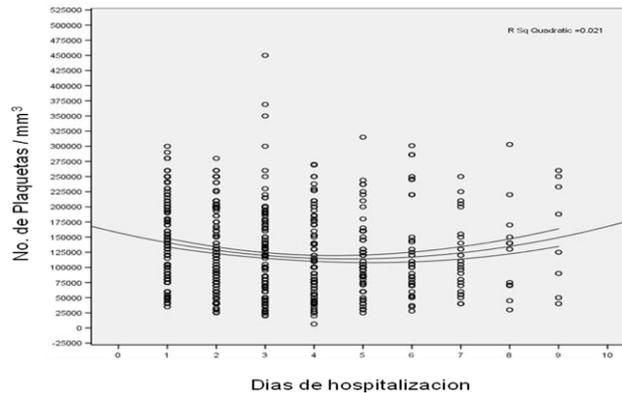




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA – LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO



Tesis para optar al título de Licenciado (a) en Bioanálisis Clínico

Marcadores hematológicos asociados con la severidad del dengue en pacientes atendidos en el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello (HEODRA), en el periodo 2005 – 2008.

Autores(as):

Br. Melissa del Socorro Meléndez Avendaño.

Br. María Gabriela Palma Reyes.

Tutor:

Dr. Filemón Bucardo Rivera. Ph.D.

Docente UNAN - León

Asesora:

Lic. Rosa Emelina Alonso. MSc.

Docente UNAN-León

Septiembre del 2010. León, Nicaragua.

RESUMEN

La fiebre hemorrágica es la complicación más grave que experimentan los pacientes que han sido infectados con el virus del dengue, se caracteriza por prominentes manifestaciones hemorrágicas asociadas con trombocitopenia y hemoconcentración. Con el objetivo de valorar el comportamiento de los marcadores hematológicos durante la evolución de la forma severa del dengue, 127 expedientes de pacientes con diagnóstico clínico de dengue hemorrágico que asistieron al HEODRA entre Enero del 2005 y Diciembre del 2008 fueron analizados. La información relacionada con características clínicas, epidemiológicas y resultados de laboratorio fue registrada en una ficha de recolección de datos y se construyó una base de datos en SPSS para analizar la información. El 52% fueron mujeres, la edad promedio fue de 20 años (1 – 67 años) y el mayor número de pacientes estaban entre las edades de 6 a 15 años (39%), la mayoría (79%) eran del municipio de León. El 62% (61/127) presentaron trombocitopenia ($\leq 140,000$), de los pacientes con trombocitopenia 49 presentaron niveles de plaquetas $\leq 100,000$. Los resultados indican que a partir del ingreso, existe una tendencia a la disminución en el número de plaquetas, en pacientes con dengue hemorrágico llegando al punto mínimo el cuarto día de hospitalización. En las lecturas de hematocrito la mayoría (98%) presentaron algún grado ($\geq 1\%$) de hemoconcentración. Sin embargo, solamente 32 de los 127 presentaron incrementos $\geq 21\%$ en el hematocrito. El conteo diferencial de glóbulos blancos reveló que el 86% (109/127) de los pacientes presentaron algún grado de linfocitosis ($\geq 33\%$). En un porcentaje importante (17/127) se observaron niveles de linfocitos superiores al 50%. El porcentaje de linfocitos tiene una tendencia a incrementar desde el ingreso hasta el 4to día de hospitalización y se normaliza hacia el egreso. Se observó que el 69% (34/49) de los pacientes con plaquetas $\leq 100,000$ también presentaron una prueba del torniquete positiva, pero de los pacientes hemoconcentrados solamente el 34% (11/32) fueron positivos a la misma prueba. Los resultados de este estudio demuestran que no todos los pacientes diagnosticados clínicamente como dengue hemorrágico presentan las alteraciones hematológicas descritas en la definición de casos de la OMS.

ÍNDICE

Contenido:	Páginas
Introducción	1
Antecedentes	3
Justificación	4
Planteamiento del Problema	5
Objetivos	6
Marco Teórico	7
Material y Método	27
Resultados	29
Discusión	35
Conclusiones	38
Recomendaciones	39
Bibliografía	40
Anexos	43

DEDICADA A MIS PADRES
JUANA HAYDEÉ REYES LOAÍSIGA
Y
EVERTH OSCAR PALMA HERNÁNDEZ.

María Gabriela Palma Reyes.

DEDICATORIA

Estoy escalando un peldaño mas en los conocimientos de la Ciencia Médica esto es resultado de la voluntad y sobreesfuerzo de mis profesores (Lic. Rosa Emelina Alonso y Lic. Filemón Bucardo) a la perseverancia de mis padres (Miguel Meléndez y Mercedes Avendaño) y sobre todo a la voluntad de Dios.

Espero continuar si Dios me lo permite escalando para adquirir más conocimientos médicos para brindar un mejor servicio a los pacientes que me demandan.

Melissa del Socorro Meléndez Avendaño.

Agradecimientos

Agradecemos infinitamente al Dr. *Filemón Bucardo* por ser un excelente tutor, gracias por su paciencia, su tiempo que dedicó para ayudarnos y por todo los conocimientos transmitidos durante el estudio.

A nuestra asesora metodológica Lic. *Rosa Emelina Alonso*, gracias por brindarnos parte de su valioso tiempo, por sus aportes y sugerencias.

Al sub-director del HEODRA, Dr. Marcial Montes, por autorizar la revisión de expedientes en el departamento de estadísticas.

Al departamento de microbiología, Lic. Patricia Blandón y Lic. Soledad Calderón quienes colaboraron en la recolección de la información.

Este estudio fue parcialmente patrocinado por NETROPICA, GRANT 1-N- 2008.

INTRODUCCIÓN

La infección con el virus del dengue puede ser asintomática o sintomática, también puede ser leve, moderada o severa. Actualmente se sabe que la enfermedad puede ser producida por cualquiera de los cuatro serotipos (DENV- 1, DENV- 2, DENV- 3, DENV- 4) [Rothman, 2010]. La cadena de transmisión del Dengue, está dada por el reservorio viral (persona infectada en etapa de viremia), el agente transmisor (*Aedes aegypti* y otros mosquitos del género *Aedes*) y las personas susceptibles (individuos sin anticuerpos específicos contra el serotipo circulante [Jacobs, 2000]).

La incidencia y las epidemias de dengue han aumentado exponencialmente en los últimos años a escala mundial. En el período de 1970 a 1998, el número de casos de dengue se cuadruplicó hasta alcanzar la cifra máxima de 1,3 millones, con más de 3,600 muertes [Halstead, 2007]. Aunque no se ha determinado con exactitud la carga real de la enfermedad, se estima que de los 2,500 millones de personas que viven en áreas en riesgo de transmisión, 50 millones se infectan anualmente y más de 500,000 contraen su forma más grave, el dengue hemorrágico (DH). Durante las epidemias, las tasas de ataque pueden llegar a afectar a 80–90% de las personas susceptibles y la letalidad puede ser mayor de 5% [Halstead, 2007].

Clínicamente el dengue se presenta con fiebre, mialgia, artralgia y dolor retro-orbital. La recuperación suele acompañarse de fatiga, linfadenopatía y leucopenia con linfocitosis relativa. En algunos casos, se observan trombocitopenia e incremento de las aminotransferasas. Los casos de dengue hemorrágico muestran fiebre acompañada de fenómenos hemorrágicos, tales como, trombocitopenia y hemoconcentración. En una pequeña proporción de casos se experimenta el síndrome de choque por dengue (SCD) el cual, involucra hipovolemia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1975 define la fiebre hemorrágica de dengue en base a cuatro criterios como son: fiebre, tendencia hemorrágica, trombocitopenia y prueba de fugas de plasma [Organización Mundial de la Salud, 1997].

Desafortunadamente, hasta la fecha no contamos con una vacuna específica que proteja contra la infección por el virus del dengue, no hay duda acerca de la necesidad de contar con una vacuna contra el dengue que brinde inmunidad de larga duración contra los cuatro serotipos. Sin embargo, diversos factores han impedido la elaboración de vacunas específicas contra el dengue, como la falta de un modelo animal que reproduzca la enfermedad, el aún incompleto conocimiento de su patogenia y el insuficiente financiamiento que han tenido las investigaciones sobre el dengue. La disponibilidad actual de varios candidatos vacunales constituye un gran avance en el desarrollo de vacunas contra el dengue, sin embargo, se estima que una vacuna segura y eficaz requerirá por lo menos 10 años más de investigación. En la actualidad, la erradicación del vector continúa siendo la única alternativa viable para controlar esta enfermedad y para el tratamiento eficaz de los pacientes la información de marcadores hematológicos sigue siendo la única alternativa para la identificación temprana de la enfermedad [Guzmán, 2007].

El propósito de esta investigación es evaluar el comportamiento de los marcadores hematológicos: hematocrito, recuento y diferencial de leucocitos y conteo plaquetario, en asociación con la severidad o la evolución del dengue en pacientes atendidos en Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales de la Ciudad de León, durante el período 2005 – 2008.

ANTECEDENTES

Algunos estudios realizados en el HEODRA, sugieren que la trombocitopenia es una característica común en pacientes con dengue hemorrágico. Sin embargo, en pacientes pediátricos con manifestaciones hemorrágicas investigados durante el brote epidémico en 1992, la trombocitopenia ($\leq 100,000$) se observó únicamente en el 5.7% de ellos. En ese mismo estudio los autores sugirieron que valores de plaquetas entre 100,000 y 150,000 deberían ser predictivos de dengue hemorrágico [Fonseca, 1994].

En otro estudio que se realizó en el HEODRA durante Junio y Julio de 1994 se demostró que las manifestaciones hemorrágicas, tales como; gingivorragia, metrorragia y epistaxis fueron las complicaciones más frecuentes y los resultados de laboratorio demostraron que un 55% presentaron leucopenia, 63% linfocitosis, 55% hemoconcentración y 28% trombocitopenia [González, 1994].

Más recientemente se encontró que el 95% de los pacientes con diagnóstico clínico de dengue hemorrágico tenían incrementado los niveles de hematocrito y el 64 % de esos pacientes tenían trombocitopenia [Barcenás et al., 2004].

JUSTIFICACIÓN

Este estudio contribuirá a un mejor entendimiento de los cambios hematológicos durante la evolución de la forma severa del dengue. Además permitirá valorar su aplicabilidad en el manejo de pacientes que sufren de dengue hemorrágico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- ✚ Cuál es la utilidad de los marcadores hematológicos en el monitoreo de la infección severa por dengue?

OBJETIVO GENERAL

Valorar el comportamiento de los marcadores hematológicos (Plaquetas, hematocrito y leucocitos) durante la evolución de la forma severa del dengue.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Describir las características sociodemográficas de la población en estudio.
2. Describir las características clínicas, de mayor relevancia, relacionadas con la enfermedad.
3. Determinar la frecuencia de las alteraciones hematológicas asociados con la severidad del dengue.
4. Correlacionar los hallazgos hematológicos con las manifestaciones hemorrágicas de la enfermedad.

MARCO TEORICO

Aspectos generales de la fiebre por Dengue

El dengue es la enfermedad ocasionada por el arbovirus con mayor morbilidad y mortalidad en el mundo [Guzman and Kouri, 2003]. Es endémico en extensas regiones de Oceanía, África y América. El dengue clásico se caracteriza por cefalea intensa, dolor retro-orbital, distintos tipos de hemorragias, adenopatías (cervicales posteriores, epitrocleares e inguinales) enantema y exantema. Puede haber una remisión de 2 días, reapareciendo la fiebre y síntomas más leves; hacia el día 5^{to} aparece leucopenia. La mortalidad es nula si no hay fiebre hemorrágica o choque [Ciguenza, 1997].

Aproximadamente la mitad de la población mundial vive en países donde éste es endémico y se estima que anualmente ocurren cerca de 100 millones de casos de dengue, los que originan aproximadamente 24,000 muertes [Guha-Sapir and Schimmer, 2005].

A pesar de los programas de control de vectores y del amplio conocimiento que se tiene del problema, en los últimos años se han presentado epidemias en múltiples áreas altamente urbanizadas de América Central y del Sur. En Colombia, el dengue es una entidad endemo-epidémica y durante el año 2004, fue el país con más casos de dengue hemorrágico (DH) y muertes por esta causa en América. En los primeros días de enfermedad, el dengue se presenta como un síndrome febril agudo (SFA) inespecífico, que en la mayoría de los casos evoluciona sin complicaciones y se conoce como dengue clásico (DC). Sin embargo, una proporción variable de pacientes desarrolla DH, síndrome que se caracteriza por sangrado espontáneo, trombocitopenia y extravasación del plasma, asociado a una mayor frecuencia de complicaciones y mortalidad. Ello hace esencial identificar el dengue en la primera consulta, a fin de ofrecer una atención oportuna al paciente y así disminuir su morbi-mortalidad [Martinez et al., 2006]. La evaluación de pacientes con SFA compatible con dengue sugiere que la incidencia real de esta enfermedad oscila entre 35-90% en áreas endémicas. Sin embargo, en un estudio realizado en Venezuela, se sugiere que el valor predictivo positivo del diagnóstico clínico podría llegar a ser de 100%.

Aunque la correlación entre la presunción diagnóstica de dengue y el estado real de infección podría afectar el manejo, los estudios donde se comparan el diagnóstico presuntivo con el confirmado no han evaluado la influencia del diagnóstico clínico inicial del SFA inespecífico sobre las decisiones médicas, tales como la solicitud de un hemograma (prueba que incluye los valores de hemoglobina, hematocrito, recuentos de plaquetas y de leucocitos), y la administración de medicamentos parenterales y líquidos intravenosos [Martinez et al., 2006].

La situación del dengue y del dengue hemorrágico en la región resulta realmente alarmante y las perspectivas para su control son remotas, ya que los factores de emergencia del dengue no tienen posibilidades reales de desaparecer. La disponibilidad de una vacuna efectiva contra el dengue es aún lejana, por lo que la única alternativa existente en la actualidad para el control del dengue es mediante el control y eventual erradicación del vector. La mayoría de los países lograron erradicar el vector. En la década de los 70 comenzó el deterioro del control, se reinfestaron sucesivamente los países hasta que en 1995 el panorama de distribución del vector era similar al que existía antes del inicio de la campaña continental [Guzmán].

Agente etiológico. El agente causal es un virus de la familia *Flaviviridae*: arbovirus (arthropod-borne-viruses) similar al de la Fiebre Amarilla. Los Flaviviridae son virus RNA monocatenarios de polaridad positiva que forman partículas de 40 a 50 nm de diámetro en el retículo endoplásmico, con 10,703 nucleótidos, no segmentado, con cápside icosaédrica y su replicación que ocurre en el citoplasma. Este opera directamente como ARN mensajero policistrónico, sensibles por tanto a la destrucción por agentes físicos y químicos. Su genoma codifica una poliproteína que es luego procesada en 10 polipéptidos: 3 estructurales (una proteína de nucleocápside C, una membranosas prM y una glicoproteína de envoltura E: hemaglutinante y de adherencia) y 7 no estructurales (NS), de los cuales destacamos NS1 que participa en la maduración viral y pudiera servir en el diagnóstico temprano. Se reconocen por variación de la proteína E 4 tipos antigénicos (llamados DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) sobre la base de ensayos de neutralización del efecto citopático [Chungue et al., 1995]. Existe heterogeneidad de cepas dentro de cada

tipo, que se correlaciona con variedad de secuencias de ARN, cuya identificación en prM, E y NS1 tiene utilidad epidemiológica. Las posibilidades de amplia variación y supervivencia de estos virus serían menores que para otros virus ARN, a causa de su estricta adaptación a 2 hospederos diferentes [Lindenbach, 2003].

Vectores y reservorios. Los vectores del Dengue son los mosquitos del género *Aedes*, y la especie más importante en la transmisión es *Aedes aegypti*. Otro vector de importancia epidemiológica es *Aedes albopictus*, de gran distribución en Brasil. Es el vector que mantiene la enfermedad en Asia y ha sido introducido en América difundiéndose en varios países. Ambos vectores pertenecen al subgénero *Stegomyia*. En otras zonas del planeta hay otras especies vectoras [Ortega, 2001].

La mayor parte de las regiones subtropicales y tropicales alrededor del mundo donde existen vectores *Aedes* son regiones endémicas. Se ha confirmado que el virus se transmite durante todo el año entre las latitudes 25°N y 25°S y los patrones cambiantes de la enfermedad probablemente se relacionan con el crecimiento rápido de las poblaciones urbanas, el hacinamiento y el relajamiento de los esfuerzos para controlar los diferentes mosquitos.

Aedes aegypti son artrópodos de clase Insecta, orden Diptera, familia Culicidae y subfamilia Culicinae, que incluye los géneros de mosquitos más importantes *Anopheles*, *Culex* y *Aedes*, pueden diferenciarse de manera sencilla en su estado adulto por la posición en reposo y las características morfológicas de la cabeza. Esta última es esférica con un par de ojos compuestos, la provocis está formada por las partes bucales que comprenden labrum-epifaringe, hipofaringe, mandíbulas y maxilas, todo esto constituye un fuerte órgano perforador que le permite penetrar la piel y buscar un capilar.

Los huevos son depositados individualmente, las larvas de estos géneros cuelgan suspendidas oblicuamente de la superficie del agua [Ortega, 2001]. El adulto de *Aedes aegypti*, transmisor de Dengue, tiene un dorso con bandas de color plateado o amarillo blanquecino sobre fondo oscuro, y un dibujo característico en forma de lira en el dorso del

tórax. Las patas están conspicuamente bandeadas y el último artejo de las patas posteriores es blanco. El abdomen de la hembra tiende a ser puntiagudo [Claude, 1997].

En las comunidades urbanas las epidemias de dengue, con frecuencia se inician durante la época de lluvias, cuando abunda el mosquito vector, pica durante el día y tienen una capacidad corta de vuelo como consecuencia se propagan de una casa a otra.

La fuente de infección y el reservorio vertebrado es el hombre. El virus del Dengue persiste en la naturaleza gracias al ciclo de transmisión *hombre - Aedes aegypti - hombre* [Ortega, 2001].

Hay muchas zonas del mundo que se han vuelto vulnerables a la introducción de los virus del dengue, especialmente a través de personas infectadas que se trasladan de un lugar a otro en avión y cada vez abundan más los casos de dengue.

La magnitud actual del problema de *Aedes aegypti* es mucho mayor que durante la campaña anterior de erradicación, en términos de extensión, urbanización, volumen y unidades de agua almacenada a cielo abierto y contaminadas. Todas las poblaciones del mosquito en América son ahora resistentes al DDT y algunas lo son a temefós, malathion y piretroides.

Modo de transmisión. La transmisión es indirecta, a través de los vectores biológicos mencionados. Se realiza por la picadura del mosquito hembra (hematófaga), estas se infectan cuando se alimentan de sangre contaminada (humanos virémicos), cuyas proteínas se requieren para el desarrollo de los huevos. El virus se multiplica en el epitelio intestinal del mosquito hembra infectado, ganglios nerviosos, cuerpo graso y glándulas salivales. Los mosquitos son infectantes después de un periodo de 8 a 14 días ("tiempo de incubación extrínseco") pueden infectar al hombre por nueva picadura y probablemente permanecen así el resto de su vida (1- 3 meses). [Claude, 1997].

Se pueden transmitir anticuerpos (Acs) solamente por transfusiones sanguíneas. No hay transmisión por contacto directo con una persona enferma, sus secreciones, ni por contacto con fuentes de agua o alimentos [Claude, 1997; Ortega, 2001].

Período de transmisibilidad. El tiempo intrínseco de transmisibilidad corresponde al de la viremia de la persona infectada. Comienza un día antes del inicio de la fiebre y se extiende hasta el 6° u 8° día de la enfermedad [Claude, 1997].

Susceptibilidad genética.

Etnicidad. Algunos estudios indican que en ciertas poblaciones y grupos étnicos se muestra mayor proclividad a desarrollar FHD o SCD mientras que en otras solamente se desarrolla DC. Por ejemplo, en un brote de dengue ocurrido en un pequeño país al este de Australia (Tonga) en 1974, Dengue clásico fue la manifestación predominante y en las grandes epidemias de dengue del Perú, se presentaron muy pocos casos de FHD. En otros grupos étnicos se observa la ocurrencia de FDH y SDC en infecciones primarias. En Cuba el riesgo de adquirir FDH y SCD en blancos:negros:mixtos fue de 5.5:1:1.8 respectivamente en 1981.

Un estudio realizado en Haití en 1996 sugiere fuertemente la implicancia de la etnicidad en la susceptibilidad al virus del dengue, en ese estudio el 85% de los sueros de niños de 6 – 13 años que vivían en Puerto Príncipe tenían anticuerpos anti-dengue, pero ningún caso de fiebre por dengue fue reportado en niños de esa ciudad, sin embargo 185 casos de fiebre por dengue fueron observados en caucásicos del ejército de los EEUU asentados en esa misma ciudad, lo que sugiere que los niños Haitianos de esa ciudad son menos susceptibles que los caucásicos adultos. En dos estudios realizados en Asia se reportó una mayor incidencia de FDH en los Chinos que en los Malasios. Todos estos estudios indican por tanto que la raza es un factor determinante para la susceptibilidad ante la infección por el virus del dengue [Chungue et al., 1995].

Factores genéticos. Los datos de epidemiología genética han identificado algunos genes de susceptibilidad de posible importancia en el desarrollo de dengue graves [Chaturvedi et al., 2006], en determinados alelos de los antígenos leucocitarios humanos clase (HLA) I y III locus [Nguyen et al., 2008]. Además, los polimorfismos en los genes que codifican el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), CD209 (DC-SIGN), deficiencia de glucosa-6-fosfato (G6PD), Fc γ IIAR y el receptor de vitamina D fueron identificados como posibles factores de riesgo para el dengue hemorrágico en diferentes poblaciones [Chao et al., 2008; Chaturvedi et al., 2006; Fernandez-Mestre et al., 2004]. Restricción de la (ADE) por componente del complemento C1q [Mehlhop et al., 2007] también sugiere que los individuos con deficiencia de C1q pueden ser más propensos a desarrollar el dengue

hemorrágico. La deficiencia parcial de C4, otro miembro del sistema del complemento, también puede predisponer a complicaciones oculares atípicas de la infección por dengue [Chang et al., 2007]. Polimorfismos genéticos que confieren protección frente al desarrollo de dengues graves también se han descrito recientemente en la unión de lectina a manosa 2 (MBL2) gen y en el locus de HLA de clase II [Acioli-Santos et al., 2008; Nguyen et al., 2008].

Grupos sanguíneos. Un estudio reveló que los niños con infección secundaria por el virus del dengue y tipo sanguíneo AB presentaban más probabilidades de desarrollar FHD ante una infección secundaria en comparación con los niños de tipo sanguíneo O, A y B por lo que se asoció el tipo sanguíneo de los pacientes con el desarrollo de las formas clínicas del dengue [Halsted, 2005]

Inmuno-fisiopatología de dengue

Hay muchas hipótesis sobre la patogénesis de la fiebre hemorrágica por dengue que han sido postuladas por Rosen, Hammon y Pavri. Pero la hipótesis más aceptada mundialmente ha sido la que postularon Halstead y colaboradores, conocida como “teoría secuencial”. Se apoya en datos epidemiológicos y experimentación en animales, según los cuales la FHD/SCD se presenta en personas que ya tienen anticuerpos de un serotipo de dengue (adquiridos estos anticuerpos en forma activa o pasiva) los cuales en presencia de una segunda infección por otro serotipo formarían inmunocomplejos con el virus infectante. También le da mucha importancia al tipo de secuencia viral, pues se ha comprobado que cuando el segundo virus es de los serotipos 2 y 3 existe mayor posibilidad de dengue hemorrágico que cuando lo es DENV-4. Al parecer, los Acs neutralizantes heterotípicos de reacción cruzada aumentan la severidad de una infección secundaria. En la infección primaria se incrementan los Acs neutralizantes que pueden ser altamente específicos (monotípicos). La evidencia actual apoya fuertemente la existencia de un proceso Inmunológico en la patogenia de la FHD/SCD. En Cuba, tras estudiarse las diferentes hipótesis y a la luz de la epidemia de 1981, se formuló una hipótesis integral, en la cual se reconocía el valor del criterio de Rosen en cuanto a la importancia de la virulencia de la cepa y el de Halstead en cuanto a la importancia de anticuerpos preexistentes [Martinez et al., 2006].

Fue necesario que coexistieran factores de tres tipos: epidemiológicos, virales y del huésped. Entre los factores epidemiológicos necesarios para la producción de una epidemia de FHD/SCD, que se cumplieron en Cuba en 1981, se encuentran la presencia de una masa crítica de población susceptible, que existía porque antes de la circulación del DENV- 1 en 1977, durante cuatro décadas, no se había detectado circulación de virus del dengue; y la presencia de una alta densidad del vector, condición que también existió por desatención de la Campaña Anti-*Aedes* durante ese período e intervalo de tiempo entre dos infecciones, generalmente postulado entre dos y cinco años.

Este último factor se cumplió en 1981, pues el DENV-2 circuló apenas cuatro años después de haber circulado el DENV-1. No obstante, los casos de FHD/SCD que se presentaron en

Santiago de Cuba, en 1997, fueron infectados por el DENV-2 casi 20 años después de la infección por el DENV-1 [Astudillo, 1989; James, 1991].

Los factores virales incluyen el serotipo que esté circulando en un momento dado y, sobre todo, la virulencia de la cepa circulante. En la epidemia cubana de 1981, la virulencia de la cepa que circuló aparentemente fue aumentando a medida que el agente pasaba por el huésped humano. Esto es apoyado por cifras tales como la tasa de casos fatales en relación con el número de enfermos en un período dado, así como la severidad de la enfermedad, expresada en el porcentaje de casos considerados como graves. El último aspecto referido ha sido negado por Rigau y colaboradores de acuerdo con el estudio hecho en Puerto Rico sobre los casos de 1989 a 1992 [Organización Panamericana de la Salud, 1996].

Se han señalado, entre otros factores, la edad, el sexo, el estado nutricional y la presencia de Ac preexistentes. En el caso de la FHD/SCD, según algunos, el buen estado nutricional facilitaría la presentación de formas graves de la enfermedad [Organización Mundial de la Salud, 2000].

Poco después de la picadura de un mosquito infectado, el virus interacciona con las células Langerhans (célula dendrítica) de la epidermis y las penetra mediante el receptor DC-SIGN. Estas son las células dianas primarias y presentadoras de antígenos por excelencia en la etapa más tempranas de la infección con dengue. El receptor DC-SIGN, es una molécula específica de las células dendríticas con capacidad de unirse a moléculas diferentes de las integrinas [Navarro-Sanchez, 2003]. También se ha descrito que el receptor de manosa (MBP) podría permitir la entrada del virus a la célula [Miller et al., 2008]. Estas interacciones se muestran para permitir la endocitosis mediada por clatrina o mediada por Rab5 y el proceso de transporte, y para apoyar la replicación viral [Krishnan, 2007; Van der Schaar et al., 2007]. En el interior de estas células se producen partículas virales (vesículas, vacuolas), hipertrofia del retículo endoplasmático, aumento de la mitocondria y se expresan marcadores de maduración B7-1, B7-2, HLA-DR, CD11, CD83; Esto conduce a la activación de las células dendríticas, los complejos antígeno-MHC clase II son reconocidos por los linfocitos T colaboradores (CD4), se activan con producción de

TNF α , IFN γ e IL-2, que conduce a su crecimiento y extensión mediante estimulación autocrina y paracrina [Huber, 1993]. Además estimulan a las células B para producir anticuerpos, la presencia o ausencia relativa de IFN α en el microambiente celular modula la intensidad de la inmunidad celular. Mientras las células dendríticas se han ido desplazando hacia los vasos linfáticos y los ganglios linfáticos donde generalmente ocurre el contacto con las células T, los virus que han penetrado la dermis son reconocidos por los macrófagos allí existentes, así como por las células del endotelio vascular. Recientemente se observó que la interacción de estas células estimula mayor producción de quimiocinas CXCL9, 10 y 11, que puede representar predictores de severidad de la enfermedad [Dejnirattisai et al., 2008]. La activación de los linfocitos CD8⁺ ocurre posteriormente. La respuesta de las células T CD8⁺ al virus dengue son específicas de serotipo y de reacción cruzada contra otros serotipos, su acción es citolítica directa, produce citoquinas IL-2 e IFN γ y reconoce las proteínas virales prM, E, NS1-2A y NS-3 [Mangada, 2005]. Las citoquinas producidas por células T CD4⁺ y CD8⁺ actuarían directamente sobre la célula endotelial, así como el TNF α liberado por los monocitos activados antes de ser objeto de citólisis por los linfocitos T. El sistema del complemento, activado por los inmunocomplejos (virus-anticuerpos heterotípicos) liberaría anafilotoxinas (C3a, C5a). De conjunto, producirían la extravasación plasmática, elemento fundamental de la FHD [Rothman and Ennis, 1999].

Anormalmente la elevada respuesta de células T está basada por una reacción cruzada con células T de memoria. De acuerdo con el modelo "pecado original antigénico", de baja afinidad células T de memoria generados durante la infección primaria por DENV-1 se expandió de manera selectiva durante una infección secundaria heterólogos, antes de la activación de las células T vírgenes de mayor avidez para el segundo serotipo DEN [Chaturvedi, 2000]. El resultado de esta respuesta amnésica de células T es un fenotipo apoptótico con una capacidad de eliminación de las células subóptimas DEN-infectados, y la producción de citoquinas [Mangada, 2005], lo que aumenta la permeabilidad vascular y contribuye a la patogénesis de DH / DSS [Basu and Chaturvedi, 2008; Chaturvedi, 2007; Lin et al., 2006]. La infección por dengue causa una enfermedad que incluye formas clínicamente inaparentes hasta cuadros graves de hemorragia y choque [Rothman and Ennis, 1999].

Las principales manifestaciones clínicas de la fiebre por dengue comienzan de 2 a 5 días después de la picadura infectante del mosquito el inicio de la fiebre puede ser súbito o con síntomas prodrómicos de malestar, escalofríos y cefalea, luego aparece dolor en las articulaciones, músculos y dolor retro-orbital. La temperatura retorna a lo normal después de 5 a 6 días o ceder al 3^{er} día e incrementarse de nuevo de 5 a 8 días después del inicio. Puede aparecer exantema maculopapular al 3^{er} o 4^{to} día y persistir durante 24 a 72 horas; se atenúa con la descamación, con frecuencia hay adenopatías, leucopenia con marcada leucocitosis.

La fiebre hemorrágica del dengue es el síndrome más grave, el cual se presenta a veces en personas (comúnmente en niños y mujeres) que adquirieron anticuerpos en forma pasiva (en el caso de los niños) o produjeron endógenamente anticuerpos heterólogos al dengue. A veces sobreviene Síndrome de Choque por Dengue (SCD) caracterizado por extravasación de líquidos a través de los endotelios, expresada en derrames en cavidades serosas, edema, estado de choque, hemoconcentración, hemorragias, trombocitopenia y otras alteraciones de la sangre, así como la afectación visceral (hígado, corazón, encéfalo) y de los linfocitos y órganos linfoides [Jaramillo, 2000].

Las hemorragias en el dengue son un fenómeno multicausal: vasculopatía, trombocitopenia, trastornos de la coagulación y otros (En pacientes con FHD/SCD se ha evidenciado que algunas citoquinas están asociadas con marcadores de activación de la coagulación y la fibrinólisis). La trombocitopenia no parece determinada por una disminución en la producción sino por aumento de la destrucción periférica [Camacho et al., 2004]. En cambio otros autores señalan que los mecanismos inmunes de trombocitopenia incluyen producción de plaquetas disminuida y la destrucción de plaquetas aumentada [Isarangkura et al., 1987; Mitrakul et al., 1977]. Se ha demostrado un acortamiento de la vida media de las plaquetas y diferentes explicaciones se han dado a este fenómeno. Hoy se acepta que los mecanismos que determinan trombocitopenia en el curso de infecciones virales pueden ser multifactoriales, entre ellos: a) la penetración del virus en las plaquetas o sus precursores los megacariocitos, los cuales ofrecen un medio adecuado para la replicación viral, b) los

virus pueden fijarse o adsorberse a las plaquetas provocando su agregación o degranulación, lo cual puede conducir a trombosis intravascular con depleción de las plaquetas y factores de la coagulación y c) mecanismos de tipo inmunológico.

Las respuestas autoinmunes contra los componentes virales de reacción cruzada, tales como la producción de anticuerpos específicos para dengue no estructural 1 (NS1) de proteínas, puede conducir a la lisis de plaquetas y de la apoptosis mediada por óxido nítrico de las células endoteliales, contribuyendo a la trombocitopenia y daño vascular [Lin et al., 2008; Lin et al., 2006]. El análisis proteómico ha revelado recientemente varios autoantígenos candidatos en las células endoteliales reconocida por anticuerpos anti-NS1 [Cheng et al., 2009]. La Proteína NS1 y anticuerpos anti-NS1 también han sido ampliamente implicados en la activación del complemento, otro acontecimiento clave que subyace en la mediación de extravasación del plasma [Guzmán, 2007]. Por otra parte, la formación de complejos entre NS1 y el complemento Clusterin factor inhibidor se informó que interfiere con la inhibición de complemento activando el sistema y contribuir a fuga vascular [Kurosu et al., 2007].

La formación de complejos virus – anticuerpo pocos días después de la segunda infección por dengue y el incremento de los Acs no neutralizantes promueven la infección de un número mayor de células mononucleares, seguida por la liberación de citocinas, mediadores vasoactivos y procoagulantes, los cuales conducen a Coagulación Intravascular Diseminada (CID). En la actualidad varios autores la han considerado como el factor más importante de las hemorragias. Sin embargo, no fue frecuente durante la epidemia cubana de 1981, encontrándose apenas en 11% de los pacientes [Camacho et al., 2004].

Marcadores hematológicos

Recuento Leucocitario. Los glóbulos blancos (o leucocitos) son células cuya función esencial es la de defender al organismo de los agentes patógenos; a pesar que en ciertas ocasiones pueden arremeter contra propios tejidos normales del cuerpo. Por tanto, los leucocitos forman parte de la primera línea en las defensas inmunitarias. El conjunto de estos glóbulos blancos se origina en la propia médula ósea a partir de células madres. La vida media varía de 13 – 20 días [Fischbach´s., 2000].

Los dos tipos principales de los leucocitos son los leucocitos granulocitos ó polimorfonucleares, entre ellos están los neutrófilos, eosinófilos, y basófilos; y los agranulocitos ó mononucleares, entre los que se encuentran los linfocitos y los monocitos. Los primeros se caracterizan por tener un núcleo fragmentado; mientras que, los segundos poseen claramente un núcleo unido e individualizado. Principio: La sangre con anticoagulante se deposita en un liquido diluyente (solución de Turk) que permite evidenciar los leucocitos, manteniéndolos visibles, mientras que los eritrocitos son hemolizados. El recuento del número de leucocitos se expresa por mm^3 (milímetro cúbico) y se realiza añadiendo a un tubo 380 μl de solución diluyente y agregando con una pipeta automática 20 μl de sangre, se mezcla con rotador automático (vortex) por 2 ó 3 minutos (min) luego se realiza el montaje en la cámara de Neubauer que es llenada por capilaridad, se deja en reposo de 1 a 3 min para que las células se sedimenten. Enfocar con el objetivo de 10X y cambiar al objetivo de 40X para realizar el conteo. Valores de referencia: 5,000 – 10,000/ mm^3 . De acuerdo a los valores obtenidos podemos decir que hay leucocitosis cuando aumentan los leucocitos por encima de 10,000/ mm^3 y suele deberse a leucemias, Sarampión, tos ferina, hemorragia aguda, Traumatismo o lesión hística (cirugía) y hemolisis aguda, entre otras; Leucopenia cuando hay reducción de leucocitos por debajo de 5,000/ mm^3 y se observa en infecciones virales, algunas bacterianas e infecciones muy graves, hiperesplenismo, depresión de la médula ósea inducida por fármacos como antibióticos, antihistamínicos, quimioterapia contra el cáncer, leucemia, y anemia aplásica[Fischbach´s., 2000].

Leucograma o frotis de sangre periférica. Leucocitos se dividen en dos grupos principales: granulocitos y agranulocitos. Los granulocitos reciben su nombre por los gránulos que contienen en el citoplasma. Sin embargo, cada una de estas células contiene un núcleo multilobulado, por lo que también se denominan leucocitos polimorfonucleares. Los agranulocitos, no contienen gránulos y sus núcleos tampoco son lobulados, no son necesariamente esféricos, por lo que también se denominan leucocitos mononucleares. Según esta clasificación, en la cuenta leucocitaria total pueden observarse 5 tipos de leucocitos: Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos, Linfocitos, Monocitos; cada uno de ellos tiene una función específica por lo que funcionan contra infecciones pirógenas, contra trastornos alérgicos e infecciones parasitarias, contra infecciones parasitarias, contra infecciones virales (Dengue, sarampión, rubéola, varicela) y actúan en infecciones graves mediante fagocitosis, respectivamente. Los linfocitos y monocitos se desarrollan principalmente en los tejidos linfoides del cuerpo, como ganglios linfáticos, folículos linfoides del bazo y tracto gastrointestinal, amígdalas y otros sitios; los linfocitos son células esféricas, con diámetro que varía de 6 – 8µm, su núcleo es tan grande que llena casi toda la célula, dejando solo un estrecho anillo de citoplasma. El núcleo aparece esférico, la cromatina densa del núcleo se tiñe intensamente. El citoplasma toma una coloración basófila debido a una concentración de ribosomas, la intensidad varía de azul celeste a azul oscuro [Fischbach´s., 2000].

Los monocitos son células grandes cuyo diámetro suele ser de 15-18 µm con un citoplasma que se colorea de azul grisáceo, en el cual pueden reconocerse unos finos gránulos azurófilos y vacuolas, el núcleo es excéntrico redondo o reniforme y puede mostrar una profunda depresión o forma de herradura en las células más viejas [Fischbach´s., 2000].

Según sus características morfológicas, se pueden observar y distinguir en el extendido periférico, el cual se realiza colocando una gota de sangre aproximadamente 10µl, luego se sostiene el portaobjeto conteniendo la gota con una mano y con la otra se coloca el borde del portaobjeto (en un ángulo de 30°) que se utiliza para extender el frotis, se desplaza el portaobjeto hacia atrás hasta que toque la gota de sangre y se deja que la gota se extienda por el borde del portaobjeto a continuación se desliza hacia el extremo opuesto con un

movimiento suave. Se confirmará si la extensión está bien hecha si esta cuenta con cabeza, cuerpo y cola. Se deja secar y luego se tiñe con la tinción de Wright durante 5 minutos, se diluye con agua destilada se deja 5 minutos y luego enjuagar con agua; se deja secar y posteriormente se examina con el objetivo de inmersión (100X) en la parte final del cuerpo y comienzo de la cola, el conteo se realiza con el contador de células recorriendo de izquierda a derecha o de arriba hacia abajo hasta contar 100 leucocitos anotando el número que se ha encontrado de cada tipo de ellos (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, monocitos y basófilos) cuyos valores de referencia (65 – 75%, 23 – 32%, 3 – 8 %, 2 – 4 % y 0 – 1%, respectivamente) varían según el método utilizado (manual y/o automatizado). El Significado clínico se evidencia según los resultados. Presenciamos la linfocitosis (valor >32%) en infecciones como tos ferina, sífilis, dengue, tuberculosis, hepatitis, mononucleosis infecciosa, parotiditis, rubeola, infección por citomegalovirus, entre otras. Linfopenia (valor < 23%) en enfermedades debilitantes graves como insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia renal y tuberculosis avanzada, defectos en la circulación linfática, niveles elevados de corticoides suprarrenales, inmunodeficiencia por acción de inmunosupresores [Fischbach´s., 2000].

Determinación del volumen globular (hematocrito). Los glóbulos rojos (o eritrocitos) son células de forma bicóncava que exhiben una moderada variación de tamaño con un diámetro que va de 6.7 hasta 7.7 μm (micras), de espesor de 2 μm y de 1 μm en el centro aproximadamente, y siendo el volumen medio de 83 μm^3 , esta morfología le permite utilizar la máxima cantidad de hemoglobina y proporcionarle un área superficial mayor para que ésta se combine con el oxígeno, además los glóbulos se deforman con facilidad debido a su flexibilidad cuando es necesario atravesar los capilares más pequeños, de ahí las variaciones de forma en los frotis sanguíneos [Fischbach´s., 2000].

Principio: El hematocrito mide la fracción que comprende a los glóbulos rojos (masa globular), respecto al volumen total de la muestra de sangre venosa o capilar. Su valor se expresa en porcentaje. El análisis se realiza tomando la muestra en capilares rojos heparinizados directamente del dedo, o utilizar azules sin heparina para sangre venosa con anticoagulante EDTA. Debe llenarse aproximadamente $\frac{3}{4}$ del capilar. Ocluir un extremo

del capilar con cera, luego colocar el capilar en una centrifuga de microhematocrito, con el extremo ocluido adherido al reborde externo de la plataforma, centrifugar por 5 minutos a 12,000 rpm. Posteriormente la lectura se realiza sosteniendo el tubo frente a la escala de manera que el fondo de la columna de eritrocitos quede exactamente al mismo nivel de la línea horizontal correspondiente al cero; Desplazar el tubo a través de la *escala hasta que la línea marcada con el numero 1.0 quede al nivel del tope de la columna de plasma, vigile que el fondo de la columna de eritrocitos continúe sobre la línea cero, el tubo debe encontrarse en posición vertical. La línea que pase al nivel del tope de la columna de eritrocitos indicara la fracción del volumen de éstos. Los valores de referencia en recién nacidos, lactantes (3 meses), niños (5 años), mujeres y hombres son 50% - 58%, 37% - 42%, 38% - 44%, 38% - 44% y 40% - 50%, respectivamente.

*La lectura se realiza con una escala estandarizada que expenden en el comercio.

Recuento de plaquetas. Las plaquetas (o trombocitos) son pequeños fragmentos de citoplasma que se desprenden de la periferia de los megacariocitos en la médula ósea, suelen medir de 2-3 μ m de diámetro, pero varían de 1-4 μ m, son anucleadas redondas u ovaladas y planas; Su vida media es de 7.5 días, normalmente 66% de las plaquetas se localizan en la circulación de la sangre y 33% se localiza en el bazo (órgano que participa en su liberación a la circulación). La función de las plaquetas es de participar en el proceso inicial de la coagulación de la sangre, integridad vascular y vasoconstricción; la adherencia y agregación es indispensable para que se forme un tapón que ocluye la rotura de los capilares [Fischbach's., 2000]. Principio: la sangre se diluye con una sustancia (solución diluyente: Oxalato de amonio) que hemolisa los glóbulos rojos y diluye los leucocitos, quedando las plaquetas libres. Mezclar bien la muestra de sangre obtenida con EDTA, posteriormente se miden 1980 μ l de solución diluyente en un tubo de 12x75mm, luego se aspira con una pipeta automática 20 μ l de sangre (dilución 1:100) y se limpia el interior de la punta, se descarga el contenido de la pipeta en el líquido diluyente, enjuagando la pipeta varias veces, se mezcla bien por 2 minutos en un vortex, luego se llena debidamente la cámara y se coloca en un plato petry (que contenga en el fondo un papel filtro mojado para evitar la evaporación) durante 15 minutos para permitir que las plaquetas se sedimenten. Usando el objetivo de 10x se enfoca el área rayada de la cámara y con el de 40x se cuenta

en el retículo de Thoma los 5 cuadros del recuento de glóbulos rojos. Valores de referencia 140,000 – 350,000/mm³. Se observa trombocitosis (trombocitemia >350,000/mm³) en cáncer, infecciones agudas, enfermedades inflamatorias, leucemia mielógena crónica y granulocítica, esplenectomía, deficiencia de hierro y después de anemias hemorrágicas. Se observa trombocitopenia (<100,000/mm³) en transfusión sanguínea masiva (efecto de dilución), infección por virus y bacterias, hepatopatía, hipertiroidismo y lesión de la médula ósea.

Fragilidad capilar (prueba del torniquete). Las petequias son producidas por pequeños derrames vasculares cutáneos causados por extravasación de un número pequeño de eritrocitos debido al daño capilar. En la piel se observan del tamaño de una cabeza de alfiler, inicialmente son de color rojo, violáceo o negruzco y cambian después hacia el verde, el amarillo y el marrón a consecuencia de los sucesivos cambios químicos de la sangre.

La prueba de Rumpel-Leede (del lazo o de torniquete) es una técnica que ofrece información sobre la fragilidad capilar, y se usa como diagnóstico diferencial en enfermedades como el dengue y otros trastornos hemorrágicos. La técnica consiste en someter el antebrazo del paciente a una presión intermedia entre la sistólica y la diastólica durante 5 minutos. Tras la retirada del manguito de presión y esperar a que la piel recupere su estado relajado se observa la zona presionada. El conteo de petequias producidas por la fragilidad capilar en un área de unos 10 cm² superior a 30 es positivo del signo de Rumpel-Leede. No repetir en el mismo miembro antes de los 7 días. Los valores normales: ninguna petequia o hasta 10 petequias en un área de 5 cm. Escala para informar el número de petequias: 0 a 10 = 1+, 10 a 20 = 2+, 20 a 50 = 3+, 50 o más petequias = 4+. Valores aumentados: pueden indicar coagulación intravascular difusa, disminución del fibrinógeno, disminución de la protrombina, deficiencia de factor VII, trombocitopenia, tromboastenia, enfermedad de Von Willebrand, deficiencia de vitamina K. Y puede estar asociado a afecciones no relacionadas con los trastornos de la coagulación como escarlatina, hipertensión, diabetes, gripe, sarampión y escorbuto.

Mecanismo de la hemostasia.

El término hemostasia significa prevención de la pérdida de sangre; y se define como la serie de mecanismos que evitan que se mantenga en el tiempo una pérdida de sangre cuando se produce situación de continuidad entre el vaso y el medio interno (hemorragia interna), o entre el vaso y el medio externo (hemorragia externa). Es un proceso complejo el cual involucra mecanismos que actúan paralelamente.

Para comprender esto, resulta esencial explicar la naturaleza de las plaquetas. Estas llamadas también trombocitos son discos redondos u ovals minúsculos, varían de 1 a 4 μ m de diámetro; se forman en la médula ósea a partir de los megacariocitos, que se fragmentan y forman diminutas plaquetas, poseen muchas características funcionales de las células completas, aunque no tienen núcleos ni se reproducen. Su citoplasma contiene varios factores activos como: moléculas de actina y miosina, similares a las de las células musculares, así como otra proteína contráctil, la trombostenina, que determina una contracción de las plaquetas. También contienen restos de retículo endoplásmico y del aparato de Golgi que sintetizan diversas enzimas y almacenan grandes cantidades de iones de calcio. Contienen además, mitocondrias y sistemas enzimáticos capaces de formar trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP) y prostaglandinas que producen reacciones vasculares y tisulares locales. También contiene un factor estabilizador de la fibrina y un factor de crecimiento. La membrana celular, posee en su superficie una cubierta de glucoproteínas que evita su adherencia al endotelio normal, pero no a las áreas lesionadas de la pared vascular, especialmente a las células endoteliales lesionadas, e incluso en mayor medida a cualquier colágeno expuesto de la profundidad de la pared vascular; además, contienen grandes cantidades de fosfolípidos que desempeñan varias funciones en la activación de múltiples puntos del proceso de la coagulación de la sangre. Por tanto, la plaqueta es una estructura activa que posee una semivida en la sangre de 8 a 12 días, después se elimina de la circulación principalmente por el sistema de macrófagos tisulares. Más de la mitad de las plaquetas son suprimidas por los macrófagos del bazo [Harrison.].

Constricción vascular. Lo primero que se produce cuando se rompe un vaso sanguíneo es una vasoconstricción local, de modo que la sangre no sale inmediatamente después de la lesión. Se realiza en base a la liberación local del neurotransmisor norepinefrina (N.E.) por las vesículas que se forman en los nervios simpáticos de la pared de los vasos sanguíneos. Los axones poseen varicosidades o ensanchamientos, donde se encuentran reunidas las vesículas con el neurotransmisor. Cuando una célula es dañada libera su K^+ al exterior, por lo que aumenta la concentración de éste alrededor del axón simpático, despolarizándolo y de esta manera entra Calcio al interior, permitiendo la exocitosis de las vesículas con N.E. al exterior.

Luego paralelamente, cuando las plaquetas entra en contacto con el subendotelio (el endotelio que se ha roto) se unen con sustancias que son extrañas como las fibras de colágeno de la pared vascular; entonces las plaquetas que tienen receptores para colágeno se fijan a éste produciendo una reacción de activación plaquetaria, que implica la ruptura de su glicocálix que le daba forma. Al romperse, las plaquetas se deforman, empiezan a hincharse, adoptando formas irregulares con numerosos pseudópodos, esto hace que se encuentren unas con otras y se fusionen los pseudópodos de las distintas plaquetas que han llegado al sitio de la lesión, además se produce lo que se llama membrana evertida, en la cual se expone al exterior lo que normalmente esta en el interior de la membrana en especial a los fosfolípidos, lo que tiene gran importancia en el proceso coagulativo, además las plaquetas contribuyen a prolongar la vasoconstricción mediante sus proteínas contráctiles que se contraen poderosamente secretando serotonina, adrenalina y ADP (agregantes plaquetarios) [Harrison.].

En el subendotelio existe un factor de adhesión plaquetaria (Von Willebrand) producido por las células endoteliales y que es secretado a dos compartimientos: al subendotelio, donde juega un rol en la adhesión plaquetaria, provocando una adhesión fuerte entre las plaquetas y así logran resistir el paso de la sangre; y también es secretado a la circulación, donde tiene un rol en la permanencia de uno de los factores de la coagulación, el factor antihemofílico A (VIII). Las plaquetas activadas comienzan a sintetizar Tromboxano A^2 que también es vasoconstrictor, y la adhesividad de estas nuevas plaquetas facilita su

adherencia a las plaquetas activadas originalmente. Pero no es conveniente que la vasoconstricción se mantenga por mucho tiempo, de hecho, ya no es necesaria una vez que se formó el trombo plaquetario porque ya detuvo el sangramiento. La vasoconstricción termina de forma activa, mediante una vasodilatación provocada por Prostaciclina (antiagregante plaquetario), que son producidas por las células endoteliales, y de esta manera el tejido recupera su irrigación. Así es como se forma el tapón hemostático temporal o trombo plaquetario [Harrison.].

Paralelamente, se produce el proceso de coagulación cuyo objetivo es llegar a formar trombina a partir de protrombina para llegar a formar el tapón hemostático definitivo. La producción de trombina depende de una cascada de reacciones que proceden de dos vías:

Vía extrínseca. Solamente ocurre cuando hay una lesión en el vaso sanguíneo. (La coagulación se produce en 15 segundos). El tejido lesionado libera un complejo de varios factores llamado factor tisular o tromboplastina tisular (Factor III), que se compone en especial de fosfolípidos de las membranas tisulares y de un complejo lipoproteico que actúa sobre todo como una enzima proteolítica. La activación requiere que el factor VII se active al entrar en contacto con dicha proteína del subendotelio. Para la activación del factor X, se necesita que el factor III se una en un complejo con el factor VII de la coagulación, y en presencia de iones de calcio, actúa enzimáticamente sobre el factor X para dar el factor X activado (Xa). En este punto el sistema de coagulación extrínseco se une con el intrínseco y las etapas que originan la formación de fibrina son idénticas. El factor Xa se combina de inmediato con los fosfolípidos tisulares, que integran el factor tisular, o con los fosfolípidos adicionales liberados de las plaquetas, así como con el factor V para dar el complejo llamado activador de la protrombina, a pocos segundos y en presencia de iones de Ca^{++} éste escinde la protrombina para formar trombina. (Anexo 2)

Vía intrínseca. Está ocurriendo todo el tiempo, pero muy lentamente, de tal manera que cualquier producto que se forme a partir de esta vía es retirado de la circulación por

mecanismos limitantes de la coagulación y fibrinolíticos. (1 – 6 minutos para la coagulación). El traumatismo sanguíneo produce: a) la activación del factor XII y b) la liberación de fosfolípidos plaquetarios. La pérdida de integridad del endotelio vascular expone la sangre circulante al colágeno, altera dos factores importantes: el factor XII y las plaquetas, cuando se altera el factor XII una enzima proteolítica lo convierte en factor XIIa, al mismo tiempo el traumatismo sanguíneo lesiona las plaquetas como consecuencia de su adhesión, de esta forma se liberan fosfolípidos plaquetarios que contienen la lipoproteína llamada factor plaquetario³. El factor XIIa actúa enzimáticamente sobre el factor XI para activarlo, esta reacción también precisa de cininógeno HMW (del inglés, high-molecular weight, de peso molecular (PM) elevado) y se acelera por la precalicreína. El factor XIa actúa entonces sobre el factor IX de forma enzimática para activarlo. El factor IXa , junto con el factor VIIIa, los fosfolípidos y el factor 3 de las plaquetas lesionadas, activan el factor X, las plaquetas son el factor de coagulación que falta en la enfermedad hemorrágica llamada trombocitopenia. Este paso coincide con el último de la vía extrínseca, es decir el factor Xa se combina con el factor V y los fosfolípidos plaquetarios o tisulares para formar el complejo llamado activador de la protrombina, este inicia a su vez en cuestión de segundos, la escisión de la protrombina para formar trombina[Harrison.].

Todo este proceso, lleva a la formación de trombina, que es una enzima proteolítica cuya función es de atacar proteolíticamente al fibrinógeno, que se encuentra en el plasma sanguíneo, por sus extremos. El producto de estos son los monómeros de fibrina, que tienen una carga positiva en un extremo y una negativa en el otro extremo, de esta manera se unirán los monómeros a través de las cargas. Se formaran grandes hilos de fibrina, donde quedaran atrapados los glóbulos rojos y se originará un tapón hemostático definitivo que es el coágulo.

Los tejidos lesionados y el endotelio vascular liberan muy lentamente un poderoso activador llamado activador del plasminógeno tisular (t-PA) que alrededor de un día después y una vez que el coágulo ha detenido la hemorragia, convierte finalmente el plasminógeno en plasmina que, a su vez digiere las fibras de fibrina así como otros coagulantes protéicos como el fibrinógeno, el factor V, el factor VIII, la protrombina y el factor XII, de esta forma se elimina el coágulo [Harrison.].

MATERIAL Y MÉTODO

Tipo y diseño de estudio: Estudio descriptivo - retrospectivo de corte transversal.

Universo de estudio: El total de pacientes del municipio de León, infectados con el virus del Dengue entre el 2005 – 2008.

Selección y tamaño de muestra: Se obtendrá la información a partir de fuente secundaria, se seleccionaron un total de 127 pacientes (Expedientes), que cumplan con todos los criterios de inclusión.

Unidad de análisis: Expedientes de pacientes con diagnóstico clínico de Dengue Hemorrágico, durante el 2005 – 2008.

Criterios de inclusión:

- Pacientes hospitalizados entre el 2005 – 2008.
- Casos clínicamente diagnosticados como dengue hemorrágico según la clasificación de la OMS.
- Información de la evolución de los pacientes en el expediente clínico relacionada con los marcadores hematológicos.

Criterios de exclusión:

- Datos incompletos en el expediente.

Procedimiento y recolección de información: Una vez obtenido el permiso del Dr. Marcial Montes, sub-director del Hospital, para acceder a los expedientes con diagnóstico clínico de dengue hemorrágico, se realizó la recolección de información clínica y epidemiológica en una ficha de recolección de datos elaborada para este fin. (Anexo 1)

Ética de la investigación: Este estudio es parte del Proyecto de investigación “Dengue – Susceptibilidad” que se lleva a cabo en el departamento de Microbiología de la UNAN-León. Este proyecto fue previamente revisado y aprobado por el comité de ética para las investigaciones biomédicas (CEIB) de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNAN- León (ver copia del acta del comité de ética).

Plan de análisis: La información de cada ficha se vaciará en una base de datos elaborada en SPSS 14.0 y con este programa se realizarán análisis en tablas de 2X2, cálculos de porcentaje, promedios y frecuencias.

RESULTADOS

Características demográficas de los pacientes. Un total de 127 pacientes ingresados en el HEODRA con diagnóstico clínico de dengue hemorrágico fueron incluidos en este estudio. El 52% de esos pacientes fueron del sexo femenino, la edad promedio fue de 20 años (1 – 67 años) y el mayor número de pacientes estaban entre las edades de 6 a 15 años (39%). De acuerdo a la procedencia, el 79% de individuos estudiados eran del municipio de León. En relación a la ocupación, la mayoría fueron estudiantes con 49.2%, seguido de obreros con 12.5%, amas de casa con 11%, y profesionales de distintos perfiles cuyo ambiente de trabajo es la oficina con ≤ 6.3 (Tabla 1).

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes.

Parámetros	n	(%)
Sexo		
Femenino	66	(52%)
Masculino	61	(48%)
Edades (años)		
≤ 5	9	(7%)
6 – 15	50	(39%)
16 -25	37	(29%)
≥ 26	31	(24%)
Procedencia		
León	101	(79.6%)
Otros municipios	26	(20.4%)
Actividad a la que se dedica		
Estudiante	63	(49.2%)
Obrero	16	(12.5%)
Ama de Casa	14	(11%)
Trabajo de Oficina	8	(6.3%)
Otros	15	(11.7%)
SD	11	(8.6%)

Características clínicas. De los 127 pacientes en estudio las manifestaciones clínicas más relevantes fueron fiebre (95%), escalofríos (75.6%), vómitos (62.2%), cefalea (59.1%), mialgia (55.1%), dolor abdominal (48.8%), anorexia (41.7%), dolor retro-orbital (34.6%), tos (22%) y artralgia (11%) (Tabla 2).

Tabla 2. Características clínicas relacionadas con la enfermedad

Características clínicas	n (%)
Fiebre	121 (95)
Escalofríos	96 (75.6)
Vómitos	79 (62.2)
Cefalea	75 (59.1)
Mialgia	70 (55.1)
Dolor abdominal	62 (48.8)
Anorexia	53 (41.7)
Dolor retro-orbital	44 (34.6)
Tos	28 (22)
Artralgia	14 (11)
Diarrea	12 (9.4)
Hepatomegalia	4 (3.1)
Disnea	2 (1.6)

Manifestaciones hemorrágicas. Las principales manifestaciones hemorrágicas encontradas en los pacientes investigados fue rash petequial con 18%, seguido de sangrado vaginal 12.5%, gingivorragia con 11.7% y epistaxis 8.6% de casos, derrame pleural, hematemesis, melena, hematuria y ascitis se encontraron en $\leq 4\%$ (Tabla 3).

Tabla 3. Manifestaciones hemorrágicas

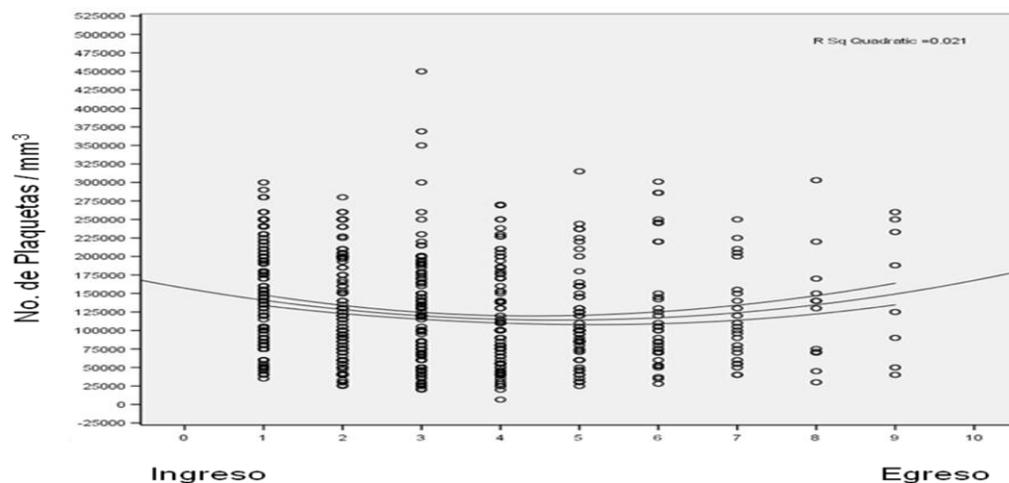
Manifestaciones hemorrágicas	n (%)
Petequia	23 (18)
Hemorragia vaginal	16 (12.5)
Gingivorragia	15 (11.7)
Epistaxis	11 (8.6)
Derrame pleural	5 (3.9)
Hematemesis	4 (3.1)
Melena	2 (1.6%)
Hematuria	2 (1.6%)
Ascitis	0

Comportamiento de los marcadores hematológicos en el curso del dengue hemorrágico.

Trombocitopenia. Del total de pacientes con diagnóstico clínico de dengue hemorrágico el 62% (61/127) presentaron trombocitopenia ($\leq 140,000$). De los pacientes con trombocitopenia 49 presentaron niveles de plaquetas $\leq 100,000$.

Para investigar el comportamiento en los niveles de plaquetas durante el curso de la infección se comparó días de hospitalización y conteo de plaquetas/mm³. Los resultados indican que a partir del día de ingreso existe una tendencia a la disminución en el número de plaquetas, llegando al punto mínimo al 4^{to} día de hospitalización. Posteriormente se observa una recuperación (Fig. 1)

Figura 1. Comportamiento en los niveles de plaquetas durante el curso del dengue hemorrágico, en paciente hospitalizados en el HEODRA entre Enero 2005 y Diciembre 2008. (n = 127)



Hemoconcentración. La mayoría (98%) de los pacientes con diagnóstico clínico de dengue hemorrágico presentaron algún grado ($\geq 1\%$) de hemoconcentración. Sin embargo, solamente 32 de los 127 presentaron incrementos en el hematocrito $\geq 21\%$ (Tabla 4).

Tabla 4. Relación entre el incremento en el porcentaje de hematocrito, grupos de edades y sexo.

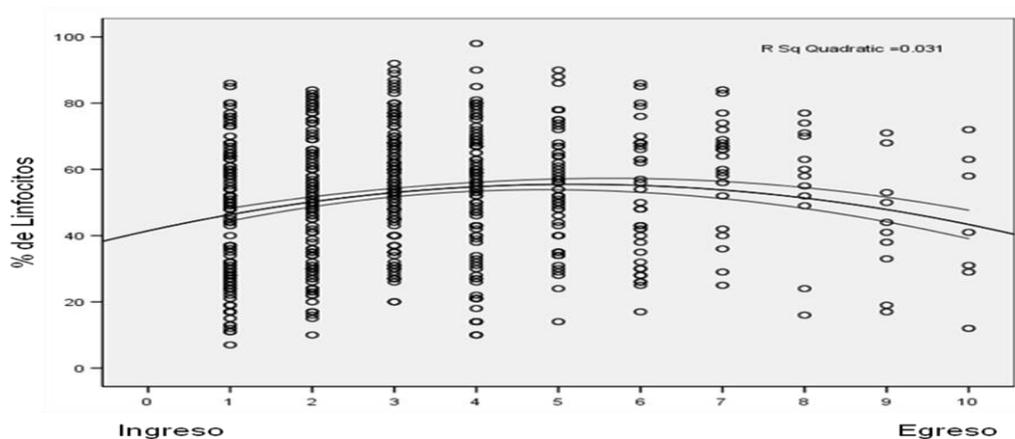
Grupos de edades (años)	Incrementos de hematocritos			Total
	0 a 10%	11 a 20%	$\geq 21\%$	
≤ 5	4	3	2	9
6 – 15	20	17	13	50
16 – 25	15	8	14	37
≥ 26	10	18	3	31
Todas las edades	49	46	32	127
Sexo				
Femenino	24	26	16	66
Masculino	25	20	16	61
Ambos sexos	49	46	32	127

Linfocitosis. El conteo diferencial de glóbulos blancos revela que el 86% (109/127), de los pacientes presentaron algún grado de linfocitosis ($\geq 33\%$). El incremento de linfocitos en el conteo diferencial durante el curso de la infección fue independiente de la edad y el sexo de los pacientes. En un porcentaje importante (17/127) se observaron niveles de linfocitos superiores al 50% (Tabla 5). El porcentaje de linfocitos tiene una tendencia a incrementar desde el ingreso hasta el 4to día de hospitalización y se normaliza hacia el egreso.

Tabla 5. Relación entre los porcentajes de linfocitos, grupos de edad y sexo.

Grupos de edades (años)	Estratos de los porcentajes de Linfocitos			Total
	≤ 22	23 - 32	≥ 33	
≤ 5	0	2	7	9
6 – 15	0	6	44	50
16 – 25	2	2	33	37
≥ 26	0	6	25	31
Todas las edades	2	16	109	127
Sexo				
Femenino	2	7	57	66
Masculino	0	9	52	61
Ambos sexos	2	16	109	127

Figura 2. Comportamiento en los niveles de Linfocitos durante el curso del dengue hemorrágico, en pacientes hospitalizados en el HEODRA entre enero 2005 y Diciembre 2008. (n = 127).



Relación entre los marcadores hematológicos y manifestaciones hemorrágicas. Para investigar si existe alguna asociación entre las manifestaciones hemorrágicas y algunos marcadores hematológicos, todos los pacientes con niveles de plaquetas $\leq 100,000$ (n = 49) y con hematocrito $\geq 21\%$ (n = 32) fueron analizados en relación a las características hemorrágicas que presentaron (Tabla 6). Los resultados revelan que el 69% (34/49) de los pacientes con plaquetas $\leq 100,000$ también presentaron fragilidad capilar, pero de los pacientes hemoconcentrados apenas el 34% (11/32) fueron positivos a la misma prueba (Tabla 6).

Tabla 6. Relación entre los marcadores hematológicos y manifestaciones hemorrágicas

Características hemorrágicas	Marcadores hematológicos	
	Trombocitopenia $\leq 100,000$	Incremento de Hto $\geq 21\%$
Fragilidad capilar (n = 53)	34	11
Petequias (n = 23)	13	3
Gingivorragia (n = 15)	12	6
Hemorragia vaginal (n = 16)	8	6
Epistaxis (n = 11)	7	2
Derrame pleural (n = 5)	5	3
Hematemesis (n = 4)	2	1
Melena (n = 2)	2	0
Hematuria (n = 2)	0	2

DISCUSION

La mayoría de los pacientes investigados en este estudio eran del municipio de León, particularmente del núcleo urbano, esta observación se relaciona con las altas tasas de prevalencia (>90%) observados en los mayores núcleos urbanos de Nicaragua, León y Managua [Balmaseda et al., 2006]. Otro dato relevante es que los grupos de edad más afectados fueron el de 6 – 15 años, seguido por el de 16 a 25 años. Una de las razones por las que estos grupos de edades resultaron más afectados podría estar relacionada con el estado inmunológico o con la historia de las infecciones previas en estos individuos. Una de las primeras teorías para explicar el DH plantea que aquellas personas que han sido inmunizadas con un serotipo en particular podrían desarrollar DH cuando se infectan con un serotipo distinto [Halstead, 2007]. También se ha sugerido que la secuencia de infección es importante, ya que los individuos que se infectan primero con DENV-1 y después con DENV-2 tienen mayor riesgo de desarrollar DH, como se observó en la epidemia de Cuba en 1981 (18). Es muy probable que la mayoría de los individuos entre las edades de 6 a 25 años analizados en este estudio hayan sido infectados previamente con el DENV-3 y -4, serotipos predominantes en los 90s en Nicaragua [Balmaseda et al., 1999], y que la segunda infección haya sido con el DENV-2, el cual predominó entre el 2005 y 2008, entonces la secuencia de infección DENV-3 y DENV-2 o DENV-4 y DENV-2 también podrían ser relevante. Para confirmar esta hipótesis se necesitarían ensayos de neutralización para verificar a cuales serotipos se expusieron estos individuos.

Las características clínicas más relevantes relacionadas con la enfermedad son fiebre, escalofríos, vómitos, cefalea, mialgia, dolor abdominal, anorexia, dolor retro-orbital, tos, artralgia, diarrea, hepatomegalia, y disnea; de las cuales hepatomegalia es una característica clínica fundamental en el DH, las restantes se consideran inespecíficas del DH, pero son utilizadas para la clasificación del dengue clásico realizando un diagnóstico diferencial. Sin embargo, en este estudio solamente el 3 % de los pacientes se les diagnóstico hepatomegalia, indicando la necesidad de equipamiento que permita que todos aquellos pacientes con sospecha de DH puedan acceder a este diagnóstico. Además del estudio hepático mediante ultrasonido también es necesario realizar análisis bioquímico de la

función hepática que incluye la medida de albumina, transaminasas (TGO/AST y TGP/ALT) y bilirrubina directa.

Según la OMS el conteo de plaquetas $<100,000/\text{mm}^3$ y hemoconcentración $>20\%$ sobre el valor normal son criterios para el diagnóstico del DH con alto valor predictivo positivo. En este estudio se observó que el 62 % de los pacientes con DH presentaron trombocitopenia ($<140,000$) y el 38% presentaron niveles de plaquetas $<100,000/\text{mm}^3$. La observación que solamente el 38% de los casos clasificados clínicamente como DH presentaron conteo de plaquetas $<100,000/\text{mm}^3$ indica que los criterios clínicos prevalecen sobre los criterios de la OMS. De hecho en poblaciones bien definidas, donde los criterios de la OMS se aplican estrictamente, se ha observado una concordancia de 88% con relación al diagnóstico realizado por un médico experto [Srikiatkachorn et al., 2010]. Estas observaciones indican que debería realizarse una redefinición de caso de DH, donde el umbral del conteo de plaquetas debería ser superior de 100,000. Por otra parte hay muchos casos que presentan diversas manifestaciones hemorrágicas con conteo de plaquetas normal.

En este estudio, observamos que posterior al ingreso del paciente se produce una fuerte tendencia a disminuir el conteo de las plaquetas alcanzando su punto mínimo en el cuarto día posterior al ingreso, no obstante, ese punto mínimo en la mayoría de los casos es mayor de 100,000. Estos resultados podrían indicar que el criterio para clasificar el caso de DH sería la tendencia a la disminución y no un valor estándar ($<100,000$) como el que se utiliza actualmente.

La causa de la trombocitopenia en la infección con dengue es poco conocida. Algunos autores han observado que en el dengue clásico se produce una disminución en la producción de plaquetas y en el DH se produce un aumento en la destrucción de las mismas [Cardier et al., 2005]. Otros proponen que la reducción de las plaquetas se debe a diversos mecanismos que incluye la repuesta auto-inmune. Mediante análisis proteómicos se ha revelado que los anticuerpos anti-NS1 pueden reconocer varias estructuras en las células endoteliales llevándolas a su destrucción y por tanto facilitar la fuga de plasma.

Un valor de hematocrito superior al 20% del valor normal del paciente es la primera anomalía en el DH. La utilidad de este criterio presenta dificultades porque al ingreso del paciente no se conoce cuál es su valor normal del hematocrito y además estos pacientes reciben rehidratación intravenosa durante la hospitalización ocultando de esta manera la fuga de plasma. Los hallazgos de este estudio son consecuentes con esta hipótesis porque solamente el 25% de los casos clasificados como DH presentaron incremento >20% en el hematocrito. Este hallazgo en el análisis del hematocrito refuerza la idea que debe producirse una redefinición de caso de DH.

Las observaciones presentadas en este estudio son consecuentes con las encontradas en diversos estudios a nivel global y eso ha conducido a una redefinición de la clasificación del dengue. En la “Clasificación revisada del dengue” propuesta por la OMS y actualmente en período de validación se identifican 3 categorías; 1) Dengue sin signos de alarma, 2) Dengue con signos de alarma y 3) Dengue severo. Dengue sin signos de alarma es un caso probable de dengue, que tiene fiebre más 2 de los siguientes criterios: náusea, vómitos, exantema, cefalea, mialgias, artralgias, prueba del torniquete (+), leucopenia y cualquier signo de alarma. Dengue con signos de alarma es un caso con dolor en abdomen espontáneo o provocado, vómitos persistentes, acumulación clínica de fluidos (derrame pleural y ascitis), sangrado de mucosas, letárgica e irritabilidad, hepatomegalia >2cm; análisis de laboratorio: aumento del hematocrito, junto con una rápida caída de las plaquetas. El caso de dengue severo incluye choque por escape severo de líquidos (escape severo de plasma que lleva al choque), acumulación de fluidos y distress respiratorio; hemorragia severa según evaluación del clínico y daño severo a órganos (Hígado, SNC, corazón etc.). (Anexo 3)

CONCLUSIONES

1. De los pacientes con dengue hemorrágico investigados en este estudio, el 52% eran del sexo femenino, la edad promedio fue 20 años, la mayoría (39%) eran 6 – 15 años y el 80% eran de la zona urbana.
2. Las manifestaciones hemorrágicas más comunes fueron rash petequeial (18%), sangrado vaginal (12.5%), gingivorragia (11.7%), epistaxis (9%) y derrame pleural (4%). Hematemesis, melena, hematuria y ascitis se encontraron en $\leq 4\%$.
3. Del total de pacientes investigados 61 (48%) presentaron trombocitopenia $\leq 140,000$ y solamente 49 de esos pacientes presentaron niveles de plaquetas $\leq 100,000$.
4. Del total de pacientes investigados solamente 32 (25%) presentaron incrementos en el hematocrito $\geq 21\%$.
5. El conteo diferencial de glóbulos blancos reveló que el 86% (109/127), de los pacientes presentaron algún grado de linfocitosis ($\geq 33\%$).
6. El 69% (34/49) de los pacientes con plaquetas $\leq 100,000$ también presentaron una prueba del torniquete positiva (fragilidad capilar). Sin embargo, de los pacientes hemoconcentrados solo el 34% (11/32) fueron positivos a esta prueba.

RECOMENDACIONES

1. Valorar la importancia de los análisis de laboratorio (plaquetas y hematocrito) en la redefinición de la clasificación del dengue propuesto por la OMS, mediante la reclasificación de los casos utilizando los criterios de disminución de plaquetas y hemoconcentración.
2. En este estudio se observaron defectos en los métodos de diagnóstico clínico del DH, por lo que se recomienda en casos de pacientes que presenten hemoconcentración y/o fuga capilar hacer uso de radiografías de tórax cuando hay sospecha de derrame pleural, ecografía abdominal en caso de ascitis, ultrasonido de abdomen superior para pacientes que presenten en los exámenes de laboratorio las pruebas hepáticas (TGO-TGP) con niveles elevados y que podrían presentar hepatomegalia. Además de pruebas de la hemostasia como TP, TPT y fibrinógeno.
3. Para verificar si la secuencia de infección tiene algún efecto en la severidad del dengue se recomienda hacer ensayos de neutralización que permitan verificar a cuales serotipos ha estado expuesto el paciente.

REFERENCIAS

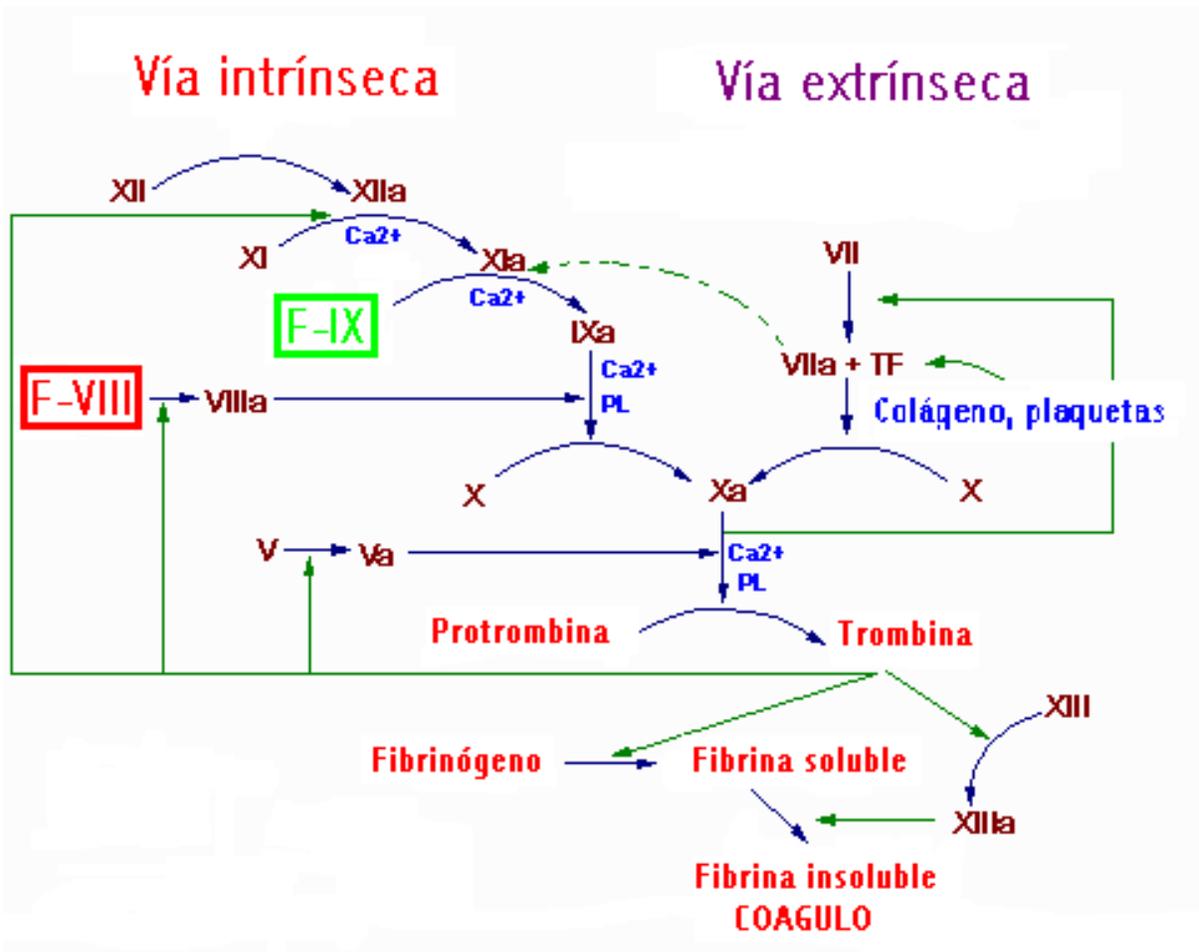
- Acioli-Santos B, Segat L, Dhaliya R, Brito CA, Braga-Neto UM, Marques ET, Crovella S. 2008. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Human immunology* 69(2):122-128.
- Astudillo JM, M. 1989. Dengue confirmado virológica y serológicamente en Cali, Colombia.:2 - 7.
- Balmaseda A, Hammond SN, Tellez Y, Imhoff L, Rodriguez Y, Saborio SI, Mercado JC, Perez L, Videia E, Almanza E, Kuan G, Reyes M, Saenz L, Amador JJ, Harris E. 2006. High seroprevalence of antibodies against dengue virus in a prospective study of schoolchildren in Managua, Nicaragua. *Trop Med Int Health* 11(6):935-942.
- Balmaseda A, Sandoval E, Perez L, Gutierrez CM, Harris E. 1999. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 61(6):893-897.
- Barcenas C, Benedith F, Valverde A. 2004. Alteraciones fisiologicas en los niveles de hematocrito durante la evolucion de la infeccion con diagnostico clinico de dengue. UNAN - LEON
- Basu A, Chaturvedi UC. 2008. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS immunology and medical microbiology* 53(3):287-299.
- Camacho T, de la Hoz F, Cardenas V, Sanchez C, de Calderon L, Perez L, Bermudez A. 2004. Incomplete surveillance of a dengue-2 epidemic in Ibaguè, Colombia, 1995-1997. *Biomedica* 24(2):174-182.
- Cardier JE, Marino E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, Rothman AL. 2005. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine* 30(6):359-365.
- Chang PE, Cheng CL, Asok K, Fong KY, Chee SP, Tan CK. 2007. Visual disturbances in dengue fever: an answer at last? *Singapore medical journal* 48(3):e71-73.
- Chao YC, Huang CS, Lee CN, Chang SY, King CC, Kao CL. 2008. Higher infection of dengue virus serotype 2 in human monocytes of patients with G6PD deficiency. *PloS one* 3(2):e1557.
- Chaturvedi U, Agarwal, R., Elbishbishi, E. 2000. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: Implications for pathogenesis. *Immunol Med Microbiol* 28:183- 188.
- Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. 2006. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS immunology and medical microbiology* 47(2):155-166.
- Chaturvedi U, Shrivastava, R., Tripathi, R. 2007. Dengue virus-specific suppressor T cells: current perspectives. *Immunol Med Microbiol* 50:285-299.
- Cheng HJ, Lin CF, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Luo YH, Lin YS. 2009. Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ 234(1):63-73.

- Chungue E, Cassar O, Drouet MT, Guzman MG, Laille M, Rosen L, Deubel V. 1995. Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses. *The Journal of general virology* 76 (Pt 7):1877-1884.
- Ciguenza Gyc. 1997. *Enfermedades Infecciosas*. vol 2.:792 - 793.
- Claude J, Benneth, et al. 1997. Virus causantes de fiebre hemorrágicas; . vol 2.:2084.
- Dejnirattisai W, Duangchinda T, Lin CL, Vasanawathana S, Jones M, Jacobs M, Malasit P, Xu XN, Sreaton G, Mongkolsapaya J. 2008. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *J Immunol* 181(9):5865-5874.
- Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. 2004. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue antigens* 64(4):469-472.
- Fischbach's. 2000. *Manual of Laboratory and Diagnostic Test*.
- Fonseca T. 1994. Características clínico epidemiológicas del dengue hemorrágico en niños hospitalizados en el HEODRA durante la epidemia de 1992.
- González L, Moreno, G. 1994. Comportamiento epidemiológico y clínico de dengue en el departamento de medicina interna del HEODRA.
- Guha-Sapir D, Schimmer B. 2005. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerging themes in epidemiology* 2(1):1.
- Guzmán M, García, G., Kourí, G. 2007. El dengue y el dengue hemorrágico prioridades de investigación. vol.21.
- Guzmán M, Kourí, G. et al. La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas. Instituto de Medicina Tropical "Padro Kourí".
- Guzman MG, Kouri G. 2003. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 27(1):1-13.
- Halstead SB. 2007. Dengue. *Lancet* 370(9599):1644-1652.
- Halsted S, Heins, F., Banett, A. 2005. Dengue virus molecular basic of cell entry and pathogenesis. *Vaccine* 23:849-856.
- Harrison. *Tratado de fisiopatología médica*.
- Huber D, Roblin, B., Gestas, P. et al. 1993. Serum level of tumor necrosis factor alpha, interleukine 6 and interleukine 1, beta in dengue infected patients. *Am J Trop Med Hyg* 1993:324 - 331.
- Isarangkura PB, Pongpanich B, Pintadit P, Phanichyakarn P, Valyasevi A. 1987. Hemostatic derangement in dengue haemorrhagic fever. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 18(3):331-339.
- Jacobs M. 2000. Dengue: emergence as a global public health problem and prospects for control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94(1):7-8.
- James SK, D. et al. 1991. Determinants and predictors of dengue infection in Mexico and epidemiology.:1168 - 1178.
- Jaramillo C. 2000. *Infecciones por Arbovirus*.52.
- Krishnan M, Sukumaran, B., Pal, U. 2007. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and west nile viruses. . *Journal of virology* 81:4881-4885.
- Kurosu T, Chaichana P, Yamate M, Anantapreecha S, Ikuta K. 2007. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochemical and biophysical research communications* 362(4):1051-1056.

- Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC, Chiu SC, Hsiao YL, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Lin YS. 2008. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 88(10):1079-1089.
- Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. 2006. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral immunology* 19(2):127-132.
- Lindenbach D. 2003. *Molecular biology of flaviviruses*. 23 - 61.
- Mangada M, Rothman, A. 2005. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4 T cells to heterologous serotypes. *J Immunol* 175:2676-2683.
- Martinez RA, Diaz FA, Villar LA. 2006. [Clinical criteria to diagnose dengue in its early stages]. *Biomedica* 26(1):22-30.
- Mehlhof E, Ansarah-Sobrinho C, Johnson S, Engle M, Fremont DH, Pierson TC, Diamond MS. 2007. Complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner. *Cell host & microbe* 2(6):417-426.
- Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. 2008. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS pathogens* 4(2):e17.
- Mitrakul C, Poshychinda M, Futrakul P, Sangkawibha N, Ahandrik S. 1977. Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 26(5 Pt 1):975-984.
- Navarro-Sanchez E. 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses.:723-728.
- Nguyen TP, Kikuchi M, Vu TQ, Do QH, Tran TT, Vo DT, Ha MT, Vo VT, Cao TP, Tran VD, Oyama T, Morita K, Yasunami M, Hirayama K. 2008. Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS neglected tropical diseases* 2(10):e304.
- Organización Mundial de la Salud. 1997. *Dengue hemorrhagic, diagnosis, treatment, prevention and control*.
- Organización Mundial de la Salud. 2000. *Report of the informal consultation*
- Organización Panamericana de la Salud. 1996. *Fiebre hemorrágica del dengue en Venezuela*. vol 17.
- Ortega L. 2001. *Dengue un problema emergente*. 45 - 50.
- Rothman A. 2010. *Dengue Virus*. London: Springer.
- Rothman AL, Ennis FA. 1999. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257(1):1-6.
- Srikiatkachorn A, Gibbons RV, Green S, Libraty DH, Thomas SJ, Endy TP, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL, Nimmannitaya S, Kalayanarooj S. 2010. Dengue hemorrhagic fever: the sensitivity and specificity of the world health organization definition for identification of severe cases of dengue in Thailand, 1994-2005. *Clin Infect Dis* 50(8):1135-1143.
- Van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts BL, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. 2007. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *Journal of virology* 81(21):12019-12028.

ANEXOS

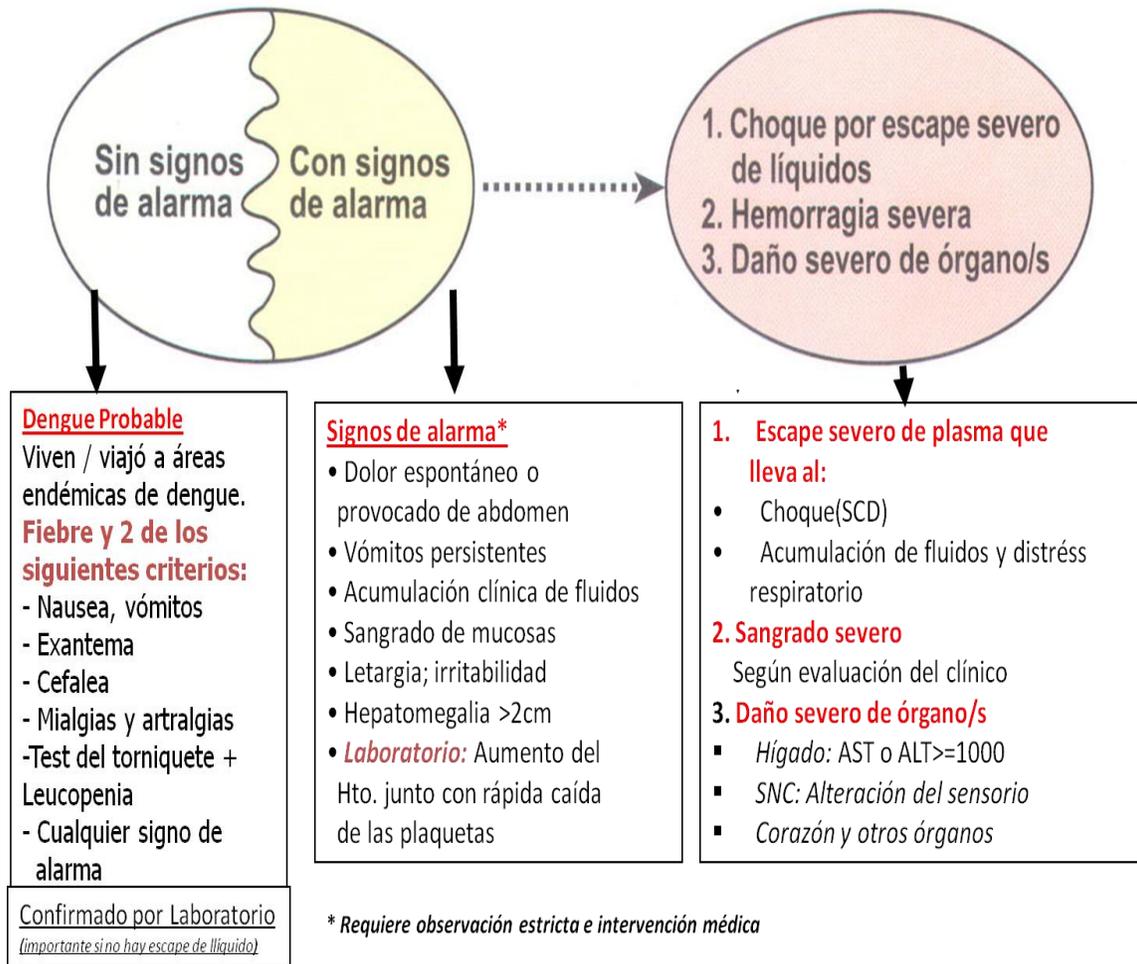
ANEXO 2



Clasificación revisada del Dengue

DENGUE ± signos de alarma

DENGUE SEVERO



ANEXO 1

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS. UNAN-LEÓN
FICHA EPIDEMIOLÓGICA PROYECTO DENGUE-SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA**

1. DATOS GENERALES

1.1. SILAIS: _____ 1.2. Municipio: _____ 1.3. Unidad de salud: _____
1.4. Número de expediente: _____ 1.5. Cod. Vivienda: _____ 1.6. Fecha: ___/___/___

2. DATOS PERSONALES

2.1. Nombres y Apellidos: _____
2.2. Edad: ___/___ 2.3. Fecha de nacimiento: ___/___/___ 2.4. Sexo: F () M () 2.5. Ocupación: _____
2.6. Nombre del padre y/o madre: _____
2.7. Dirección: _____
2.8. Procedencia: Urbano _____ Rural _____ 2.9. Viajó el último mes? Si ___ No ___ Dónde? _____
2.10. Embarazada: _____ Tiempo de embarazo: _____ meses 2.11. Enfermedades crónicas: _____
a. Asma _____ b. Alergia respiratoria _____ c. Alergia dermatológica _____ d. Diabetes _____ e. Otros _____
2.12. Enfermedad aguda adicional: a. Malaria _____ b. Neumonía _____ c. Infec. de vías urinarias _____ d. Otra _____

3. DATOS DE LA VIVIENDA

3.1. Fuente de Agua: Agua potable: si () no () b. Puesto público: _____ c. Pozo: _____ d. Río: _____
3.2. Presencia de animales en la casa: a. perros _____ b. gatos _____ c. ratones _____ d. ganado _____ e. cerdos _____ f. otros _____

4. DATOS CLINICOS

4.1. Fecha de inicio de los síntomas: ___/___/___ 4.2. Fecha de toma de la muestra: ___/___/___
4.3. Hora de toma de la muestra: ___ a.m. / p.m. 4.4. Hora de refrigeración de la muestra: ___ a.m. / p.m.
Marque: Si (S) No (N) Desconocido (D)
4.5. Síntomas: 4.6. Signos:
a. fiebre _____ a. rash _____ m. prueba del torniquete positivo _____
b. cefalea _____ b. epistaxis _____ n. P/ A (sistólica / diastólica) _____ mmHg
c. mialgia _____ c. petequias _____ ñ. Frec. Cardíaca o pulso ___ / min.
d. artralgia _____ d. melenas _____ o. llenado capilar ___ / seg.
e. dolor retroorbital _____ e. hematemesis _____ p. temperatura ___ °C
f. dolor abdominal _____ f. gingivorragia _____ q. Frec. Respiratoria ___ / min.
g. diarrea _____ g. hematuria _____ r. vomito _____
h. escalofríos _____ h. hemorragia vaginal _____ s. hepatomegalia _____
i. anorexia _____ i. derrame pleural _____ t. disnea _____
j. tos _____ u. ictericia _____
k. piel fría _____
l. ascitis _____

4.7 AL INGRESO HOSPITALARIO: MARCAR: SI (S) NO (N) DESCNOCIDO (D)

PRESENCIA DE SIGNOS DE DESHIDRATACION: a. llanto sin lagrimas ___ b. mucosas secas ___ c. globo ocular hendido ___
d. fontanales hundidas ___ e. pliegue cutáneo ___
HOSPITALIZADO ___ fecha de ingreso: ___/___/___ Fallecido ___ Fecha de fallecido ___/___/___

5. LABORATORIO CLÍNICO

5.1. HEMÁTICA: Hematocrito _____ Hemoglob. _____ Plaquetas _____ G/ Blancos _____ LINF _____ SEG _____ MON _____



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
 FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
 UNAN LEÓN

Comité de Ética para Investigaciones Biomédicas (CEIB)
 FWA00004523/IRB00003342

Miembros Honorarios:

- *Dr. Uriel Guevara Guerrero*
(q.e.p.d.)
- *Dr. Jaime Granera Soto*

Consejo Ejecutivo:

- *Dra. Nubia Pacheco Solís*
Presidenta
- *Dr. Efrén Castellón Cisneros*
Vice-Presidente
- *Dra. Eliette Balladares Cardoza*
Secretaria
- *Lic. Irella Romero Salazar*
Miembro

Fundado en la Facultad de
 Ciencias Médicas
 UNAN - León
 Nicaragua
 1995

Expiration data 30/03/10

León, 03 de junio de 2008

ACTA No. 20

Lic. Filemón Bucardo MSc.
 Investigador Principal
 Sus Manos

Estimado Maestro:

Después de haber recibido el Protocolo de Investigación titulado: "INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL DENGUE Y SU ASOCIACIÓN CON FACTORES GENÉTICOS DEL HUÉSPED EN NICARAGUENSES Y HONDUREÑOS.", se hace la revisión por miembros del Comité de Ética y se determina lo siguiente: *Se aprueba la conducción de dicha Investigación, basados en que cumple con los principios delineados en la Declaración de Helsinki y reúne los principios éticos básicos.*

Como Comité de Ética, valoramos muy positivamente la importancia de este trabajo. Copia de esta carta debe estar presente en el Protocolo e informe final.

Sin otro particular, nos es grato suscribirnos.



[Firma]
DRA. NUBIA PACHECO S.
 Presidenta del CEIB
 Facultad de CC. MM.
 UNAN-León

[Firma]
DRA. ELIETTE BALLADARES C.
 Secretaria del CEIB
 Facultad de CC. MM.
 UNAN-León

[Firma]
DRA. MERCEDES CÁCERES S.
 Vice-Decana
 Facultad de Ciencias Médicas
 UNAN - León



Cc: Archivo
 rhl