

Estudio aleatorizado, doble ciego, placebo controlado de doxiciclina en pacientes con dengue. Modulación de citoquinas y respuesta clínica

Randomized, double-blind, placebo-controlled study of doxycycline in patients with dengue. Cytokine modulation and clinical response

Nicolás González ^{1,2} 

Soraya Araya ^{1,2} 

Sara Amarilla ^{1,2} 

Fernando Galeano ^{1,2} 

Gabriela Sanabria ^{1,3} 

Juan Figueredo ¹

Antonio Arbo ^{1,2} 

¹ Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

² Instituto de Medicina Tropical, Departamento de Pediatría. Asunción, Paraguay.

³ Instituto de Medicina Tropical, Departamento de Investigación y Docencia. Asunción, Paraguay.

Resumen

Introducción: Los niveles de citoquinas podrían ser determinantes en la severidad de la Fiebre Dengue. La supresión de su actividad con inmunomoduladores modificaría su evolución. **Objetivo:** Determinar el efecto de la adición de doxiciclina sobre el perfil de citocinas de pacientes con dengue y valorar la respuesta clínica y el impacto en la severidad de pacientes con Fiebre de Dengue. **Materiales y métodos:** Estudio aleatorio, doble ciego, placebo controlado con doxiciclina. Ambos grupos recibieron la medicación por 7 días y se

¹ Fecha de recepción: 22 de abril de 2022.

Fecha de aprobación: 31 de mayo de 2022.

Correspondencia: González Nicolás. E-mail: nicoperrotta@hotmail.com

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Los autores han participado igualmente de: a. Concesión de la idea, b. Diseño del estudio, c. Obtención, análisis y/o interpretación de los datos, d. Escritura del artículo o revisión crítica del contenido intelectual importante, y e. Aprobación de la versión a ser publicada.



controló la evolución clínica, laboratorio y niveles de citoquinas en los días 0, 3 y 7. **Resultados:** Fueron incluidos en el estudio 61 pacientes, 36 (59%) en el grupo placebo y 25 (41%) en el grupo doxiciclina. Se observó que los pacientes tratados con doxiciclina mostraron menor plaquetopenia en el día 0 y 3 [(170029±47483/mm³ vs 198875±52211/mm³)(p<0,05) y 129545±62840/mm³ vs 165048±51142/mm³)(p<0,05)] al compararlo con el grupo placebo. Los niveles de IL-6, TNF y raIL-1 no mostraron diferencias significativas. Se observó una tendencia a menores niveles de IL-1β en el grupo tratado con doxiciclina (52,1±97 vs 3,3±7,7)(0,08). **Conclusiones:** No se constató diferencias en la presentación clínica, hospitalización ni en la mortalidad entre pacientes tratados con doxiciclina comparados con placebo. Hubo una tendencia a menores niveles de IL-1β en los pacientes tratados con doxiciclina. Debe aumentarse el tamaño de la muestra para confirmar o rechazar los resultados.

Palabras clave: Citoquinas, doxiciclina, fiebre dengue.

Abstract

Background: Cytokine levels could be determinant in the severity of Dengue Fever. The suppression of their activity with immunomodulators would modify its evolution. **Objective:** To determine the effect of doxycycline on the cytokine profile of patients with dengue fever and to assess the clinical response and the impact on the severity of patients with dengue fever. **Materials and methods:** Randomized, double-blind, placebo-controlled study with doxycycline. Both groups received the medication for 7 days and clinical evolution, laboratory and cytokine levels were monitored on days 0, 3 and 7. **Results:** 61 patients were included in the study, 36 (59%) in the placebo group and 25 (41%) in the doxycycline group. It was observed that patients treated with doxycycline showed lower thrombocytopenia at day 0 and 3 [(170029±47483/mm³ vs 198875±52211/mm³)(p<0.05) and 129545±62840/mm³ vs 165048±51142/mm³)(p<0.05)] when compared to the placebo group. IL-6, TNF and raIL-1 levels showed no significant differences. A trend to lower IL-1β levels was observed in the doxycycline treated group (52.1±97 vs 3.3±7.7)(0.08). **Conclusions:** There was no difference in clinical presentation, hospitalization or mortality among patients treated with doxycycline compared to placebo. There was a trend to lower IL-1β levels in patients treated with doxycycline. The sample size should be increased to confirm or reject the results.

Keywords: Cytokines, doxycycline, dengue fever.

Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de fiebre dengue (FD) ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. Se estima que hay unos 390 millones de casos cada año, de los cuales alrededor de 100 millones se presentan de forma sintomática (1).

En el Paraguay, la primera epidemia de FD reportada data de los años 1989 – 1990 con circulación del serotipo DENV-1, en el 2000 al 2006, los serotipos circulantes fueron el DENV-2 y el DENV-3 y en 2007, la epidemia ha sido causada predominantemente por

DENV-3 (2). Desde el año 2009 se estableció como endemia con brotes anuales. En 2012-2013 el serotipo circulante fue DENV-2, con mayor número de consultas y morbimortalidad. Luego, en el año 2016, emergió el DENV-1. Desde el 2009 se han presentado unos 300000 casos de dengue, con una tasa promedio de 30 casos por 100000 habitantes por año (3–7).

La FD es una enfermedad con un amplio espectro de presentaciones clínicas que van desde una forma inaparente o asintomática, una forma leve o no específica hasta una enfermedad hemorrágica grave, en ocasiones mortal. La presentación sintomática, luego de un período de incubación de 3 a 7 días, se caracteriza por tres fases: una fase febril inicial, una fase crítica que coincide con el periodo de defervescencia y una fase de recuperación espontánea (8,9). La fase febril aguda se acompaña de cefalea, dolor retro-orbitario, rash maculopapular, mialgias y artralgias. Las formas severas se caracterizan por signos de insuficiencia circulatoria y manifestaciones hemorrágicas. En ocasiones, el virus del dengue afecta órganos internos (formas viscerales o atípicas), causando complicaciones como encefalitis, miocarditis o hepatitis, las cuales pueden tener un curso fatal (10-12).

Varios estudios han explorado los factores que podrían determinar la progresión de la enfermedad de dengue clásico a dengue hemorrágico o DSS y/o complicaciones viscerales, tales como el estado inmunológico, la genética de poblaciones, los títulos de viremia, infección secundaria por serotipos heterólogos y alteración de citoquinas como interferón Gamma, IL-1, IL-6, TNF, IL-10, receptor soluble IL-1(13,14). En este sentido, la replicación del virus del dengue se produciría principalmente en los fagocitos mononucleares (15-16). La activación de macrófagos infectados y la producción de citocinas como el factor de necrosis tumoral- α (TNF α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1b (IL-1b) serían parte de la respuesta a la infección (17,18). Estas citoquinas proinflamatorias a su vez, estarían asociadas con la liberación de péptidos quimiotácticos, producción de fiebre y la activación de células endoteliales que conducirían a la permeabilidad vascular, fenómeno involucrado en las formas graves de la infección por dengue (19,20). La producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1b) y los eventos desencadenados están modulados en parte por compuestos antiinflamatorios. El antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) puede funcionar como un inhibidor al antagonizar la unión de IL-1 al receptor de la superficie celular de IL-1 en una interacción competitiva (21).

Si bien existen datos acerca del aumento de citocinas proinflamatorias en pacientes con formas graves de la FD (Hober et al. 1993, 1998, Kuno & Bailey 1994, Iyngkaran et al. 1995, Kubelka et al. 1995), el mecanismo exacto aún queda por descubrir y existen numerosos intentos de suprimir los niveles de citoquinas, incluyendo la utilización de antibióticos con propiedades inmunomoduladoras, como las tetraciclinas o el cloranfenicol (22-25).

El presente estudio evalúa la habilidad de la doxiciclina para reducir los niveles de citoquinas en pacientes con dengue sin signos de alarma, con signos de alarma y dengue grave, así como su repercusión en la evolución clínica de la enfermedad.

Materiales y Métodos

Diseño y criterios de inclusión

Es un estudio aleatorizado, doble ciego, placebo controlado con doxiciclina. Fueron incluidos pacientes de 8 a 50 años atendidos en el Instituto de Medicina Tropical del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social entre enero a marzo de 2018, con clínica sospechosa de Fiebre Dengue (FD), Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) ó Síndrome de Shock por Dengue (SSD) en las primeras 48 horas de iniciado los síntomas y con diagnóstico confirmado por PCR y/o antígeno NS1 positivo. Se excluyeron pacientes con comorbilidades (embarazo, diabetes mellitus, hipertensión arterial, úlcera péptica, anemias hemolíticas, obesidad, VIH, colagenopatías, insuficiencia renal, cáncer), infecciones concurrentes y pacientes que reciben alguna medicación concomitante excepto paracetamol.

Definiciones

Fiebre dengue: fiebre más dos de los siguientes síntomas: mialgias, artralgias, cefalea, dolor retro-ocular, exantema macular o maculopapular, vómitos y dolor abdominal confirmado serología positiva IgM positiva, antígeno NS1 positivo y/o PCR positiva en sangre.

Dengue Grave: cuadro febril característico, con signos de alarma, extravasación del plasma (signos de shock por dengue y serositis), hemorragia grave y/o compromiso grave de órganos (GOT y/o GPT >1000, alteración de la conciencia, insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca, miocarditis).

Síndrome de Shock por Dengue: Fiebre Dengue con disminución de la perfusión tisular con o sin hipotensión, afectación del sensorio y oligoanuria.

Aleatorización, esquema de dosis, conservación de muestras y análisis de datos.

La distribución de los grupos se realizó por aleatorización simple.

La doxiciclina fue formulada en dos presentaciones: Jarabe con concentración de 100mg/5cc y comprimidos de 100 mg. El placebo se formuló en jarabes y comprimidos con apariencias idénticas a los preparados de doxiciclina, conteniendo solamente excipientes. En ambos casos se inició la administración en las primeras 48 horas de enfermedad.

Dosis de doxiciclina según la edad:

- De 8 a 14 años: Carga 4 mg/kg/día y luego 2 mg/kg/dosis cada 12 hs por 7 días.
- De 15-17 años: Carga 200mg y luego 100 mg cada 12 hs por 7 días.
- De 18 – 50 años: Carga 200 mg y luego 100 mg cada 12 hs por 10 días.

Se midieron los niveles de IL-6, IL-1 β , TNF, receptor antagonista de IL-1 en el grupo doxiciclina y control, estableciendo la comparación al día 0, 3 y 7.

Las muestras se almacenaron a -70 °C y los ensayos se realizaron de forma ciega haciendo las mediciones por el método ELISA (kit comercial R & D System, Minneapolis, MN, USA), según las instrucciones del fabricante. Los límites de detección son los siguientes: IL-6: 0,7 pg/ml, IL-1 β < 1 pg/ml, antagonista del receptor IL-1 14 pg/ml, TNF 0,6 pg/ml.

Se comparó la evolución clínica de los pacientes pertenecientes al grupo doxiciclina y al grupo control. Se consideraron las siguientes variables: signos de alarma (dolor abdominal, vómitos, signos de sangrado leve o moderado), trombocitopenia, hemoconcentración, presencia de extravasación, presencia de choque, duración del choque, número de esquemas de expansiones, requerimiento de internación, días de internación, complicaciones (encefalitis, miocarditis, hepatitis, hemorragias severas), óbito.

Todos los pacientes recibieron la atención y tratamientos recomendados en las Guías de Fiebre Dengue de la OMS.

Análisis de los datos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (SPSS Statistics for Windows, Versión 17.0. Chicago: SPSS Inc). Se utilizaron medidas descriptivas de tendencia central y de dispersión. Para el análisis se utilizó la prueba de χ^2 para variables categóricas y la prueba t no pareada para variables continuas. Se consideró el nivel de significancia con valor de $p < 0,05$.

Consideraciones éticas, financiamiento y conflictos de intereses.

El proyecto de investigación fue aprobado previamente por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical. Se respetaron las normas de buenas prácticas de investigación de Helsinki, la confidencialidad de los pacientes, el consentimiento informado del tutor y los principios de beneficencia y benevolencia. Fue financiado por el programa de PROCENCIA I del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología del Paraguay con contrapartida del Instituto de Medicina Tropical. Se declara la ausencia de conflictos de intereses de los autores en todo el proceso de investigación.

Resultados

Se enrolaron 61 pacientes con antígeno NS1 positivo y se reunieron 36 (59%) en el grupo placebo y 25 (41%) en el grupo doxiciclina. La mediana de la edad fue de 17 años (rango IC1-3 = 15). Del total de pacientes, 35 (57%) eran de sexo femenino, con una relación 1,3:1.

Ningún paciente presentó datos de comorbilidades. Tres (5%) casos tenían antecedentes de FD previo. En 45 (74%) pacientes se observó anticuerpos IgG e IgM negativos, en 2 (3%) IgM positiva IgG negativa, en ningún caso IgG e IgM positivas y en 3 (5%) pacientes IgG positiva e IgM negativa. No se obtuvieron datos serológicos en la primera consulta en 11 (18%) casos. Nueve (15%) pacientes presentaron por lo menos un signo de alarma.

Del total de casos, 47 (77%) pacientes fueron atendidos de manera ambulatoria con diagnóstico de FD 14 (23%) requirieron ingreso hospitalario. En este último grupo, 7 presentaron signos de Síndrome de Shock por Dengue (SSD) y requirieron fluidoterapia parenteral, 3 por signos de sangrado moderados y 3 por plaquetopenia menor a $60000/\text{mm}^3$. La comparación de los grupos placebo y doxiciclina se observan en la tabla 1.

Tabla 1. Características de Pacientes Pediátricos con Fiebre Dengue según Grupo de Estudio.

	Placebo n=36 (%)	Doxiciclina n=25 (%)	P
Sexo			
Masculino	15 (42)	11 (44%)	NS
Femenino	21 (58)	14 (56%)	NS
Edad			
Mediana	19	15	
IC ₁₋₃	20	11	
Dengue Previo	2 (6)	1 (4)	NS
Signos de Alarma	4 (11)	5 (20)	NS
Dolor Abdominal	0/8	1/5	NS
Vómitos	1/8	1/5	NS
Plaquetopenia	3/8	0/5	NS
Hemorragia	2/8	1/5	NS
Hipoperfusión	2/8	4/5	NS
Serología			
IgM (-) IgG (-)	27 (75)	18 (72)	NS
IgM (+) IgG (-)	1 (3)	1 (4)	NS
IgM (+) IgG (+)	0	0	
IgM (-) IgG (+)	3 (8)	0	
Sin Datos	5 (14)	6 (24)	NS
Hospitalización	9 (25)	5 (20)	NS
Fluidoterapia	3/9	4/5	NS
Mortalidad	0	0	

Los datos de laboratorio según el día de enrolamiento se visualizan en la tabla 2. Se observó en el hemograma del día 0 (n=60) que 38 (63%) pacientes presentaron leucocitos $<5000/\text{mm}^3$, 17 (28%) hematocrito >42 y 15 (25%) plaquetas $<150000/\text{mm}^3$; en el día 3 (n=54) 46 (85%) pacientes presentaron leucocitos $<5000/\text{mm}^3$, 30 (56%) hematocrito >42 y 30 (56%) plaquetas $<150000/\text{mm}^3$ y en el día 7 (n=37) 18 (49%) pacientes presentaron leucocitos $<5000/\text{mm}^3$, 15 (41%) hematocrito >42 y 11 (30%) plaquetas $<150000/\text{mm}^3$. En el hepatograma según el día de enrolamiento se observó que en el día 0 (n=58) 21 (36%) pacientes presentaron GOT >40 y 16 (28%) casos GPT >40 ; en el día 3 (n=48) 41 (85%) casos mostraron GO T >40 y 30 (62%) GPT >40 ; y en el día 7 (n=30) en 22 (73%) pacientes se observó GOT >40 y (77%) GPT >40 .

Al comparar los grupos placebo y doxiciclina según los días de enrolamiento (Tabla 3), se encontró en el día cero unas plaquetas de 170029 (DE \pm 47483) en grupo placebo y 198875 (DE \pm 52211) (p $<$ 0,05) en el grupo doxiciclina; en el día tres 129545 (DE \pm 62840) en grupo placebo y 165048 (DE \pm 51142) (p $<$ 0,05) y en el día siete 224636 (DE \pm 124387) y en el grupo doxiciclina 234333 (DE \pm 83337) (p $>$ 0,05). Además, al analizar el descenso de los valores de las plaquetas intragrupo, se encuentra una diferencia significativa en ambos grupos entre el día 0 y 3.

Tabla 2. Características de Laboratorio de Pacientes Pediátricos con FD.

	D0	D3	D7
	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
Leucocitos	4618±2372	3501±1373	5145±1289
N (%)	70±14	50±14	45±11
RAN	3399±2123	1478±795	1450±1431
L (%)	26±13	44±14	44±12
RAL	1038±487	1405±1005	1341±1183
Hb	13±1	14±1	13±1
Hto	41±3	42±4	41±4
Plaquetas	181763±51058	143352±60633	228568±108395
Urea	22±6	19±5	18±5
Cr	1±0,2	1±0,2	1±0,2
GOT	41±27	87±96	115±116
GPT	35±21	66±69	135±150
Albúmina	4±0,4	4±0,4	4±0,2
TP	79±12	91±8	93±6
TTPA	38±7	36±5	30±4
Fibrinógenos	268±91	248±57	237±24
	D0 (n=61)	D3 (n=54)	D7 (n=37)
L<5000	38 (62%)	46 (85%)	18 (49%)
HTO>42	17 (28%)	30 (56%)	15 (41%)
P<150000	15 (25%)	30 (56%)	11 (30%)
Urea>40	1/58	0/51	0/30
Cr>1,1	4/58	1/51	0/30
GOT>40	21/58	41/48	22/30
GPT>40	16/58	30/48	23/30
Albúmina<3,5	2/56	1/46	0/27
TP<70%	14/51	1/46	0/23
TTPA>40	15/51	8/46	0/23
Fib<200	1/51	5/46	1/23

En el análisis de los niveles de citoquinas, se observa que no hay diferencias intragrupos entre el día 0 y los días 3 y 7. Al comparar los grupos placebo y doxicilina solo se encuentra una tendencia de descenso de la IL-1 β en el grupo doxicilina (Tabla 4).

Tabla 3. Características de Laboratorio de Pacientes Pediátricos con Fiebre Dengue según Grupo de Estudio.

Día Cero			
Grupo	PLACEBO	DOXICICLINA	t student
Leucocitos	4093	5406	<0,05
N (%)	68	73	
RAN	2930	3938	NS
L (%)	28	23	
RAL	989	1067	NS
Hb	13,4	13,3	NS
Hto	41	41	NS
Plaquetas	170029*	198875*	<0,05
Urea	23	21	NS
Cr	0,7	0,7	NS
GOT	47	33	<0,05
GPT	39	30	NS
Albúmina	4,2	4,3	NS
TP	79	79	NS
TTPA	39	37	NS
Fib	256	285	NS
Día 3			
Grupo	PLACEBO	DOXICICLINA	t student
Leucocitos	3385	3684	NS
N (%)	51	47	
RAN	1535	1396	NS
L (%)	43	46	
RAL	1370	1457	NS
Hb	13,8	14,1	NS
Hto	42	42	NS
Plaquetas	129545*	165048*	<0,05
Urea	19	19	NS
Cr	0,8	0,6	<0,05
GOT	100	63	NS
GPT	76	49	NS
Albúmina	4,0	4,2	NS
TP	91	90	NS
TTPA	37	34	NS
Fib	250	246	NS
Día 7			
Grupo	PLACEBO	DOXICICLINA	t student
Leucocitos	5333	4870	NS
N (%)	45	46	
RAN	1525	1341	NS
L (%)	45	44	
RAL	1410	1243	NS
Hb	13,1	13,5	NS
Hto	40,5	41,2	NS
Plaquetas	224636	234333	NS
Urea	18	17	NS
Cr	0,60	0,56	NS
GOT	133	92	NS
GPT	145	122	NS
Albúmina	4,1	4,2	NS
TP	95	91	NS
TTPA	30	30	NS
Fib	237	237	NS

* $p < 0,05$ intragrupo.

Tabla 4. Niveles Promedio de Citoquinas en Grupo Placebo y Doxiciclina según Día de Enrolamiento.

	Día 0			Día 3			Día 7		
	Placebo	Doxiciclina	t-Student	Placebo	Doxiciclina	t-Student	Placebo	Doxiciclina	t-Student
IL-6	29,3	67,8	NS	50,4	120,8	NS	275,7	113,7	NS
IL-1 β	6,8	14,4	NS	5,9	9,7	NS	52,1	3,3	0,08
TNF	58,8	54,8	NS	68,0	80,3	NS	88,1	70,3	NS
ra IL-1	11,2	14,5	NS	10,3	12,2	NS	33,7	10,1	NS

* $p < 0,05$

Discusión

La infección causada por el virus del dengue no tiene tratamiento específico actualmente. El manejo clínico consiste en medidas sintomáticas y en la administración de fluidos según el caso (26). Sin embargo, se ha observado que la doxiciclina podría inhibir la replicación del virus del dengue in vitro, a través de la inhibición de la proteasa viral y disminución del ingreso del virus a la célula del huésped (27,28). En este contexto, en el presente estudio investigamos la evolución clínica y los niveles de citoquinas con el uso de doxiciclina en pacientes ambulatorios con fiebre dengue.

Las características clínicas y la tasa de hospitalización del grupo de estudio en general son similares a las encontradas en investigaciones previas (6,7,8). Guilarde AO et al describen una tasa de hospitalización mayor y un mayor sangrado espontáneo en relación a este presente estudio debido probablemente al mayor número de casos con DHF (29). Sin embargo, en este sentido, Bhattacharjee B. et al, encontraron que el uso de doxiciclina disminuyó el sangrado y la fuga capilar (30). Por otro lado, en el análisis por grupos encontramos que la presentación clínica el primer día de enrolamiento en el grupo placebo y doxiciclina eran comparables, sin embargo, al revisar los perfiles de laboratorio hemos observado una menor plaquetopenia al día 0 y 3 en el grupo que recibió doxiciclina. Estas diferencias encontradas en el día 0 no se pueden atribuir al efecto de la doxiciclina, ya que es el día en el que iniciaron la medicación. La plaquetopenia que se observa en el grupo doxiciclina en el día 3 podría deberse a la diferencia que ya se muestra en el día 0 y no necesariamente al efecto de la doxiciclina. Además, al analizar el descenso de los valores de las plaquetas intragrupo, se encuentra una diferencia significativa en ambos grupos entre el día 0 y 3. En este contexto, Vikek P. et al, encuentran una diferencia significativa de los valores de plaquetas pero en los días 4 y 7 de la administración de doxiciclina (31). En otro sentido, se encontró mayor número de leucocitos y menor valor de la enzima hepática GOT en el día 0 en el grupo doxiciclina, sin embargo, tampoco sería atribuible a la medicación.

La investigación de TM Fredeking et al mostró una reducción en la mortalidad con el uso de doxiciclina, sin embargo, no hemos registrado muertes por dengue en ninguno de los grupos y no podemos concluir que haya algún impacto de la doxiciclina (32).

Varias investigaciones se han realizado acerca del papel de las citoquinas en la fiebre dengue. En trabajo de Arias J. et al se ha demostrado el aumento de los niveles de

citoquinas en pacientes con fiebre dengue en sus distintas formas de presentación¹⁴. Asimismo, J. Castro et al han observado una modulación de las citoquinas proinflamatorias con el uso de doxiciclina, sin embargo, este efecto no hemos podido reproducir en nuestra investigación, a excepción de la IL-1 β , en la que observamos una tendencia al descenso con el uso de doxiciclina. Tampoco se ha encontrado diferencia en los niveles de rIL-1 (13).

Si bien es un trabajo aleatorio, doble ciego, con grupo placebo, las limitaciones se presentan por el bajo número de población estudiada por la pérdida de casos a lo largo del estudio, lo cual podría influir en el análisis de los resultados.

Conclusiones

No se constató diferencias en la presentación clínica, hospitalización ni en la mortalidad entre pacientes tratados con doxiciclina comparados con placebo. Hubo una tendencia a menores niveles de IL-1 β en los pacientes tratados con doxiciclina. Debe aumentarse el tamaño de la muestra para confirmar o rechazar los resultados.

Referencias bibliográficas

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
2. Ramos-Castañeda J, Barreto Dos Santos F, Martínez-Vega R, Galvão de Araujo JM, Joint G, Sarti E. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1):e0005224..
3. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Boletín Epidemiológico. Paraguay 2016. Revisado 2018. Disponible: http://www.vigisalud.gov.py/webdgvgs/files/boletines/09_01_2017_10_48_08_Boletin-Epidemiologico_SE-50.pdf. Published 2016..
4. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Boletín epidemiológico. Paraguay 2015. Revisado: 2018. Disponible: http://www.vigisalud.gov.py/webdgvgs/files/boletines/30_08_2016_10_18_15_Boletin-epidemiologico-SE-50.pdf.
5. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. epidemiológico. Paraguay. 2016 Revisado: 2018. Disponible: [Boletín.http://www.vigisalud.gov.py/webdgvgs/files/boletines/26_08_2016_11_01_24_2014.12.24-boletin-epidemiologico.pdf](http://www.vigisalud.gov.py/webdgvgs/files/boletines/26_08_2016_11_01_24_2014.12.24-boletin-epidemiologico.pdf). Published 2014.
6. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Paraguay. Boletín epidemiológico 2018. Revisado 2018. Dispnable: http://www.vigisalud.gov.py/webdgvgs/files/boletines/39_2018_Boletin.pdf.
7. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Boletín epidemiológico. Paraguay. 2018. Revisado 2018. Disponible: http://www.vigisalud.gov.py/webdgvgs/files/boletines/17_01_2018_11_49_39_Boletin-Epidemiologico_SE-52.pdf. Published 2017.
8. Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007;370(9599):1644-52.

9. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen vV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012;366(15):1423-32.
10. Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascón J. Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet Neurol*. 2013;12(9):906-919.
11. Garg RK, Malhotra HS, Jain A, Malhotra KP. Dengue-associated neuromuscular complications. *Neurol India*. 2015;63(4):497–516.
12. Tan S-S, Bujang MA. The clinical features and outcomes of acute liver failure associated with dengue infection in adults: a case series. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(2):164–9.
13. Castro JEZ, Vado-Solis I, Perez-Osorio C, Fredeking TM. Modulation of cytokine and cytokine receptor/antagonist by treatment with doxycycline and tetracycline in patients with dengue fever. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:370872.
14. Arias J, Valero N, Mosquera J, Montiel M, Reyes E, Larreal Y, et al. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology*. 2014;452–453:42–51.
15. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis*. 1989;11 Suppl 4:S830-9.
16. Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz AC. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol* [Internet]. 1997;71(6):4226–32.
17. Yang KD, Lee CS, Hwang KP, Chu ML, Shaio MF. A model to study cytokine profiles in primary and heterologously secondary Dengue-2 virus infections. *Acta Virol*. 1995;39(1):19-21.
18. Hober D, Delannoy AS, Benyoucef S, De Groote D, Wattré P. High levels of sTNFR p75 and TNF alpha in dengue-infected patients. *Microbiol Immunol*. 1996;40(8):569-73.
19. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci*. 2001;8(5):377-88.
20. Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, Lin CF, Yeh TM, Do QH, Vu TQ, Chen LC, Huang JH, Lam TM, Liu CC, Halstead SB. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis*. 2004 Jan 15;189(2):221-32.
21. Arias J, Valero N, Mosquera J, Montiel M, Reyes E, Larreal Y, Alvarez-Mon M. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology*. 2014;452-453:42-51.
22. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, Imbert P, Pecarere JL, Vergez-Pascal R, Wattré P, 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. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48(3):324-31.
23. Kuno G, Bailey RE. Cytokine responses to dengue infection among Puerto Rican patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994 Apr-Jun;89(2):179-82.
24. Iyngkaran N, Yadav M, Sinniah M. Augmented inflammatory cytokines in primary dengue infection progressing to shock. *Singapore Med J*. 1995;36(2):218-21.

-
25. Kubelka, C. F. et al. RESEARCH NOTE: Analysis of Tumor Necrosis Factor- α Serum Level in Brazilian Patients with Dengue-2. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1995. 90(6), 741-742.
 26. World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control : new edition. World Health Organization; 2009.
 27. Rothan HA, Mohamed Z, Paydar M, Rahman NA, Yusof R. Inhibitory effect of doxycycline against dengue virus replication in vitro. *Arch Virol*. 2014;159(4):711-8.
 28. Rothan HA, Buckle MJ, Ammar YA, Mohammadjavad P, Shatrah O, Noorsaadah AR, Rohana Y. Study the antiviral activity of some derivatives of tetracycline and non-steroid anti inflammatory drugs towards dengue virus. *Trop Biomed*. 2013;30(4):681-90.
 29. Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB Jr, Feres VC, Rocha B, Levi JE, Souza VA, Boas LS, Pannuti CS, Martelli CM. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis*. 2008;197(6):817-24.
 30. Bhattacharjee B, Bhattacharya S, Sardar B, Raj P, Ghosh M, Majumdar D, et al. Dengue and doxycycline-experience in a tertiary care hospital in eastern India in the year 2017 - An initial report. *J Pharmacol Ther Res* 2018;2(2):14-17.
 31. Vivek P, Naveet M, Amit M, Medha M, Dal Chand K, Ravi M, et al. Effect of doxycycline and doxycycline with carica papaya on thrombocytopenia and leucopenia in acute dengue fever patients. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 2022;11(6):3270-5.
 32. Fredeking TM, Zavala-Castro JE, González-Martínez P, Moguel-Rodríguez W, Sanchez EC, Foster MJ, Diaz-Quijano FA. Dengue Patients Treated with Doxycycline Showed Lower Mortality Associated to a Reduction in IL-6 and TNF Levels. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2015;10(1):51-8.