágico y choque por dengue. En los primeros días aparece exantema en un porcentaje variable de los pacientes; no se ha demostrado que el exantema sea un factor pronóstico.

Las manifestaciones referidas predominan al menos durante las primeras 48 horas de enfermedad y pueden extenderse durante algunos días más en la que pudiéramos considerar como la ETAPA FEBRIL de la enfermedad.

Entre el 3º y 6º día para los niños, y entre el 4º y 6º día para los adultos (como período más frecuente pero no exclusivo de los enfermos que evolucionan al dengue grave), la fiebre desciende, el dolor abdominal se hace intenso y mantenido, se observa derrame pleural o ascitis, los vómitos aumentan en frecuencia y comienza la ETAPA CRÍTICA de la enfermedad, por cuanto es el momento de mayor frecuencia de instalación del choque. También en esta etapa se hace evidente la hepatomegalia. La presencia de signos de alarma es muy característica del tránsito a esta etapa y anuncian complicaciones tales como el choque⁵².

El recuento plaquetario muestra un descenso progresivo hasta llegar a las cifras más bajas durante el día del choque para después ascender rápidamente y normalizarse en pocos días. El choque se presenta con una frecuencia 4 ó 5 veces mayor en el momento de la caída de la fiebre o en las primeras 24 horas de la desaparición de ésta; que durante la etapa febril.

Existen signos de alarma que anuncian la inminencia del choque, tales como el dolor abdominal intenso y continuo, los vómitos frecuentes, somnolencia y/o irritabilidad, así como la caída brusca de la temperatura que conduce a hipotermia a veces asociada a lipotimia. Estos signos identifican precozmente la existencia de una pérdida de líquidos hacia el espacio extravascular que por tener un volumen exagerado y producirse de manera súbita el paciente difícilmente podrá compensar o no podrá compensar por sí solo.

Los signos de alarma indican el momento en el cual el paciente puede ser salvado si recibe tratamiento con soluciones hidroelectrolíticas en cantidades suficientes para reponer las pérdidas producidas por la extravasación de plasma, a veces agravada por pérdidas al exterior (sudoración, vómitos, diarreas).

Después de la etapa crítica, el enfermo pasa un tiempo variable en la etapa de recuperación que también requiere de la atención médica pues durante este período es que el paciente debe eliminar fisiológicamente el exceso de líquidos que se había extravasado hasta normalizar todas sus funciones vitales; en el niño y el adulto sano esta diuresis aumentada es bien tolerada, pero hay que vigilar especialmente a los pacientes con algún tipo de cardiopatía, nefropatía o adultos mayores. Debe vigilarse también una posible coinfección bacteriana, casi siempre

pulmonar, así como la aparición del llamado exantema tardío (10 días o más). Algunos pacientes adultos se mantienen muchos días con astenia y algunos refieren bradipsiquia durante semanas.

Complicaciones y formas graves e inusuales de dengue

- Choque por dengue: presente en la inmensa mayoría de los enfermos que agravan y fallecen, como causa directa de muerte o dando paso a complicaciones tales como: hemorragias masivas, coagulación intravascular diseminada, edema pulmonar no cardiogénico, fallo múltiple de órganos.
- Por su relativa poca frecuencia también se les ha llamado “formas atípicas de dengue”, a veces asociadas a una determinada predisposición individual u otra enfermedad previa o coexistente (infecciosa o no infecciosa).
- Durante una epidemia es posible que se presente alguno de estos casos: hepatitis o hepatopatía, que conduce a fallo hepático agudo; encefalitis o encefalopatía, expresada frecuentemente en alteraciones de la conciencia (coma), a veces también con convulsiones; miocarditis o miocardiopatía, que se manifiesta como disminución de la contractibilidad miocárdica con disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y posible insuficiencia cardíaca; así como nefritis o nefropatía que puede ser causa de insuficiencia renal agudo o puede afectar selectivamente a la función de reabsorción propia del túbulo renal distal y de esa manera contribuir al aumento de líquido del espacio extravascular⁵⁰.

Atención del paciente con Dengue

El abordaje del paciente con diagnóstico probable de dengue tiene como objetivo identificar la fase clínica de la enfermedad en la que se encuentra el paciente. Esta información es necesaria para instaurar un manejo adecuado.

Definiciones de caso

Caso probable de dengue: Todo paciente que presente una enfermedad febril aguda de hasta siete días, de origen no aparente, acompañada de 2 o más de los siguientes síntomas: cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgias, postración, exantema, puede estar acompañado o no de hemorragias y que tenga un

hemograma sugestivo de enfermedad viral, y que además tenga antecedente de desplazamiento (hasta 15 días antes del inicio de síntomas) o que resida en un área endémica de dengue.

Caso probable de Dengue con Signos de alarma: Paciente que cumple con la anterior definición y además presenta cualquiera de los siguientes signos de alarma: Dolor abdominal intenso y continuo, vómitos persistentes, diarrea, somnolencia y/o irritabilidad, hipotensión postural, hepatomegalia dolorosa mayor a 2cms, disminución de la diuresis, caída de la temperatura, hemorragias en mucosas, leucopenia (menor a 4.000), trombocitopenia (menor a 100.000).

Caso probable de Dengue grave: Paciente que presenta cualquiera de las siguientes manifestaciones y tiene antecedente previo de fiebre: Extravasación severa del plasma, Hemorragias severas según criterio clínico o Daño grave de órganos.

Caso confirmado de dengue: Caso probable de dengue, dengue grave, o mortalidad por dengue confirmado por alguno de los criterios de laboratorio para el diagnóstico (pruebas serológica IgM dengue o pruebas virológicas como aislamiento viral o RT-PCR)

Caso probable de muerte por dengue: Es la muerte de un caso probable de dengue grave con diagnóstico confirmado por laboratorio y por histopatología. Todo caso probable que fallece con diagnóstico clínico de dengue grave sin muestra adecuada de tejido será considerado por el nivel nacional como caso compatible de muerte por dengue y representa una falla del sistema de vigilancia epidemiológica.

Anamnesis

La historia clínica del paciente probable de dengue debe ser lo más detallada posible, y se deben registrar los ítem evaluados en la historia clínica.

Enfermedad actual: Precisar el día y hora de inicio de la fiebre, cronología de los signos y síntomas, búsqueda de signos de alarma (tabla 1), búsqueda manifestaciones hemorrágicas como hematemesis, melenas, epistaxis, etc. En niños los síntomas son inespecíficos presentando pérdida de apetito, y síntomas gastrointestinales principalmente vómito, dolor abdominal y distensión abdominal, etc.

Tabla 1. Signos de alarma de dengue.

1. Dolor abdominal intenso y continuo
2. Vómitos persistentes
3. Hipotensión postural /lipotimias
4. Hepatomegalia dolorosa
5. Hemorragias importantes: Melenas, hematemesis
6. Somnolencia o irritabilidad
7. Disminución de la diuresis
8. Disminución repentina de la temperatura /hipotermia
9. Aumento del hematocrito
10. Caída abrupta de plaquetas
11. Acumulación de líquidos: ascitis, edema, derrame pleural.

- Comorbilidades: el embarazo, niños menores de 5 años, mayores de 65 años, presencia de enfermedades crónicas como: Hipertensión Arterial, Diabetes mellitus, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades hematológicas crónicas (anemia falciforme), enfermedad renal crónica, enfermedad cardiovascular grave, enfermedad ácido péptica y enfermedades autoinmunes, paciente con riesgo social (Pacientes que vivan solos, difícil acceso a un servicio de salud, pobreza extrema y otros).

Examen físico.

- Examen físico general: Se debe buscar edema, verificar llenado capilar, manifestaciones hemorrágicas en piel, mucosas, escleras. Evaluar estado de hidratación.
- Signos vitales: Toma de tensión arterial en dos posiciones, frecuencia cardíaca, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura y peso. Verificar tensión arterial diferencial menor o igual a 20 mmHg (tabla 2).

Tabla 2. Signos de choque

1. Hipotension arterial
2. Presion arterial convergente (presion arterial diferencial < 20 mmHg)
3. Extremidades frias, cianosis
4. Pulso rapido y fino
5. Llenado capilar lento (>2 segundos)

- Examen físico tórax: Buscar signos de dificultad respiratoria (tirajes), signos de derrame pleural y pericárdico.
- Examen físico Abdominal: Hepatomegalia, dolor y ascitis.
- Examen físico Sistema Nervioso: Signos de irritación meníngea, evaluar estado de consciencia, alteraciones comportamiento (llanto, irritabilidad), convulsiones, sensibilidad y fuerza muscular.

Prueba de torniquete: La prueba de torniquete permite evaluar la fragilidad capilar y orienta el diagnostico del paciente con dengue, pero no define su severidad, esta deberá ser realizada obligatoriamente en todos los casos probables de dengue durante el examen físico. Los pacientes con dengue frecuentemente tienen prueba de torniquete es positiva pero NO hace diagnóstico de dengue grave y si es negativa no descarta la probabilidad de dengue.

Técnica:

1. Dibujar un cuadro de 2,5 cm X 2,5 cm en el antebrazo del paciente y verificar la presión arterial.
2. Calcular presión arterial media
3. Insuflar nuevamente el manguito hasta el valor medio y mantener por 5 minutos en adultos (3 minutos en niños) o hasta que aparezcan petequias o equimosis.

4. Contar el número de petequias en el cuadrado. La prueba será positiva cuando se cuentan 20 petequias o más en el adulto o 10 o más en los niños.

Tratamiento

Los datos de la anamnesis y el examen físico serán utilizados para la estratificación de casos y para orientar las medidas terapéuticas pertinentes. Es importante recordar que el dengue es una enfermedad dinámica y el paciente puede evolucionar de un estadio a otro rápidamente.

El manejo adecuado de los pacientes depende del reconocimiento precoz de los signos de alarma, el continuo monitoreo y estratificación de los casos y el inicio oportuno de la reposición hídrica

Todo paciente febril debe ser interrogado con pensamiento clínico y epidemiológico (residente o procede de área endémica de dengue), se debe precisar el día que iniciaron los síntomas (primer día de fiebre), con esto el médico tratante debe hacerse 3 preguntas básicas que orientarán a estratificar y a definir el tratamiento a instaurar en cada paciente.

1. ¿Tiene dengue?
2. ¿Tiene alguna comorbilidad o signos de alarma?
3. ¿Está en choque? ¿Tiene alguna complicación?

Las respuestas a esas preguntas permiten clasificar al paciente en uno de tres grupos (A, B o C) y decidir conductas:

- Grupo A: Tratamiento ambulatorio (sintomático e hidratación) con indicaciones, signos de alarma y control el primer día sin fiebre.
- Grupo B: Hospitalización para una estrecha observación y tratamiento médico.

- Grupo C: Tratamiento intensivo urgente

Grupo A: Pacientes que pueden ser manejados ambulatoriamente.

Nivel de atención: PRIMER NIVEL

Definición: Fiebre de 2 a 7 días (caso probable de dengue), no hay hemorragia, deshidratación, signos de alarma o choque.

Son pacientes que pueden tolerar volúmenes adecuados de líquido por vía oral, mantienen buena diuresis, no tienen signos de alarma, particularmente durante la defervescencia.

Se debe orientar al paciente y a los familiares acerca del reposo en cama, la ingesta de líquidos en abundante cantidad (2 litros o más para adultos o lo correspondiente a niños), puede ser leche, sopas o jugos de frutas (excepto cítricos). El agua sola no es suficiente para reponer las pérdidas de electrolitos asociadas a sudoración, vómitos u otras pérdidas, además se debe hacer énfasis respecto a los signos de alarma, particularmente en el momento de la caída de la fiebre (53).

Para aliviar los síntomas generales (mialgias, artralgias, cefalea, etc.) y para controlar la fiebre, se debe administrar acetaminofén (nunca más de 4 g por día para los adultos y a la dosis de 10-15 mg/ Kg de peso en niños), así como la utilización de medios físicos, hasta que descienda la fiebre.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los Salicilatos (Aspirina) están contraindicados en pacientes con dengue. No se debe utilizar ningún medicamento por vía intramuscular.

La dipirona debe ser considerada para manejo exclusivo de segundo y tercer nivel, no se debe administrar intramuscular, ni en paciente pediátrico, y cuando se utilice se debe informar riesgos.

Seguimiento: A los pacientes del grupo A se les debe hacer un seguimiento estricto, se debe realizar una valoración el día de la defervescencia (primer día sin

fiebre) y posteriormente evaluación diaria hasta que pase el periodo crítico (48 horas después de la caída de la fiebre), donde se tiene que evaluar el recuento de plaquetas, hematocrito y aparición de signos de alarma.

Grupo B: Pacientes que deben ser Hospitalizados para una estrecha observación y tratamiento médico.

Nivel de atención: SEGUNDO NIVEL

Son los pacientes con cualquiera de las siguientes manifestaciones:

- Signos de alarma
- Pacientes con enfermedades crónicas como: Hipertensión arterial, diabetes mellitus, asma, enfermedades hematológicas o renales crónicas, enfermedades del sistema cardiovascular, enfermedad ácido péptica o enfermedad autoinmune.
- Niños menores de 5 años
- Pacientes embarazadas
- Pacientes mayores de 65 años
- Paciente con riesgo social (Pacientes que vivan solos, difícil acceso a un servicio de salud, pobreza extrema y otros).

Tratamiento en pacientes con signos de alarma

- Iniciar reposición de líquidos por vía intravenosa (I.V.) utilizando soluciones cristaloides, como solución salina isotónica al 0.9% u otra. Comenzar por 10 ml/Kg/hora y posteriormente mantener la dosis o disminuirla de acuerdo a la respuesta clínica del paciente.

- Se debe tomar una muestra para hematocrito antes de iniciar la reposición de líquidos por vía intravenosa (I.V.) y después repetir el hematocrito periódicamente (cada 6 horas). Administrar la cantidad mínima necesaria para mantener la adecuada perfusión y una diuresis adecuada (0.5 ml/kg/hora).
- Habitualmente se necesita continuar esta administración de líquidos por vía I.V. durante 48 horas. Si hay empeoramiento clínico o elevación del hematocrito, aumentar la dosis de cristaloides I.V. a 10 ml/kg/peso/hora hasta la estabilización del paciente o hasta su remisión a una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).

Tratamiento en pacientes sin signos de alarma

Estimularlos a ingerir abundante cantidad de líquidos por vía oral, mantener reposo en cama y vigilar la evolución de los síntomas de dengue y de los signos propios de cualquier otra enfermedad que padezca (comorbilidad). Si no puede ingerir líquidos, iniciar tratamiento de reposición de líquido por vía I.V. utilizando solución salina al 0.9%, con o sin dextrosa, a una dosis de mantenimiento.

Seguimiento: A los pacientes del grupo B se les debe hacer un seguimiento estricto y monitorear signos de alarma hasta que pase la fase crítica, balance de líquidos. Se debe monitorear constantemente (1- 4 horas) Signos vitales (tensión arterial, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, PAM), perfusión periférica, gasto urinario (4 - 6 horas), Hematocrito (12 horas), función de otros órganos (función renal, hepática).

Laboratorios a realizar en pacientes del Grupo B: Cuadro hemático completo con el fin de evaluar leucopenia, Trombocitopenia, hemoglobina y hematocrito, transaminasas (ALT, AST), Tiempos de coagulación (PT, PTT), e IgM dengue. Electrocardiograma en paciente con alteraciones del ritmo cardíaco.

Grupo C: Pacientes que requieren tratamiento de emergencia y cuidados intensivos porque tienen dengue grave

Nivel de atención: TERCER NIVEL. Manejo del paciente pediátrico: El tratamiento está enfocado al manejo del choque mediante resucitación con aporte por vía I.V. de soluciones cristaloides, preferiblemente Lactato de Ringer un bolo de 20 ml/kg. Este plan de reanimación está diseñado para estabilización del paciente en 8 horas. Re-evaluar la condición del paciente (signos vitales, tiempo de llenado

capilar, hematocrito, diuresis, entre otros) y decidir, dependiendo de la situación clínica, si el paciente continua inestable se pueden administrar hasta 2 bolos de cristaloides o aplicar coloides, si el paciente evidencia mejoría se hace una reducción progresiva de la cantidad de líquidos así: De 5 a 7 ml/kg/hora por 2 horas y reevaluar, 3 a 5 ml/kg/h en las siguientes 4 horas y reevaluar y 2 cc/kg/h por 2 horas. Si el hematocrito desciende y el paciente mantiene el estado de choque, pensar en que se ha producido una hemorragia, casi siempre digestiva, se indica transfusión de glóbulos rojos. Si con el manejo anterior el paciente no está estable se sugiere iniciar soporte inotrópico por posible disfunción miocárdica y/o miocarditis por dengue. Si el paciente evoluciona satisfactoriamente se debe continuar líquidos de mantenimiento.

Manejo del paciente adulto: A igual que en el paciente pediátrico el tratamiento está enfocado al manejo del choque mediante resucitación con aporte por vía I.V. de soluciones cristaloides, preferiblemente Lactato de Ringer bolo de 500 -1000 ml en la primera hora de acuerdo al estado del paciente hasta obtener una PAM de 70 – 80 y luego dosis mantenimiento de hasta 100 ml/h para mantener la PAM mayor a 80.

En el caso de estar fuera de una institución en tercer nivel el paciente debe ser remitido en ambulancia medicalizada.

Si el hematocrito desciende y el paciente mantiene el estado de choque, pensar en que se ha producido una hemorragia, casi siempre digestiva, e indicar transfusión de glóbulos rojos.

Seguimiento: A los pacientes del grupo C se les debe hacer un seguimiento estricto, monitoreando signos de alarma y balance de líquidos hasta que pase la fase crítica. Se debe monitorear constantemente, cada hora, los signos vitales (tensión arterial, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, PAM), perfusión periférica, gasto urinario (4 - 6 horas), Hematocrito (cada 12 horas), función de otros órganos (función renal, hepática)

Laboratorios a realizar en pacientes del Grupo C.:

Anticuerpos IgM para dengue o aislamiento viral

Obligatorios: Hematocrito, hemoglobina, plaquetas, leucograma y otros de acuerdo a necesidad, gases arteriales, electrolitos, transaminasas, albúmina, Rx tórax, ecografía abdominal, electrocardiograma, ecocardiograma, pruebas de función renal; en pacientes con sospecha de encefalitis, convulsiones o signos de focalización se debe tomar TAC de cráneo simple.

Criterios de egreso

- Ausencia de fiebre de 24 – 48 horas
- Mejoría del estado clínico (estado general, apetito, gasto urinario, estabilidad hemodinámica, no signos de dificultad respiratoria).
- Aumento en el recuento plaquetario, usualmente precedido de aumento en los leucocitos.
- Hematocrito estable aún sin Líquido endovenosos.

Diagnostico diferencial. Teniendo en cuenta el amplio espectro clínico del dengue, las principales enfermedades que hacen parte del diagnóstico diferencial son: Influenza, enterovirus, enfermedades exantemáticas (sarampión, rubéola, parvovirus, eritema infeccioso, mononucleosis infecciosa, exantema súbito, citomegalovirus), hepatitis virales, absceso hepático, abdomen agudo, otras arbovirosis (fiebre amarilla), escarlatina, neumonía, sepsis, leptospirosis, malaria y salmonelosis⁵³.

Vigilancia en salud pública. El dengue es un evento de interés en salud pública y por lo tanto es de notificación obligatoria, esta debe realizarse según los lineamientos e instrumentos del sistema de vigilancia en salud pública nacional, teniendo en cuenta las definiciones de caso vigentes descritas en el protocolo de vigilancia nacional.

Confirmación por laboratorio

- Diagnóstico serológico: La serología es utilizada para la detección de anticuerpos IgM para virus dengue y debe ser solicitada a partir del sexto día de inicio de síntomas (ELISA) ⁵⁴.
- Diagnóstico virológico: Tiene por objetivo identificar el patógeno y monitorear el serotipo viral circulante. Para la realización de la técnica de aislamiento viral la muestra debe ser recolectada hasta el quinto día de inicio de síntomas. (Aislamiento viral, RT-PCR) ⁵⁴.
- Diagnóstico en casos de mortalidad: Toda muerte debe ser investigada. Se debe tener muestra de suero almacenada de todo paciente que puede evolucionar a muerte para la realización de laboratorios específicos.
- Cuando el paciente fallece se debe hacer una necropsia clínica, por ser una muerte por un evento de interés en salud pública, se deben tomar fragmentos de hígado, bazo, pulmón., ganglios y cerebro con el fin de esclarecer la etiología de la muerte.
- Para la realización de exámenes histopatológicos e inmunohistoquímicos, el material recolectado debe ser almacenado en un frasco con formol taponado al 10% y transportado en temperatura ambiente. A su vez se debe almacenar tejido en solución salina normal y debe ser refrigerado con el fin de realizar pruebas virológicas.

Linfopoyetina del Estroma Tímico

La Linfopoyetina del Estroma Tímico (TSLP) fue originalmente identificada en un medio condicionado de una línea celular murina de estroma tímico (Z210R.1), en 1994, actuando principalmente como factor de crecimiento y de diferenciación de los linfocitos B y la proliferación de los linfocitos T (Jenkins et al, 2000⁵⁵).

El TSLP es una citocina, de cuatro hélices α , recientemente descrita, codificada por una secuencia que se encuentra en el cromosoma 5q22.1, miembro de la familia de citoquinas hematopoyéticas en las que se incluyen la interleuquina-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 e IL-21. El receptor de TSLP (TSLPR), es un

heterodimero consistente en la cadena α del receptor de la IL-7 y una cadena γ común. Diferente a la IL-7, el TSLP no activa la vía Janus Kinasas (JAKS), probablemente debido al correceptor específico de TSLP, TSLPR- γ ⁵⁶.

En las células epiteliales de la piel, intestino y los pulmones, se encuentra el principal foco de producción de TSLP en el hombre, adicionalmente varios otros tipos celulares como los fibroblastos pulmonares, mastocitos y células de músculo liso bronquial, pueden, bajo condiciones de inflamación, producir TSLP⁵⁷.

Estudios sobre TSLP en el humano han demostrado el potencial papel de la respuesta inflamatoria tipo Th2. Primeramente se encontró que las células dendríticas mieloides CD11c+ coexpresaban la cadena α del receptor de la IL-7 y la cadena γ del receptor de TSLP, y respondían a la estimulación con TSLP por la producción de quimocinas atrayentes de células Th2 como la CCL17 y CCL22. De manera diferente a otros factores que activan células dendríticas (CDs), las CDs tratadas con TSLP eran capaces de promover la diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes hacia linfocitos Th2 proinflamatorios capaces de producir IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α , pero bajas concentraciones de IFN- γ e IL-10. Adicionalmente, el TSLP mostro ser un potenciador de la supervivencia de las CDs y factor que induce la maduración de las mismas aumentando la expresión de moléculas de activación como el HLA-DR, CD40, CD80, CD83 y CD86. Singularmente el TSLP induce la expresión de OX40-L sobre las CDs en ausencia de la IL-12, y de la interacción entre OX40 y OX40-L se identifico como señal de TSLP para inducir la diferenciación de los linfocitos T CD4+ vírgenes a el perfil Th2⁵⁷.

Algunos estímulos disparan la producción de TSLP por parte de las celular involucradas en este proceso, citoquinas, como el Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), el Interferon- γ (IFN- γ), la IL-1 β , IL-4, IL-13 y el Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β), componentes bacterianos, como el ácido lipoteicoico, lipopolisacarido (LPS), peptidoglicanos, y algunos virus, como el Rinovirus⁵⁷.

Es de especial interés resaltar el papel de los virus como potentes inductores de TSLP. Un estudio realizado con un modelo en virus, en 2007, demuestra cómo la producción de TSLP es fuertemente impulsada por parte de células epiteliales de vías aéreas luego de la estimulación con ARN de doble cadena que actúa de manera directa sobre el Receptor Tipo Toll-3 (TLR-3) y como tiene efecto sinérgico en la expresión de citoquinas como la IL-4 debido a una respuesta tipo Th2.

6. HIPÓTESIS

La infección por Virus Dengue (VD) produce el aumento de las concentraciones plasmáticas de TSLP en pacientes pediátricos, muestra diferencias entre la fase aguda comparada con la fase de convalecencia de la enfermedad y está relacionada con la parámetros paraclínicos de severidad clínica de la enfermedad.

7. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Cuadro 1. Operacionalización de variables.

Variables	Definición	Dimensión Subvariable	Categorías	Indicador	Nivel de medición
Características Sociodemográficas	Características que condicionan la infección por virus dengue	Edad	Edad en años	Años	De razón
		Sexo	Masculino Femenino	Proporción de genero	Nominal
Concentraciones plasmática de TSLP	Concentraciones plasmáticas de TSLP solubles en muestras de niños infectados con Virus dengue y clínicamente sanos	Concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados por VD.	pg/mL	Proporción de concentraciones	De razón
		Concentraciones plasmáticas de TSLP en niños sanos.	pg/mL		De razón
		Concentraciones plasmáticas de TSLP en niños con atópicos.	pg/mL		De razón

Comparación de las concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados con VD, sanos y atópicos.	Diferencias en las concentraciones plasmáticas en niños infectados con VD, sanos y atópicos.	Concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados con VD, niños sanos y atópicos.	pg/mL	Proporción de concentraciones	De razón
Concentración plasmática de TSLP en niños infectados por VD en fase aguda y convaleciente de la infección.	Diferencias en las concentraciones plasmáticas de TSLP en las fases aguda y convaleciente de la infección por VD.	Concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados por VD en fase aguda. Concentración plasmática de TSLP en niños infectados por VD en fase convaleciente de la infección.	pg/mL pg/mL	Proporción de concentraciones Proporción de concentraciones	De razón De razón
Relación entre las concentraciones de TSLP en niños infectados por VD y características paraclínicas de la infección	Relación entre los niveles de TSLP y el conteo de plaquetas circulantes.	Concentración plasmática de TSLP en niños infectados por VD Recuento de plaquetas circulantes	pg/mL Recuento de plaquetas	Proporción de concentraciones X10 ⁵	De razón De intervalo

8. DISEÑO METODOLOGICO

8.1 TIPO DE ESTUDIO

Este proyecto de investigación es un estudio observacional descriptivo, de serie de casos, transversal de tipo retrospectivo; es observacional, puesto que su objetivo solo es obtener información de la población, sin la intervención directa sobre la misma; es descriptivo debido a que representan una piedra angular en epidemiología, y son aquellos que estudian situaciones que ocurren en condiciones naturales, más que en situaciones experimentales, conciernen y son diseñados para describir la distribución de variables, sin considerar hipótesis causales o de otro tipo, en cambio de ellos se derivan eventuales hipótesis de trabajo susceptibles de ser verificadas en fases posteriores; transversal por que se obtiene la información en un momento dado de tiempo, sin el objeto de hacer seguimiento en el tiempo de la evolución de los datos o de la población a estudio y es retrospectivo por que se realiza la recolección de datos de los años anteriores al estudio.; donde se determinaron y compararon las concentraciones plasmáticas de TSLP en muestras de niños con infección con VD, que acudieron al hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva, durante el periodo comprendido entre enero de 2009 y diciembre de 2010.

8.2 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizo en el servicio de pediatría del hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva, centro de atención hospitalaria de tercer nivel y centro de referencia para la zona sur de Colombia, comprendido por los departamentos de Caquetá, Putumayo, Amazonas y parte sur del departamento del Tolima y Cauca.

8.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

8.3.1 Población. La población del estudio fueron niños con diagnostico de infección con virus dengue , entre los 1 y los 14 años de edad que asistieron al hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva, durante el periodo comprendido entre enero de 2009 y diciembre de 2010.

Muestras de sangre venosa periférica de voluntarios sanos entre los 1 y los 14 años de edad provenientes de una institución educativa de la ciudad de Neiva como el control negativo de la prueba.

Muestras de sangre venosa periférica de niños voluntarios con atopía entre los 1 y los 14 años de edad que asistieron a consulta con el servicio de alergología del hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva como control positivo de la prueba.

8.3.2 Muestra. Se utilizó una muestra de tipo no probabilística, de sujetos voluntarios, donde se seleccionaron 20 niños de edades entre los 1 y los 14 años de edad; con infección con VD diagnosticada y definida por la clasificación revisada de la OMS para dengue, 20 niños clínicamente sanos sin presencia de infección con virus dengue, sin antecedentes de atopía y con un examen físico normal y 20 niños atópicos con antecedentes documentados de atopía por historia clínica, con signos y síntomas de enfermedad alérgica que se encontraran con o sin tratamiento farmacológico.

8.3.3 Muestreo. Se realizó un muestreo de tipo no probabilístico de sujetos voluntarios, por conveniencia, de 20 niños de edades entre los 1 y los 14 años de edad; con infección con VD diagnosticada y definida por la clasificación revisada de la OMS para el grupo de pacientes con dengue, 20 niños clínicamente sanos sin antecedentes de atopía y con un examen físico normal y 20 niños con antecedente documentado de atopía por historia clínica, con signos y síntomas de enfermedad alérgica que se encontraran con o sin tratamiento farmacológico.

8.4 TECNICAS

En investigación se utilizaron las técnicas de investigación de campo, realizando mediciones biofisiológicas in vitro de los pacientes del estudio, donde fue evaluado por técnica de ELISA, a partir de muestras de sangre venosa periférica, las concentraciones plasmáticas de TSLP y sus niveles se registraron en picogramos por mililitro (pg/mL).y la técnica de investigación documental, a partir de la historia clínica de estos pacientes.

8.5 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS

En este estudio se necesitó la asesoría y tutoría de un especialista en epidemiología para la orientación, desarrollo y evaluación de los datos obtenidos en esta investigación.

Se realizó la debida capacitación en el laboratorio de inmunología de la facultad de salud de la Universidad Surcolombiana que contaba con los recursos materiales y de infraestructura necesarios para la realización de la investigación, sobre las técnicas de laboratorio que se utilizaron en el desarrollo de esta investigación y la elaboración de un protocolo para la medición de las concentraciones plasmáticas de TSLP por medio de la técnica de ELISA con todas las medidas de bioseguridad correspondientes a este estudio.

Los niños que fueron incluidos en este estudio tenían una edad entre los 1 y 14 años, se conformaron tres grupos y cada uno con un total de 20 integrantes, distribuidos como: pacientes con dengue, muestras de pacientes voluntarios sanos como el control negativo de la prueba y muestras de pacientes con atopia, que representaban el control positivo de esta investigación.

En el grupo de niños con dengue se incluyeron aquellos pacientes que asistieron al servicio de pediatría del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva, que tenían diagnóstico, clasificación y manejo según la clasificación revisada de la OMS para dengue.

El segundo grupo, los niños voluntarios sanos, fueron muestras de pacientes sin presencia de infección con virus dengue, sin antecedentes de atopia y con un examen físico normal al momento de la obtención de la muestra de sangre venosa total

Las muestras de voluntarios con atopia, representaban el control positivo de esta investigación, fueron incluidos por tener antecedentes documentados de atopia por historia clínica, con signos y síntomas de enfermedad alérgica que se encontraran con o sin tratamiento farmacológico y que asistieron a consulta con el servicio de alergología del hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva.

Se realizo la investigación documental de los niños con infección con VD que ingresaron al hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva y se determinaron la distribución por género y edad.

Se realizo la toma de una muestra de sangre venosa total de 4 a 6 mL de sangre, por técnica de venopunción, en tubos con acido etilendiaminotetracético (EDTA). Posteriormente la muestra fue centrifugada a 250xg por 10 minutos, después se tomo el plasma obtenido y por último estas muestras fueron almacenadas en tubos eppendorff a -20°C hasta el momento del procesamiento de la muestra para la cuantificación del TSLP-humano.

Se utilizo 1 muestra de sangre venosa total de los pacientes voluntarios sanos y a los pacientes con atopia.

El grupo de pacientes con dengue se les realizo la toma de dos muestras de sangre, por la técnica antes descrita, la primera en la fase aguda de la enfermedad, considerada entre el tercero y quinto día luego del inicio de la sintomatología y la segunda muestra se tomo el día catorce de la enfermedad, considerada como la fase de convalecencia.

La determinación de las concentraciones plasmáticas de TSLP-humano se realizo por medio de la técnica ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) usando un estuche comercial (R&D systems catalogo DY1398), donde placas de 96 pozos fueron cubiertas con 100 µL/pozo de anticuerpo de captura anti- TSLP humano hecho en oveja (solución de trabajo de 0.8µg/ml diluido en PBS estéril), las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante toda la noche.

Al día siguiente, se desecho el sobrenadante y se realizo el lavado de la placa tres veces con solución de lavado (TWEEN 20 en PBS al 0.05%), se bloquearon los pozos con el reactivo diluyente (BSA en PBS al 1%) y se incubaron a temperatura ambiente por una hora. Se realizo de nuevo el lavado de las placas, posteriormente se adiciono las muestras de los pacientes voluntarios a un volumen final de 100 µL/pozo; como control positivo de la placa se utilizo el reactivo estándar proporcionado por el kit comercial (reconstituido en 0.5ml de reactivo diluyente) se realizaron 7 diluciones al ½ con una concentración inicial de 2,000 pg /ml y como control negativo se adicionaron 100 µL/pozo de albúmina de suero bovino (BSA) en 3 pozos, se cubrieron las placas y se incubaron a temperatura ambiente por dos horas. Se repitió el proceso de lavado de las placas, como se menciona anteriormente y se adicionaron 100µL/pozo de anticuerpo de detección anti- TSLP humano biotinilado hecho en oveja (solución

de trabajo de 400ng/ml en reactivo diluyente), se cubrieron las placas y se incubaron a temperatura ambiente por dos horas. Se realizó un nuevo lavado de las placas, se agregaron 100 μ L/pozo de la solución de estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano) proporcionado por el kit comercial, a una dilución de trabajo de 1/100 en reactivo diluyente, y se incubaron las placas a temperatura ambiente por 20 minutos, se repitió el proceso de lavado de las placas en 3 oportunidades y se agregaron 100 μ L/pozo de la solución de sustrato (solución de TMB en 1ml de DMSO reconstituido en 9ml de buffer citrato fosfato y 10 μ L de H₂O₂), se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos, protegiéndolas de la luz directa y luego las placas fueron detenidas con 50 μ L/pozo de solución de detención (H₂SO₄ al 2N).

La lectura de las placas se realizó usando el espectrofotómetro ELX 800 (Bio - Tek instruments), a una longitud de onda de 450nm; donde el límite de sensibilidad del ensayo fue de 31.25 pg/ml y se asignó un valor arbitrario de 15 pg/mL a los valores por debajo del límite de sensibilidad.

8.6 PLAN DE TABULACION Y ANALISIS DE DATOS

Los datos obtenidos a partir de las técnicas de recolección de información se almacenaron en hojas de cálculo del programa Microsoft office Excel 2007 del paquete de Microsoft office 2007; las cuales representaron la base de datos del estudio y fueron la referencia de información a evaluar en nuestra investigación.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.0, en el cual se usaron pruebas no paramétricas para la realización de comparaciones entre los grupos a evaluar, para el análisis de grupos independientes, se utilizó la prueba de Mann-Whitney, para el análisis de variables pareadas se utilizó el test de Wilcoxon y para determinar el grado de correlación entre las variables se usó el coeficiente de correlación de Spearman. Una $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa en todos los casos.

9. CONSIDERACIONES ETICAS

Esta investigación será realizada según las disposiciones generales consagradas en la resolución 8430 de 1993, por las cuales se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud y la cual según el artículo 11 de la misma, clasifica esta esta investigación como con riesgo mínimo, que representan estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, electrocardiogramas, pruebas de agudeza auditiva, termografías, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, recolección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a grupos o individuos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico y registrados o su autoridad delegada, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos que se definen en el artículo 55 de esta resolución.

Teniendo en cuenta también las disposiciones generales del capítulo III de la misma en sus artículos 23 al 28, sobre la investigación en menores de edad y discapacitados.

Esta investigación clasificada como de riesgo mínimo cumple las disposiciones explícitas en los artículos 14, 15 y 16 de la resolución 8430 de 1993, con lo referente a la aplicación de un consentimiento informado a la población de estudio, que será sometido a evaluación ante el comité de ética médica de la facultad de salud de la universidad Surcolombiana, según la normatividad establecida. (Ver anexo A)

Este estudio no presenta conflicto de intereses.

10. RESULTADOS

Características sociodemográficas de los pacientes infectados con VD

Se realizó la selección de 20 pacientes que ingresaron al hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva con infección por VD, según la clasificación revisada de la OMS y se realizó la distribución por género y edad.

Cuadro 2. Características sociodemográficas.

EDAD (AÑOS)	FRECUENCIA	%(n=20)
1	1	5
3	2	10
4	3	15
5	4	20
7	3	15
8	2	10
9	1	5
10	1	5
11	2	10
12	1	5
GENERO		
MASCULINO	10	50
FEMENINO	10	50

Fuente: base de datos concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados con VD.

La tabla 4 nos muestra la distribución por género y edad de los niños infectados con VD, la distribución de edad de los pacientes fue entre 1 y 12 años de edad, con un promedio de 6.45 años y una mediana de 6 años.

Con respecto al género de los pacientes se encontró que el 50% (10 pacientes) correspondían al género masculino y el otro 50% (10 pacientes) eran de género femenino.

Determinación de las concentraciones plasmáticas de TSLP

Se realizó la toma de muestras de sangre venosa periférica a los 20 niños con infección por VD, se tomaron 20 muestras de niños sanos y de 20 niños con atopía de la seroteca del laboratorio de inmunología de la universidad surcolombiana, luego del cual se realizaron las respectivas mediciones biofisiológicas in vitro utilizando la técnica de ELISA y se determinaron las concentraciones plasmáticas de TSLP en cada uno de los grupos.

Cuadro 3. Concentraciones plasmáticas de TSLP.

PACIENTE	SANOS (pg/ml)	DENGUE (pg/ml) AGUDO	DENGUE (pg/ml) CONVALESCIENTE	ATOPIICOS (pg/ml)
1	99.5	15.0	15.0	271.5
2	193.4	338.4	229,3	328.1
3	609.0	70.5	95	931.7
4	15.0	57.0	260,3	372.9
5	785.7	15.0	15.0	539.6
6	139.8	1228.7	893,4	1265.0
7	15.0	15.0	15.0	15.0
8	15.0	15.0	15.0	15.0
9	15.0	37.6	15.0	113.5
10	172.0	72.9	15.0	88.0
11	15.0	1095.9	290,3	688.1
12	137.8	85.4	15.0	76.1
13	15.0	15.0	15.0	72.5
14	15.0	15.0	15.0	330.6
15	15.0	333.8	174,6	2643.0
16	15.0	15.0	15.0	5163.9
17	284.2	15.0	15.0	36.8
18	86.9	44.5	15.0	15.0
19	15.0	1186.0	1177,5	104.4
20	942.6	448.0	374,3	485.4

Fuente: base de datos concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados con VD.

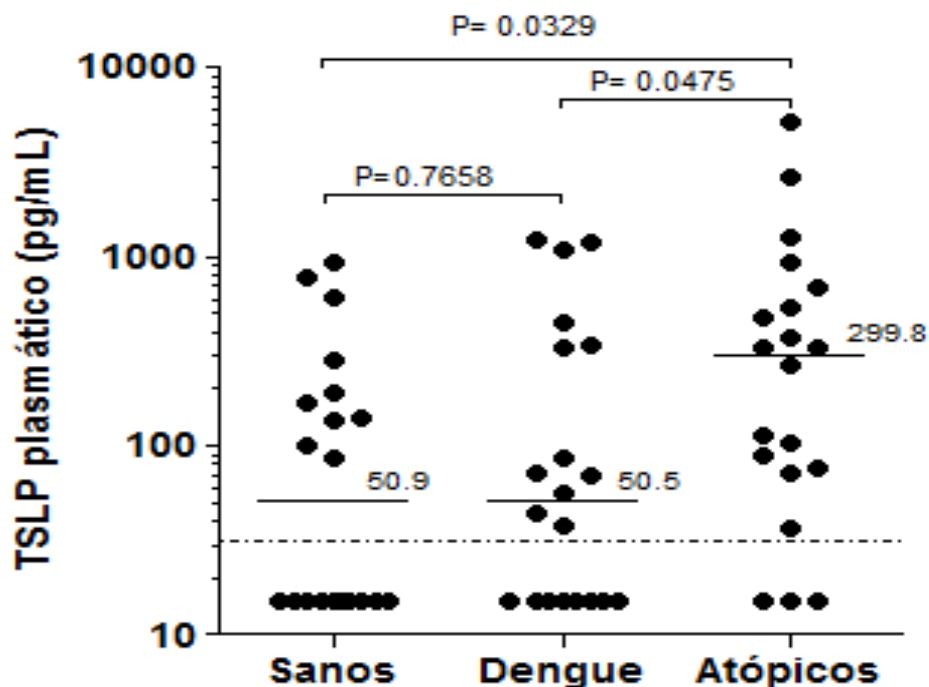
Como se muestra en la tabla 5, en los niños infectados con VD se encontraron concentraciones plasmáticas de TSLP de distribución muy variable, 12 niños con infección con VD en fase aguda tenían concentraciones plasmáticas detectables

con un valor máximo 1228.7 pg/mL y una mediana de 50.5 pg/mL; en la fase de convalecencia de la infección se identificaron concentraciones de TSLP en 8 niños con una concentración máxima de 1177.5 pg/mL y una mediana de 15.6 pg/mL, en los niños atópicos como control positivo de la prueba se encontraron concentraciones plasmáticas detectables de TSLP en 17 niños de los 20 niños, con niveles mayores a las concentraciones niños infectados con VD, con un valor máximo de 5163.9 pg/mL y una mediana de 299.8 pg/mL; En los niños sanos que representaban el control negativo de la prueba, 10 de los 20 niños tenían concentraciones plasmáticas de TSLP detectables con un valor máximo de 942.6 pg/mL y una mediana de 50.9 50.5 pg/mL.

Comparación de niveles plasmáticos de TSLP en niños infectados con VD, niños sanos y niños atópicos

Debido a que un patrón de citoquinas Th2 ha sido asociado con las formas severas de dengue y la TSLP ha sido un factor que favorece la respuesta Th2, se determinaron los niveles plasmáticos de TSLP en niños infectados con dengue y se compararon con niños sanos y atópicos como control.

Figura 1. Comparación de las concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados con VD, sanos y atópicos.



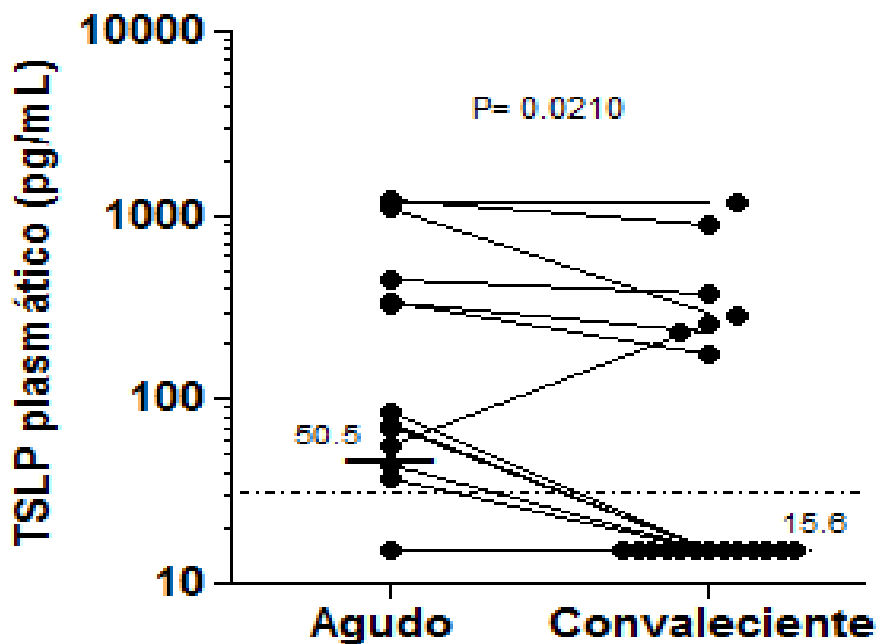
Fuente: base de datos concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados con VD.

Como muestra la figura 1, no existieron diferencias significativas en la concentración de TSLP entre niños sanos y los infectados con dengue en fase aguda, con una mediana (rango) de 50.9 pg/mL (15.6 – 942.6) y 50.5 pg/mL (15.6 – 1,228), respectivamente (P= 0.76, Mann-Whitney test). Como ha sido previamente reportado, se observó un aumento significativo de las concentraciones de TSLP en niños atópicos al ser comparados con niños sanos (P=0.032, Mann-Whitney test) y niños con dengue (P=0.047, Mann-Whitney test). Diecisiete de 20 niños atópicos, tuvieron concentraciones detectables de TSLP, con una mediana de 299.8 pg/mL (15.6 – 5,163.9). En conjunto estos resultados sugieren que la infección con VD en su fase aguda, no altera la concentración plasmática de TSLP y que niños con atopía tienen incrementado el nivel de este marcador.

Niveles de TSLP plasmática en fase aguda y convaleciente de la infección por VD.

Ya que los valores plasmáticos de las citoquinas son dinámicos y varían rápidamente a través del tiempo, la concentración de TSLP fue evaluada en fase aguda y convaleciente de la infección en los mismos pacientes con dengue.

Figura 2. Concentración plasmática de TSLP en niños infectados por VD en fase aguda y convaleciente de la infección.



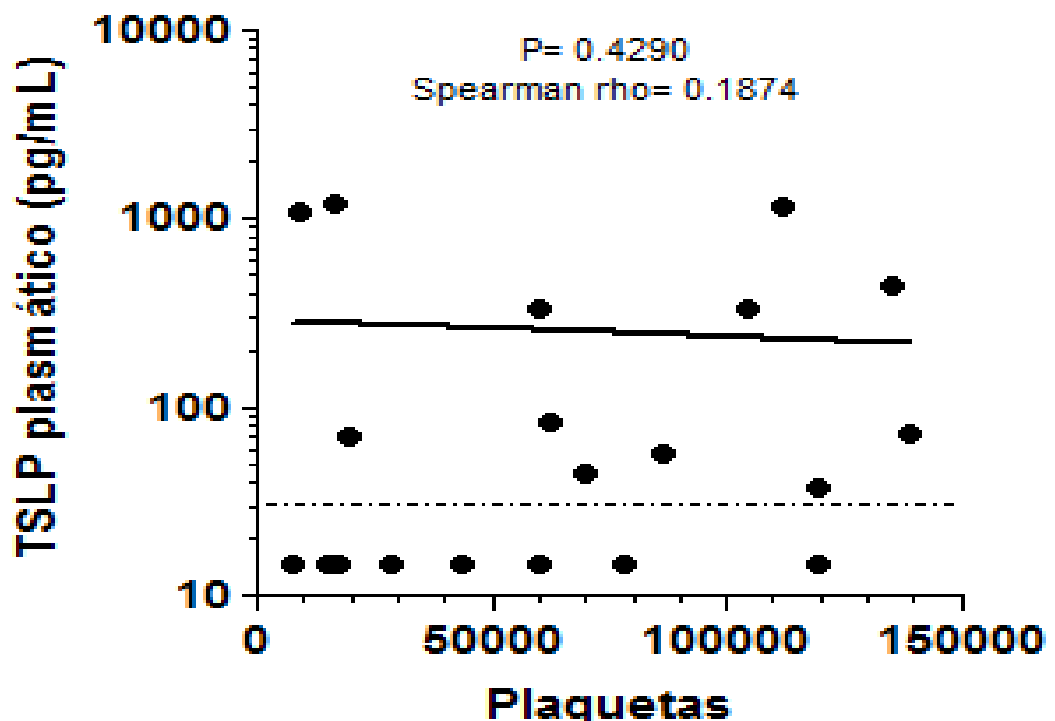
Fuente: base de datos concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados con VD.

Como se muestra en la figura 2, una caída significativa en la cantidad de TSLP circulante fue detectada entre la etapa aguda y convaleciente de la infección, con una mediana (rango) de 50.5pg/mL (15.6-1,228.3) y 15.6pg/mL (15.6-1,177) (P=0.021, Wilcoxon test), respectivamente. En conjunto estos resultados sugieren que en la convalecencia de los pacientes que se recuperaron de una infección por VD, la cantidad TSLP fue inhibida. La concentración de TSLP plasmática no se relaciona con el número de plaquetas circulantes.

Relación entre las concentraciones plasmáticas de TSLP y la trombocitopenia en la severidad clínica de la enfermedad

Finalmente se evaluó la posible relación entre la concentración de TSLP y la trombocitopenia como marcador de gravedad de la enfermedad. El número de plaquetas se obtuvo del cuadro hemático de los pacientes realizado en la misma muestra en que el TSLP fue medido.

Figura 3. Ausencia de relación entre los niveles de TSLP y el conteo de plaquetas circulantes.



Fuente: base de datos concentraciones plasmáticas de TSLP en niños infectados con VD.

Los resultados obtenidos (figura 3.) no mostraron relación alguna entre la concentración plasmática de TSLP y el grado de trombocitopenia en los pacientes con dengue (Spearman $\rho=0.18$, $P=0.42$). Este resultado sugiere que la TSLP no está relacionada con el descenso en las plaquetas observado en los pacientes infectados con VD.

11. DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la concentración plasmática de TSLP en niños infectados con VD, niños sanos y niños atópicos como controles y se encontró que: A. No existieron diferencias en la concentración plasmática de TSLP entre niños infectados con VD y niños sanos, pero fue significativamente más alta en los niños atópicos. B. Hubo una caída significativa de la TSLP entre la fase aguda y de convalecencia de los niños infectados con VD y C. No se encontró correlación entre los niveles de TSLP plasmático y el número de plaquetas circulantes.

Con respecto a las condiciones sociodemográficas la distribución de edad se encontró un predominio de niños menores de 6 años de edad con un promedio de edad de 6.45 años y una mediana de 6 años, que concuerdan con lo reportado en la literatura con una incidencia entre los 5 y 9 años⁵⁸; con respecto a la distribución de género el 50% son de género masculino y 50% femenino, estos datos no son significativos debido al tamaño de la población, se debe realizar en un población de mayor tamaño.

Al comparar los niveles plasmáticos de TSLP entre niños infectados con VD, niños sanos (como control negativo) y niños atópicos (como control positivo), no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los dos primeros grupos evaluados. Como se esperaba y en apoyo de datos previamente publicados⁵⁹, niveles significativamente más altos de TSLP fueron encontrados en niños con atopía. Estos resultados, en primer lugar, apoyan la validez del ensayo usado para la detección de TSLP plasmático en este estudio, además de sugerir al menos de manera parcial la participación limitada o la no participación de éste factor circulante en la fisiopatología de la infección por VD. De notar, los niveles basales de TSLP encontrados en niños sanos fueron superiores a los reportados recientemente en una población pediátrica asiática⁵⁹. Niveles 10 veces más altos de TSLP fueron también encontrados en los niños atópicos de nuestro estudio comparado a niños atópicos asiáticos. Con los resultados obtenidos es importante resaltar el hecho de que puede la TSLP estar determinada por variables ambientales o genéticas que por las limitaciones del estudio son difíciles discernir.

Variáveis socio ambientales como las frecuentes parasitosis intestinales en los países en vías de desarrollo y que se adquieren con gran facilidad en las edades tempranas debido al inadecuado manejo de las aguas y residuos, pueden predisponer en cierta medida concentraciones plasmáticas elevadas. La ubicuidad y la cantidad de alérgenos que se pueden hallar en los diferentes espacios que frecuenta esta población en particular pueden ser también un nicho que influya en la producción de cantidades altas de esta proteína en sangre. La proporción

enorme de vacunas a las que están sometidos los niños durante este periodo de la infancia y aun el tipo de alimentación (por ejemplo las frutas) que se ingieren en esta parte del mundo son factores que de alguna manera podrían estar interviniendo en la síntesis de TSLP por parte de las células que conforman el sistema inmunológico.⁶⁰ Cabe anotar que los diferentes serotipos del virus dengue puedan en cierta medida influir en el tipo de respuesta que suscita en el organismo; finalmente factores genéticos no deben ser descartados como explicación a las diferencias en los valores de TSLP plasmáticos encontrados en estas dos poblaciones⁶¹.

Datos importantes y que se deben observar con mucha atención son los encontrados cuando se evaluaron de manera comparativa dos fases importantes de la enfermedad, en donde se puede reconocer una caída significativa en la concentración de TSLP entre la fase aguda y convaleciente de la infección por VD. La razón que explica esta diferencia no es clara. La gran mayoría de los niños infectados incluidos en este estudio tienen diagnóstico de dengue con signos de alarma y todos ellos por lo tanto, no desarrollaron dengue severo. La puntualización de que solamente un paciente cumplió con los criterios de gravedad es importante, puesto que es en esta población en donde se describió la polarización existente hacia un perfil tipo Th2. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado estudios posteriores sobre la temática podrían incluir un número mayor de pacientes con diagnóstico de dengue severo. El IFN γ (marcador típico de la respuesta Th1) ha sido implicado en la protección contra las formas severas de la infección e incluso en modelos humanos de vacunación, LT CD8+ productores de IFN γ han sido recientemente propuestos como un marcador de protección⁶². Es posible que la mayoría de estos niños que no desarrollaron la forma severa, hubieran tenido un perfil Th1 dominante que haya por tanto suprimido durante el curso tardío de la enfermedad factores que inducen la respuesta Th2, dentro de ellos la TSLP.

En apoyo de la no participación directa del TSLP plasmático en la fisiopatología de la infección por VD, no se encontró correlación entre los niveles de TSLP y la trombocitopenia, un conocido marcador de severidad⁵¹, aunque es claro que este no es el estudio ideal para analizar el posible papel de la TSLP en la severidad de la infección puesto que solo un paciente, como se mencionó anteriormente, cumplió con los criterios de gravedad. Sin embargo, los niveles de TSLP en el plasma de ese paciente se encontraron también por debajo del límite de detección de la técnica.

Aunque son muchas las publicaciones sobre TSLP y modelos experimentales que muestran su implicación en procesos inmunológicos, son relativamente escasos

aquellos trabajos que miden el comportamiento de la TSLP en plasma humano y esto se limita a enfermedades atópicas⁵⁹; Este es el primer trabajo, a nuestro conocimiento, que explora el papel de este mediador inmune medido en plasma en la fisiopatología de la infección por VD y los resultados en general sugieren que no hay una implicación directa de este.

Existen otras citoquinas que juegan también un importante papel en la inducción de un perfil Th2, como lo son la IL-7, IL-33 y la IL-25^{63, 64}, que bajo estímulos de algunos componentes de patógenos pueden iniciar un cambio en la respuesta inmunológica y por tanto deben ser evaluados en la infección por VD en un futuro. La participación de la TSLP en la respuesta inmune a VD debe además ser analizada no solo a nivel sistémico (como el evaluado aquí) sino a nivel local en el epitelio.

12. CONCLUSIONES

Las concentraciones en plasma de TSLP, como se ha descrito en publicaciones anteriores, fueron mucho mayores, comparadas con las que presentaron el grupo de pacientes con dengue en fase aguda de la enfermedad y el grupo control.

No se encontraron diferencias significativas cuando se contrastaron los niveles de TSLP plasmático en los pacientes con dengue y el grupo de voluntarios sanos.

Se presenta una disminución estadísticamente significativa en las concentraciones plasmáticas de TSLP en los pacientes con dengue en fase de convalecencia cuando se relaciona con la fase aguda de la enfermedad.

No se encontró relación entre un conocido marcador de severidad en el dengue, como la trombocitopenia, y los niveles en plasma de TSLP en los pacientes con dengue.

Es posible que la TSLP no tenga un papel relevante dentro de los eventos fisiopatológicos en la infección con virus dengue, sin embargo, se deben evaluar algunos otros parámetros y condiciones que puedan direccionar la respuesta inflamatoria en esta enfermedad.

13. RECOMENDACIONES

Algunos aspectos que cobran relevancia dadas las aproximaciones que nos permite examinar el trabajo que se llevó a cabo en cuanto a algunos de los eventos involucrados en la fisiopatología de la infección por virus dengue incluyen:

- Abarcar un mayor número de pacientes con diagnóstico de dengue grave o severo según los criterios fijados en la guía de la OMS del 2010 para el diagnóstico, clasificación y manejo del dengue, con el fin de evaluar y poder determinar factores pronósticos que nos indiquen de forma aproximada cual será el curso de la enfermedad.
- Evaluar de forma comparativa la posible interacción o relación que pueda darse en los pacientes con dengue entre la TSLP y citoquinas tipo Th1, como el IFN- γ , con la finalidad de señalar si las posibles concentraciones bajas de una u otra citoquina se deben a una acción antagonista de la una hacia la otra o se debe a una fase con una disminuida producción de citoquinas proinflamatorias
- Se debe examinar igualmente la posibilidad que la respuesta tipo Th2 en los casos de pacientes con formas graves de la enfermedad este liderada por otras citoquinas diferente a la TSLP, dentro de las que se incluyen la IL-7, IL-33 y la IL-25, de las que se han descrito importante influencia en la respuesta inmunológica frente a parásitos y en enfermedades alérgicas.
- Dada la importante producción de TSLP en los pacientes que se incluyeron en el estudio y que se clasificaron en el grupo de atópicos, comparado con otras poblaciones en donde se han llevado a cabo estudios que evalúan las concentraciones de TSLP en plasma en niños con alergias, cabe la posibilidad de estimar los niveles de ésta y evaluar su posible asociación con patologías concretas como la rinitis alérgica, el asma bronquial y la dermatitis atópica.

BIBLIOGRAFIA

1. LIU, Y.J., Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med*, 2006. 203(2): p. 269-73.
2. CENTRE FOR DISEASE CONTROL, DENGUE, <<http://www.cdc.gov/NCIDO/DVBID/DENGUE>>
3. KUBELKA, C.F., multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP- 1 beta and IFN- gamma as predictive factors for severity. *BMC infectious diseases*, 2008
4. AGARWAL, R., *et al.*, A clinical study of the patients with dengue hemorrhagic fever during the epidemic of 1996 at Lucknow, India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1999. 30(4): p. 735-40.
5. CHATURVEDI, U.C., *et al.*, Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol*, 1999. 59(3): p. 335-40.
6. _____ Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever. *Indian J Med Res*, 2009. 129(1): p. 1-3.
7. RESTREPO, B.N., *et al.*, Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg*, 2008. 79(5): p. 673-7.
8. _____ *et al.*, Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2008. 41(1): p. 6-10.
9. CHATURVEDI, U.C., Tumour necrosis factor & dengue. *Indian J Med Res*, 2006. 123(1): p. 11-4.
10. Shi, Y.J., Z.Y. Jiang, and K. Zeng, [Effect of IL-6 and TNF-alpha on Dengue virus infection of human dendritic cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2006. 22(4): p. 469-71.

11. NGUYEN, T.H., *et al.*, Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis*, 2004. 189(2): p. 221-32.
12. HOUGHTON-TRIVINO, N., *et al.*, Levels of soluble ST2 in serum associated with severity of dengue due to tumour necrosis factor alpha stimulation. *J Gen Virol*, 2010. 91(Pt 3): p. 697-706.
13. SIERRA, B., *et al.*, MCP-1 and MIP-1alpha expression in a model resembling early immune response to dengue. *Cytokine*, 2010. 52(3): p. 175-83.
14. PRIYADARSHINI, D., *et al.*, Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS One*, 2010. 5(1): p. e8709.
15. BOZZA, F.A., *et al.*, Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis*, 2008. 8: p. 86.
16. DEJNIRATTISAI, W., *et al.*, A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *J Immunol*, 2008. 181(9): p. 5865-74.
17. KUBELKA, C.F., *et al.*, Metalloproteinases are produced during dengue fever and MMP9 is associated with severity. *J Infect*, 2010. 61(6): p. 501-5.
18. AZEREDO, E.L., *et al.*, Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology*, 2010. 130(2): p. 202-16.
19. RAY, R.J., *et al.*, Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development in vitro, in *Eur J Immunol*. 1996. p. 10-6.
20. HE, R. and R.S. GEHA, Thymic stromal lymphopoietin. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. 1183: p. 13-24.

21. ISAKSEN, D.E., *et al.*, Requirement for stat5 in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction. *J Immunol*, 1999. 163(11): p. 5971-7.
22. RECHE, P.A., *et al.*, Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol*, 2001. 167(1): p. 336-43.
23. SOUMELIS, V., *et al.*, Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP, in *Nat Immunol*. 2002. p. 673-80.
24. _____, V. and Y.J. LIU, Human thymic stromal lymphopoietin: a novel epithelial cell-derived cytokine and a potential key player in the induction of allergic inflammation, in *Springer Semin Immunopathol*. 2004. p. 325-33.
25. WANG, Y.H. and Y.J. Liu, OX40-OX40L interactions: a promising therapeutic target for allergic diseases? *J Clin Invest*, 2007. 117(12): p. 3655-7.
26. AL-SHAMI, A., *et al.*, A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med*, 2005. 202(6): p. 829-39.
27. ZIEGLER, S.F., The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. *Curr Opin Immunol*, 2010.
28. ZIEGLER, S.F. and Y.J. Liu, Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat Immunol*, 2006. 7(7): p. 709-14.
29. KOYAMA, K., *et al.*, A possible role for TSLP in inflammatory arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 357(1): p. 99-104.
30. TAYLOR, B.C., *et al.*, TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J Exp Med*, 2009. 206(3): p. 655-67.
31. POULSEN, L.K. and L. Hummelshoj, Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann Med*, 2007. 39(6): p. 440-56.

32. ZIEGLER, S.F. and D. Artis, Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat Immunol*, 2010. 11(4): p. 289-93.

33. ZHENG, X., *et al.*, TSLP and downstream molecules in experimental mouse allergic conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. 51(6): p. 3076-82.

34. WONG, C.K., *et al.*, Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and pro-survival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. 43(3): p. 305-15.

35. XIA, H., *et al.*, [Respiratory syncytial virus infection promotes the production of thymic stromal lymphopoietin and accelerates Th2 inflammation in mouse airway]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2009. 29(4): p. 724-8.

36. FONTENOT, D., *et al.*, TSLP production by epithelial cells exposed to immunodeficiency virus triggers DC-mediated mucosal infection of CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(39): p. 16776-81.

37. ULLER, L., *et al.*, Double-stranded RNA induces disproportionate expression of thymic stromal lymphopoietin versus interferon-beta in bronchial epithelial cells from donors with asthma. *Thorax*, 2010. 65(7): p. 626-32.

38. QIAO, J., A. Li, and X. Jin, TSLP from RSV-stimulated rat airway epithelial cells activates myeloid dendritic cells, in *Immunol Cell Biol*. 2010.

39. OMS/WHO, DENGUE Y DENGUE HEMORRAGICO, 2009
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>>

40. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD OPS/OMS- Guía de Atención Clínica Integral del Paciente con Dengue. Bogotá, 2010

41. SECRETARIA DEPARTAMENTAL DE SALUD DEL HUILA, "Presentación del cuarto informe de evaluación de indicadores de Vigilancia en Salud Pública del Departamento del Huila, 2008"
<<http://www.gobhuila.gov.co/cms/images/stories/file/salud/vigilancia/IV%20INFORME%20TRIM%20HUILA%202008%20.pdf>>

42. NIELSEN, D.G., *the relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis*. Review, *Virology Journal* 2009
43. LAUERMAN, *et al. human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP*. *Nat Immunol*. 2002
44. KATO A, FAVORETO S Jr, Avila PC and Schleimer RP. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2007; 179:1080-1087.
45. ROSA, Ma. del Ángel. *Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral*. Cinvestav. 2006
46. SUCHITRA RANJIT. *Dengue viral infections and shock syndromes: An overview*. Review article, *Journal of pediatric infectious diseases* 4 (2009) 107-117.
47. A.L. ROTHMAN, *Pathogenesis of Dengue virus infection, Up To Date* 2008. Descargado de <http://www.Uptodate.com>. Acceso septiembre 2010
48. MARTÍNEZ R,; DÍAZ FA,; VILLAR LA. Evaluación de la definición clínica de dengue sugerida por la Organización Mundial de la Salud. *Biomédica*, Vol. 25, 2005, p. 412 – 6
49. GUBLER D, Clark G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging Infectious Diseases* V 1, p 55-57, 1995.
50. GONZALES G,; MENDEZ A. Dengue: espectro clínico. *Tribuna Médica*, 1999;99(5):203
51. TDR/WHO. *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control* (TDR/WHO, Geneva, Switzerland, 2009).
52. MARTÍNEZ, E. La prevención de la mortalidad por dengue: un espacio y un reto para la atención primaria de salud. *Rev. Panam. Salud Pública*, v.20, n.1, p.60-74, 2006.

53. GUZMAN, M. G. & KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int. J. Infect. Dis.* 8, 69–80 (2004).
54. N.A. JENKINS, *et al.* molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *J. Exp. Med.* 192:671-680
55. LIU, Y.J.; V. SOUMELIS, N.; WATANABE, T; *et al* Ito, TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 193 – 219.
56. RIMOLDI, M. *et al.* Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6 ,507 – 514 (2005).
57. Ito, T. *et al.* TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand . *J. Exp. Med.* 202, 1213 – 1223 (2005).
58. HAMMOND S, BALMASEDA A, *et.al* Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73: 1063-70.
59. LEE, E. B. *et al.* Increased serum thymic stromal lymphopoietin in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 21, e457-460, doi:PAI919 [pii]
60. COOPER, P. J. *et al.* Impact of early life exposures to geohelminth infections on the development of vaccine immunity, allergic sensitization, and allergic inflammatory diseases in children living in tropical Ecuador: the ECUAVIDA birth cohort study. *BMC Infect Dis* 11, 184, doi:1471-2334-11-184 [pii]
61. HUNNINGHAKE, G. M. *et al.* TSLP polymorphisms are associated with asthma in a sex-specific fashion. *Allergy* 65, 1566-1575, doi:ALL2415 [pii] 10.1111/j.1398-9995.2010.02415.x.
62. GUNTHER, V. J. *et al.* A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. *Vaccine* 29, 3895-3904, doi:S0264-410X(11)00406-3 [pii] 10.1016/j.vaccine.2011.03.038.

63. LU, N., WANG, Y. *et.al* use two different mechanisms to regulate human CD4+ T cell homeostasis. *J Exp Med* 206, 2111-2119, doi:jem.20090153 [pii] 10.1084/jem.20090153 (2009).

64. SAENZ, S. A., TAYLOR, B. C. & ARTIS, D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev* 226, 172-190, doi:IMR713 [pii] 10.1111/j.1600-065X.2008.00713.x (2008).

ANEXOS

Anexo A. Consentimiento Informado

**AUTORIZACION EN PARTICIPACION DE PROYECTO
“CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE TSLP EN POBLACION PEDIATRICA
INFECTADOS CON VIRUS DENGUE”**

Si usted desea participar en este estudio, por favor complete los siguientes datos y conserve una copia de este documento.

Fecha: ____ de _____ del _____

Yo, _____
Nombre completo de la persona que entrega el consentimiento

Declaro que me explicaron los objetivos y los procedimientos de este estudio y que tuve la posibilidad de hacer preguntas para aclarar mis dudas.
Doy voluntariamente mi consentimiento para participar en este estudio a mi hijo/hija _____, en el desarrollo de este proyecto de investigación.

Entiendo que el personal a cargo del estudio revisara los registros médicos de mi hijo/hija, realizara controles clínicos y paraclínicos con toma de 6 ml de sangre a mi hijo.

Firma de la persona que acepta el consentimiento

Nombre completo del profesional que obtuvo el consentimiento

TESTIGO 1	TESTIGO 2
NOMBRE:	NOMBRE:
FIRMA:	FIRMA:
CC No:	CC No:

Concentraciones plasmáticas de linfopoyetina estromal tímica en niños infectados por virus dengue

Plasmatic concentrations of thymic stromal lymphopoietin in dengue virus-infected children

David Pastrana¹, Jhonny K. Muñoz¹,
Felipe Ortiz¹, Rocío Vega²,
Jairo A. Rodríguez², Doris Salgado²,
Luz Stella Rodríguez³ y Carlos F. Narváez²

Resumen

La linfopoyetina estromal tímica (TSLP) es un citoquina recientemente descrita que juega un papel clave en la fisiopatología de enfermedades alérgicas y parasitarias. La TSLP, luego de ser producida por el epitelio en respuesta a diferentes estímulos como componentes bacterianos y virales, condiciona a células dendríticas locales a generar una respuesta de linfocitos Th2. En el dengue, una enfermedad viral febril endémica en Colombia, un predominante perfil de citoquinas Th2 ha sido descrito en los niños que presentan formas severas y potencialmente letales de la enfermedad. Aquí se determinaron por ELISA, las concentraciones plasmáticas de TSLP en niños con dengue en fase aguda y convaleciente de la enfermedad, comparándolos con los niveles presentes en niños sanos y atópicos como controles. Los resultados indican que no hay diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de TSLP entre los niños sanos y los niños infectados con dengue en fase aguda. Sin embargo, una disminución significativa fue encontrada en los niños infectados entre la etapa aguda y convaleciente de la infección. Cuando se compararon los niveles de TSLP con el número de plaquetas, un conocido marcador de severidad en el dengue, no hubo correlación. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el TSLP plasmático podría no estar implicado directamente en la fisiopatología de la infección por virus dengue. Otros factores de polarización de linfocitos T locales y sistémicos deberían ser evaluados.

Palabras clave:
virus dengue (VD),
linfopoyetina
estromal tímica
(TSLP),
linfocitos T (LT),
Th2, ELISA

Abstract

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is a recently described cytokine involved in the physiopathogenesis of allergic and parasitic diseases. After production by epithelial cells in response to different stimuli like bacterial and viral components, the TSLP modulate the function of dendritic cells to generate a Th2-lymphocyte response. In dengue, an endemic viral febrile disease in Colombia, a predominant Th2-cytokine pattern has been described in children suffering forms severe and potentially lethal dengue. Here, it was determined by ELISA, the plasma concentrations of TSLP in children undergoing the acute and convalescent stage, in comparison to healthy and atopic children's levels as controls groups. Results show no significant differences in plasma concentrations of TSLP between healthy and acute-phase dengue-infected

Key words:
virus dengue (VD),
thymic stromal
lymphopoietin,
(TSLP),
T lymphocytes, Th2,
ELISA

¹ Estudiantes de Medicina, Semillero de Investigación SINEDIR, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia.

² Grupo de Parasitología y Medicina Tropical, Facultad de Salud, Programa de Medicina, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia.

³ Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Correspondencia:
Carlos F. Narváez.
Correo electrónico:
cfnarvaez@usco.edu.co
Número de Fax:
57-8-8718959

Recibido: 11 de mayo de 2011
Aceptado: 23 de junio de 2011

children and just atopic children showed significant higher levels of TSLP. However, a significant decrease in plasmatic TSLP was noted between the acute and convalescent phase of the dengue infection. When comparing the TSLP levels to the number of platelets, a known marker of dengue severity, there was no correlation. These findings support the hypothesis that plasma TSLP could not be directly involved in the pathogenesis of dengue infection in children and other local T lymphocyte polarization and systemic factors should be explored.

Introducción

El dengue es la enfermedad viral transmitida por vector más importante a nivel mundial. Se estima que 2,5 billones de personas en el mundo están en riesgo de contraer la infección y que más de 50 millones se infectan cada año, número que incluye a los 500.000 casos en donde la hospitalización es necesaria. En general, la mortalidad por dengue se estima en 1%, pero varía dependiendo de la región analizada y puede llegar a ser del 5% en países como el nuestro⁽¹⁾. El virus dengue (VD) es un virus que pertenece a la familia *Flaviviridae*, cuyo genoma está constituido por ARN de cadena sencilla y polaridad positiva. Existen cuatro serotipos diferentes (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) con una homología mayor al 65% entre ellos. El virión maduro está conformado por 3 proteínas estructurales: la proteína E que se encuentra en la envoltura, proteína M, asociada a la membrana, proteína C que forma la cápside y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) que especialmente participan en el control de la replicación viral y en la evasión de la respuesta inmune⁽²⁻⁴⁾.

La infección con VD causa una enfermedad de amplio espectro clínico que incluye desde cuadros asintomáticos hasta cuadros graves que pueden conducir a la muerte. Entre las formas graves se destacan hemorragias, choque, insuficiencia hepática, encefalopatía y miocarditis^(5,6). Actualmente se han dilucidado algunos de los mecanismos por los cuales la infección por VD puede provocar una enfermedad severa. Entre ellos se destacan la alteración de la inmunidad mediada por células con el aumento de producción de mediadores inflamatorios, la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) y la acción del complemento^(7,8).

Hay evidencia de que el patrón de citoquinas producido por los linfocitos T (LT) durante la infección, es un factor determinante de la severidad de la enfermedad⁽⁹⁾. Se ha reportado por ejemplo, que LT CD8+ homotípicos producen generalmente importantes cantidades de IFN γ , un citoquina clave para la inmunidad celular, mientras que LT CD8 + heterotípicos generalmente producen importantes cantidades de TNF α , una citoquina proinflamatoria que ha sido asociada con la severidad de la enfermedad^(10,11). Mientras que el papel de las citoquinas en la fisiopatología y asociación con manifestaciones clínicas de la enfermedad permanece controversial, es aceptado que el IFN γ puede tener un papel protector en la infección o vacunación con VD⁽¹²⁾. Por el contrario, se ha descrito que en niños que sufren formas severas de infección por VD ocurre un cambio hacia la producción de IL-4 (clásica citoquina que define el perfil Th2)⁽¹³⁾.

Varios factores inducen la polarización de LT vírgenes hacia un perfil Th2. Dentro de ellos tenemos la baja producción de IL-12p70 por la célula presentadora de antígeno (CPA), la presencia de IL-4 externa, la relación del número de CPA y LT, entre otras⁽¹⁴⁾. Recientemente la TSLP ha sido mostrada como uno de los principales factores que inducen a la célula dendrítica (CD) a producir la polarización de LT hacia un perfil Th2. En apoyo de esto, la TSLP ha sido ampliamente caracterizada en enfermedades alérgicas y parasitarias⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Las células epiteliales de la piel, intestino y pulmones son la principal fuente de TSLP en el humano; adicionalmente otros tipos celulares como fibroblastos, mastocitos, células de músculo liso bronquial y recientemente células dendríticas murinas, pueden bajo

ciertas condiciones de inflamación producir TSLP^(15,18-20). Algunos estímulos como citoquinas, componentes bacterianos como el ácido lipoteicoico, lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicano y componentes estructurales virales (como el ARN de doble cadena) son inductores de la producción de TSLP por el epitelio⁽²¹⁻²³⁾. El efecto inductor en la producción de TSLP por reconocidos patrones moleculares asociados a patógenos es posiblemente mediado a través de los Toll-like receptors (TLR, por sus siglas en inglés)⁽²⁴⁾. La CPA local, generalmente una célula dendrítica, es condicionada por el TSLP para generar una respuesta Th2 cuando migra al nódulo linfoide secundario^(16,25). Este condicionamiento es especialmente caracterizado por una disminución en la producción de IL-12p70 y un aumento en la producción de IL-10 por parte de la célula dendrítica⁽²⁶⁾. Finalmente, en todos estos modelos, la producción de TSLP favorece la respuesta Th2.

Ya que en formas severas de dengue ha sido mostrada la existencia de una respuesta Th2 y que uno de los más fuertes factores inmunes recientemente asociado a la polarización Th2 *in vitro* e *in vivo* es la TSLP, en este trabajo se propuso determinar si los niveles de TSLP en plasma están alterados durante la infección por VD en niños.

Materiales y métodos

Pacientes y muestras

Niños con edades entre 1 y 14 años, fueron divididos en tres grupos, cada uno con un total de 20 integrantes: 1) niños sanos, 2) niños atópicos, 3) niños con dengue. Como niños sanos fueron tomados los menores provenientes de una Institución Educativa, previo examen pediátrico y paraclínico (cuadro hemático). El grupo de pacientes atópicos se conformó a partir de los niños que asistían a la consulta de alergia del Hospital Universitario de Neiva y que tenían al menos uno de los siguientes diagnóstico clínico y/o paraclínico: eczema, rinitis y/o asma. En el grupo de niños con dengue se incluyeron

pacientes hospitalizados en el servicio de pediatría del Hospital Universitario de Neiva que cumplían con criterios diagnósticos según la clasificación revisada de la Organización Mundial de la Salud⁽²⁷⁾. De los 20 niños incluidos en el grupo de dengue, 19 tenían diagnóstico de dengue con signos de alarma y 1 niño correspondió a dengue severo. Los signos de alarma (n) en el grupo de dengue fueron: dolor abdominal (11), vómito persistente (6), trombocitopenia marcada (2). La característica clínica del paciente con dengue severo fue el choque.

A todos los niños se les tomó 4 a 6 mL de sangre total, por venopunción, en tubos con EDTA. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 250 xg por 10 minutos, se tomó el plasma que fue conservado a -20°C hasta el momento de la realización del ELISA para la cuantificación de TSLP. Al grupo de niños con dengue se les tomó una muestra en la fase aguda (día 3 a 7 después de iniciada la fiebre) y otra en la fase de convalecencia (día 14).

El protocolo utilizado en este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana. Todos los padres o acudientes firmaron el consentimiento informado.

Diagnóstico de infección por VD

El diagnóstico de infección por VD y la clasificación se realizó teniendo en cuenta los criterios revisados de la OMS⁽²⁷⁾. El diagnóstico clínico de la infección se apoyó por la presencia de IgM específica para VD y/o la proteína viral NS1⁽²⁸⁾ en el plasma tomado después del día 6 o al día 3 día de iniciados los síntomas, respectivamente.

Detección de TSLP en plasma

La detección de la concentración plasmática de TSLP se realizó por medio de ELISA, usando un estuche comercial (R&D systems, número de catálogo: DY1398), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este estuche ha sido utilizado en previas publicaciones para la medición de TSLP en modelos de infección viral⁽²⁹⁾ y en niños con

síndrome atópico⁽³⁰⁾. Brevemente, placas de 96 pozos (Nunc, Thermo Scientific, USA) se cubrieron con anticuerpo anti-TSLP humano hecho en oveja y se incubaron a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente, se desechó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con PBS - Tween 20 al 0,05% (solución de lavado), se bloqueó con PBS - albúmina sérica bovina (BSA) al 1% (reactivo diluyente) y se incubaron a temperatura ambiente por 1 h. Tras lavar en tres oportunidades con solución de lavado, se adicionaron 100 μ L/pozo de las muestras en diluciones seriadas. Como control negativo se agregó a algunos pozos reactivo diluyente en ausencia de muestra. La placa fue cubierta e incubada a temperatura ambiente por 2 h al cabo de las que se repitió el lavado de las placas, se adiciono el anticuerpo de detección anti-TSLP humano biotinilado y se incubó por 2 h más. Después de tres lavados, se agregó estreptavidina-peroxidasa y se incubó por 20 minutos, se repitió el proceso de lavado y se agregó 100 μ L/pozo de solución de revelado (1 tableta de tetrametilbenzidina, 1 mL de DMSO, 9 mL de buffer citrato fosfato y 10 μ L de peróxido de hidrógeno). Las placas fueron detenidas con 50 μ L de H₂SO₄, 2N. La placa fue leída usando un espectrofotómetro ELX-800 (Bio-Tek instruments), a una longitud de onda de 450 nm. El límite de sensibilidad del ensayo es de 31,2 pg/mL.

Análisis estadístico

Todos los resultados son mostrados en forma de mediana (rango). Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPadPrism versión 5.0. Pruebas estadísticas no paramétricas fueron usadas. Para el análisis de dos grupos independientes se utilizó la prueba de Mann-Whitney y la prueba de Wilcoxon para el análisis de datos pareados. Para determinar el grado de correlación entre dos variables se usó el coeficiente de correlación de Spearman (ρ). Una $P \leq 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa en todos los casos. Para los valores de TSLP por debajo del límite de sensibilidad y por

propósitos estadísticos, se les asignó un valor de 15 pg/mL.

Resultados

Concentraciones plasmáticas de TSLP en los pacientes con dengue

Debido a que un patrón de citoquinas Th2 ha sido asociado con formas severas de dengue⁽¹³⁾ y la TSLP ha sido un factor que favorece la respuesta Th2⁽¹⁶⁾, se determinaron los niveles plasmáticos de TSLP en niños infectados con dengue y se compararon con niños sanos y atópicos como control.

Como muestra la Figura 1, no existieron diferencias significativas en la concentración de TSLP entre niños sanos y los infectados con dengue en fase aguda, con una mediana (rango) de 50,9 pg/mL (15,6-942) y 50,5 pg/mL (15,6-1,228,3), respectivamente ($P = 0,76$, Mann-Whitney test). Como ha sido previamente reportado, se observó un aumento significativo de las concentraciones de TSLP en niños atópicos al ser comparados con niños sanos ($P = 0,032$, Mann-Whitney test) y niños con dengue ($P = 0,047$, Mann-Whitney test).

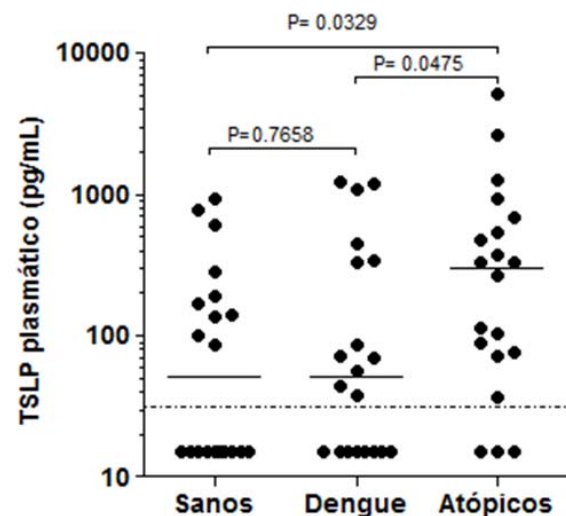


Figura 1. Concentración de TSLP en plasma. Los niveles de TSLP en las muestras de plasma de niños sanos, niños infectados con VD en fase aguda y niños atópicos fueron evaluadas por ELISA. Los puntos representan los niveles de TSLP de cada niño. Las barras horizontales representan la mediana. El valor de P usando la prueba de Mann-Whitney es mostrado. La línea punteada representa el nivel de sensibilidad del ensayo (31,2 pg/mL).

Diecisiete de 20 niños atópicos, tuvieron concentraciones detectables de TSLP, con una mediana de 299 pg/mL (15,6-5,163). En conjunto estos resultados sugieren que la infección con VD en su fase aguda, no altera la concentración plasmática de TSLP y que niños con atopía tienen incrementado el nivel de este marcador.

Niveles de TSLP plasmático en fase aguda y convaleciente de la enfermedad por VD

Ya que los valores plasmáticos de las citoquinas son dinámicos y varían rápidamente a través del tiempo, la concentración de TSLP fue evaluada en fase aguda y convaleciente de la infección en los mismos pacientes infectados con dengue.

Como se muestra en la Figura 2, una caída significativa en la cantidad de TSLP circulante fue detectada entre la etapa aguda y convaleciente de la infección, con una mediana (rango) de 50,5 pg/mL (15,6-1,228) y 15,6 pg/mL (15,6-1,177) ($P = 0,021$, Wilcoxon test), respectivamente. En conjunto estos resultados sugieren que en la convalecencia de los pacientes que se recuperaron de una infección por VD, la cantidad TSLP fue inhibida.

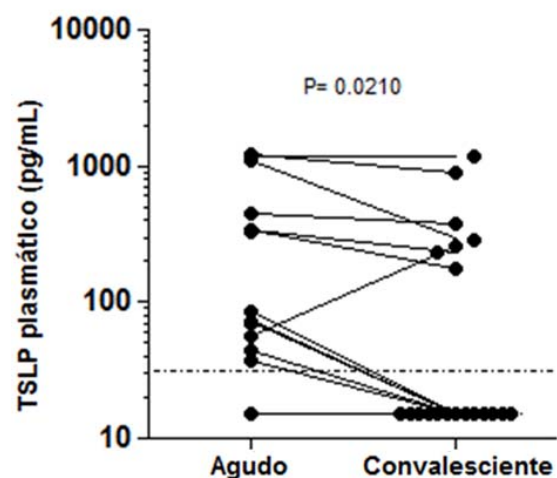


Figura 2. Concentración plasmática de TSLP en niños infectados por VD en fase aguda y convaleciente de la infección. Las concentraciones de TSLP en el plasma de los niños infectados con VD fueron evaluadas por ELISA. Las líneas continuas unen la muestra tomada en fase aguda y de convalecencia en el mismo paciente. La P establecida usando la prueba de Wilcoxon es mostrada. La línea punteada representa el nivel de sensibilidad del ensayo (31,2 pg/mL).

La concentración de TSLP plasmática no se asocia con el número de plaquetas circulantes

Finalmente se evaluó la posible asociación entre la concentración de TSLP y la trombocitopenia como marcador de gravedad de la enfermedad. El número de plaquetas se obtuvo del cuadro hemático de los pacientes realizado en la misma muestra en que la TSLP fue medida. Los resultados obtenidos (Figura 3) no mostraron correlación alguna entre la concentración plasmática de TSLP y el grado de trombocitopenia en los pacientes con dengue (Spearman rho = 0,18, $P = 0,42$). Este resultado sugiere que la TSLP no está relacionada con el descenso en las plaquetas observado en los pacientes infectados con VD.

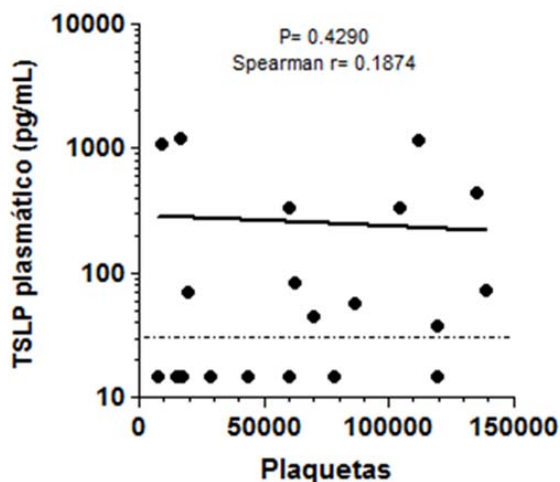


Figura 3. Ausencia de correlación entre los niveles de TSLP y el conteo de plaquetas circulantes. Los niveles de TSLP y número de plaquetas fueron evaluados en la misma muestra en fase aguda. La línea de tendencia y el grado de correlación (RHO de Spearman) son mostrados.

Discusión

En este estudio se analizó la concentración plasmática de TSLP en niños infectados con VD, niños sanos y niños atópicos como controles y se encontró que: 1. No existieron diferencias en la concentración plasmática de TSLP entre niños infectados con VD y niños sanos, pero fue significativamente más alta en los niños atópicos.

2. Hubo una caída significativa de la TSLP entre la fase aguda y de convalecencia de los niños infectados con VD. 3. No se encontró correlación entre los niveles de TSLP plasmático y el número de plaquetas circulantes.

Al comparar los niveles plasmáticos de TSLP entre niños infectados con VD, niños sanos (como control negativo) y niños atópicos (como control positivo), no se encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los dos primeros. Como se esperaba y en apoyo de datos previamente publicados⁽³⁰⁾, niveles significativamente más altos de TSLP fueron encontrados en niños atópicos. Estos resultados apoyan la validez del ensayo usado para la detección de TSLP plasmático en este estudio, sugiriendo la no participación de éste factor circulante en la fisiopatología de la infección por VD. De notar, los niveles basales de TSLP encontrados en niños sanos fueron superiores a los reportados recientemente en una población pediátrica asiática⁽³⁰⁾. Niveles diez veces más altos de TSLP fueron también encontrados en los niños atópicos de nuestro estudio comparado a niños atópicos asiáticos. Helmintiasis adquiridas en edad pediátrica, pueden modular la respuesta inmune a alérgenos y a la vacunación⁽³¹⁾. Es posible, como es frecuente en países en vías de desarrollo, que las infecciones parasitarias crónicas del tracto gastrointestinal y que escapan al examen médico rutinario, predispongan en la población pediátrica la liberación de cantidades significativas de TSLP al plasma de forma "basal", haciendo por lo tanto que la TSLP se detecte de manera más evidente en estos niños. Otros factores como los genéticos no deben ser descartados como explicación a las diferencias en los valores de TSLP plasmáticos encontrados en estas dos poblaciones⁽³²⁾.

Existió una caída significativa en la concentración de TSLP entre la fase aguda y convaleciente de la infección por VD. La razón que explica esta diferencia no es clara. La gran mayoría de los niños infectados incluidos en este estudio tienen diagnóstico de dengue con signos de alarma y todos ellos por lo tanto, no desarrollaron dengue severo. El IFN γ (marcador típico de la respuesta

Th1) ha sido implicado en la protección contra las formas severas de la infección e incluso en modelos humanos de vacunación, LT CD8 $^{+}$ productores de IFN han sido recientemente propuestos como un marcador de protección⁽³³⁾. Es posible que la mayoría de estos niños que no desarrollaron la forma severa hubieran tenido un perfil Th1 dominante que haya por tanto suprimido durante el curso tardío de la enfermedad factores que inducen la respuesta Th2, dentro de ellos la TSLP.

En apoyo de la no participación directa del TSLP plasmático en la fisiopatología de la infección por VD, no se encontró correlación entre los niveles de TSLP y la trombocitopenia, un conocido marcador de severidad⁽²⁷⁾, aunque es claro que este no es el estudio ideal para analizar el posible papel del TSLP en la severidad de la infección puesto que solo un paciente cumplió con los criterios de dengue severo. Sin embargo, los niveles de TSLP en el plasma de ese paciente se encontraron también por debajo del límite de detección de la técnica.

Aunque son muchas las publicaciones sobre TSLP y modelos experimentales que muestran su implicación en procesos inmunológicos, son relativamente escasos aquellos trabajos que miden el comportamiento de la TSLP en plasma humano y esto se limita a enfermedades atópicas⁽³⁰⁾; Este es el primer trabajo, a nuestro conocimiento, que explora el papel de este mediador inmune medido en plasma en la fisiopatología de la infección por VD y los resultados en general sugieren que no hay una implicación directa de este.

Existen otras citoquinas que juegan también un importante papel en la inducción de un perfil Th2, como lo son la IL-7, IL-33 y la IL-25^(34,35), que bajo estímulos de algunos componentes de patógenos pueden iniciar un cambio en la respuesta inmunológica y por tanto deben ser evaluados en la infección por VD en un futuro. La participación de la TSLP en la respuesta inmune a VD debería además ser analizada no solo a nivel sistémico (como el evaluado aquí) sino a nivel local en el epitelio.

Agradecimientos

A los pacientes, a los niños sanos, a la Institución Educativa Angel María Paredes, al personal de pediatría del Hospital Universitario de Neiva y al semillero de investigación SINEDIR por su apoyo al estudio.

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Proyección Social de la Universidad Surcolombiana, mediante la convocatoria interna de proyectos de menor cuantía y apoyo a Semilleros de Investigación.

Referencias Bibliográficas

- Guzmán, M.G. & Kouri, G. 2009. Dengue in Cuba: research strategy to support dengue control. *Lancet* 374: 1660-1661, doi: S0140-6736(09)61975-9 [pii] 10.1016/S0140-6736(09)61975-9.
- Perera, R. & Kuhn, R.J. 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* 11: 369-377, doi: S1369-5274(08)00089-1 [pii] 10.1016/j.mib.2008.06.004.
- Ashour, J. *et al.* 2010. Mouse STAT2 restricts early dengue virus replication. *Cell Host Microbe* 8: 410-421, doi: S1931-3128(10)00344-6 [pii] 10.1016/j.chom.2010.10.007.
- Munoz-Jordan, J.L. *et al.* 2005. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol* 79: 8004-8013, doi: 79/13/8004 [pii] 10.1128/JVI.79.13.8004-8013.2005.
- Salgado, D.M., Panqueba, C.A., Castro, Castro, D., M, R.V. & Rodríguez, J.A. 2009. [Myocarditis in children affected by dengue hemorrhagic fever in a teaching hospital in Colombia]. *Rev Salud Pública* (Bogotá) 11: 591-600, doi: S0124-00642009000400010 [pii].
- Salgado, D.M. *et al.* Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 29: 238-242, doi: 10.1097/INF.0b013e3181bc3c5b.
- Nielsen, D.G. 2009. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virol J* 6: 211, doi: 1743-422X-6-211 [pii] 10.1186/1743-422X-6-211.
- Murphy, B.R. & Whitehead, S S. 2011. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol* 29: 587-619, doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101315.
- Hatch, S. *et al.* 2011. Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection. *J Infect Dis* 203: 1282-1291, doi: jir012 [pii] 10.1093/infdis/jir012.
- Friberg, H. *et al.* Memory CD8+ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive. *Immunol Cell Biol* 89: 122-129, doi: icb201061 [pii] 10.1038/icb.2010.61.
- Bashyam, H.S., Green, S. & Rothman, A.L. 2006. Dengue virus-reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. *J Immunol* 176: 2817-2824, doi: 176/5/2817 [pii].
- Gunther, V.J. *et al.* 2011. A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. *Vaccine* 29: 3895-3904, doi: S0264-410X(11)00406-3 [pii] 10.1016/j.vaccine.2011.03.038.
- Chaturvedi, U.C. 2009. Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever. *Indian J Med Res* 129: 1-3.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1: 311-316, doi: 10.1038/79758.
- Ying, S. *et al.* 2005. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* 174: 8183-8190, doi: 174/12/8183 [pii].
- Wang, Y.H. *et al.* 2006. Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity* 24: 827-838, doi: S1074-7613(06)00230-5 [pii] 10.1016/j.immuni.2006.03.019.
- Esnault, S., Rosenthal, L.A., Wang, D.S. & Malter, J.S. 2008. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) as a bridge between infection and atopy. *Int J Clin Exp Pathol* 1: 325-330.
- Miazgowiec, M.M., Headley, M.B., Larson, R.P. & Ziegler, S.F. 2009. Thymic stromal lymphopoietin and the pathophysiology of atopic disease. *Expert Rev Clin Immunol* 5: 547-556, doi: 10.1586/eci.09.45.
- Zhang, Z. *et al.* 2009. Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 1536-1541, doi: 0812668106 [pii] 10.1073/pnas.0812668106.
- Kashyap, M., Rochman, Y., Spolski, R., Samsel, L. & Leonard, W.J. 2011. Thymic Stromal Lymphopoietin Is Produced by

- Dendritic Cells. *J Immunol*, doi: jimmunol.1100355 [pii] 10.4049/jimmunol.1100355.
21. Holgate, S.T. 2007. The epithelium takes centre stage in asthma and atopic dermatitis. *Trends Immunol* 28: 248-251, doi: S1471-4906(07)00104-4 [pii] 10.1016/j.it.2007.04.007.
 22. Allakhverdi, Z. et al. 2007. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med* 204: 253-258, doi: jem.20062211 [pii] 10.1084/jem.20062211.
 23. Qiao, J., Li, A. & Jin, X. TSLP from RSV-stimulated rat airway epithelial cells activates myeloid dendritic cells. *Immunol Cell Biol*, doi: icb201085 [pii] 10.1038/icb.2010.85.
 24. Kato, A. & Schleimer, R.P. 2007. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 19: 711-720, doi: S0952-7915(07)00164-1 [pii] 10.1016/j.coi.2007.08.004.
 25. Wang, J. & Xing, F. 2008. Human TSLP-educated DCs. *Cell Mol Immunol* 5: 99-106, doi: 10.1038/cmi.2008.12.
 26. Rimoldi, M. et al. 2005. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6: 507-514, doi: ni1192 [pii] 10.1038/ni1192.
 27. WHO. 2009. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. *World Health Organization* Geneva.
 28. Barniol, J. et al. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC Infect Dis* 11: 106, doi: 1471-2334-11-106 [pii] 10.1186/1471-2334-11-106.
 29. Fontenot, D. et al. 2009. TSLP production by epithelial cells exposed to immunodeficiency virus triggers DC-mediated mucosal infection of CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16776-16781, doi: 0907347106 [pii] 10.1073/pnas.0907347106.
 30. Lee, E.B. et al. 2009. Increased serum thymic stromal lymphopoietin in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 21: e457-460, doi: PAI919 [pii] 10.1111/j.1399-3038.2009.00919.x.
 31. Cooper, P. J. et al. 2011. Impact of early life exposures to geohelminth infections on the development of vaccine immunity, allergic sensitization, and allergic inflammatory diseases in children living in tropical Ecuador: the ECUAVIDA birth cohort study. *BMC Infect Dis* 11: 184, doi: 1471-2334-11-184 [pii] 10.1186/1471-2334-11-184.
 32. Hunninghake, G. M. et al. 2010. TSLP polymorphisms are associated with asthma in a sex-specific fashion. *Allergy* 65: 1566-1575, doi: ALL2415 [pii] 10.1111/j.1398-9995.2010.02415.x.
 33. Gunther, V. J. et al. 2011. A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. *Vaccine* 29: 3895-3904, doi: S0264-410X(11)00406-3 [pii] 10.1016/j.vaccine.2011.03.038.
 34. Lu, N., Wang, Y.H., Arima, K., Hanabuchi, S. & Liu, Y.J. 2009. TSLP and IL-7 use two different mechanisms to regulate human CD4+ T cell homeostasis. *J Exp Med* 206: 2111-2119, doi: jem.20090153 [pii] 10.1084/jem.20090153.
 35. Saenz, S.A., Taylor, B.C. & Artis, D. 2008. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev* 226: 172-190, doi: IMR713 [pii] 10.1111/j.1600-065X.2008.00713.x.