

DETECCIÓN DE TNF α EN PLASMA POR ELISA Y CITOMETRÍA: UNA
COMPARACIÓN EN DENGUE

HARRISON HERRERA DELGADO

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA - HUILA
2016

DETECCIÓN DE TNF α EN PLASMA POR ELISA Y CITOMETRÍA: UNA
COMPARACIÓN EN DENGUE

HARRISON HERRERA DELGADO

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

Asesor

CARLOS FERNANDO NARVAEZ ROJAS MD MSc PhD

Médico y Cirujano (Universidad Surcolombiana)

Magister en Microbiología con énfasis en Inmunología (Pontificia Universidad Javeriana)

Doctorado en Ciencias Biológicas (Pontificia Universidad Javeriana)

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

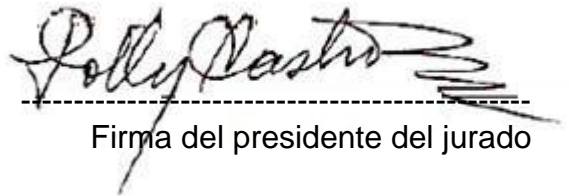
FACULTAD DE SALUD

PROGRAMA DE MEDICINA

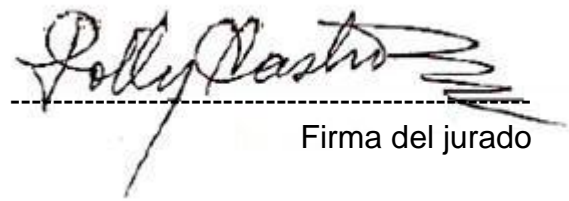
NEIVA - HUILA

2016

Nota de aceptación:



Firma del presidente del jurado



Firma del jurado

Firma del jurado

Neiva, Mayo del 2016.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

A los pacientes del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva que participaron voluntariamente en este estudio.

A los profesores, médicos residentes y médicos internos del servicio de pediatría del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva por el apoyo en el estudio.

Al semillero de investigación SINEDIR por su crítica constructiva y formación académica.

A COLCIENCIAS por la financiación de esta idea.

A todos los participantes, Mil Gracias...

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 OBJETIVO GENERAL	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5. MARCO TEÓRICO	20
5.1 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF- α)	20
5.2 METODOS DE DETECCIÓN	21
5.3 DENGUE Y TNF- α	22
6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	23
7. DISEÑO METODOLÓGICO	24
7.1 TIPO DE ESTUDIO	24
7.2 UBICACIÓN DEL ESTUDIO	24
7.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO	24
7.4 ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR LAS VARIABLES DE CONFUSIÓN	25
7.5 TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS	25
7.6 PLAN DE ANALISIS DE RESULTADOS	26

	Pág.
7.7 INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCION DE INFORMACIÓN	27
7.8 PRUEBA PILOTO	27
7.9 CODIFICACION Y TABULACIÓN	29
7.10 FUENTES DE INFORMACIÓN	29
7.11 CONSIDERACIONES ETICAS	30
8. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	31
8.1 CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	31
8.2 ELISA ES MÁS EFICIENTE PARA DETECTAR TNF-A EN PLASMA	31
8.3 CBA ES EFICIENTE EN LA DETECCIÓN DE TNF-A EN SOLUCIONES BUFFER	32
8.4 EL PLASMA AFECTA LA EFICIENCIA EN LA DETECCIÓN DE TNF-A	33
8.5 LA DILUCIÓN DEL PLASMA MEJORA LA DETECCIÓN DE TNF-A	35
8.6 .NIVELES DE TNF-A EN PLASMA Y SUERO	37
9. DISCUSIÓN	38
10. CONCLUSIONES	42
11. RECOMENDACIONES	43
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
ANEXOS	49

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Caracterización clínica y paraclínica	31

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Porcentaje de recuperación de TNF α determinados por CBA	28
Figura 2. Niveles de TNF-a en plasma ELISA vs CBA	29
Figura 3. Niveles de TNF- α en plasma de niños con infección aguda por virus dengue, sanos y medio de cultivo, determinados por ELISA y CBA	32
Figura 4. Correlación entre los niveles de TNF- α obtenidos por ELISA Y CBA en líquido de lavado broncoalveolar	33
Figura 5. Porcentaje de recuperación de TNF- α en plasma y medio de cultivo	34
Figura 6. Porcentaje de recuperación de TNF- α en plasma diluido al $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$	36
Figura 7. Niveles de TNF- α en plasma y suero	37

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Instrumento de recolección de datos	50
Anexo B. Cronograma de actividades	51
Anexo C. Tabla de presupuesto	52

RESUMEN

El dengue es la enfermedad viral más importante transmitida por vectores y las citoquinas (CTS) han demostrado ser importantes en su fisiopatología. Particularmente, la infección del dengue incrementa los niveles de TNF- α en plasma, y en algunos casos se ha propuesto una asociación entre los niveles de esta citocina y la severidad clínica. Debido a que el TNF- α es una CT crítica en la inmunidad contra el dengue, es fundamental su eficiente y precisa detección. A través del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, kit DuoSet R & D) y citometría basada en microesferas (CBA, Kit inflamatoria, BD), se compararon los niveles de TNF- α en muestras pareadas de plasma y suero de 33 sanos y 76 niños con dengue confirmado. Además, también se realizaron ensayos de porcentaje de recuperación de las concentraciones de TNF- α utilizando TNF- α recombinante humano y soluciones estériles (RPMI 1640 y PBS, ambos de Gibco, como controles negativos).

En soluciones estériles, los niveles de TNF- α evaluados por ELISA y CBA correlacionaron positivamente ($r = 0,72$, $P < 0,0001$, prueba de Pearson). Sin embargo, en plasma, la tasa de detección de TNF- α fue significativamente mayor por ELISA ($P < 0,0001$, test de Fisher). En comparación con los controles sanos, los niveles de TNF- α fueron significativamente más altos en el suero que en plasma de los niños infectados de dengue ($p = 0,03$, prueba de Wilcoxon), lo que sugiere que el suero es más eficiente que el plasma para la medición de este CT. Los porcentajes de recuperación de TNF- α fueron mucho más bajos en el plasma que en medio de cultivo ($p \leq 0,01$, prueba de Mann-Whitney), pero fue igualmente bajo en el plasma de sanos vs dengue ($P = 0,2$, prueba de Mann-Whitney), lo que indica que el efecto es independientemente de la enfermedad. Dos diluciones seriadas de plasma de niños sanos y con dengue (con y sin adición de TNF- α recombinante) se llevaron a cabo, y el porcentaje de recuperación más alto se obtuvo cuando se diluyeron las muestras con concentraciones elevadas de TNF- α ($P = 0,008$, prueba de Friedman), pero no en las muestras no diluidas de niños con dengue o cuando las bajas concentraciones de TNF- α recombinante fueron añadidas ($P \geq 0,1$, test de Friedman).

En resumen, se encontró una diferencia en la eficiencia en la detección de TNF- α , y esto se explica en parte por el tipo de muestra. Por lo tanto, la evaluación adecuada del TNF- α en plasma ha demostrado ser aun un desafío.

Palabras clave: ELISA, CBA, Dengue, TNF- α .

ABSTRACT

Dengue is the most important viral vector-borne disease and cytokines (CTs) have shown to be important in its pathophysiology. Particularly, dengue infection increases levels of tumor necrosis factor (TNF)- α in plasma, and some times, an association between these levels and clinical severity has been proposed. However, results are not frequently comparable between studies. Due to TNF- α is a critical CT in immunity against dengue, its efficient and accurate measurement. Through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, duoset kit R&D) and cytometric bead array (CBA, Inflammatory Kit, BD), TNF- α levels in paired plasma and serum samples from 33 healthy and 76 children with confirmed dengue were compared. In addition, TNF- α spike recovery assays using human recombinant TNF- α and sterile solutions (RPMI 1640 and PBS, both from GIBCO, as negative controls) were also performed. In sterile solutions, levels of TNF- α evaluated by ELISA and CBA positively correlated ($r=0.72$, $P<0.0001$, Pearson test). However in plasma, detection rate of TNF- α was significantly higher by ELISA ($P<0.0001$, Fisher test). Compared with healthy controls, TNF- α levels were significantly higher in serum than plasma from dengue infected children ($P=0.03$, Wilcoxon test), suggesting that serum is more efficient than plasma to the measurement of this CT. Percentages of TNF- α recovery were much lower in plasma than culture medium ($P\leq 0.01$, Mann-Whitney test), but it was similarly low in healthy and dengue plasma ($P=0.2$, Mann-Whitney test), indicating that the effect is regardless of disease. Serial two-fold dilutions of plasma from dengue and healthy children (with and without addition of human recombinant TNF- α) were done, and higher % of recovery were obtained when the samples with high TNF- α concentrations were diluted ($P=0.008$, Friedman test), but not in undiluted samples of children with dengue or when low concentrations of human recombinant TNF- α were added ($P\geq 0.1$, Friedman test).

In short, differential efficiency in detection of TNF- α was found, and this is partially explained by the sample type. Thus, adequate evaluation of plasma TNF- α shown to be more than a challenge.

Keywords: ELISA, CBA, Dengue, TNF- α .

INTRODUCCIÓN

El factor de necrosis tumoral (TNF)- α es una citoquina (CT) crítica en la defensa inmune a patógenos, producida principalmente por macrófagos y linfocitos T. Sus dos receptores (receptor de TNF I y II) activan vías de señalización intracelulares que llevan al reclutamiento del factor nuclear κ B y de caspasas, desencadenando respuestas inflamatorias y apoptosis, respectivamente. Debido a su gran implicación en enfermedades infecciosas e inflamatorias el TNF- α es frecuentemente evaluado en muestras biológicas.

La medición de CTs es afectada por factores biológicos como la cinética o la unión a proteínas séricas o receptores solubles, o técnicos como el tipo de muestra, la manipulación de la misma, la experticia del operador y el tipo de ensayo usado. Para la medición de ésta CT el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) es el más utilizado y considerado “gold standard”, pero recientemente métodos basados en esferas han obtenido gran acogida debido a que permiten el análisis de un mayor número de analitos en un menor volumen de muestra. Todos los factores arriba mencionados afectan la eficiencia de la detección de CTs y otros analitos en muestras biológicas, por lo que en ciertos casos los resultados pueden no reflejar la concentración real y éstos deben ser analizados con precaución.

Una enfermedad en la que resulta crítica la medición de TNF- α es el dengue. Esta enfermedad es producida por el virus dengue y tiene un alto impacto a nivel mundial. Un eje fundamental en la fisiopatología del dengue es la producción de CTs como interleucina (IL)-2, 6, 8, 10, interferón (IFN)- γ y TNF- α . Éstas juegan un papel crítico en el desarrollo de fuga vascular y fenómenos hemorrágicos característicos de ésta enfermedad y en algunos estudios sus niveles plasmáticos se asocian con formas severas de la enfermedad. Sin embargo, el caso del TNF- α es peculiar, ya que aunque se ha encontrado elevado en pacientes infectados en comparación con controles sanos, en la mayoría de estudios las concentraciones plasmáticas no superan los 10 pg/mL y la correlación con la severidad ha sido tanto positiva como negativa o no encontrada, indicando una baja reproducibilidad de los resultados en la medición de ésta CT. Ésta alta variabilidad no es encontrada cuando el TNF- α es evaluado en sobrenadante de cultivo celular. Ya que es frecuente el análisis del TNF- α tanto en dengue como en otras enfermedades infecciosas y autoinmunes, la medición eficiente y reproducible de ésta CT es crítica y estudios que evalúen los factores que afectan su detección son más que necesarios.

Aquí se evaluó, a través de dos ensayos, la eficiencia en la medición de TNF- α en plasma de niños con infección por virus dengue e individuos sanos como controles, además de pacientes adultos con otras patologías diferentes a dengue donde se

esperan altos niveles de la CT. La detección de TNF- α en medio de cultivo celular fue también evaluado. Bajos porcentajes de recuperación de la CT fueron obtenidos en plasma, independientemente de la condición del individuo, en comparación con medio de cultivo, indicando un efecto directo de éste tipo de muestra sobre la eficiencia en la medición del TNF- α .

1. ANTECEDENTES

La medición de analitos solubles es una herramienta fundamental en el campo clínico e investigativo. Diferentes métodos que permiten la detección y cuantificación de múltiples moléculas solubles en líquidos biológicos y cultivos celulares se han desarrollado a lo largo de los años¹. Uno de los métodos más ampliamente utilizados para éste propósito es el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), desarrollado en los años 70. Un avance importante en el campo fue la introducción de técnicas como la citometría de flujo (CF) que combinaban los principios del ELISA con tecnologías que permitían la detección de múltiples moléculas en un solo ensayo. A partir de esto, surgieron ensayos de CF basados en microesferas que proporcionan la posibilidad de evaluar múltiples analitos en un único ensayo con el consecuente ahorro de volumen de muestra y de tiempo, una de estas técnicas es Cytometric Bead Array (CBA). Dentro de las moléculas frecuentemente analizadas por ésta técnica se encuentran las citocinas^{2,3} y su rendimiento usualmente es aceptable cuando se compara con el ELISA. Además, resultados comparables entre las dos técnicas se han obtenido en pacientes con endotoxemia inducida⁴. Evidentemente, la principal ventaja que ofrece el CBA es que permite el análisis en conjunto de varios de éstos mediadores inflamatorios a la vez, en una cantidad de muestra inferior a la que se utilizaría en el ELISA para la detección de uno solo^{5,6}. Se ha descrito además, mayor sensibilidad del CBA comparado con ELISA^{7,8}. En contraste, aunque estudios que comparan la detección de citocinas en plasma y suero a través de las dos técnicas han demostrado su similitud, se ha visto que en sobrenadantes de cultivos celulares los valores de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) detectados por CBA se encuentran muy por debajo de lo esperado⁹ y los resultados podrían no reflejar el valor real. En relación a esto, resultados previos en nuestro laboratorio mostraron menores concentraciones de

¹ VIGNALI DA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *Journal of immunological methods*. 2000;243(1-2):243-255.

² OLIVER KG, KETTMAN JR, FULTON RJ. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system. *Clinical chemistry*. 1998;44(9):2057-60.

³ MEIJERINK M, et al. Cryopreservation of monocytes or differentiated immature DCs leads to an altered cytokine response to TLR agonists and microbial stimulation. *Journal of immunological methods*. 2011;373(1-2):136-42.

⁴ KHAN SS, et al. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2004;61(1):35-9.

⁵ TARNOK A, HAMBSCHE J, CHEN R, VARRO R. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clinical chemistry*. 2003;49(6 Pt 1):1000-2.

⁶ CARSON RT, VIGNALI DA. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *Journal of immunological methods*. 1999;227(1-2):41-52

⁷ *Ibid.*, p. 41-52.

⁸ VIGNALI DA. *Op. Cit.*, p. 243-55

⁹ DEFAWE OD, et al. Optimization and qualification of a multiplex bead array to assess cytokine and chemokine production by vaccine-specific cells. *Journal of immunological methods*. 2012;382(1-2):117-28.

TNF-a en plasma y líquido cefalorraquídeo de pacientes adultos con meningitis, cuando se midieron a través de CBA comparado con ELISA, aunque este estudio no fue diseñado con tal fin (Torres M., datos no publicados). Existe controversia en estudios de correlación entre niveles de citocinas como el TNF-a detectado por ELISA y formas de severidad del dengue. Estudios han demostrado una correlación directa entre niveles elevados de TNF-a y severidad¹⁰, lo cual no es consistente con la correlación inversa observada en otros¹¹. Esto indica que puede haber variaciones en la concentración detectada por las dos técnicas en muestras de pacientes con condiciones inflamatorias.

¹⁰ ARIAS J, et al. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Journal of virology*. 2014; 452-453:42-51

¹¹ LIMONTA D, et al. Apoptotic Mediators in Patients With Severe and Non-Severe Dengue From Brazil. *Journal of Medical Virology*; 2014 v.86, n.8, :1437-47,.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue es una enfermedad viral que tiene un alto impacto en morbilidad, mortalidad y gastos económicos a nivel mundial¹². En el caso de Colombia, el departamento del Huila no es ajeno al problema y en el periodo comprendido entre 2010 y 2012 se registraron más de 13,000 casos, 1400 de los cuales correspondieron a la forma severa, además de 20 casos fatales¹³

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citocina crítica en la defensa inmune a patógenos, producida principalmente por macrófagos y linfocitos T. su respuesta en la defensa inmune frente a patógenos puede implicar mecanismos fisiológicos no deseados que terminan siendo lesivos para el organismo como lo es su acción en la células endoteliales que conlleva a la vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, extravasación plasmática, shock y puede llegar a causar la muerte. Una enfermedad en la que resulta crítica la medición de TNF-a es el dengue ya que se ha demostrado que en la fisiopatología de la enfermedad existe un aumento de esta citocina y en algunos casos se ha asociado a severidad¹⁴.

Actualmente existen múltiples métodos para determinar cuantitativamente los niveles de citocinas en fluidos corporales, cada uno con ventajas y desventajas como son el volumen de muestra requerido, sensibilidad, los costos y otros. No se conoce a ciencia cierta cuál método, forma y tipo de muestra es la más sensible para la detección de esta citocina (TNF-a). Se ha descrito mayor sensibilidad del CBA comparado con ELISA y a su vez existen estudios que comparan la detección de citocinas en plasma y suero a través de las dos técnicas y han demostrado similitud. Además, resultados fueron comparables a los obtenidos con otros tipos de técnicas¹⁵ y la variabilidad intra e inter-ensayo son en general aceptables¹⁶.

En este estudio se realizara una comparación entre los métodos ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) y un ensayo basado en microesferas con citometría de flujo (CBA) para establecer cuál es el método más eficiente, la forma

¹² SIMMONS CP, et al. Dengue. The New England journal of medicine. 2012;366(15):1423-32.

¹³ Instituto nacional de salud Colombia. Reporte periodo 2010 – 2012. Boletín epidemiológico 2012;40(52):10.

¹⁴ MALAVIGE GN, et al. Cellular and Cytokine Correlates of Severe Dengue Infection. PLoS ONE. 2012;7(11):e50387.

¹⁵ MORGAN E, et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. Clinical immunology (Orlando, Fla). 2004;110(3):252-66.

¹⁶ BELABANI C, et al. A condensed performance-validation strategy for multiplex detection kits used in studies of human clinical samples. Journal of immunological methods. 2013;387(1-2):1-10.

y tipo de muestra más adecuado para detectar esta citosina. Con lo anterior se plantea la siguiente pregunta:

¿Cuáles son los factores que afectan la medición del TNF-a en dengue pediátrico?

3. JUSTIFICACIÓN

La medición de citocinas es frecuentemente utilizada en la investigación básica y clínica. Estas moléculas son ampliamente estudiadas con el objetivo de establecer asociaciones de severidad, pronóstico, cinética y seguimiento de enfermedades, principalmente infecciosas y autoinmunes, para lograr un mejor entendimiento de las patologías y una mejor terapéutica. Por tal motivo, es crítico la estandarización de técnicas y metodologías eficaces para su detección. El TNF- α es una citocina crítica en la patogénesis de la respuesta inflamatoria y que se sabe, se incrementa en personas infectadas con dengue, que constituye una enfermedad endémica en nuestra región, con alto impacto socioeconómico. Ya que es importante su eficiente medición en plasma y estudios que miden diversas citocinas en fluidos corporales son llevados a cabo frecuentemente en nuestro laboratorio, es necesario optimizar los métodos de detección de estas moléculas, ya que de ello depende la confiabilidad de los análisis y estudios que se hagan.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar Cuáles son los factores que afectan la medición del TNF-a en dengue pediátrico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar las concentraciones de TNF-a plasmático obtenido por CBA y ELISA en niños sanos y niños infectados con dengue.
- Determinar si el tipo de muestra (plasma Vs Suero), afecta la medición por CBA y ELISA.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF-A)

El TNF- α es una proteína transmembrana tipo II compuesta por una larga cadena polipeptídica de 233 aminoácidos estructurada en homotrimeros^{17,18}. A partir de esta forma transmembrana es liberada la forma homotrimerica soluble (citocina) por medio del clivaje de una proteasa (enzima convertidora de TNF- α)¹⁹. El TNF- α es una citocina crítica en la defensa inmune a patógenos²⁰, es un pirógeno endógeno capaz de producir fiebre, muerte celular apoptótica, inflamación e inhibición de la tumorigenesis y replicación viral; Es producida principalmente por macrófagos y linfocitos T.

El TNF tiene la capacidad de unirse a dos receptores (receptor TNF I – 120a y TNF II – 120b). TNF I se expresa en la mayoría de tejidos y puede ser activado por la forma transmembrana y soluble, a diferencia de TNF 2 que se encuentra solo en células del sistema inmune y responden principalmente a la forma transmembrana de TNF- α ²¹.

Al contacto de los receptores de TNF con su ligando forma trímeros. Esta unión causa un cambio conformacional lo que lleva a la disociación de la proteína inhibidora SODD del dominio de muerte, que sirve como plataforma de unión a proteínas e iniciar una de las tres vías de activación^{22,23}:

¹⁷ KRIEGLER M, et al. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1988;53(1):45-53.

¹⁸ TANG P, HUNG MC, KLOSTERGAARD J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*. 1996;35(25):8216-25.

¹⁹ BLACK RA, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*. 1997;385(6618):729-33.

²⁰ PFEFFER K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003;14(3-4):185-91.

²¹ THEISS AL, et al. Tumor necrosis factor (TNF) α increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(43):36099-109.

²² WAJANT H, PFIZENMAIER K, SCHEURICH P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*. 2003;10(1):45-65.

²³ CHEN G, GOEDEL DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5573):1634-5.

- Activación de NF- κ B: esta vía de señalización intracelular lleva finalmente al reclutamiento del factor nuclear (NF)- κ B. NF- κ B es un factor de transcripción heterodimérico que se transloca al núcleo y media la transcripción de proteínas implicadas en la supervivencia y proliferación celular, la respuesta inflamatoria, y los factores anti-apoptóticos²⁴.
- Activación de la vía MAPK: el TNF induce a activación del grupo JNK relacionado con stress celular. La proteína JNK se transloca al núcleo y activa factores de transcripción tales como c-Jun y ATF2. La vía de JNK está implicada en la diferenciación celular, la proliferación, y es generalmente pro-apoptótica²⁵.
- Activación de la vía de muerte celular: la muerte celular inducida por TNF juega un papel menor en comparación con su función en procesos inflamatorios y tiene un efecto débil en comparación con la familia FAS. Su acción es mediada por el reclutamiento de altas concentraciones de caspasa 8 la cual induce su activación autoproteolítica y posterior escisión de caspasas efectoras, lo que conlleva a la apoptosis celular²⁶.

5.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN

Dentro de las técnicas utilizadas para la detección de citocinas se encuentra el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). La técnica ELISA se basa en la unión del antígeno a detectar con un anticuerpo unido a una fase sólida y luego una segunda unión de un anticuerpo conjugado a una enzima que indirectamente detecta la presencia del antígeno como un cambio de color (dado por la catálisis del sustrato respectivo de la enzima) que es proporcional a la cantidad de antígeno presente en el sistema²⁷. Actualmente se han introducido técnicas como Cytometric Bead Array (CBA) que combinan la citometría de flujo con los principios del ELISA, permitiendo la detección de múltiples moléculas en un solo ensayo.

Cytometric Bead Array (CBA) es un ensayo de CF basado en microesferas

²⁴ HEHLGANS T, PFEFFER K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005;115(1):1-20.

²⁵ KANT S, et al. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes & development*. 2011;25(19):2069-78.

²⁶ GAUR U, AGGARWAL BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical pharmacology*. 2003;66(8):1403-8.

²⁷ CROWTHER JR. The ELISA guidebook. *Methods in molecular biology*. 2000;149:III-IV, 1-413.

ampliamente utilizado en la actualidad²⁸. Éste permite la detección de uno o varios analitos solubles a través de la unión con esferas de un tamaño y fluorescencia conocidos que han sido conjugadas con anticuerpos específicos para la molécula a detectar; luego de la adición de un anticuerpo acoplado a un fluorocromo se formará un complejo esfera de captura-analito-anticuerpo conjugado, haciendo posible su análisis. Aquí, la señal de fluorescencia será proporcional a la cantidad de analito en la muestra que podrá ser cuantificada con la ayuda de una curva estándar²⁹.

5.3 DENGUE Y TNF-A

Una enfermedad en la que resulta crítica la medición de TNF-a es el dengue. El virus dengue hace parte de la familia *flaviviridae*, es un patógeno transmitido por vectores que afecta los humanos con alta prevalencia, impacto en morbilidad, mortalidad y gastos económicos a nivel mundial³⁰. Según estimaciones recientes, se producen 390 millones de infecciones cada año, de las cuales 96 millones se manifiestan clínicamente³¹.

Existe cuatro serotipos de virus dengue (DENV 1-4), difieren antigénicamente en la proteína de envoltura. Dentro de su presentación clínica se observa un espectro desde una enfermedad febril leve hasta formas severas donde se han asociado factores como el serotipo, la hemorragia y mecanismos fisiopatológicos de extravasación plasmática capilar ocasionada por el aumento de la permeabilidad vascular, secundaria a la respuesta inflamatoria donde se encuentra implicado el TNF-a. Se ha demostrado que en la fisiopatología de la enfermedad existe un aumento del TNF-a y en algunos casos se asocia a formas severas de la misma³².

²⁸ LENG SX, et al. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences. 2008;63(8):879-84.

²⁹ VIGNALI DA. Op. Cit. , p. 243-55.

³⁰ SIMMONS CP, et al. Op. Cit. , p. 1423-32.

³¹ BHATT S, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature. 2013;496(7446):504-7.

³² MALAVIGE GN, Op. Cit. , p. e50387

6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN	SUBVARIABLE	INDICADORES O CATEGORÍAS	NIVEL DE MEDICIÓN	ÍNDICE
Concentración de TNF α	Niveles de TNF α en muestras biológicas medidas con distintos métodos		<ul style="list-style-type: none"> • Pg/ml 	Razón	<ul style="list-style-type: none"> • Valor absoluto • Porcentaje
Tipo de población	Paciente del cual fue tomada la muestra de acuerdo a la presencia o ausencia de infección por DENV		<ul style="list-style-type: none"> • Niño con diagnóstico de Dengue • Niño sano 	Nominal	Porcentaje
Método de medición	Técnica que se utilizara para la medición de la concentración de TNF α en cada una de las muestras		<p>Medición de la Concentración de TNFα utilizando el método de ELISA</p> <p>Medición de la Concentración de TNFα utilizando el método de CBA</p>	Nominal	
Tipo de muestra	Líquido biológico en el cual se realizara la detección de TNF α		<ul style="list-style-type: none"> • Plasma • Suero 	Nominal	

7. METODOLOGÍA

7.1 TIPO DE ESTUDIO

Observacional, prospectivo, con análisis de casos y controles

7.2 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

Las muestras fueron recolectadas de niños con dengue atendidos en el hospital Hernando Moncalenao Perdomo ubicado en la calle 9 No. 15-25, Neiva, Huila. El componente técnico-experimental del proyecto será realizado en el laboratorio de infección e inmunidad de la universidad Surcolombiana ubicado en la Calle 9 No.14-03.

7.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

En este estudio se incluyeron niños entre 2 meses y 14 años de edad con infección por VD (n=76) (entre el tercer y séptimo día de iniciados los síntomas) y niños sanos como controles (n=33). Dos a cuatro mL de sangre venosa fueron colectados en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, BD Vacutainer, Ref: 367861). Los tubos fueron centrifugados a 300 x g por 10 minutos y el plasma se recolectó y conservó a -70°C.

Además de niños sanos, pacientes adultos con otras patologías diferentes a dengue donde altos niveles de TNF- α son esperados fueron también incluidos como controles: i. Pacientes con sospecha de tuberculosis (TB) pulmonar con tres baciloscopias negativas e indicación de fibrobroncoscopía más lavado broncoalveolar (Perdomo-Celis F. et al. datos no publicados). ii. Pacientes con meningitis bacteriana (Perdomo-Celis F. et al. datos no publicados). Para el caso de los pacientes con sospecha de TB pulmonar, una muestra del líquido de lavado broncoalveolar (BAL) fue almacenada a -70°C hasta el momento de su análisis. A los pacientes con meningitis bacteriana, una muestra de plasma fue obtenida en la fase aguda de la enfermedad (en las primeras 24 horas del ingreso hospitalario), como se describió previamente.

En el momento de su análisis, cada muestra de plasma y BAL fue descongelada y centrifugada por 2600 x g por 10 minutos. Previa a la centrifugación, las muestras

de BAL fueron también pasadas por un filtro de 0.22µm (Merck Millipore, Billerica, MA; Cat: SLFG025LS).

7.4 ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR LAS VARIABLES DE CONFUSIÓN

Dentro de las posibles variables de confusión que se pueden presentar en el componente experimental son los falsos positivos, los cuales serán controlados utilizando controles negativos en cada ensayo.

7.5 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Diagnóstico de la infección por virus dengue

Para el diagnóstico, clasificación y seguimiento clínico de los pacientes con dengue se siguió la guía revisada de la OMS 2009 [19] y la guía integrada de manejo de dengue en Colombia 2010. El diagnóstico de la infección se confirmó por la presencia de la proteína viral NS1 y/o inmunoglobulina (Ig) M específica de VD en plasma (evaluadas antes y después del 5 día de iniciado los síntomas, respectivamente).

Para la detección en plasma de IgM e IgG específicas de VD y la proteína viral NS1 se emplearon los estuches comerciales de ELISA Dengue IgM capture (Ref: E-DEN01M), Dengue IgG capture (Ref: E-DEN02G) y Dengue Early (Ref: E-DEN02P), respectivamente (todos de Panbio, Alere, Australia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para conocer el tipo de infección (primaria o secundaria) se determinó la relación IgM/IgG virus específicas en plasma, tomando como infecciones secundarias una relación ≤ 2 , como previamente reportado³³.

Determinación del porcentaje de recuperación de TNF- α

TNF- α humano recombinante (R&D, Minneapolis, MN, parte N° 840121) fue añadido a plasma de niños con infección por virus dengue, niños sanos y medio de cultivo a concentraciones indicadas (Figura 3.). Luego de incubación por 30 minutos a 37°C, las muestras fueron inmediatamente analizadas por ELISA y/o CBA, como se describe adelante. El porcentaje de recuperación se obtuvo como previamente

³³ INNIS BL, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1989;40(4):418-27.

descrito (REF): %Rec = (spiked sample result – unspiked sample result) x 100 / known spike added concentration.

Medición de TNF- α por ELISA y CBA

La concentración del TNF- α en plasma y medio de cultivo fue evaluada por ELISA usando un estuche comercial (Duoset Human TNF- α , R&D, Minneapolis, MN, Cat: DY-210), siguiendo todas las recomendaciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 3pg/mL. El promedio de las densidades ópticas (DO 450nm) de los controles negativos fue de 0.060. El cálculo de la concentración de TNF- α se hizo por interpolación de las DO de las muestras a una curva estándar usando regresión logística de 4 parámetros con el software GraphPad Prism versión 6.0.

Para el caso de CBA se usó el estuche comercial Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD, San Jose, CA, Cat: 551809) (que además permite la medición de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ), siguiendo todas las recomendaciones del fabricante. El límite de detección reportado (en pg/mL) para TNF- α es de 2.8. Los software FACS Diva (v. 6.1.3) y FCAP (v. 3.0.14), ambos de BD, fueron usados para la adquisición de las beads y el cálculo de la concentración de la CT, respectivamente. Para ambos ensayos las muestras fueron analizadas por duplicado. Sólo se incluyeron experimentos donde el coeficiente de correlación de la curva estándar fue >99% y la variabilidad de los duplicados fue menor al 10%.

7.6 PLAN DE ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos son presentados como medianas y rangos. Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla CA). Para analizar dos grupos independientes se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Para analizar más de dos grupos independientes se usó la prueba de Kruskal-Wallis. Si la P de Kruskal-Wallis fue <0.05 se usó la prueba de comparación múltiple de Dunn, según cada caso. El grado de correlación entre variables se determinó con las pruebas de Pearson y Spearman. La prueba de Fisher se empleó para análisis de frecuencias. En todos los casos se tomó como significativo un valor de P<0.05.

7.7 INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCION DE INFORMACIÓN

El instrumento utilizado para la recolección de datos consiste en una tabla diseñada por los investigadores donde se registrara la información sociodemográfica y relacionada con la enfermedad extraída de las historias clínicas. Por otra parte, los datos obtenidos de los procesos experimentales serán registrados en el instrumento que se muestra en los anexos.

7.8 PRUEBA PILOTO

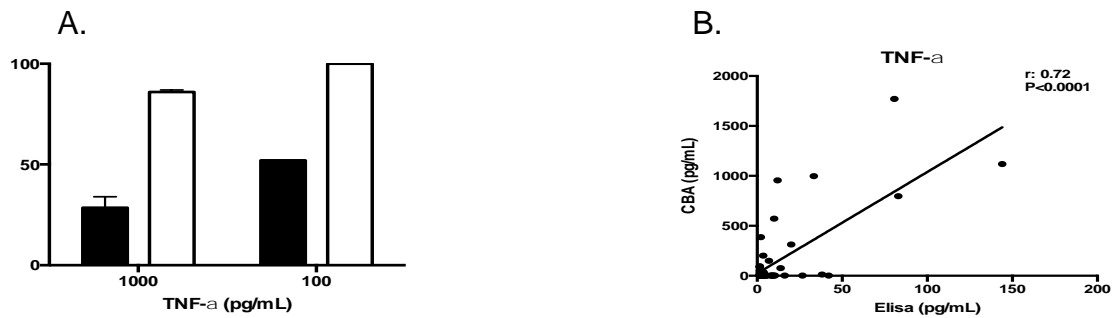
Para la medición del TNF α por CBA se empleó un estuche comercial, cuyo uso se ha extendido a diversos tipos de muestras como plasma, suero y sobrenadante de cultivo celular. Uno de los objetivos del trabajo es determinar la precisión de los métodos (CBA y ELISA) para cuantificar TNF α humano. Para determinar esto, concentraciones conocidas de TNF- α recombinantes fueron añadidos a medio de cultivo celular (RPMI 1640, Gibco), una solución buffer estéril y fueron analizadas por CBA, para determinar el porcentaje de recuperación (concentración de citoquina encontrada / concentración de citoquina esperada) x 100.

Éste análisis fue realizado además en plasma de voluntarios sanos para comparar el porcentaje de recuperación según el tipo de muestra (Plasma Vs Medio de cultivo) n: 40. Como se muestra en la Figura 1, luego de la adición de 1,000 y 100 pg/mL de TNF- α humano recombinante a los dos tipos de muestras, los porcentajes de recuperación obtenidos fueron del 86 y 100% en medio de cultivo y 28.5 y 52%, en plasma, respectivamente. Éstos resultados demuestran una eficiente detección de las citoquinas en el medio de cultivo que fue mucho mejor que en plasma. Se concluye así que el tipo de muestra influye en la capacidad de detección de TNF α por CBA (Figura 1).

Como fue propuesto, aquí se comparó la concentración plasmática y en medio de cultivo de TNF α determinada por CBA y ELISA. Como se muestra en la Figura 2 y Figura 1 (B) respectivamente. Baja pero detectables niveles de TNF- α fueron detectados en plasma tanto por ELISA como por CBA (Media 17 y 6pg/mL, respectivamente, P=0.01,t test). Los niveles plasmáticos de TNF α fueron 2 veces más altos cuando el ELISA más que el CBA, a diferencia de los niveles obtenidos en medio de cultivo donde los valores fueron muy similares.

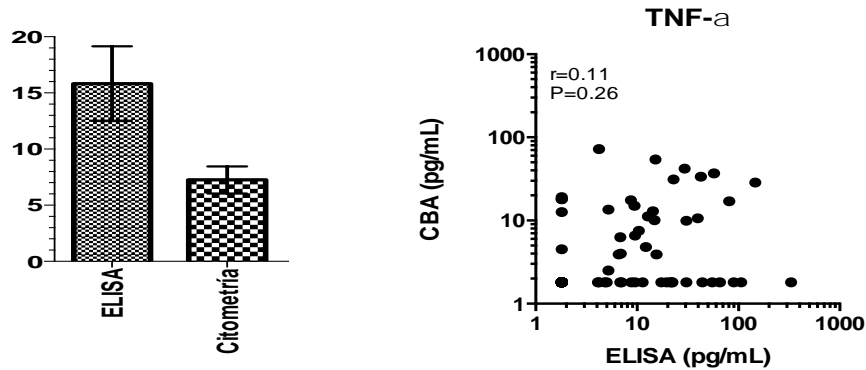
Cuando se comparó la cantidad de TNF- α detectadas por los dos métodos con las mismas muestras, no se encontró correlación entre las mismas en muestras de plasma a diferencia de las cantidades detectadas en medio de cultivo que si se encontró una correlación moderada. Con lo anterior se concluye que el método de detección determina de forma importante los resultados obtenidos.

Figura 1. Porcentaje de recuperación de TNF α determinados por CBA



A. Porcentaje de recuperación de TNF α Plasma de voluntarios sanos Vs Medio de cultivo realizado por CBA. Luego de la adición de 1,000 y 100 pg/mL de TNF- α humano recombinante a los dos tipos de muestras, los porcentajes de recuperación obtenidos fueron del 86 y 100% en medio de cultivo y 28.5 y 52%, en plasma, respectivamente. Se concluye así que el tipo de muestra influye en la capacidad de detección de TNF α por CBA. **B.** En medio de cultivo, la concentración de TNF-a recombinante detectada por los dos métodos correlaciona moderadamente y significativamente.

Figura 2. Niveles de TNF-a en plasma ELISA vs CBA



- A.** Niveles de TNF-a plasmáticos en niños con dengue detectados por ELISA y citometría (eje Y mide pg/mL). **B.** No Correlación en los niveles de TNF-a plasmáticos determinados por ELISA y citometría.

7.9 CODIFICACIÓN Y TABULACIÓN

La información obtenida aplicando el instrumento de recolección de datos fue registrada, codificada y tabulada utilizando tablas en el programa de office Excel 2013 para su observación y tratamiento de forma sistemática, posterior será transferida al software GraphPadPrism 5.0 para su análisis. Este procedimiento se realizó de forma manual.

7.10 FUENTES DE INFORMACIÓN

Los datos sociodemográficos y relacionados con la enfermedad se recolectaron de fuente indirecta con la consulta de historias clínicas, y la información relacionada con la concentración de la molécula a estudio fue recolectada de fuente directa mediante el registro de los resultados obtenidos con técnicas experimentales realizadas por los autores del estudio.

7.11 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto fue aprobado previamente por el comité de ética de la universidad Surcolombiana y el Hospital Universitario de Neiva según consta en acta No. 031 del 22 de diciembre del 2010 y regido según la resolución 8430 de 1993 de la Republica de Colombia del Ministerio de Salud. Todas las muestras fueron recolectadas con previa firma de consentimiento y asentamiento informado escrito por parte de los pacientes incluidos o sus cuidadores. Se siguieron todos los principios expresados en la Declaración de Helsinki. La investigación no implico ningún riesgo para las personas del estudio

8. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

8.1 CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

En este estudio se incluyeron pacientes con infección por virus dengue y controles sanos. Al comparar valores paraclínicos entre una muestra de ambos grupos, se encontró un valor menor significativo en la mediana de las variables leucocitos, hemoglobina y plaquetas del grupo con infección por virus dengue ($P < 0.005$, Prueba de Mann-Whitney). A diferencia del hematocrito donde se encontró una mediana menor en el grupo de controles sanos, aunque esta diferencia fue no significativa ($P > 0.05$, Prueba de Mann-Whitney).

Tabla 1. Características clínicas de la población de estudio.

	DENGUE (N:76)	SANOS (N:33)	VALOR P*
Edad, meses, mediana (rango) ¹	52 (13 - 172)	96 (48 - 132)	0,2
Día de fiebre, mediana (rango) ¹	5 (5 - 8)	-	-
Leucocitos, cels/uL * 1000; mediana (rango) ¹	4.6 (2.4 - 10.1)	7.6 (5.6 - 10.9)	0,0033
Hemoglobina, g/dL; mediana (rango) ¹	12 (10.6 - 14.7)	12.1 (11.2 - 15.7)	0,0033
Hematocrito, %; mediana (rango) ¹	38.5 (31.5 - 40)	36.6 (33.8 - 47.3)	0,0827
Plaquetas, cels/uL * 1000; mediana (rango) ¹	87.0 (42.0 - 179.9)	290 (262 - 460)	0,001

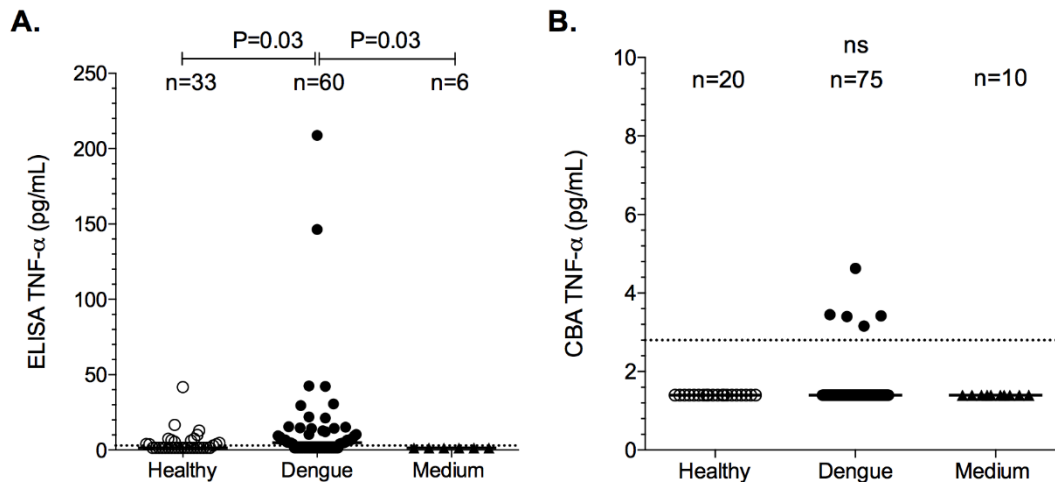
* Test Mann Whitney

8.2 ELISA ES MÁS EFICIENTE PARA DETECTAR TNF- α EN PLASMA

Para establecer cuál de los dos ensayos aquí evaluados (ELISA y CBA) es más eficiente en la medición de TNF- α en plasma, los niveles de la citoquina fueron determinados en plasma de niños sanos y con infección aguda por virus dengue, además de medio de cultivo como control. Niveles significativamente mayores de TNF- α fueron encontrados en plasma de niños con dengue en comparación con niños sanos y medio de cultivo, pero ésta diferencia fue obtenida cuando éstos fueron determinados por ELISA (Figura 1A, $P=0.03$ y $P=0.03$, Dengue vs sanos y dengue vs medio de cultivo, respectivamente; Dunn's post-hoc test) pero no por CBA (Figura 1B, $P > 0.1$, Dunn's post-hoc test), indicando que ELISA es más eficiente

para determinar los niveles de la citoquina en plasma. Consistentemente, una mayor tasa de detección de la citoquina fue obtenida por ELISA que por CBA en plasma de pacientes con dengue ($P < 0.0001$, Prueba de Fisher).

Figura 3. ELISA es más eficiente para detectar TNF- α en plasma.



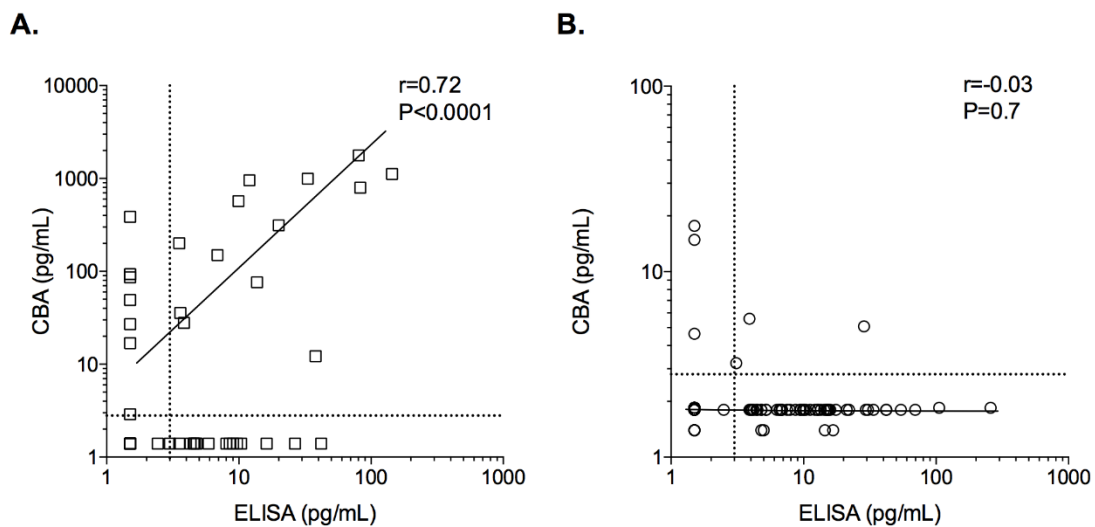
Niveles de TNF- α en plasma de niños con infección aguda por virus dengue, sanos y medio de cultivo, determinados por ELISA (A) y CBA (B). En la parte superior se muestra el número de muestras analizadas en cada grupo. El valor P de la prueba de Kruskal-Wallis y Dunn's post-hoc test son mostrados. Las líneas continuas indican la mediana para cada grupo y las líneas a trazos cortos indican el límite de detección de los ensayos. ns: No estadísticamente significativo.

8.3 CBA ES EFICIENTE EN LA DETECCIÓN DE TNF-A EN SOLUCIONES BUFFER

Ya que CBA demostró ser menos eficiente en la detección de TNF- α en plasma, evaluamos si su baja eficiencia es dependiente del método o del tipo de muestra analizada. Por lo tanto, se determinaron los niveles de TNF- α en líquido de lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes adultos con sospecha de tuberculosis pulmonar por CBA y ELISA y una correlación entre ambos métodos fue obtenida. Como muestra la Figura 2, altos niveles de la citoquina fueron obtenidos por ambos métodos en BAL, con una moderada correlación positiva entre los dos (Pearson $r=0.72$, $P < 0.0001$, Figura 2A). Como esperado, no hubo correlación entre los niveles

de TNF- α en plasma determinados por ambos métodos (Pearson $r=-0.03$, $P=0.7$, Figura 2B). Éstos resultados indican que CBA es eficiente en la detección de TNF- α en BAL, una solución buffer, pero no en plasma, sugiriendo que al parecer el tipo de muestra es crítica en la eficiente detección de esta citoquina. Ya que ELISA demostró mayor eficiencia en ambos tipos de muestras, éste fue el ensayo escogido para los análisis subsecuentes.

Figura 4. CBA es eficiente en la detección de TNF- α en soluciones buffer.



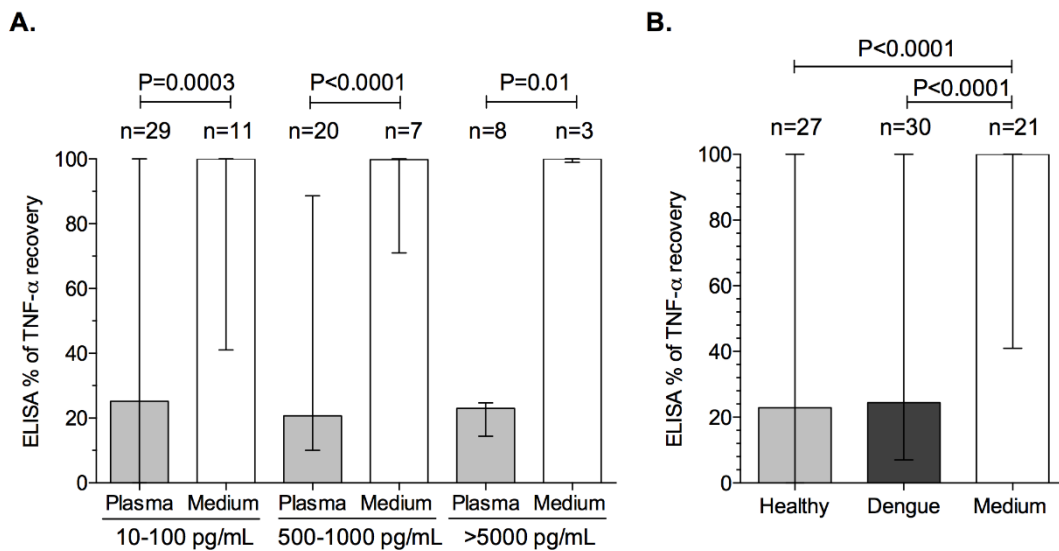
Correlación entre los niveles de TNF- α obtenidos por ELISA y CBA en líquido de lavado broncoalveolar de pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar (A) y en plasma de pacientes con dengue y controles sanos (B). El coeficiente de determinación de Pearson (r y valor P) es mostrado. Las líneas a trazos cortos indican el límite de detección de los ensayos.

8.4 EL PLASMA AFECTA LA EFICIENCIA EN LA DETECCIÓN DE TNF-A

Basados en los resultados previos donde se evidenciaba una baja detección de TNF- α en plasma, se consideró que era posible que biológicamente existiera una baja concentración de la citoquina en las muestras analizadas. Por lo tanto, para evaluar la eficiencia de la detección de TNF- α en plasma de pacientes con infección aguda por virus dengue y sanos, concentraciones conocidas de la citoquina fueron añadidos a muestras de plasma y medio de cultivo celular como control y se analizó por ELISA el porcentaje de recuperación, según la fórmula descrita en la sección de

metodología. Como muestra la Figura 3A, comparado con el medio de cultivo, bajos porcentajes de recuperación de TNF- α fueron obtenidos en plasma (tanto de niños con infección aguda por virus dengue como sanos) luego de la adición de concentraciones bajas (10-100 pg/mL), intermedias (500-1000 pg/mL) y altas (>5000 pg/mL) de la citoquina ($P \leq 0.01$, Prueba de Mann-Whitney; Figura 3A), indicando que la muestra afecta la medición de la citoquina. Sin embargo, es posible que el efecto no sea debido al tipo de muestra sino a la enfermedad de la persona. Por lo tanto, el porcentaje de recuperación de TNF- α (a las concentraciones previamente descritas) fue analizado en plasma de niños sanos y con infección por virus dengue, con medio de cultivo como control. Como muestra la figura 3B, mayores porcentajes de recuperación fueron obtenidos en medio de cultivo en comparación con el plasma de ambos grupos de individuos ($P < 0.0001$, Dunn's post-hoc test; Figura 3B), pero no se encontraron diferencias al comparar plasma de niños sanos y con infección por virus dengue ($P > 0.5$, Prueba de Mann-Whitney; Figura 3B). En resumen, el plasma demostró afectar la eficiencia para la detección de TNF- α , pero éste efecto es independiente de la enfermedad del individuo del cual procede la muestra.

Figura 5. El plasma afecta la eficiencia en la detección de TNF- α .



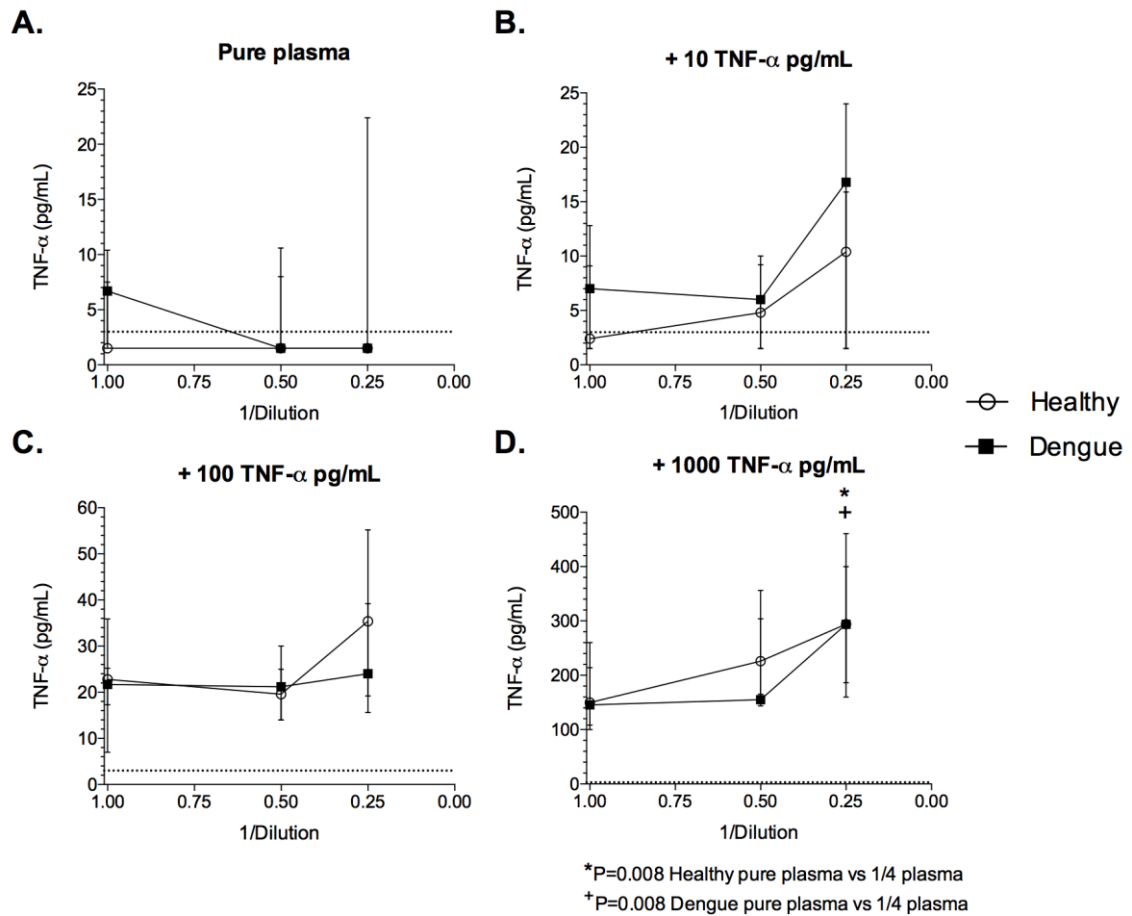
A. A través de ELISA se obtuvo el porcentaje de recuperación de TNF- α en plasma y medio de cultivo luego de la adición de concentraciones de la citoquina (10-100, 500-1000 y >5000 pg/mL). El valor P de la prueba de Mann-Whitney es mostrado.
B. A través de ELISA se obtuvo el porcentaje de recuperación de TNF- α en plasma de niños sanos, con infección aguda por virus dengue y medio de cultivo luego de

la adición de concentraciones conocidas de la citoquina (las mismas empleadas en A fueron agrupadas). El valor P de la prueba de Kruskal-Wallis y Dunn's post-hoc test son mostrados. En la parte superior se muestra el número de muestras analizadas en cada grupo. Para todos los casos la mediana y rangos son mostrados

8.5 LA DILUCIÓN DEL PLASMA MEJORA LA DETECCIÓN DE TNF- α , PERO SÓLO A ALTAS CONCENTRACIONES DE LA CITOQUINA

En conjunto, los resultados previos demostraron que el plasma afecta la eficiencia en la detección de TNF- α independiente del ensayo empleado e incluso luego de la adición de concentraciones elevadas de la misma. Por lo tanto, es probable que con la dilución del plasma, y por ende de las diversas proteínas y demás factores solubles que puedan interactuar con la citoquina, mejore la detección del TNF- α . Basados en ésta hipótesis, concentraciones conocidas de TNF- α fueron añadidas a plasma de niños sanos y con infección aguda por virus dengue, diluciones seriadas al medio (1/2 y 1/4) en solución diluyente fueron realizadas y los niveles de la citoquina fueron determinadas por ELISA. Como muestra la Figura 4, no hubo diferencias en la detección de TNF- α en ninguna de las condiciones evaluadas (plasma puro, diluido 1/2 y diluido 1/4) cuando la concentración de la citoquina era baja (plasma sin adición de TNF- α , o con la adición de sólo 10 y 100 pg/mL), tanto en plasma de niños sanos como con infección por virus dengue ($P \geq 0.5$, Prueba de Friedman, Figura 4A-C). Sin embargo, cuando 1000 pg/mL de TNF- α fueron añadidos al plasma, mayores niveles fueron obtenidos en la dilución 1/4 en comparación con el plasma no diluido o diluido 1/2, tanto en niños sanos como con infección por virus dengue ($P=0.0008$, Prueba de Friedman, Figura 4D). Los resultados sugieren que sólo en presencia de altas concentraciones de TNF- α la dilución del plasma mejora la detección de ésta.

Figura 6. La dilución del plasma mejora la detección de TNF- α , pero solo a altas concentraciones.

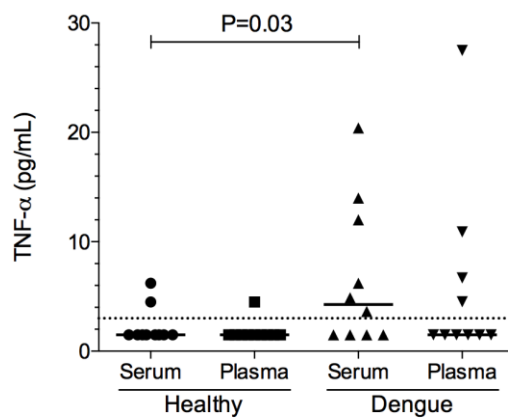


A través de ELISA se determinaron los niveles de TNF- α en plasma de voluntarios sanos y niños con dengue (n=5 en cada grupo) sin (A) y con la adición de 10 (B), 100 (C), y 1000 (D) pg/mL de la citoquina. Diluciones seriadas al medio (1/2 y 1/4) fueron realizadas en medio diluyente. Se muestran las medianas y rangos para cada grupo y diluciones. El valor P de la prueba de Friedman es mostrado.

8.6 EL SUERO PERMITE OBSERVAR LAS DIFERENCIAS BIOLÓGICAS EN LOS NIVELES DE TNF-A ENTRE INDIVIDUOS SANOS Y CON INFECCIÓN AGUDA POR VIRUS DENGUE

Para evaluar si la baja eficiencia en la detección de TNF- α en plasma es específica de éste tipo de muestra o es similar en otras como suero, la citoquina fue evaluada por ELISA en muestras puras de plasma y suero (pareadas) de niños con infección aguda por virus dengue y controles sanos. Como muestra la Figura 5, aunque se detectaron bajos niveles de la citoquina en ambos tipos de muestras, cuando el TNF- α fue evaluado en suero, niveles significativamente mayores fueron encontrados en niños con infección por virus dengue en comparación con sanos ($P=0.03$, Prueba de Mann-Whitney), no siendo así cuando se evaluaron en plasma ($P>0.8$, Prueba de Mann-Whitney; Figura 5). Por lo tanto, al parecer el suero permite detectar las diferencias en las concentraciones biológicas del TNF- α entre pacientes agudamente enfermos y controles sanos.

Figura 7. Niveles de TNF- α en plasma y suero determinados por ELISA



Niveles de TNF- α en plasma y suero de niños sanos y con infección aguda por virus dengue determinados por ELISA. Las líneas continuas indican la mediana de cada grupo y las líneas a trazos cortos indican el límite de detección del ensayo. El valor P de la prueba de Mann-Whitney es mostrado.

9. DISCUSIÓN

En este estudio la técnica de ELISA demostró ser más eficiente comparado con CBA en la detección de TNF-a en muestras de plasma, donde se evidencio niveles significativamente mayores de esta citocina en muestras de niños con dengue en comparación con sanos y medio de cultivo. Estos resultados son comparables con los obtenidos en otros estudios donde se ha demostrado mayor eficiencia en la detección de TNF-a mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado enzima³⁴, considerado la técnica estándar para la detección de citocinas³⁵, a pesar de sus desventajas frente a ensayos basado en citometria de flujo con microesferas mencionadas anteriormente. Sin embargo estudios han demostrados una buena correlación entre las concentraciones de citocinas obtenidos por ELISA y kits de CBA^{36,37,38}. Estas diferencias pueden ser en parte explicadas por los diferentes anticuerpos utilizados por las distintas compañías fabricantes y de sus diferentes tecnologías³⁹.

Varios estudios han descrito la elevación de citocinas proinflamatorias como el TNF-a durante el proceso de enfermedades infecciosas como lo es el dengue cuando se compara con las concentraciones de pacientes sanos^{40,41}, aunque la mayoría de los casos en concentraciones más bajas de lo esperado o indetectable cuando se compara con la expresión de ARN mensajero de polimorfonucleares de sangre periférica en estados proinflamatorios y la presencia de la molécula en fluidos corporales⁴², esto nos hace pensar en la existencia de un factor soluble que pueda estar afectando su medición. Es limitado conocer un valor exacto de la

³⁴ DOSSUS L, et al. Validity of multiplex-based assays for cytokine measurements in serum and plasma from "non-diseased" subjects: comparison with ELISA. *Journal of immunological methods*. 2009;350(1-2):125-32.

³⁵ ELSHAL MF, MCCOY JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*. 2006;38(4):317-23.

³⁶ TIMMONS BW, HAMADEH MJ, TARNOPOLSKY MA. Two methods for determining plasma IL-6 in humans at rest and following exercise. *European journal of applied physiology*. 2009;105(1):13-8.

³⁷ DUPONT NC, et al. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *Journal of reproductive immunology*. 2005;66(2):175-91.

³⁸ PRABHAKAR U, EIRIKIS E, DAVIS HM. Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP assay. *Journal of immunological methods*. 2002;260(1-2):207-18.

³⁹ KHAN SS, et al. *Op. Cit.*, p. 35-9.

⁴⁰ CHAKRAVARTI A, KUMARIA R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *The Indian journal of medical research*. 2006;123(1):25-30.

⁴¹ VILLAR LA, et al. Biomarcadores pronóstico de gravedad del dengue. *Biomedica*. 2013;33(supl.1):108-16.

⁴² BRAZILLE P, et al. Decreases in plasma TNF-alpha level and IFN-gamma mRNA level in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and an increase in IL-2 mRNA level in PBMC are associated with effective highly active antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Clinical and experimental immunology*. 2003;131(2):304-11.

concentración de TNF-a en muestras de fluidos corporales debido a los distintos factores que afectan su medición y a la imposibilidad de recrear un ambiente biológico en el cual esta molécula interactúa.

El TNF-a es particular ya que se detecta en menor concentración de las demás citocinas proinflamatorias aun conociéndose que está ampliamente implicada, lo cual la hace una de las citocinas más ampliamente estudiada.⁴³

Muchos estudios reportan elevación de citocinas inflamatorias en la patogénesis de enfermedades como el dengue, aunque esta información puede llegar a ser imprecisa cuando se trata de citocinas como el TNF-a, ya que existen factores que no se encuentran bien descritos y pueden estar afectando su medición, lo que generaría una limitación en la interpretación por falta de información. Dentro de los posibles factores que pueden estar afectando la estabilidad de la molécula y su detección en fluidos corporales están: el tipo de muestra, las proteínas solubles, anticuerpos, receptores solubles, complejos inmunes, lisozimas, el recipiente donde se recolecta la muestra, el tiempo de almacenamiento, los ciclos de congelación – descongelación⁴⁴ y el estuche comercial utilizado⁴⁵. Estudios han demostrado mejores resultados en la detección de citocinas cuando se realiza técnicas de purificación de la muestra donde se depleta los anticuerpos y proteínas presentes en la muestra⁴⁶.

Los resultados obtenidos al comparar la detección de TNF-a por las técnicas de ELISA y CBA en BAL de pacientes con sospecha de tuberculosis, donde se encontró una moderada correlación positiva; sugiere que al parecer el tipo de muestra es crítica en la eficiente detección de esta citocina, evidenciando el posible papel que juegan los factores mencionados anteriormente en la molécula a detectar. Estos resultados son confirmados con los hallazgos encontrados en otro estudio donde se evaluó la eficiencia de ensayos basados en CF para la detección de citocinas en soluciones buffer⁴⁷

⁴³ SACHDEVA N, ASTHANA D. Cytokine quantitation: technologies and applications. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:4682-95.

⁴⁴ DE JAGER W, et al. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC immunology*. 2009;10:52.

⁴⁵ DUPONT NC, et al. *Op. Cit.* , p. 175-91.

⁴⁶ DE JAGER W, et al. Improved multiplex immunoassay performance in human plasma and synovial fluid following removal of interfering heterophilic antibodies. *Journal of immunological methods*. 2005;300(1-2):124-35.

⁴⁷ RIOS-LUGO MJ, et al. Optimization of buffer solutions to analyze inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid by multiplex flow cytometry. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2015;20(1):e13-6.

Al evaluar el porcentaje de recuperación como se describió en la metodología, se encontró una diferencia significativa entre plasma de niños sanos, con infección por virus dengue y medio de cultivo, pero no se encontraron diferencias al comparar plasma de niños sanos y con infección por virus dengue. Estos resultados demuestran que el plasma afecta la eficiencia para la detección de TNF-a, pero este efecto es independiente de la enfermedad.

Se han descritos múltiples métodos con el objetivo de mejorar y establecer una forma eficiente para la detección de citocinas. Basados en la hipótesis de la presencia de factores que afectan la detección de las citocinas, se quiso demostrar si la dilución del plasma (ver metodología), y por ende los diversos factores solubles que puedan interactuar con la molécula, mejora la detección de TNF-a. No hubo diferencias significativas en la detección de TNF-a en ninguna de las condiciones evaluadas, excepto cuando 1000pg/mL de TNF-a fueron añadidos al plasma, niveles mayores fueron obtenidos en la dilución 1/4 en comparación con plasma puro y diluido al 1/2. Esto puede ser explicado por la dilución, ya que esta implica la molécula en estudio. A pesar de que estos resultados sugieren mejora en la detección de TNF-a en presencia de altas concentraciones, continua siendo un método ineficaz debido a que de forma natural el TNF-a es detectado en bajas concentraciones, muy inferiores a 1000pg/mL⁴⁸⁴⁹.

En los resultados obtenidos no se observó diferencia significativa entre las concentraciones de TNF-a en plasma de niños sanos y con infección por virus dengue por ninguna de las dos técnicas, en comparación con otros estudios donde existe una marcada diferencia significativa entre muestras de pacientes sanos e infectados con virus dengue⁵⁰⁵¹. Estos resultados pueden ser explicados por el bajo número de muestras utilizadas. Los niveles detectados de TNF-a comparando plasma y suero de niños sanos e infectados con virus dengue fueron no significativos, aunque existió una diferencia significativa cuando se comparó suero de sanos y dengue. Se ha descrito que la detección de citocinas puede ser afectada por el anticoagulante utilizado en la recolección de la muestra⁵²⁵³. Esto genera que el plasma y suero no sean equivalentes por su eliminación de proteínas, fibrinógeno

⁴⁸ CHAKRAVARTI A, KUMARIA R. Op. Cit. , p. 25-30.

⁴⁹ SALGADO DM. Pattern of serum cytokines in children with dengue hemorrhagic fever in Neiva, Colombia. 2010;2(1):21-29.

⁵⁰ ARIAS J, et al. Op. Cit. , p.:42-51.

⁵¹ VILLAR LA, et al. Op. Cit. , p. 108-16

⁵² RICHES P, GOODING R, MILLAR BC, ROWBOTTOM AW. Influence of collection and separation of blood samples on plasma IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations. Journal of immunological methods. 1992;153(1-2):125-31.

⁵³ LUM G, GAMBINO SR. A comparison of serum versus heparinized plasma for routine chemistry tests. American journal of clinical pathology. 1974;61(1):108-13.

y plaquetas, en este último. A pesar de esto, en este estudio no se observó diferencias significativas, resultados que son compartidos con otros estudios⁵⁴.

⁵⁴ Dossus L, Becker S, Achaintre D, Kaaks R, Rinaldi S. Op. Cit. , p. 125-32.

10. CONCLUSIONES

- ELISA es más eficiente para detectar TNF- α en plasma
- CBA es eficiente en la detección de TNF- α en soluciones buffer
- El plasma afecta la eficiencia en la detección de TNF- α
- La dilución del plasma mejora la detección de TNF- α , pero sólo a altas concentraciones de la citoquina

11. RECOMENDACIONES

Continuar con el estudio de ésta enfermedad, el registro continuo de los datos clínicos y paraclínicos de todos los pacientes y el fortalecimiento del departamento de infectología pediátrica, para así brindar el mejor tratamiento de los niños con dengue.

Continuar con el estudio de detección de TNF- α ya que hasta el momento no se ha podido estandarizar una forma eficaz para su detección.

Implementar nuevas técnicas y métodos para la detección de TNF- α distintos a los utilizados en este estudio y comparar su eficacia.

BIBLIOGRAFÍA

ARIAS J, *et al.* Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Journal of virology*. 2014; 452-453:42-51

BELABANI C, *et al.* A condensed performance-validation strategy for multiplex detection kits used in studies of human clinical samples. *Journal of immunological methods*. 2013;387(1-2):1-10.

BHATT S, *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.

BLACK RA, *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997;385(6618):729-33.

BRAZILLE P, *et al.* Decreases in plasma TNF-alpha level and IFN-gamma mRNA level in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and an increase in IL-2 mRNA level in PBMC are associated with effective highly active antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Clinical and experimental immunology*. 2003;131(2):304-11.

CARSON RT, VIGNALI DA. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *Journal of immunological methods*. 1999;227(1-2):41-52.

CHAKRAVARTI A, KUMARIA R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *The Indian journal of medical research*. 2006;123(1):25-30.

CHEN G, GOEDDEL DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5573):1634-5.

CROWTHER JR. The ELISA guidebook. *Methods in molecular biology*. 2000;149:III-IV, 1-413.

DEFAWE OD, et al. Optimization and qualification of a multiplex bead array to assess cytokine and chemokine production by vaccine-specific cells. *Journal of immunological methods*. 2012;382(1-2):117-28.

DE JAGER W, et al. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC immunology*. 2009;10:52.

DOSSUS L, et al. Validity of multiplex-based assays for cytokine measurements in serum and plasma from "non-diseased" subjects: comparison with ELISA. *Journal of immunological methods*. 2009;350(1-2):125-32.

DE JAGER W, et al. Improved multiplex immunoassay performance in human plasma and synovial fluid following removal of interfering heterophilic antibodies. *Journal of immunological methods*. 2005;300(1-2):124-35.

DUPONT NC, et al. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *Journal of reproductive immunology*. 2005;66(2):175-91.

ELSHAL MF, MCCOY JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*. 2006;38(4):317-23.

GAUR U, AGGARWAL BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical pharmacology*. 2003;66(8):1403-8.

HEHLGANS T, PFEFFER K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005;115(1):1-20.

INNIS BL, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1989;40(4):418-27.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD COLOMBIA. Reporte periodo 2010 – 2012. *Boletín epidemiológico* 2012;40(52):10.

KANT S, *et al.* TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes & development.* 2011;25(19):2069-78.

KHAN SS, *et al.* Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry Part B, Clinical cytometry.* 2004;61(1):35-9.

KRIEGLER M, *et al.* A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell.* 1988;53(1):45-53.

LIMONTA D, *et al.* Apoptotic Mediators in Patients With Severe and Non-Severe Dengue From Brazil. *Journal of Medical Virology;* 2014 v.86, n.8, :1437-47.

LENG SX, *et al.* ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences.* 2008;63(8):879-84.

LUM G, GAMBINO SR. A comparison of serum versus heparinized plasma for routine chemistry tests. *American journal of clinical pathology.* 1974;61(1):108-13.

MALAVIGE GN, *et al.* Cellular and Cytokine Correlates of Severe Dengue Infection. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e50387.

MEIJERINK M, *et al.* Cryopreservation of monocytes or differentiated immature DCs leads to an altered cytokine response to TLR agonists and microbial stimulation. *Journal of immunological methods.* 2011;373(1-2):136-42.

MORGAN E, *et al.* Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clinical immunology (Orlando, Fla).* 2004;110(3):252-66.

OLIVER KG, KETTMAN JR, FULTON RJ. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system. *Clinical chemistry.* 1998;44(9):2057-60.

PFEFFER K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003;14(3-4):185-91.

PRABHAKAR U, EIRIKIS E, DAVIS HM. Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP assay. *Journal of immunological methods*. 2002;260(1-2):207-18.

RICHES P, GOODING R, MILLAR BC, ROWBOTTOM AW. Influence of collection and separation of blood samples on plasma IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations. *Journal of immunological methods*. 1992;153(1-2):125-31.

RIOS-LUGO MJ, *et al.* Optimization of buffer solutions to analyze inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid by multiplex flow cytometry. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2015;20(1):e13-6.

SACHDEVA N, ASTHANA D. Cytokine quantitation: technologies and applications. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:4682-95.

SALGADO DM. Pattern of serum cytokines in children with dengue hemorrhagic fever in Neiva, Colombia. 2010;2(1):21-29.

SIMMONS CP, FARRAR JJ, NGUYEN V, WILLS B. Dengue. *The New England journal of medicine*. 2012;366(15):1423-32.

TANG P, HUNG MC, KLOSTERGAARD J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*. 1996;35(25):8216-25.

TARNOK A, HAMBSCHE J, CHEN R, VARRO R. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clinical chemistry*. 2003;49(6 Pt 1):1000-2.

THEISS AL, *et al.* Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(43):36099-109.

TIMMONS BW, HAMADEH MJ, TARNOPOLSKY MA. Two methods for determining plasma IL-6 in humans at rest and following exercise. *European journal of applied physiology*. 2009;105(1):13-8.

VIGNALI DA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *Journal of immunological methods*. 2000;243(1-2):243-255.

VILLAR LA, *et al.* Biomarcadores pronóstico de gravedad del dengue. *Biomedica*. 2013;33(supl.1):108-16.

WAJANT H, PFIZENMAIER K, SCHEURICH P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*. 2003;10(1):45-65.

ANEXOS

Anexo A. Instrumento



Lab I&I



DETECCIÓN DE TNF α EN PLASMA POR ELISA Y CITOMETRÍA: UNA COMPARACIÓN EN DENGUE

Autor: Harrison Herrera Delgado – Estudiante Medicina - USCO

Tutor: Carlos Fernando Narváez MD, MSc, PhD

OBJETIVO GENERAL

La presente investigación tiene como objetivo determinar cuál de los dos métodos (citometría o ELISA) es más eficiente para medir la concentración de TNF α en muestras de plasma y suero dengue y no dengue.

- Concentración de TNF α : _____ Pg/ml
- Tipo de población: Dengue_____. No dengue_____
- Tipo de muestra: Plasma_____. Suero_____
- Método de medición: ELISA_____. CBA_____

Anexo B. Cronograma de actividades

Tiempo (meses)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Actividad												
Anteproyecto												
Revisión bibliográfica												
Formulario de marco teórico												
Diseño de formulario												
Enrolamiento de voluntarios sanos y pacientes infectados con VD.												
Medición de TNF-a por ELISA y Citometría												
Análisis de resultados												
Entrega de informe final												

Anexo C. Presupuesto

RUBROS	FUENTES		TOTAL
	COLCIENCIAS	USCO	
PERSONAL	0	0	
EQUIPOS	2,000,000	0	2,000,000
SOFTWARE			0
MATERIALES		500,000	500,000
SALIDAS DE CAMPO		0	0
MATERIAL BIBLIOGRÁFICO		0	0
PUBLICACIONES Y PATENTES		0	0
SERVICIOS TÉCNICOS		0	0
VIAJES		1,500,000	1,500,000
CONSTRUCCIONES	No financiable		
MANTENIMIENTO	No financiable		
ADMINISTRACION	(3% del total solicitado)	0	0
TOTAL	2,000,000	2,000,000	4,000,000