

**NIVELES DE ST2s E IL-33 EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA CON
MIOCARDITIS DENGUE.**

**ANDRES FELIPE ARRIETA ÁVILES
CHRISTIAN DAVID GUERRERO OSORIO
NÉSTOR DANIEL RAMÍREZ BORRERO**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA
2009**

**NIVELES DE ST2s E IL-33 EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA CON
MIOCARDITIS DENGUE.**

**ANDRES FELIPE ARRIETA ÁVILES
CHRISTIAN DAVID GUERRERO OSORIO
NÉSTOR DANIEL RAMÍREZ BORRERO**

Trabajo presentado como requisito para optar al título de Médico y Cirujano

Asesores:

LUZ STELLA RODRIGUEZ CAMACHO
Qca MSC Cd PhD en ciencias biológicas con énfasis en inmunología
DOLLY CASTRO BETANCOURT
MSC en epidemiología
ROCIO VEGA VEGA
MD Pediatra
CARLOS FERNANDO NARVAEZ ROJAS
MD MSC PhD en ciencias biológicas con énfasis en inmunología
DORIS SALGADO DE PANQUEBA
MD Pediatra
JAIRO ANTONIO RODRÍGUEZ RODRIGUEZ
MD MSC PhD en inmunología

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA
2009**

Nota de aceptación

Firma Presidente del jurado

Firma Jurado

Firma Jurado

Neiva, Diciembre 9 del 2009

DEDICATORIA

**A Dios, a nuestras familias,
y a nuestros seres queridos.**

Andrés,

Cristian,

Néstor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

A los docentes que pertenecen al Grupo de Investigación de Parasitología y Medicina Tropical, por guiarnos durante el desarrollo de este trabajo.

Al personal del laboratorio de inmunología por su colaboración desinteresada.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
2.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	15
2.2 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	16
2.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 OBJETIVO GENERAL	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5. MARCO TEÓRICO	20
5.1 GENERALIDADES SOBRE DENGUE.....	21
5.2 MARCADORES DE SEVERIDAD EN DENGUE.....	22
5.3 IL-33.....	23
5.4 ST2	23
5.5 MIOCARDITIS EN DENGUE	24
5.6 ST2 EN DENGUE	27
6. METODOLOGÍA	28
6.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	28
6.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	28

6.3 CRITERIOS DE INCLUSION	29
6.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	31
6.5 TÉCNICAS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS Y TRABAJO DE LABORATORIO	31
6.6 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN Y PLAN DE ANÁLISIS	33
6.7 ASPECTOS ÉTICOS	33
7. RESULTADOS.....	35
7.1 PACIENTES CON INFECCIÓN POR DENV PRESENTAN NIVELES AUMENTADOS DE ST2S.....	38
7.2 NIVELES DE IL-33 NO SE ELEVAN EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR DENV	40
7.3 NIVELES DE IL-33 NO SE CORRELACIONAN CON NIVELES DE ST2S.....	41
7.4 NIVELES DE ST2S Y CK-MB RELACIONADOS CON LA SEVERIDAD CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR DENV	42
7.5 CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE ST2S Y CK-MB EN PACIENTES CON VALORES DE CK-MB (+) PARA INJURIA CARDIACA	43
8. DISCUSIÓN	44
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	51

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Criterios de inclusión	29
Tabla 2. Clasificación clínica de miocarditis	30
Tabla 3. Operacionalización de variables	31
Tabla 4. Variables sociodemográficas y variables clínicas	35

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Niveles de ST2s e IL-33 en pacientes con infección por DENV	39
Figura 2. Niveles de ST2s e IL-33 en pacientes con miocarditis dengue	40
Figura 3. Correlación de los niveles de ST2s e IL-33	41
Figura 4. Niveles de ST2s y CK-MB relacionados con la severidad de la infección por DENV	42
Figura 5. Correlación entre los niveles de ST2s y CK-MB	43

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A Autorización para el uso de las muestras obtenidas en estudios posteriores	52
Anexo B Instrumento de medición	53
Anexo C Costos	54
Anexo D Cronograma	56

RESUMEN

La enfermedad por virus dengue (DENV) tiene una presentación clínica espectral que va desde el dengue sin signos de alarma hasta la fiebre hemorrágica dengue. Los niños son los mas afectados en el Huila, con una mortalidad global del 1%, donde la miocarditis dengue (MD) es la principal causa de muerte (60%) (Salgado et al, Infectio, 2008). Se ha demostrado la participación de mediadores inflamatorios solubles en la patogénesis y severidad de la enfermedad. El ST2 soluble (ST2s), un factor involucrado en la permeabilidad vascular, se ha encontrado incrementado en los pacientes con las formas severas de la infección (Becerra et al. 2008). La IL-33, una citoquina que ha sido asociada con cardio protección, es el ligando natural del ST2s, la unión a el ST2s inhibe la acción protectora de la IL-33 en modelos murinos (Sanada et al, 2007). El objetivo de este estudio es determinar la relación entre los niveles de ST2s e IL-33 en el suero de los pacientes con MD.

La cuantificación de st2s e IL-33 se realizo a través de ELISA sándwich en las muestras de los pacientes menores de 13 años de edad con MD, atendidos en el Hospital Hernando Moncaleano Perdomo. Los pacientes infectados con DENV tuvieron niveles séricos significativamente aumentados de ST2s, pero no mostraron cambios significativos en los niveles séricos de IL-33. No se encontró correlación entre la concentración de estas proteínas, sugiriendo que los niveles de ST2s no modifican los niveles de IL-33. Se hallo una buena correlación no significativa entre los niveles de ST2s y CK-MB.

Palabras claves: Dengue, Miocarditis, Miocarditis dengue, ST2s, IL-33.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) disease has a clinical spectral presentation, since dengue without warning signals to severe dengue hemorrhagic fever. Children are the most affected in Huila, with 1% of average fatality, with myocarditis dengue (MD) as the leading cause of death (60%) (Salgado et al, Infectio, 2008). It has been shown the participation of soluble inflammatory mediators in the pathogenesis and severity of the disease. Soluble ST2 (ST2s), a factor involved in the vascular permeability, has been found increased in patients with severe forms of infection (Becerra et al. 2008). IL-33, a cytokine that has been associated with cardio protection, is the natural ligand of ST2s, binding to ST2s inhibits the protective action of IL-33 in murine model (Sanada et al, 2007). The aim of this study was to determine the relationship between levels of ST2s and IL-33 in sera from patients with Dengue myocarditis (MD).

Quantification of ST2s and IL-33 was performed by sandwich ELISA in samples of patients under 13 years old with MD, treated at the Hernando Moncaleano Perdomo Hospital. The DENV infected patients have significantly increased serum levels of ST2s, but don't show significant changes in serum levels of IL-33. We don't found correlation between the concentration of these proteins, suggesting that levels of ST2s don't change levels of IL-33. We found a good, not significant correlation between levels of ST2s and CK-MB.

Key Words: Dengue, Myocarditis, Dengue Myocarditis, ST2s, IL-33.

INTRODUCCIÓN

Múltiples son las teorías acerca de la patogénesis de Fiebre Dengue hemorrágico (FDH), pero la más aceptada indica que la enfermedad es producto de la respuesta inmune del huésped. Existe bastante información sobre el papel que desempeñan los anticuerpos de baja afinidad durante las reinfecciones y se propone que las células infectadas, producen una gran explosión de mediadores inflamatorios, como IFN- γ , IL-2 y TNF- α que dan como resultado una amplia cadena de eventos que inducen la disfunción celular produciendo un desbalance en los procesos coagulatorios que conducen a fuga plasmática, hemorragia y choque; caracterizando el cuadro clínico y la fisiopatología de la Infección por Dengue^{1 2}.

Sin embargo aun no es claro, como esta gran estimulación inflamatoria con la producción de los mediadores interactúa de manera plena para hacer evidente el espectro clínico de la enfermedad donde solamente 2.5% de los pacientes que desarrollan Fiebre dengue hemorrágico y Síndrome de choque dengue (SCD) las formas más graves, fallecen. Adicionalmente en la actualidad la severidad alcanzada por dicho cuadro viral incluye formas atípicas potencialmente letales para el ser humano como la encefalopatía y la Miocarditis; de las cuales la más frecuente en nuestro medio es la miocarditis.

En su estudio de mortalidad por dengue hemorrágico en niños en Colombia, Salgado y colaboradores reportan una tasa de letalidad promedio de 1.03%, en un estudio realizado con 338 pacientes con diagnóstico de FDH, que requirieron ingreso a la unidad de cuidados intensivos pediátricos. Este estudio reporta la miocarditis aguda (caracterizada por pobre respuesta a la reanimación con líquidos intravenosos, con choque persistente, fenómenos arrítmicos y aumento de las enzimas cardíacas), como la mayor causa de mortalidad, en un 60% del total de fallecimientos³.

¹GREEN, S y ROTHMAN A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. En: Curr Opin Infect Dis. 2006. vol. 19, N° 5, p. 429-36.

²KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. En: Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2007. vol. 30, p. 329-340.

³SALGADO, D, *et al.* Mortalidad por dengue hemorrágico en niños en Colombia: más allá del choque. En: Infectio. 2008. vol. 12, No 1, p. 249-255.

La IL-33 y el ST2s son moléculas relativamente jóvenes que han demostrado tener un importante papel en reacciones inmunológicas en diferentes modelos experimentales. Llama la atención el papel descrito en la inmunopatogénesis de la infección por DENV y los modelos experimentales de miocarditis viral.

Todo este conocimiento acerca de estas dos moléculas y de su posible relación con la función cardíaca en diferentes procesos patológicos, ha despertado nuestro interés en conocer los niveles de ST2s e IL-33 en la complicación más frecuente y mortal del Dengue en nuestro medio, la miocarditis Dengue; y con estos valores poder aportar al conocimiento en el posible papel cardioprotector de la IL-33; así como la posibilidad que niveles elevados de ST2s sean un marcador biomolecular de severidad en la miocarditis Dengue; y con esto abrir un camino en que permita emplear estas dos moléculas y su dinámica en la miocarditis Dengue como posible factor pronóstico y/o diagnóstico en esta complicación de la infección por DENV.

Conocer el comportamiento de la IL-33 y ST2s en miocarditis por virus dengue permitiría ampliar el conocimiento de la fisiopatología de esta manifestación clínica atípica de la enfermedad causada por virus dengue, siendo esto un paso inicial en la posible utilización de estas como marcadores que permitan prever el desarrollo de esta complicación en los pacientes con FDH, llevando así a una intervención temprana y adecuada. Un conocimiento mayor, podría permitir largo plazo que estas se puedan utilizar como terapia farmacológica.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

En su estudio de mortalidad por dengue hemorrágico en niños en Colombia, Salgado y colaboradores reportan una tasa de letalidad promedio de 1.03%, en un estudio realizado con 338 pacientes con diagnóstico de FDH, que requirieron ingreso a la unidad de cuidados intensivos pediátricos. Este estudio reporta la miocarditis aguda (caracterizada por pobre respuesta a la reanimación con líquidos intravenosos, con choque persistente, fenómenos arrítmicos y aumento de las enzimas cardíacas), como la mayor causa de mortalidad, en un 60% del total de fallecimientos⁴.

Kabra y colaboradores, en un estudio prospectivo con 54 niños menores de 12 años admitidos en todos los Institutos de Ciencias Médicas de la India en Nueva Delhi después del 15 de octubre de 1996 y en diferentes estadios de la enfermedad, en el cual se emplearon como métodos diagnósticos Ecocardiografía Doppler color en 2 dimensiones y modo M; para todos los pacientes fue calculada la fracción de eyección y la fracción de acortamiento, encontrando que la fracción de eyección se encontraba disminuida (<50%) en 9 de los 54 pacientes correspondiendo al 16.7%⁵.

Por otra parte, en Tailandia el estudio de Khongphatthanayothin y colaboradores, con el objetivo de determinar la depresión miocárdica y su efecto en la severidad en la infección por DENV; fue realizado con 91 pacientes pediátricos quienes presentaban infección por Virus Dengue evidenciada mediante serología o PCR; determinó que la fracción de eyección fue menor al 50% en 6.7%, 13.8% y 36% de pacientes con Fiebre Dengue (FD), FDH y SCD respectivamente. Este estudio concluyó que la disfunción cardíaca en la infección por DENV es una complicación no infrecuente y que contribuye a la severidad clínica del SSD⁶.

En cuanto al papel de ST2 en la infección por DENV el estudio de Houghton, midió la expresión de dos isoformas de este gen (receptor soluble y anclado

⁴Ibíd., p. 13.

⁵KABRA SK, *et al.* Myocardial dysfunction in children with dengue haemorrhagic fever. *En: National Medical Journal of India.* 1998. vol.11, No. 2, p. 59-61.

⁶KHONGPHATTHANAYOTHIN, A, *et al.* Myocardial depression in dengue hemorrhagic fever: Prevalence and clinical description. *En: Pediatric Critic Care Med.* 2007. vol. 8, No. 6, p. 524-539.

a membrana T1/ST2s y T1/ST2L respectivamente) en 21 pacientes con FD y 17 con FDH. Realizó medición de estas dos isoformas en los diferentes estadios de la infección por DENV usando PCR, ELISA y cultivo de células endoteliales. Datos *in vitro* podrían indicar que TNF α y otras moléculas solubles presentes en el suero de los pacientes con Dengue, podrían regular la expresión de T1/ST2 en las células endoteliales. T1/ST2s podría ser incluido como un marcador de severidad y probablemente contribuya a la regulación negativa de la respuesta inflamatoria durante la enfermedad severa y pueda ser parte de un mecanismo de retroalimentación y control⁷.

En cuanto a la IL-33, es una molécula relativamente joven descrita en 2005 por Jochen Schmitz dentro de la familia de IL-1, la cual según este autor es el ligando específico de las dos isoformas del ST2, y que por medio de la isoforma anclada a membrana (ST2L), utiliza esta vía de señalización por medio de la familia de MAP-quinasas y la activación de NF-kB, sugiriendo una posible función inmunomoduladora[7]. Adicionalmente Shoji Sanada en un estudio realizado en ratas sometidas a sobrecarga de presión mediante TAC (Transverse Aortic Constriction) y en las cuales se midieron niveles de ST2 e IL-33 luego de un tiempo; concluyó que la señalización por la vía de IL-33/ST2, cumple una función protectora del miocardio bajo estrés y que la IL-33 posee propiedades antiinflamatorias y antifibróticas en el miocardio⁸.

2.2 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La enfermedad causada por la Infección con el virus Dengue es una patología prevalente propia de zonas tropicales en las cuales se encuentra un gran número de países y una proporción importante de la población mundial, por tal razón los seres humanos que habitan dichas zonas se encuentran frecuentemente expuestos a la infección por dicho virus. Colombia además de ser un país ubicado en la zona tropical, reúne muchas de las características ambientales necesarias para la supervivencia y proliferación del vector *Aedes aegypti*. Algunas de ellas son la variedad de regiones ubicadas bajo los 2200 msnm y los altos índices de pluviosidad entre otros. Aunado a la presencia del vector que garantiza la transmisibilidad, en Colombia se cuenta con la presencia de los cuatro serotipos de virus Dengue, exponiendo a la población a una mayor

⁷HOUGHTON, N. *et al.* Levels of soluble ST2 in serum associate with severity of dengue due to TNF- α stimulation. *En: Journal of General Virology*. 2009. Paper in press.

⁸SCHMITZ, J, *et al.* IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *En: Immunity*. 2005. vol. 23; p. 479–490.

probabilidad de infección, reinfección y a las complicaciones derivadas de la enfermedad.

Se estima que ocurren entre 50 y 100 millones de casos de Fiebre dengue anualmente en todo el mundo, de los cuales aproximadamente 500.000 son formas agresivas de la enfermedad: fiebre dengue hemorrágico y síndrome de shock dengue, con una mortalidad entre el 1 y el 4.5%. En Colombia, el Huila es una región de gran endemidad para FD y FDH. En el año de 1997 hubo una gran epidemia y en el año 2004 se alcanzó una tasa de 60 por 100 000 habitantes, mientras el promedio nacional fue de 12 por 100 000 habitantes⁹

Neiva posee una alta prevalencia de la enfermedad causada por el virus dengue, y gran parte de la población afectada es la pediátrica. En este grupo poblacional se presentan complicaciones de forma frecuente, entre ellas, las hemorragias especialmente gastrointestinal o del sistema nervioso central, la encefalitis, la hepatitis y la miocarditis, estas tres últimas llamadas “manifestaciones clínicas atípicas”. Estas últimas fueron la principal causa de muerte en una serie de casos reportados en un estudio realizado en el Hospital Universitario de Neiva. La miocarditis fue entre este grupo la principal causa de muerte

2.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la relación entre los niveles séricos de ST2s y la IL-33 y la miocarditis en pacientes con infección por virus dengue, así como en la severidad clínica y para clínica de dicha complicación?

⁹SALGADO, D, *et al.* Clinical and epidemiological characterisation of dengue haemorrhagic fever in Neiva, Colombia, 2004. En: Revista de Salud Pública. 2007. vol. p. 53-63.

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la miocarditis ha permitido dilucidar el rol de ciertas moléculas en la fisiopatología de las miocarditis virales. El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) se ha reconocido como una citoquina proinflamatoria importante en el inicio y continuación del proceso inflamatorio de los cardiomiocitos, relacionando sus altos niveles con mayor depresión de la función miocárdica¹⁰. El TNF- α se expresa marcadamente en la FDH y es un importante inductor de la expresión de St2 en ensayos de células tratadas con sueros de pacientes con FDH (Houghton et al, 2008). El St2s actúa como antagonista de la IL-33 sobre el st2L que se encuentra en la membrana de las células. Se sabe que esta IL-33 actúa como una citoquina cardioprotectora en los modelos de compromiso miocárdico biomecánico en ratas¹¹.

Conocer el comportamiento de la IL-33 y ST2s en miocarditis por virus dengue permitiría ampliar el conocimiento de la fisiopatología de esta manifestación clínica atípica de la enfermedad causada por virus dengue, siendo esto un paso inicial en la posible utilización de estas como marcadores que permitan prever el desarrollo de esta complicación en los pacientes con FDH, llevando así a una intervención temprana y adecuada. Un conocimiento mayor, podría permitir largo plazo que estas se puedan utilizar como terapia farmacológica.

¹⁰CALABRESE, F, *et al.* Overexpression of tumor necrosis factor (TNF) α and TNF α receptor I in human viral myocarditis: clinicopathologic correlations. En: Modern Pathology. 2004. vol 17, p. 1108-1118.

¹¹SANADA, S, *et al.* IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. En: The Journal of Clinical Investigation. 2007. vol. 6; p. 117.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación existente entre los niveles de ST2s e IL-33 en sueros de pacientes con infección por virus dengue y el desarrollo de miocarditis, así como la correspondencia entre dichos niveles de interleuquinas y la severidad del compromiso miocárdico evaluado clínica y paraclínicamente

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cuantificar la concentración de la molécula ST2s en suero de los pacientes incluidos en el estudio.

- Cuantificar la concentración de la molécula IL-33 en suero de los pacientes incluidos en el estudio.
- Relacionar los niveles de ST2s e IL-33 con la presencia de miocarditis en la infección por DENV.
- Relacionar los niveles de ST2s e IL-33 con el grado de severidad de la miocarditis, en los pacientes con ese diagnóstico.

5. MARCO TEÓRICO

Múltiples son las teorías acerca de la patogénesis del Dengue, pero la más aceptada indica que la enfermedad es producto de la respuesta inmune del huésped. Existe bastante información sobre el papel que desempeñan los anticuerpos de baja afinidad durante las reinfecciones y se propone que las células infectadas, producen una gran explosión de mediadores inflamatorios, como IFN- γ , IL-2 y TNF- α que dan como resultado una amplia cadena de eventos que induce la disfunción celular produciendo fuga plasmática, hemorragia y choque; caracterizando el cuadro clínico y la fisiopatología de la Infección por Dengue¹²¹³.

Sin embargo aun no es claro, como esta gran estimulación inflamatoria con la producción de los mediadores interactúa de manera plena para hacer evidente el espectro clínico de la enfermedad donde solamente 2.5% de los pacientes que desarrollan FHD/SCD las formas más graves, fallecen. Adicionalmente en la actualidad la severidad alcanzada por dicho cuadro viral incluye formas atípicas potencialmente letales para el ser humano como la encefalopatía y la Miocarditis. Teniendo en cuenta la importancia de Miocarditis por Dengue en nuestro medio por su representatividad, se hace evidente de conocer la fisiopatología global vinculando la dinámica a nivel de este órgano blanco. Algunos estudios han detectado mediadores con funciones de inmunoregulación e inmunosupresoras, como IL-10 e IL4; que eventualmente podrían regular la respuesta inmune de los pacientes, aunque los mecanismos sigan siendo desconocidos.

De otro lado, trabajos recientes han demostrado la sobre-regulación de la molécula ST2 y la regulación a la baja de la IL-33 en sueros de pacientes con Fiebre por Dengue¹⁴, molécula que ha sido señalada como un importante regulador negativo de la respuesta inflamatoria, así como mediador y regulador importante de la función efectora de la IL-33.

Basados en este conocimiento, es válido estudiar la dinámica de expresión de ST2 durante la infección natural por virus dengue así como de IL-33 y su regulación en pacientes y/o sueros de pacientes en los cuales se documentó la infección por el virus, sumado a los pocos estudios de la dinámica del ST2 en el Dengue y aun mas en la Miocarditis por Dengue; de esta manera se

¹²GREEN, Op.cit., p.13

¹³KURANE, Op.cit., p. 13

¹⁴ BECERRA, A, *et al.* Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients. *En: Cytokine*. 2008. vol. 41, p. 114-120.

hace valido ahondar en su papel durante la enfermedad y específicamente en la Miocarditis como morbilidad asociada a la enfermedad, con la idea que esta información permita ofrecer una nueva interpretación de la patogenia y sea de utilidad para adoptar nuevas conductas en el manejo de la infección y de la complicación a nivel cardiaco.

5.1 GENERALIDADES SOBRE DENGUE

El dengue es una importante enfermedad viral transmitida por vector a los seres humanos con una presentación clínica variada, abarcando desde casos asintomáticos hasta aquellos que conllevan a la muerte.

Se estima que ocurren entre 50 y 100 millones de casos de Fiebre dengue anualmente en todo el mundo, de los cuales aproximadamente 500.000 son formas agresivas de la enfermedad: fiebre dengue hemorrágico y síndrome de shock dengue, con una mortalidad entre el 1 y el 4.5%. En Colombia, el Huila es una región de gran endemicidad para FD y FDH. En el año de 1997 hubo una gran epidemia y en el año 2004 se alcanzó una tasa de 60 por 100 000 habitantes, mientras el promedio nacional fue de 12 por 100 000 habitantes¹⁵.

Esta patología infecciosa es causada por el virus dengue (DVEN), transmitido por el mosquito *Aedes aegypti*. El virus dengue hace parte de la familia *flaviviridae*, que se caracteriza por tener su información genética en una cadena sencilla de RNA que se transcribe con polaridad positiva. Se conocen cuatro serotipos, de los cuales el serotipo 2 está asociado más frecuentemente con las formas severas de la enfermedad¹⁶.

Clínicamente se caracteriza por ser de curso febril y producir compromiso del estado general, cefalea, dolor retro-ocular, osteomuscular, abdominal y otros. En las formas complicadas se presenta diátesis hemorrágica, fuga plasmática y “atípicamente” manifestaciones como hepatitis, miocarditis y encefalitis¹⁷ (Salgado Doris 2008). La OMS (WHO, 2001) ha establecido criterios para clasificar las formas severas del Dengue en cuatro grados:

Grado I: Fiebre con síntomas inespecíficos, con prueba de torniquete positiva

Grado II: Las manifestaciones anteriores, mas hemorragias espontáneas.

Grado III: Lo anterior más signos de falla circulatoria.

Grado IV: Choque profundo.

¹⁵SALGADO, Op.cit., p. 17

¹⁶HOUGHTON, Op.cit., p. 16

¹⁷SALGADO, Op.cit., p. 13

Esta clasificación no reconoce otros componentes que demarcan severidad en la enfermedad e incluso el orden en severidad no siempre sigue la secuencia planteada por esta graduación.

5.2 MARCADORES DE SEVERIDAD EN DENGUE

Como ya es conocido, la severidad de la enfermedad por virus dengue está directamente relacionada con la respuesta inmune del hospedero. Por lo tanto se han realizado diferentes investigaciones que permitan conocer cómo actúan los mediadores inmunológicos y su papel en la respuesta a la infección por DENV; buscando poder determinar cuál de estos mediadores se puede utilizar como marcador de severidad en la infección por DENV y permita una intervención más temprana en la enfermedad y disminuir de esta forma la mortalidad.

Diferentes investigaciones han demostrado el aumento de varias citoquinas en la infección por DENV. Dentro de estos se ha encontrado que niveles séricos elevados de marcadores de activación de LT como el receptor soluble de TNF- α , IL-2, CD8 soluble e IFN- γ y han encontrado correlación con la severidad de la enfermedad en pacientes con FDH¹⁸. Además, niveles aumentados de citoquinas vasoactivas como TNF- α , IL-6, IL-8 y Molécula de Adhesión Vascular Soluble 1 (sVCAM-1) han sido reportados en pacientes infectados con DENV¹⁹²⁰.

De esta forma se plantea que las citoquinas tienen un papel fundamental en el desarrollo de las diferentes presentaciones clínicas de la infección por DENV; y que la severidad de estas presentaciones clínicas está directamente relacionada con el aumento en el nivel de algunas citoquinas. Las principales citoquinas encontradas en pacientes con FDH son TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IFN- γ ²¹²². Estas citoquinas parecen ser producidas tanto por Macrófagos como por células endoteliales²³.

¹⁸KURANE, I, *et al.* Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *En: J Clin Invest.* 1991. vol. 88, p. 1473-1480

¹⁹HOBER, D, *et al.* Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *En: Am J Trop Med Hyg.* 1993. vol. 48, p. 324-331.

²⁰MURGUE, B, CASSAR, O y DEPARIS, X. Plasma concentrations of sVCAM-1 and severity of dengue infections. *En: J Med Virol.* 2001. vol. 65, p. 97-104

²¹KURANE, O.p.cit., p. 22

²²HOBER, O.cit., p. 22

²³AVIRUTNAN, P, *et al.* Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *En: J Immunol.* 1998. vol. 161, p. 6338-6346

De todas las citoquinas que se han estudiado, se ha propuesto que el papel fundamental lo desempeña el TNF- α , ya que participa en los mecanismos de fuga vascular y daño celular. Recientemente se han descrito nuevas moléculas que pueden desempeñar un papel fundamental en diferentes enfermedades, como en el dengue, dentro las que se encuentran ST2 y IL-33.

5.3 IL-33

La IL-33 fue descrita en 2005 como miembro de la familia de IL-1. Es una proteína de 18kDa en su forma madura y su gen se encuentra localizado en el cromosoma 9q 24.1. La IL-33 es expresada en muchos tejidos, pero su expresión es más restringida al tipo celular, encontrándose una expresión constitutiva en células del músculo liso humano entre otras células.

Se han descrito varias funciones de la IL-33 dentro del sistema inmune relacionadas principalmente a su unión con la molécula ST2 en sus diferentes isoformas (ST2L/ST2s). La IL-33 tiene la capacidad por la vía de ST2L de activar la cascada de las MAP quinasas y finalmente activar el factor nuclear κ B (NF- κ B); siendo este el principal mecanismo relacionado con la función inmunomoduladora que se le otorga a la IL-33²⁴.

Otros estudios han reportado un importante rol de la IL-33 como cardioprotector ya que disminuye la respuesta hipertrófica y de fibrosis del músculo cardíaco a estímulos como la sobrecarga de presión²⁵.

Aunque la IL-33 es una molécula relativamente joven ha demostrado tener un importante papel en reacciones inmunológicas en diferentes modelos experimentales por lo cual es importante estudiar el papel que juega en la inmunopatogénesis de la infección por DENV y de la miocarditis dengue como comorbilidad asociada más severa a dicha infección.

5.4 ST2

ST2 es una proteína miembro de la familia de citoquinas IL-1. Esta proteína con múltiples asociaciones a la fisiología de diferentes procesos patológicos y no patológicos que tienen lugar en modelos humanos, como en modelos animales experimentales, conduce a que esta proteína sea descrita como un biomarcador en diferentes enfermedades.

²⁴Schmitz, Op.cit., p. 16

²⁵SANADA, Op.cit., p. 18

Inicialmente descrita como un gen de respuesta primaria en fibroblastos de modelos murinos, y como un gen de respuesta a oncogenes; la proteína ST2 es producto del empalme alternativo de diferentes genes implicados en su transcripción, generando de tal manera tres moléculas de RNAm las cuales codifican para tres formas del ST2. La primera es el ST2L, una forma de mayor tamaño anclada a la membrana celular; la segunda es ST2s, una forma más corta, soluble, liberada por las células en las cuales se ha detectado dicha molécula; la tercera es ST2v, una variante anclada a la membrana. En la actualidad no se conocen los mecanismos que estimulan o inhiben la replicación y posterior expresión de esta proteína.

La expresión de estas tres formas se ha detectado en múltiples tejidos y tipos celulares humanas, incluyendo las células hematopoyéticas y células endoteliales, como respuesta a múltiples estímulos inflamatorios como el lipopolisacárido, IL-1 β , TNF α y la IL-6. En la actualidad es poco el conocimiento acerca del papel de las diferentes formas de ST2 en los procesos tanto fisiológicos como patológicos, de tal manera que en los resultados de algunos modelos de investigación se vincule ST2 como molécula protectora o reguladora de la respuesta inmune²⁶²⁷²⁸, y por el contrario otras investigaciones lo proponen como molécula que juega un papel importante en los mecanismos inmunopatológicos y que se relaciona directamente con la severidad de diferentes enfermedades²⁹³⁰.

5.5 MIOCARDITIS EN DENGUE

La miocarditis se define como la inflamación del músculo miocardio. Tiene una amplia gama de etiologías, desde infecciosas (el virus dengue un representante de esto), tóxicas y mediadas por el sistema inmune. La Miocarditis hace parte de las llamadas manifestaciones atípicas de la enfermedad causada por dengue³¹, pero no por esto deja de tener un importante impacto en la población afectada, principalmente la pediátrica.

Aunque no se conoce con certeza como el virus dengue afecta el miocardio, se han diseñado modelos experimentales para miocarditis viral, principalmente con virus coxsackie y es a partir de estos modelos de donde se ha obtenido la mayor parte del conocimiento sobre fisiopatología en esta

²⁶WALZL, G, *et al.* Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)-but not Th1-driven immunopathology. *En: J Exp Med.* 2001. vol. 193, p. 785-792

²⁷OSHIKAWA, K, *et al.* ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. *En: Biochem Biophys Res Commun.* 2002. vol. 299, p. 18-24

²⁸BRINT, E.K, *et al.* ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *En: Nat Immunol.* 2004. vol. 5, p. 373-379

²⁹HOUGHTON, Op.cit., p. 16

³⁰SANADA, Op.cit., p. 18

³¹SALGADO, Op.cit., p. 13

enfermedad³². La fase inicial, MIOCARDITIS AGUDA, es paralela a la viremia y se caracteriza por invasión y muerte de la célula miocárdica, activación de los macrófagos que liberan citoquinas como Interleukina-1, Interleukina-2, factor de necrosis tumoral alfa e interferón gamma. Después de cuatro días inicia el aclaramiento viral e infiltración del miocardio por parte de mononucleares como Linfocitos T citotóxicos, Linfocitos B activados y Natural Killer que aumentan la muerte de los miocardiocitos. Después de los 14 días hay ausencia de virus en la sangre y es en esta tercera etapa, MIOCARDITIS CRONICA, que se hacen notables consecuencias como falla cardíaca, cardiomiopatía dilatada y fibrosis³³.

Las manifestaciones clínicas de las miocarditis virales en general son muy variadas y pueden ir desde aquellas asintomáticas hasta la muerte. Estas se han clasificado en las formas *fulminante*, que es precedida de pródromos, hay falla cardíaca y termina en muerte o supervivencia con función miocárdica normal. La forma *subaguda o crónica* presenta pródromos, disfunción ventricular, aumento del índice cardiorácico, además puede progresar a cardiomiopatía dilatada y la forma de *cardiomiopatía dilatada* que se caracteriza por presentar falla cardíaca, con una supervivencia del 60% a los 5 años.^{34 35}. Vale la pena resaltar que las nuevas técnicas de biología molecular han permitido encontrar una correlación importante entre ciertas moléculas como el Factor de Necrosis tumoral Alfa y la evolución clínica, de manera que a mayor expresión de este, hay mayor depresión de la función miocárdica, además es más expresado en aquellas miocarditis que son de etiología viral en comparación de aquellas por etiología diferente³⁶.

En el diagnóstico de esta enfermedad no existe un método ideal, siendo esta situación reconocida aun en importantes artículos de revisión³⁷. La mejor forma de llegar al diagnóstico es a través de una valoración integral que incluya una adecuada historia clínica, un buen examen físico y un amplio arsenal de paraclínicos según la disposición con que se cuente. Es necesario excluir primero otras condiciones patológicas como alteraciones cardíacas estructurales, arritmias cardíacas, enfermedades sistémicas, etc.

La biopsia endomiocárdica ha sido considerada como el mejor parámetro para el diagnóstico de miocarditis. Para su interpretación se tienen en cuenta los Criterios de Dallas de 1986. Schmaltz et al, encontró que la biopsia era

³²LOPEZ, I y HERRERA, H. Miocarditis viral. En: Medigraphic Arterisa. 2006. vol. 13, No 3, p. 122-128.

³³FELDMAN, A y McNAMARA, D. Myocarditis. En: New England Journal of Medicine. 2000. vol 343, N° 19; p. 1388-1398.

³⁴³⁴LOPEZ, Op.cit., p. 24

³⁵SHEKERDEMIAN, L y BOHN D. Acute viral myocarditis: Epidemiology and pathophysiology. En: Pediatric Critical Care Medicine. 2006. vol. 7, No. 6, p. S2-S7.

³⁶CALABRESE, Op.cit., p. 18

³⁷CHECCHIA, P y KULIK, T. Acute viral myocarditis: Diagnosis. En: Pediatric Critical Care Medicine. 2006. vol 7, N° 6, p. S8-S11.

diagnóstica en el 11% de los casos, útil en el 71% y no útil en el 16%³⁸. Los métodos de biología molecular adicionales como PCR, hibridización de ácido ribonucleico, aumentan la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico. Martin et al usando PCR en 38 muestras de miocardio en sospecha de miocarditis, tomó 17 controles y detectó genoma viral en 68% de las muestras para miocarditis mas no en los controles. Calabrese et al encontraron que a pesar de esto no es el método perfecto por cuanto es un procedimiento invasivo expuesto a complicaciones, es dependiente del evaluador, el resultado puede variar de acuerdo al sitio del que se tome la muestra del miocardio.

La electrocardiografía es una herramienta fácilmente disponible, económica, no invasiva y de alta utilidad para la evaluación de un caso en el cual se sospeche miocarditis. Aunque los ritmos son variables, los más comunes son la taquicardia sinusal, complejos QRS de bajo voltaje, inversión o aplanamiento de la onda T (Keith et al: 31 de 45 casos con aplanamiento o inversión de T)³⁹. Puede haber elevación marcada del segmento ST, arritmias como Taquicardia Supraventricular, Taquicardia ectópica atrial, extrasístole ventricular, Fibrilación Ventricular, etc⁴⁰.

La radiografía de tórax en realidad es de poca utilidad en el diagnóstico de miocarditis viral, se limita a mostrar los signos de falla cardíaca⁴¹.

La ecocardiografía es una herramienta de extremo valor en el estudio de esta enfermedad. Muestra ventrículos aumentados de tamaño, en diástole y fin de sístole, fracción de eyección y de acortamiento disminuidas, regurgitación atrio ventricular. Otros hallazgos son anomalías regionales en movimientos de pared, sin disfunción global o dilatación ventricular e hipertensión pulmonar (por aumento de presión en aurícula izquierda).

Las enzimas cardíacas han sido evaluadas y se ha encontrado una mejor sensibilidad y especificidad de las troponinas con respecto a la CPK-MB. Soongswang et al evaluó la troponina T como marcador no invasivo de miocarditis en una población pediátrica, tomando un grupo control y utilizando los criterios de Dallas como Gold Standard, encontró que un nivel de 0.052ng/ml es un buen punto de corte para hacer el diagnóstico de miocarditis viral.

Entre los inconvenientes que se han encontrado está la falta de una adecuada correlación entre los niveles de las troponinas y los hallazgos en la biopsia endomiocárdica.

³⁸ Ibid., p. 25

³⁹ KEITH, J, ROWE R, VLAD P. Heart Disease in Infancy and Childhood. 1978. p. 928–931

⁴⁰ CHECCHIA, Op.cit., p. 25

⁴¹ LOPEZ, Op.cit., p. 24

Actualmente se evalúan la utilidad de nuevas ayudas diagnósticas como lo son la Resonancia Magnética Nuclear Cardiovascular y la Gammagrafía antimiosina, las cuales son útiles para evaluar la extensión de la inflamación en el miocardio. El uso de la Resonancia ayuda a direccionar la interpretación de la biopsia. Sin embargo aun no se sabe cuál es la mejor variable en estos estudios para la evaluación de la miocarditis⁴².

5.6 ST2 EN DENGUE

La infección por virus Dengue es un proceso infeccioso agudo que envuelve la sobre producción de moléculas proinflamatorias acorde a esto se han encontrado niveles elevados de ST2 en pacientes con fiebre dengue en los días febriles tardíos de la enfermedad, así como también se ha observado que los niveles de ST2 hallados en pacientes con infecciones secundarias por virus dengue son mucho más elevados que en aquellos con una infección primaria, relacionando la severidad de la enfermedad y los niveles de ST2, pudiendo llegar a ser un marcador diferencial para prever los diferentes estadios de la enfermedad y el probable curso clínico de la misma⁴³.

Basados en los resultados de los estudios citados nos proponemos estudiar los niveles de algunas citoquinas en suero humano como lo son la IL-33 y ST2s en infección por DENV y su correlación con el desarrollo de miocarditis dengue como complicación más severa de dicho cuadro infeccioso, llegando a usarlos como biomarcador de severidad en la enfermedad por DENV.

⁴²CHECCHIA, Op.cit., p. 25

⁴³BECERRA, Op.cit., p. 20

6. METODOLOGÍA

6.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Se realizó un estudio observacional y descriptivo en el cual se llevó a cabo la recolección de la información de forma retrospectiva. Para tal efecto se utilizó la información clínica correspondiente a los pacientes a los cuales pertenecían las muestras de suero de los menores de 13 años atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano de Neiva con diagnóstico de miocarditis de Enero de 2005 a Diciembre de 2006, existentes en la seroteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Surcolombiana. A partir de dichas muestras se realizó la cuantificación de las citoquinas en estudio, ST2s e IL-33 para obtener la información propuesta.

De igual manera se utilizó la información clínica y las muestras almacenadas correspondientes al periodo comprendido entre Octubre de 2008 hasta Septiembre de 2009, en el cual se incluyeron los pacientes menores de 13 años atendidos en el servicio de Pediatría del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva con diagnóstico de miocarditis por dengue, asignando los controles respectivos con pacientes quienes tuvieran el diagnóstico de FDH, así por cada caso de miocarditis se asignó un caso de FDH. Finalmente se contó con la participación de 3 voluntarios sanos como punto de referencia.

6.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

La población a estudio fueron los pacientes menores de 13 años admitidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la Ciudad de Neiva para los periodos mencionados. Del total de pacientes atendidos se seleccionó para participar en el estudio los pacientes que cumplieran los criterios de inclusión para el grupo A (abajo explicado) dentro del periodo de tiempo establecido. Se conformó un segundo grupo (grupo B) cuyo número de participantes fue asignado en una proporción 1:1 respecto al grupo A según los criterios mencionados abajo. Las características de los grupos son:

- Grupo A: Pacientes con Miocarditis. Se incluyeron los pacientes que cumplieran con los criterios para miocarditis Dengue según el protocolo

vigente en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la Ciudad de Neiva.

- Grupo B o Grupo Control: Pacientes con FDH. Se incluyeron los pacientes que cumplían los criterios de la OMS para FDH.

La selección de la muestra (n) se llevo a cabo de manera no aleatoria, incluyendo pacientes que cumplan con los parámetros establecidos en el estudio. Este método es conocido como muestreo por conveniencia.

6.3 CRITERIOS DE INCLUSION

Los criterios de inclusión, para los dos grupos de pacientes (Fiebre Hemorrágica por Dengue y Miocarditis Dengue) fueron los siguientes:

Tabla 1 Criterios de inclusión

Fiebre dengue hemorrágico	Miocarditis
Fiebre de 3 a 7 días	Sospecha clínica
Evidencia de sangrados	Evidencia de alteraciones cardiacas en rayos x de tórax ,electro o ecocardiograma, gammagrafía cardiaca (cuando sea posible)
Evidencia de fuga vascular (derrames serosos y/o aumento del hematocrito).	Alteraciones bioquímicas
Trombocitopenia menor a 100.000/ ml	Demostración de enfermedad viral.
IgM positiva para virus dengue	Biopsia endomiocárdica (si es posible su realización)

Fuente: Pediatr Crit Care Med 2006 Vol. 7, Nº 6 (Suppl.)

A su vez la miocarditis se clasifico clínicamente en:

Tabla 2 Clasificación clínica de miocarditis

Miocarditis fulminante	Miocarditis subaguda o crónica :	Miocardiopatía dilatada
Curso viral corto	Pródromo viral	Falla cardiaca congestiva
Choque cardiogénico	Falla cardiaca	Cardiomegalia en los rayos x de tórax
Arritmia ventricular	Cardiomegalia en rayos x	Disfunción ventrículo izquierdo
Muerte súbita	Disfunción ventricular izquierda	Historia familiar
Tamaño cardiaco normal		
Disfunción ventricular izquierda		

Fuente: Pediatr Crit Care Med 2006 Vol. 7, Nº 6 (Suppl.)

6.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 3 Operacionalización de las variables

Variable	Definición	Subvariables	Categorías	Nivel de medición	Índice
Sociodemográfica	Son características generales de los participantes que de alguna u otra forma pueden tener una implicación en las condiciones clínicas.	Edad	Meses	Razón	Promedio o mediana
		Sexo	Masculino o femenino	Nominal	Porcentaje
Clínica	Son aquellas que se determinan por medio de una evaluación médica integral y que pueden ser cuantificadas o caracterizadas por medio de paraclínicos.	Hipotensión arterial	Mediana	Nominal	Porcentaje
		Frecuencia cardíaca	Mediana	Ordinal	Porcentaje
		CPK-MB	Mediana	Nominal	Porcentaje
		Troponina I	Mediana	Nominal	Porcentaje
Inmunológica	Hace referencia al comportamiento de la respuesta del sistema inmunológico a un agente extraño	ST2s	Niveles séricos	Razón	Promedio o mediana
		IL33	Niveles séricos	Razón	Promedio o mediana

6.5 TÉCNICAS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS Y TRABAJO DE LABORATORIO

Para la recolección de datos se realizó una revisión documental que incluyó:

- Revisión de la base de datos correspondiente a las muestras de pacientes con miocarditis almacenadas en la seroteca de la facultad de salud de la universidad Surcolombiana.
- La selección de los pacientes pertenecientes a los Grupos de la muestra se realizara acorde al cumplimiento de los criterios ya mencionados para cada grupo.
- Se llevo a cabo la revisión de los datos obtenidos a partir de la aplicación del instrumento a los pacientes seleccionados para el estudio acorde a la selección de la muestra planteada con anterioridad.

Para la determinación de la concentración de las moléculas ST2s e IL-33 se utilizaron kits comerciales de ELISA ⁴⁴⁴⁵, que ya había sido usado por otros autores⁴⁶. Se siguieron las recomendaciones del fabricante.

Los autores recibieron capacitación teórica acerca de los fundamentos de la técnica de ELISA, y posteriormente un periodo de entrenamiento de un mes en el laboratorio. Durante este tiempo, se realizaron 4 ensayos de ELISA para detectar IgG humana total en muestras de voluntarios sanos.

En la realización de los ensayos de ST2 e IL-33 se estableció un control negativo con el fin de aumentar la confiabilidad de los resultados obtenidos, que contenía todos los reactivos necesarios para el desarrollo de la prueba, excepto la muestra (suero de paciente o estándar). El valor de la absorbancia obtenida en este se multiplicó por dos, y este resultado se tomó como límite inferior de detección. Los valores por debajo de este límite se consideraron como no detectables y se les asignó un valor arbitrario correspondiente a la mitad del último valor de la curva estándar para cada molécula (ST2= 15,6 pg/mL; IL-33=11,7 pg/mL)

Con el fin de disminuir la posibilidad de sesgos en la realización de los experimentos, los mismos fueron hechos en ciego, mediante la asignación de un código a cada muestra que no fue conocido por las personas encargadas de realizar el trabajo de laboratorio. Luego de culminar todos los experimentos se rompió el ciego.

⁴⁴Biotinylated Anti-human IL-33 Antibody. [Sitio en internet] R&D Systems. Disponible en <http://www.rndsystems.com/pdf/BAF3625>. Acceso el 10 de septiembre 2008.

⁴⁵Human IL-1 R4/ST2. [Sitio en internet] R&D Systems. Disponible en <http://www.rndsystems.com/pdf/dy523>. Acceso el 10 de septiembre 2008.

⁴⁶HOUGHTON, Op.cit., p. 16

6.6 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN Y PLAN DE ANÁLISIS

Para el análisis de los resultados, los datos fueron divididos según la condición clínica del paciente del cual procedían, de esta forma se clasificaron en tres grupos: Voluntarios Sanos con una $n=3$, Fiebre Dengue Hemorrágico con una $n=13$ y Miocarditis dengue con una $n=13$, para el análisis estadístico estos datos fueron presentados utilizando la mediana como medida de tendencia central. Posterior a esto, los datos referentes a las concentraciones de las moléculas objeto de estudio, obtenidos a través de la realización de los ELISA tipo sándwich se analizaron por medio del programa GraphPad Prism 5. Para tal efecto se usaron pruebas no paramétricas y para la comparación de muestras independientes la prueba de Mann-Whitney. Las correlaciones se analizaron por el test de Spearman y se aceptó como estadísticamente significativo un valor de $p<0,05$.

6.7 ASPECTOS ÉTICOS

La presente investigación ha sido ideada y diseñada atendiendo a lo estipulado por la LEY 23 DE 1981 y por la RESOLUCIÓN No. 8430 de 1993, por la cual se establecen las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, atendiendo a lo planteado en el TITULO II relacionado con LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS, en su CAPITULO I, sobre LOS ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS:

La metodología de este trabajo se desarrolla bajo las disposiciones legales vigentes en el país (Art. 54 Ley 23/81); con las condiciones y requerimientos necesarios para conservar la dignidad, la protección de los derechos y el bienestar de los participantes (Art. 5 Res. 8430/93). Conforme a esta investigación, el dengue es una enfermedad con una alta prevalencia a nivel mundial, así como en nuestro país y en la región surcolombiana, a la cual pertenecemos. Es una enfermedad con un amplio espectro de presentación, dentro de las cuales, las formas severas pueden llegar a ser mortales, con cifras reportadas para nuestra región entre el 1 y el 4.5% por la doctora Doris Salgado et al; siendo la presentación más severa y frecuente la miocarditis por dengue.

En los últimos años se han dado grandes avances en el conocimiento de la fisiopatología de esta enfermedad, que permiten comprender mejor su relación con el huésped y de esta forma buscar diferentes alternativas para su manejo. La IL-33 y el ST2 surgen como potenciales mediadores en el

desarrollo de esta enfermedad, y pueden tener una implicación especial en la miocarditis por dengue como complicación.

Con el fin de conocer mejor la relación de estas dos moléculas en dicha patología, se plantea su medición en suero de pacientes con este diagnóstico.

Por ser desarrollada en seres humanos, esta investigación cumple con los requisitos expuestos en el artículo 6° de la Resolución 8430/93 en cuanto:

- Se justifica en principios científicos y éticos.
- Prevalece la seguridad de los participantes.
- Cuenta con la autorización por escrito para la utilización de las muestras obtenidas por el grupo de investigación.
- Será realizado bajo la supervisión estricta de profesionales de la salud con conocimiento y experiencia tanto en áreas clínicas, como en el área investigativa; vinculados como docentes a la facultad de salud de la Universidad Surcolombiana, y como personal asistencial al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo.
- La seguridad que no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad.

En cuanto al riesgo de los participantes en este estudio, según lo planteado en el artículo 11 de la Resolución 8430/93, este estudio puede clasificarse en sin riesgo porque la metodología es retrospectiva, ya que se utilizarán técnicas y procedimientos a muestras que ya han sido recogidas por el grupo de investigación de PARASITOLOGÍA Y MEDICINA TROPICAL de la facultad de salud, del cual forma parte el semillero SINEDIR, al cual se encuentra vinculado este proyecto; y una revisión documental retrospectiva. Por lo tanto no existe ninguna intervención directa sobre los participantes, o que impliquen algún riesgo.

Es importante aclarar que en el momento de la toma de la muestra, los tutores de los pacientes firmaron una autorización para el uso de la muestra en estudios posteriores (Anexo A).

7. RESULTADOS

Tras el proceso de captación, registro y seguimiento de los pacientes, se incluyeron 45 pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidado Intensivo del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, luego de aplicar los criterios de inclusión mencionados en la tabla 2, la muestra se redujo a 13 pacientes con miocarditis. Para cada caso positivo de miocarditis se asignó el control respectivo, para la asignación de cada control se tomaron como criterios la edad y el género de los pacientes con miocarditis, posteriormente se captaron 3 voluntarios sanos que se tomaron como control negativo. Para analizar la comparatividad de los grupos de pacientes se utilizaron medidas de tendencia central aplicadas a la información sociodemográfica, clínica y paraclínica de los pacientes con miocarditis y sus controles, para el periodo mencionado.

Así, la información fue organizada en la tabla 4 donde se aprecia de manera clara la comparatividad sociodemográfica de los dos grupos de pacientes (FDH y MD) al analizar las variables en cuestión y su medida de tendencia central.

Tabla 4 Variables sociodemográficas y variables clínicas

		FDH (n = 13)		MD (n = 13)	
		%/Mediana (Rango)	(n)	%/Mediana (Rango)	(n)
Variables sociodemográficas					
Edad (meses)		72 (7 - 144)	13,0	72 (7 - 144)	13,0
Genero	Masculino	46,2%	6,0	46,2%	6,0
	Femenino	53,8%	7,0	53,8%	7,0
Peso (kg)		20 (7,5 - 39)	13,0	22,5 (7,5 - 40,5)	13,0
Prueba confirmatoria					
Serología positiva		92,3	12,0	92,3	12,0
Variables clínicas					
Días de fiebre		5 (1 - 5)	13,0	4 (3 - 8)	13,0
Estado de conciencia	Normal	84,6%	11	92,3%	12
	Alterado	15,4%	2	7,7%	1
Temperatura (°C)		36,5 (35,5 - 37,6)	13	36,8 (36 - 39)	13
Tensión arterial sistólica (mmHg)		95 (79 - 118)	13	100 (76 - 118)	13
Tensión arterial diastólica (mmHg)		62 (49 - 82)	13	63 (45 - 83)	13
Tensión arterial media (mmHg)		73 (59 - 92)	13	74 (55 - 85)	13

Frecuencia cardiaca (Lpm)		118 (70 - 179)	13	102 (56 - 190)	13
Frecuencia respiratoria (Respm)		26 (28 - 48)	13	22 (16 - 70)	13
Hemoglobina (mg/dL)		13 (7,3 - 22,7)	13	11,8 (9 - 15)	13
Hematocrito (%)		37,6 (20,3 - 45,61)	13	33,7 (4,7 - 44,7)	13
Plaquetas (*10 ³ /mm ³)		62 (20 - 99)	13	64 (11 - 151)	13
CPK (UI/L)		203 (36 - 726)	9	86,5 (45 - 2528)	6
CPK-MB (UI/L)		16 (9 - 42)	8	28 (4 - 685)	8
Troponina (ng/ml)		0,0055 (0,001 - 0,01)	2	0,02 (0,001 - 0,21)	7
Electrocardiograma	Normal	50,0%	2	12,5%	1
	Alterado	50,0%	2	87,5%	7
Ecocardiograma	Normal	100,0%	1	66,7%	6
	Alterado	0,0%	0	33,3%	3
Índice de efusión pleural (%)		13 (0 - 40)	8	20 (0 - 40)	10
Uso de dobutamina	Si	15,4%	2	38,5%	5
	No	84,6%	11	61,5%	8
Uso de dopamina	Si	23,1%	3	46,2%	6
	No	76,9%	10	53,8%	7
Uso de noradrenalina	Si	7,7%	1	23,1%	3
	No	92,3%	12	76,9%	10
Uso de milrinone	Si	15,4%	2	30,8%	4
	No	84,6%	11	69,2%	9

De los 13 pacientes incluidos en cada grupo todos tenían prueba confirmatoria para DEN y cumplían criterios clínicos para ser clasificados en uno u otro grupo.

Se aprecia una homogeneidad en los dos grupos en cuanto a la edad con una medida de tendencia central de 72 meses, y para el género, donde el porcentaje de distribución fue de 46,2% para hombres y 53,8% para mujeres, lo anterior fue el resultado de la aplicación de los criterios de asignación de controles orientado a minimizar variaciones o la intervención de variables confundentes que pudieran alterar la diferencia real en la cuantificación de las moléculas en cuestión para cada grupo. Así mismo el no existían mucha variación en la medida de tendencia central del peso para cada grupo siendo respectivamente de 20 Kg para el grupo FDH y 22,5 Kg para el grupo de MD.

Al analizar la variables clínicas se aprecia como los pacientes con FDH al momento de consultar al servicio de urgencias llevan una mayor numero de días de fiebre (5 días) en comparación con el grupo de MD los cuales presentan un menor numero de días de fiebre, esto podría ser el significado de la mayor urgencia o gravedad del cuadro clínico de los pacientes con MD (4 días) que los obliga a consultar en los servicios de urgencia mas tempranamente. Curiosamente cuando se analiza la variable referente a el estado de conciencia al momento del ingreso se aprecia que una alteración de esta se presenta mayoritariamente en el grupo FDH (15,4%) comparado

con el grupo de MD (7,7%), lo cual podría ser indicativos que los cuadros de FDH, son cuadros que por su naturaleza llevan al paciente a consultar de manera tardía y así alcanzar cuadros con un compromiso clínico avanzado que se reflejan en la alteración del estado de conciencia de los pacientes, por el contrario para los pacientes con MD quienes debido a la severidad del cuadro clínico se ven obligados a consultar tempranamente en el servicio de urgencias, el hallazgo de un estado de conciencia alterado es menos frecuente.

Exceptuando la frecuencia cardíaca (FDH=118 lpm (70-179), MD=102 lpm (56-90)), la frecuencia respiratoria (FDH=26 respm (28-48), MD=22 respm (16-70)), la hemoglobina (FDH=13 mg/dL (7,3-22,7), MD=11,8 mg/dL (9-15)) y el hematocrito (FDH=36,7% (20,3-45,61), MD=33,7% (4,7-44,7)) donde se evidencia una medida de tendencia central mayor en el grupo FDH; en las variables clínicas y/o paraclínicas como lo son la temperatura (FDH=36,5° (35,5-37,6), MD=36,8° (36-39)), tensión arterial sistólica (FDH=95 mmHg (79-118), MD=100 mmHg (76-118)), tensión arterial diastólica (FDH=62 mmHg (49-82), MD=63 mmHg (45-83)), tensión arterial media (FDH=73 mmHg (59-92), MD=74 mmHg (55-85)) y plaquetas (FDH=62*10³/mm³ (20-99), MD=64*10³/mm³ (11-151)), se evidencia que la medida de tendencia central (mediana) en estos casos es mayor en el grupo de MD con respecto al grupo FDH.

En cuanto a los marcadores de lesión cardíaca como son la CPK (FDH=203 UI/L (36-726), MD=86,5 UI/L (45-2528)) y la CPK-MB (FDH=16 UI/L (9-42), MD=28 UI/L (4-685)), se obtuvo una medida de tendencia central para la CPK mayor en el grupo de FDH respecto al grupo de MD; por el contrario para la CPK-MB se obtuvo una medida de tendencia central mayor en el grupo de MD respecto al grupo de FDH, donde la mediana se encontraba por encima del valor mínimo de diagnóstico para lesión cardíaca que es de 25 UI/L. Al analizar la medida de tendencia central de la Troponina (FDH=0,0055 ng/ml (0,001-0,01), MD=0,02 ng/ml (0,001-0,21)), se evidencia un valor mayor para el grupo de MD respecto al grupo de FDH. Es importante expresar que de los 13 pacientes que conforman cada grupo solo 6 pacientes en el grupo de MD y 9 pacientes en el grupo de FDH contaban con el reporte de CPK, de igual manera solo 8 pacientes en el grupo de MD y 8 pacientes en el grupo de FDH contaban con el reporte de CPK-MB, para la Troponina I solo 7 pacientes en el grupo de MD y 2 pacientes en el grupo de FDH contaban con el reporte respectivo.

Para el grupo de MD y de FDH cuyo número de pacientes es de 13, solo 8 paciente para MD y 4 pacientes para FDH contaban con un trazado

electrocardiográfico, así en el grupo de MD el 87,5% (7 pacientes) presentaron alteración en el trazado electrocardiográfico y tan solo un 12,5% (1 paciente) presentó un trazado electrocardiográfico normal, hallazgos que son acordes a la clínica de compromiso miocardio de los pacientes incluidos en este grupo. Por el contrario en el grupo de FDH el 50% (2 pacientes) presentaron alteraciones en el trazado electrocardiográfico y el restante 50% (2 pacientes) no presentaron ninguna alteración en dicho trazado. Para el grupo de MD a 9 pacientes se le realizó ecocardiograma y en el 66,7% (6 pacientes) de estos el resultado del ecocardiograma no evidenció alteraciones ecocardiográficas compatibles con disfunción miocárdica, por el contrario solo en el 33,3% (3 pacientes) el resultado del ecocardiograma evidenció alteraciones ecocardiográficas compatibles con disfunción miocárdica; de igual manera para el grupo de FDH se le realizó ecocardiograma solo a 1 paciente (100%) en el cual el resultado del ecocardiograma no evidenció alteraciones ecocardiográficas de disfunción miocárdica.

Respecto al índice de efusión pleural como predictor de severidad de la fuga vascular, la medida de tendencia central (mediana) para el grupo de MD fue mayor respecto al grupo de FDH (MD=20% (0-40), FDH=13% (0-40)).

Al analizar el requerimiento de soporte inotrópico para los pacientes de cada grupo, se observa frecuencia de uso de inotrópicos mayor en el grupo de MD (23,1% - 46,2%) respecto al grupo de FDH (7,7% - 23,1%) para los diferentes inotrópicos mencionados. Es significativo resaltar que en el caso de los pacientes del grupo de MD que requirieron uso de inotropía, la mayoría (30,76%) necesitó de más de un inotrópico, caso contrario para el grupo de FDH donde solo el 23,07% de los pacientes requirieron soporte con más de un inotrópico.

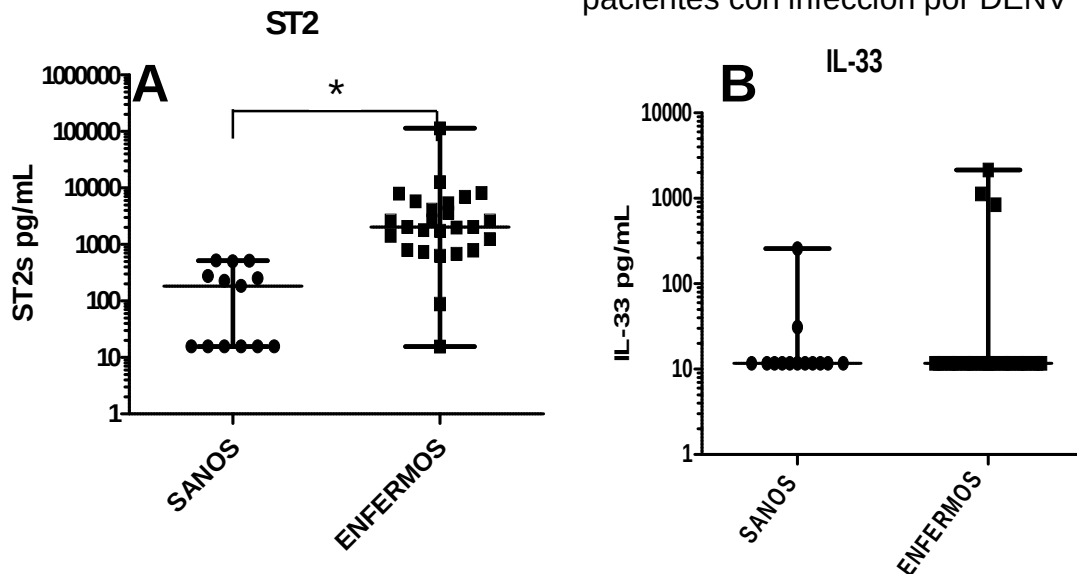
7.1 PACIENTES CON INFECCIÓN POR DENV PRESENTAN NIVELES AUMENTADOS DE ST2S

Para comprobar que los pacientes con infección por DENV presentan unos niveles elevados de ST2s, se realizó un ensayo de ELISA Sándwich en muestras de pacientes con infección por virus dengue (n=26) y en controles sanos (n=13). Los pacientes con infección por DENV presentan niveles séricos significativamente aumentados de ST2s ($P < 0,0001$). La mediana de

la concentración de ST2s en los voluntarios sanos fue 182 pg/mL y en el grupo de enfermos fue de 2035 pg/mL (fig. 1A).

Con el fin de evaluar si existe una relación entre los niveles séricos de ST2s y la severidad clínica de la infección por DENV, se analizaron los niveles de ST2s subdividiendo el grupo de enfermos en 2 subgrupos; pacientes con Fiebre dengue hemorrágico (FDH) y pacientes con Miocarditis dengue. En el grupo FDH la mediana fue de 1779 pg/mL y en el grupo Miocarditis de 2663 pg/mL. Se encontró diferencia entre estos valores, que no es estadísticamente significativa, con un valor de $p=0,1998$ (Figura 2A). Se encontró diferencia significativa entre los niveles de ST2s de los voluntarios Sanos y FDH ($p<0,0001$) y entre voluntarios Sanos y Miocarditis ($p=0,0001$) (Figura 2A).

Figura 1 Niveles de ST2 e IL-33 en pacientes con infección por DENV



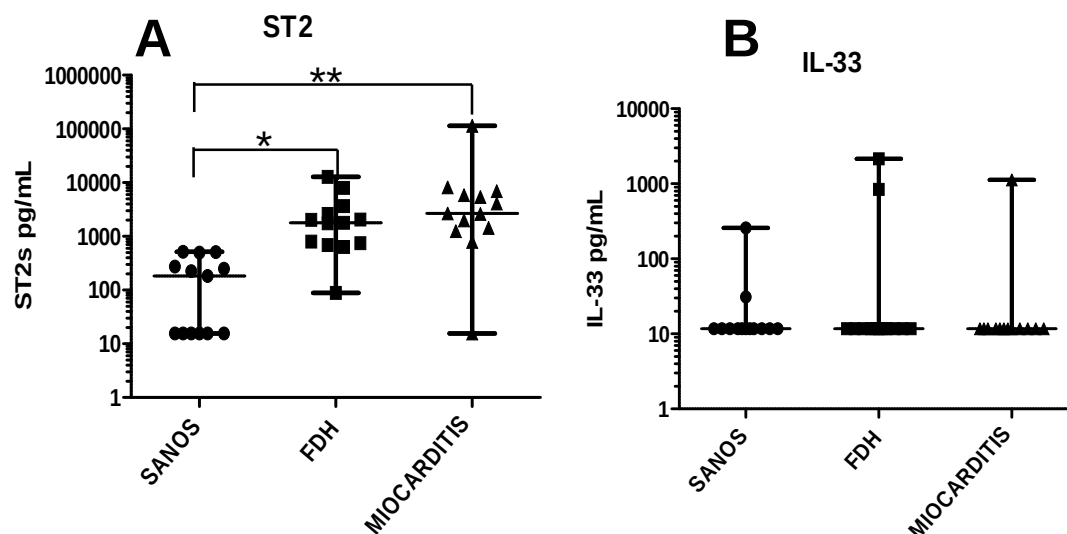
Comparación de los niveles de ST2s e IL-33 entre pacientes con infección por DENV y controles sanos. Las barras horizontales indican el valor de la mediana en cada grupo. **A:** Determinación de niveles de ST2s en muestras de pacientes sanos ($n=13$) y pacientes con infección por DENV ($n=26$) mediante la realización de un ELISA Sándwich. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos. * $P< 0.000.1$. **B:** Determinación de niveles de IL-33 en los grupos anteriores, mediante la realización de un ELISA Sándwich. No se encontró ninguna diferencia significativa entre los dos grupos.

7.2 NIVELES DE IL-33 NO SE ELEVAN EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR DENV

Para evaluar si los niveles de IL-33 se elevan en los pacientes con infección por DENV, se realizó un ensayo de ELISA Sándwich en pacientes que cursan con infección por DENV (n=26) y en voluntarios sanos (n=13). Los pacientes con infección por DENV no presentan modificaciones significativas en los niveles séricos de IL-33 ($P=0,87$). La mediana de la concentración de IL-33 en los voluntarios sanos fue 11,7 pg/mL y en el grupo de enfermos de 11,7 pg/mL (Fig. 1B).

Con el fin de evaluar la existencia de modificaciones en los niveles séricos de IL-33 según la presentación clínica de la infección por DENV (formas severas=FDH y formas atípicas=Miocarditis), se analizaron los niveles de IL-33 subdividiendo el grupo de enfermos en 2 subgrupos; pacientes con Fiebre dengue hemorrágico (FDH) y pacientes con Miocarditis dengue. En el grupo FDH la mediana fue 11,7 pg/mL y en miocarditis 11,7 pg/mL, sin diferencia significativa ($p=0,57$) (Figura 2B). No se encontró diferencia significativa entre voluntarios sanos y FDH ($p=0,9$) ni entre voluntarios sanos y Miocarditis ($p=0,64$) (Figura 2B).

Figura 2 Niveles de ST2 e IL-33 en pacientes con miocarditis dengue



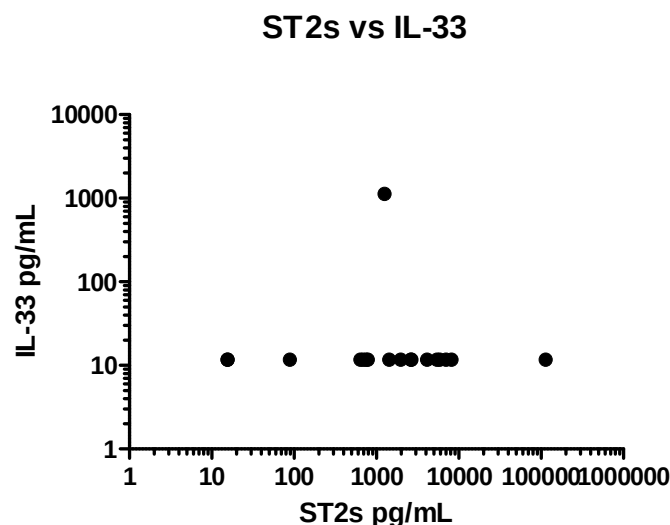
Comparación de los niveles de ST2s e IL-33 entre pacientes con FDH, con Miocarditis dengue y controles sanos. Las barras horizontales indican el valor de la media en cada grupo **A**: Determinación de niveles séricos de ST2s en pacientes con FDH (n=13), pacientes con Miocarditis dengue (n=13) y voluntarios sanos (n=13), mediante un ensayo de ELISA Sándwich. Existe diferencia significativa entre voluntarios sanos y FDH, $*P<0,0001$; y entre

voluntarios sanos y Miocarditis, $**P=0,001$. No hubo diferencia significativa entre FDH y Miocarditis ($P=0,1998$) **B**: Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para el análisis de los niveles de IL-33. No se hallaron diferencias significativas entre voluntarios sanos y FDH ($P<0,9$); y entre voluntarios sanos y Miocarditis, ($P=0,64$). No hubo diferencia significativa entre FDH y Miocarditis ($P=0,57$).

7.3 NIVELES DE IL-33 NO SE CORRELACIONAN CON NIVELES DE ST2S

Una vez determinados los niveles de las moléculas IL-33 y ST2s en suero de los pacientes con miocarditis ($n=13$), se correlacionó sus valores para evaluar si la concentración de la IL-33 guardaba alguna relación con la concentración de ST2s. Para ello se aplicó el test de Spearman. Hubo una leve tendencia a la correlación negativa ($r=-0,3$). Se encontró que entre las muestras estudiadas el aumento del ST2s no modificó los niveles de IL-33 de forma significativa ($p=0,34$).

Figura 3 Correlación de los niveles de ST2s e IL-33



Se correlacionaron los niveles de ST2s e IL-33 en los pacientes con miocarditis ($n=13$). Hubo una leve tendencia a la correlación negativa ($r=-$

0,3). El aumento de la concentración de ST2s no modificó el nivel de IL-33 de forma significativa ($p=0,34$).

7.4 NIVELES DE ST2S Y CK-MB RELACIONADOS CON LA SEVERIDAD CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR DENV

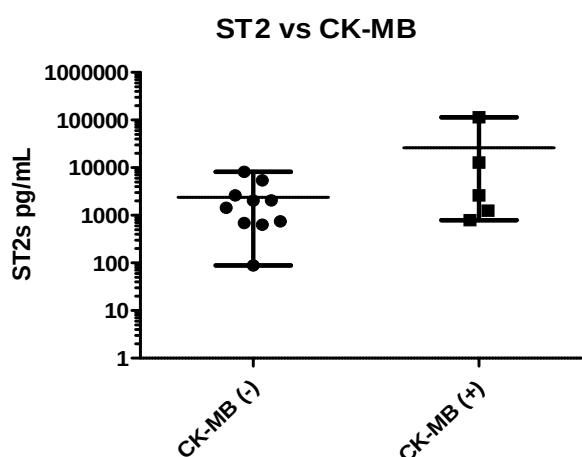
De los 39 pacientes con FDH incluidos en el estudio, 15 contaban con registro en sus historias clínicas de la medición de los niveles de CK-MB.

De acuerdo a publicaciones anteriores para la evaluación de pacientes que se presentan con patologías cardíacas⁴⁷, se tomó como valor positivo para CK-MB un nivel > 25 UI/L. Se dividió los 15 pacientes en 2 grupos, de la siguiente forma:

- Pacientes con CK-MB negativa: Valores de CK-MB menores de 25 UI/L. Un total de 10 pacientes, 7 con diagnóstico de FDH y 3 con diagnóstico de Miocarditis.
- Pacientes con CK-MB positiva: Valores de CK-MB mayores de 25 UI/L. Un total de 5 pacientes, 4 con diagnóstico de Miocarditis y 1 con diagnóstico de FDH.

Posteriormente se comparó la concentración de ST2s en estos dos grupos. La media de la concentración de ST2 en el grupo CK-MB (-) fue de 2384 pg/mL y en el grupo CK-MB (+) fue de 2629 pg/mL (Figura 3). No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los 2 grupos, con un valor de $P=0,2$.

Figura 4 Niveles de ST2s y CK-MB relacionados con la severidad de la infección por DENV



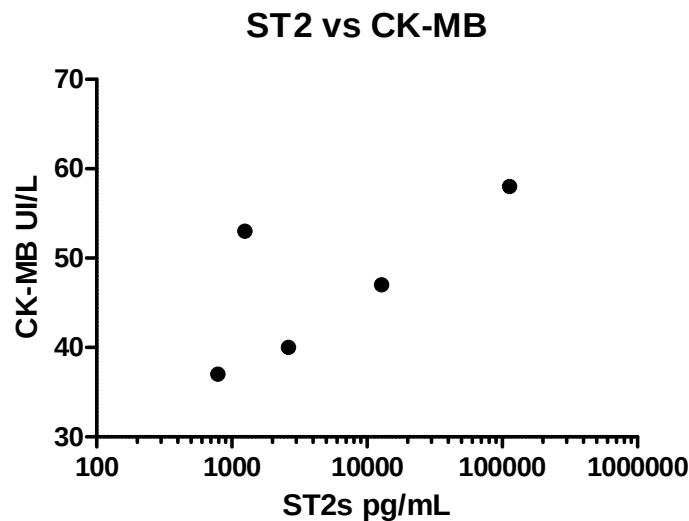
⁴⁷FRANGINI, P, *et al.* Dolor torácico y alteración del segmento ST en pacientes con vías accesorias aurículo-ventriculares. *En: Revista médica de Chile.* 2005. vol. 133, p. 570-574

Se tomaron los pacientes con reporte de niveles de CK-MB (n=15). Se tomó como valor de referencia de positividad para injuria cardiaca un valor mayor de 25 UI/L, dividiéndolos en dos grupos: CK-MB positivo (n=5) y CK-MB negativo (n=10). Se relacionaron los valores de ST2s en ambos grupos, encontrándose una mediana para el grupo CK-MB (+) de 2629 pg/mL y de 2384 pg/mL en el CK-MB (-). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (p=0,2).

7.5 CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE ST2S Y CK-MB EN PACIENTES CON VALORES DE CK-MB (+) PARA INJURIA CARDIACA

Para determinar si existe una relación entre los niveles séricos de ST2s y CK-MB en pacientes en quienes se presenta una injuria cardiaca (reportada como valor de CK-MB > 25 UI/L), se realizó una correlación de sus valores. Se obtuvo el valor de la p mediante el test de Spearman, con una P= 0,23 y el índice de correlación lineal $R^2 = 0,51$.

Figura 5 Correlación entre niveles de ST2s y CK-MB



Correlación de los valores de CK-MB y ST2s en pacientes con injuria cardiaca (CK-MB < 25 UI/L, n=5). Se encontró un índice de correlación (R^2) de 0,51, con una P= 0,23 por el test de Spearman.

8. DISCUSIÓN

Para determinar la relación existente entre los niveles de ST2s e IL-33 y el desarrollo de MD en pacientes con infección por virus dengue, nosotros conducimos un estudio para determinar la concentración de estas moléculas en dos grupos de pacientes con infección por DENV (FDH y MD) y un grupo control de voluntarios sanos. Encontramos una diferencia significativa en los niveles de ST2s entre los voluntarios sanos y el grupo de enfermos, y entre cada grupo por separado y los voluntarios sanos. No encontramos una diferencia estadísticamente significativa en los valores de ST2s entre los grupos FDH y MD. En cuanto a los niveles de IL-33, no hallamos diferencia significativa entre los voluntarios sanos y los pacientes con infección por DENV, ni entre los grupos FDH y MD. Este es el primer estudio que determina los niveles de esta citoquina y de ST2s en procesos de injuria miocárdica secundaria a infección por un agente viral. Consideramos que debido al limitado número de casos de MD, nuestros resultados fueron no significativos estadísticamente para encontrar una diferencia de ST2s entre FDH y MD, por lo que se requieren realizar estudios con una muestra mayor de pacientes.

Un estudio con pacientes adultos venezolanos reportó niveles elevados de ST2s en pacientes con FDH en comparación con otras enfermedades febriles, hallándose un pico del nivel de esta molécula en los días de defervescencia y el anterior a éste⁴⁸. De igual manera en un estudio realizado en pacientes huilenses con diagnóstico de FDH, de los cuales el 70,4% tenían menos de 5 años, se encontró niveles aumentados de ST2s en comparación con los grupos de dengue clásico y voluntarios sanos, encontrándose estos en un rango similar a nuestros resultados⁴⁹.

El ST2s es una proteína miembro de la familia de la IL-1. Es codificado por un gen que por un proceso de maduración diferencial da como resultado tres proteínas: ST2s, ST2 ligando y ST2v. El ST2 ligando actúa como el receptor para la IL-33⁵⁰. Esta molécula se expresa constitutivamente en el músculo liso y por medio de su vía de señalización activa el NF-κB. En un modelo

⁴⁸BECERRA, Op.cit., p. 20

⁴⁹HOUGHTON, Op.cit., p. 16

⁵⁰Schmitz, Op.cit., p. 16

murino se describió un papel cardioprotector contra hipertrofia de la IL-33 en estados de estrés miocárdico por sobrecarga de presión⁵¹. Nuestro estudio no encontró diferencia de los niveles de esta citoquina entre los diferentes grupos, por lo cual no es posible determinar si la IL-33 actúa como factor protector en los pacientes con infección por VDEN para el no desarrollo de MD.

Nosotros encontramos que en cinco pacientes con un reporte positivo de CK-MB, cuatro tenían una correlación positiva entre los niveles de ST2s y CK-MB. Aunque esto no fue significativo estadísticamente tal vez debido al bajo número de muestras, creemos que es un hallazgo importante que correlaciona los niveles de una molécula reconocida como marcador de injuria cardiaca con una citoquina que tiene niveles aumentados en pacientes con FDH y cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la función de la IL-33, cardioprotectora en modelos animales.

⁵¹SANADA, Op.cit., p. 18

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los pacientes con formas severas de la infección por DENV presentan un aumento en los niveles de ST2s y niveles similares de IL-33 en comparación con voluntarios sanos.
- Los pacientes con MD no presentan una correlación entre los niveles de ST2s e IL-33.
- Los pacientes con formas severas de la infección por DENV presentan una relación no significativa entre los niveles aumentados de ST2s y CK-MB.
- Se recomienda ampliar el número de pacientes con MD, con el fin de conocer si la relación encontrada en este estudio entre ST2s y CK-MB es significativa.
- Se recomienda incluir un grupo de pacientes con Dengue sin signos de alarma, como grupo de comparación.

BIBLIOGRAFÍA

AVIRUTNAN, P, *et al.* Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. En: J Immunol. 1998. vol. 161, p. 6338-6346.

BECERRA, A, *et al.* Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients. En: Cytokine. 2008. vol. 41, p. 114-120.

Biotinylated Anti-human IL-33 Antibody. [Sitio en internet] R&D Systems. Disponible en <http://www.rndsystems.com/pdf/BAF3625>. Acceso el 10 de septiembre 2008.

BRINT, E.K, *et al.* ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. En: Nat Immunol. 2004. vol. 5, p. 373-379.

CALABRESE, F, *et al.* Overexpression of tumor necrosis factor (TNF) α and TNF α receptor I in human viral myocarditis: clinicopathologic correlations. En: Modern Pathology. 2004. vol 17, p. 1108-1118.

CHECCHIA, P y KULIK, T. Acute viral myocarditis: Diagnosis. En: Pediatric Critical Care Medicine. 2006. vol 7, N° 6, p. S8-S11.

FELDMAN, A y McNAMARA, D. Myocarditis. En: New England Journal of Medicine. 2000. vol 343, N° 19; p. 1388-1398.

FRANGINI, P, *et al.* Dolor torácico y alteración del segmento ST en pacientes con vías accesorias aurículo-ventriculares. En: Revista médica de Chile. 2005. vol. 133, p. 570-574.

GREEN, S y ROTHMAN A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. En: Curr Opin Infect Dis. 2006. vol. 19, N° 5, p. 429-436.

HOBBER, D, *et al.* Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. En: Am J Trop Med Hyg. 1993. vol. 48, p. 324-331.

HOUGHTON, N. *et al.* Levels of soluble ST2 in serum associate with severity of dengue due to TNF- α stimulation. En: Journal of General Virology. 2009. Paper in press.

Human IL-1 R4/ST2. [Sitio en internet] R&D Systems. Disponible en <http://www.rndsystems.com/pdf/dy523>. Acceso el 10 de septiembre 2008.

KABRA SK, *et al.* Myocardial dysfunction in children with dengue haemorrhagic fever. En: National Medical Journal of India. 1998. vol.11, No. 2, p. 59-61.

KEITH, J, ROWE R, VLAD P. Heart Disease in Infancy and Childhood. 1978. p. 928-931.

KHONGPHATTHANAYOTHIN, A, *et al.* Myocardial depression in dengue hemorrhagic fever: Prevalence and clinical description. En: Pediatric Critic Care Med. 2007. vol. 8, No. 6, p. 524-539.

KURANE, I, *et al.* Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. En: J Clin Invest. 1991. vol. 88, p. 1473-1480.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. En: Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2007. vol. 30, p. 329-340.

LAUER, B, *et al.* Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis. En: Journal of American College of Cardiology. 1997. vol 30, p. 1354-1359.

LOPEZ, I y HERRERA, H. Miocarditis viral. En: Medigraphic Arterisa. 2006. vol. 13, No 3, p. 122-128.

Monoclonal Anti-human IL-33 Antibody. [Sitio en internet] R&D Systems. Disponible en <http://www.rndsystems.com/pdf/MAB3625>

MURGUE, B, CASSAR, O y DEPARIS, X. Plasma concentrations of sVCAM-1 and severity of dengue infections. En: J Med Virol. 2001. vol. 65, p. 97-104.

OSHIKAWA, K, *et al.* ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. En: Biochem Biophys Res Commun. 2002. vol. 299, p. 18-24.

SALGADO, D, *et al.* Clinical and epidemiological characterisation of dengue haemorrhagic fever in Neiva, Colombia, 2004. En: Revista de Salud Pública. 2007. vol. p. 53-63.

SALGADO, D, *et al.* Mortalidad por dengue hemorrágico en niños en Colombia: más allá del choque. En: Infectio. 2008. vol. 12, No 1, p. 249-255.

SANADA, S, *et al.* IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. En: The Journal of Clinical Investigation. 2007. vol. 6; p. 117.

SCHMITZ, J, *et al.* IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. En: Immunity. 2005. vol. 23; p. 479–490.

SHEKERDEMIAN, L y BOHN D. Acute viral myocarditis: Epidemiology and pathophysiology. En: Pediatric Critic Care Medicine. 2006. vol. 7, No. 6, p. S2-S7.

WALZL, G, *et al.* Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)- but not Th1-driven immunopathology. En: J Exp Med. 2001. vol. 193, p. 785-792.

ANEXOS

Anexo A AUTORIZACION PARA EL USO DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS EN ESTUDIOS POSTERIORES

El uso de la muestra en estudio posteriores nos podrá ayudar en el futuro a entender las causas o comportamiento de la enfermedad mencionada, es decir del dengue. Se puede dar el caso en donde usted no se beneficie directamente del estudio pero tanto su familia como otros individuos que puedan ser afectados si podrán beneficiarse. Por lo tanto por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su uso en estudios de investigación posteriores:

1. Autorizo conservar la muestra de sangre extraída con la posibilidad de emplearla junto con el resultado del estudio en las situaciones señaladas a continuación:
 - a. En estudios de investigación específicos para el dengue siempre y cuando se conserven en anonimato los datos de identificación del niño. Si ____ No ____.
 - b. En estudios de investigación de enfermedades de diagnostico diferencial de enfermedades febriles hemorrágicas siempre y cuando se conserve en anonimato los datos de identificación del niño. Si ____ No ____.
 - c. En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo internacional previo, con aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato los datos de identificación del niño. Si ____ No ____.
2. Deseo que las muestra extraídas a mi hijo sean desechadas una vez completado el estudio.

Nombre y Firma de la Persona que Acepta el Consentimiento

Ciudad y Fecha: _____

Anexo B INSTRUMENTO DE MEDICION

NIVELES DE ST2s E IL-33 EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA CON MIOCARDITIS DENGUE.

Nombres _____ y _____ apellidos: _____

Edad:Años: ____ Meses: ____ Días: ____ Fecha nacimiento: Año: ____ Mes: ____

Día: ____

Lugar de procedencia: _____

- Diagnóstico: _____
- Método usado para el diagnóstico: _____
- Sospecha clínica: Hipotensión: No: ____ Si: ____ ¿Cuánto? _____

Frecuencia cardiaca: _____

Otros: _____

- Electrocardiografía: _____
- Ecocardiografía: _____
- Rx _____ tórax: _____
- Enzimas cardiacas: CPK-MB: _____ TROPONINA I: _____
- Gamagrafía _____ cardiaca: _____
- Biopsia _____ endomiocárdica: _____

Clasificación clínica de la miocarditis

:

Miocarditis fulminante: _____

Miocarditis subaguda o crónica: _____

Miocardiopatía dilatada: _____

IL-33: _____ ST2s: _____

Anexo C COSTOS

El presupuesto contemplado a continuación incluye los costos directos relacionados al desarrollo del presente proyecto investigativo.

Kits y reactivos					
Elemento	Descripción	Referencia	Distribuidor	Cantidad	Valor
Kit IL-33	Human IL-33 duoSet	DY3625	R&D systems	1	\$ 645 USD.
Kit ST2/IL-1 R4	Human ST2/IL-1 R4 duoSet	DY523	R&D systems	1	\$ 645 USD.
Suero Fetal Bovino	-	-	-	-	Disponible en el laboratorio
Buffer de lavado	-	-	-	-	Disponible en el laboratorio
Reactivo diluyente	-	-	-	-	Disponible en el laboratorio
Solución sustrato	-	-	-	-	Disponible en el laboratorio
Solución de frenado	-	-	-	-	Disponible en el laboratorio
Materiales, maquinaria y equipos					
Lector de ELISA		ELX 800	BIO-TEK instruments Inc.	-	Disponible en el laboratorio.
Auto strip washer		ELX 50	BIO-TEK instruments Inc.	-	Disponible en el laboratorio.
Centrifuga clay adams o brand	Centrifuga 3200 rpm marca clay adams o brand	BD-0225	Analytical scientific Ltd.	-	Disponible en el laboratorio.
Pipetas automáticas	Pipetas automáticas brand de 100 a 1000 µl.	-	brand	-	Disponible en el laboratorio.
Pipetas automáticas	Pipetas automáticas jencons de 2 a 20 µl.	-	jencons	-	Disponible en el laboratorio.
	Puntas de pipeta palatizadas, plastibrand,	702315	brand	1	31.60 EUR.

Puntas de pipeta desechables	marca brand. amarillas de 2 a 200 µl sin esterilizar. paquete por 960 puntas.				
	Puntas de pipeta palatizadas, plastibrand, marca brand. azules de 50 a 1000 µl sin esterilizar. paquete por 960 puntas.	702320	brand	1	31.60 EUR.
Tubos de Ensayo	Tubos de ensayo secos.	-	-	-	Disponible en el Laboratorio.
Tubos Eppendorf	Tubos Eppendorf de 1.5 ml.	-	-	-	Disponible en el Laboratorio.
Impresora Epson	Impresora de resultados del lector de ELISA.	LX-300	EPSON	-	Disponible en el Laboratorio.
Total costos	-	-	-	-	\$ 2.869.681,84 Pesos colombianos

Anexo D CRONOGRAMA

Año	Mes	Actividades
2008	Enero	-----
	Febrero	• Revisión de literatura.
	Marzo	• Revisión de literatura.
	Abril	• Revisión de literatura.
	Mayo	• Selección del tema de investigación.
	Junio	-----
	Julio	• Inicio de elaboración del anteproyecto.
	Agosto	• Elaboración del anteproyecto.
	Septiembre	• Finalización de la elaboración del anteproyecto. • Presentación a convocatorias para semilleros de investigación Universidad Surcolombiana.
	Octubre	• Definición de fondos y recolección de recursos para desarrollo del proyecto.
	Noviembre	• Inicio de recolección de datos.
	Diciembre	• Inicio de recolección de datos.
2009	Enero	• Inicio de recolección de datos.
	Febrero	• Inicio de recolección de datos.
	Marzo	• Inicio de recolección de datos.
	Abril	• Inicio de recolección de datos.
	Mayo	• Inicio de recolección de datos.
	Junio	• Inicio de recolección de datos.
	Julio	• Inicio de recolección de datos.
	Agosto	• Inicio de recolección de datos.
	Septiembre	• Inicio de recolección de datos.
	Octubre	• Inicio de recolección de datos.
	Noviembre	• Organización, tabulación, análisis de datos y publicación de resultados.
	Diciembre	• Organización, tabulación, análisis de datos y publicación de resultados.