

**Sistema General de Regalías
Regalías para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación**

**Proyecto 7
“Impacto de factores nutricionales en la incidencia de dengue y la severidad de la enfermedad”**

**Programa
“AEDES - Abordando áreas endémicas de dengue para la disminución de su impacto en la sociedad”**

Investigador principal: OSCAR FERNANDO HERRÁN FALLA¹

**Coinvestigadores: EDUARDO VILLAMOR²
KATHRYN THORNTON²
GLORIA PRADA¹
ALBERTO ANGEL MARTIN¹**

^{1.} Centro de Investigaciones Epidemiológicas, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

^{2.} University of Michigan School of Public Health, Ann Arbor, Michigan, United States of America.

TABLA DE CONTENIDO

1. TITULO	3
2. RESUMEN EJECUTIVO.....	3
3. PALABRAS CLAVE.....	4
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O NECESIDAD	4
5. JUSTIFICACIÓN	5
6. OBJETIVOS	7
7. MARCOS DE REFERENCIA.....	7
8. ANÁLISIS SITUACIONAL DE LA TEMÁTICA DEL PROGRAMA	10
9. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y/O ÁREA TERRITORIAL BENEFICIADA	10
11. PRODUCTOS.....	15
12. RESULTADOS	15
13. IMPACTOS.....	16
14. COBERTURA / LUGARES DE EJECUCIÓN	16
15. CRONOGRAMA POR FASES	16
16. POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES	17
17. REGULACIÓN A CONSIDERAR	17
18. BIBLIOGRAFÍA.....	18

1. TITULO

Programa: "AEDES Colombia - Abordando Áreas Endémicas de Dengue para la disminución de su impacto en la Sociedad"

Proyecto: "Impacto de factores nutricionales en la incidencia de dengue y la severidad de la enfermedad"

2. RESUMEN EJECUTIVO

Proponemos examinar la asociación entre el estado nutricional y la infección por el virus del dengue en un estudio de cohorte de 2000 niños y adolescentes de 2-16 años. El estudio se llevará a cabo entre niños y adolescentes libres de infección por el virus del dengue al momento del ingreso a la cohorte, según confirmación serológica de IgG. Los participantes serán evaluados periódicamente durante dos años y medio para determinar la incidencia de infección. Como parte de este estudio se propone evaluar la asociación entre los marcadores bioquímicos de nutrientes que modulan la respuesta inflamatoria al momento del ingreso a la cohorte, y la infección por el virus del dengue utilizando un diseño de estudio anidado de casos y controles. Los casos serán los niños con infección incidente de dengue durante el seguimiento; los controles se seleccionarán aleatoriamente de entre los niños de la cohorte que permanezcan libres de infección durante los dos años y medio de seguimiento. En cada niño mediremos niveles de ácidos grasos, y vitaminas A y D en muestras de plasma almacenadas, que se recogerán en el momento de ingreso a la cohorte. Las concentraciones de estos nutrientes serán comparadas entre casos y controles. En segunda instancia, planeamos examinar las relaciones entre el estado antropométrico y la ingesta de micronutrientes al inicio del estudio con la incidencia de dengue durante el seguimiento, utilizando datos de todos los niños participantes en la cohorte. Un objetivo secundario del estudio será evaluar las asociaciones entre los parámetros nutricionales descritos y la severidad de la enfermedad por dengue, en los niños y adolescentes que se infecten con el virus del dengue durante el seguimiento.

2.1 SUMMARY

We propose to examine the association between nutritional status and dengue virus infection in a cohort study of 2000 children and adolescents aged 2-16 years. The study will be conducted among children and adolescents who had no prior dengue virus infection at baseline, ascertained by lack of IgG seroconversion to dengue virus, and who will be followed periodically for two and half years to determine whether they become infected. Within this cohort, we propose to evaluate the association between biomarkers of nutrients

that modulate inflammatory responses at the time of recruitment and dengue virus infection through a nested case-control study. Cases will be children with incident dengue infection; a random set of controls will be selected from the cohort among children who remained uninfected during the three-year study follow-up. We will measure the concentration of nutrients that modulate the inflammatory response (fatty acids, vitamins A and D) in stored plasma samples collected at the time of recruitment and compare the distributions of these nutrients between cases and controls. In addition, we propose to examine the relations of anthropometric status and dietary intake of micronutrients at baseline with the incidence of dengue during follow-up using the whole cohort. A secondary endpoint of the study will be severity of dengue disease among children and adolescents who become infected with dengue virus during follow-up.

3. PALABRAS CLAVE

Dengue, Estado nutricional, Ácidos grasos, Vitamina A, Vitamina D, Severidad.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O NECESIDAD

El Dengue es uno de los principales problemas de salud pública del mundo. En América, la incidencia de la enfermedad se ha incrementado 30 veces, convirtiéndose en uno de los padecimientos más importante en términos de morbilidad, mortalidad e impacto económico. La última epidemia desarrollada de la enfermedad en el territorio americano, fue la ocurrida durante el 2010, en donde solo en Colombia se presentaron 157.152 casos de Dengue, 9.482 de ellos severos; 217 muertes fueron atribuidas a la enfermedad, registrándose un aumento en la letalidad de 7.5 veces comparado con el año anterior, y superando el índice máximo considerado para esta enfermedad.

Uno de los factores más influyentes en la incidencia y los desenlaces asociados a las enfermedades infecciosas es el estado nutricional. Se estima que la desnutrición puede ser responsable de hasta la mitad de las muertes asociadas a enfermedades infecciosas en niños menores de 5 años en los países en desarrollo. Sin embargo, a pesar de que el dengue es una enfermedad infecciosa de altísima importancia en salud pública, se conoce relativamente poco sobre la influencia de factores nutricionales en aspectos relacionados con la infección por este virus y la severidad de la enfermedad. Sin embargo, el creciente reconocimiento del papel que juegan algunos nutrientes como ácidos grasos, vitaminas (A y D) y minerales (Hierro y Zinc) como moduladores de la respuesta inflamatoria, hace necesario evaluar el impacto que los nutrientes y el estado nutricional tienen sobre el riesgo de infección por virus del dengue y sobre la severidad de la enfermedad; pues se conoce que la respuesta inmune tiene un rol muy importante durante el establecimiento de las infecciones, y que su intensidad es un factor clave en el desarrollo de la extravasación plasmática que se desarrolla en los pacientes con dengue, característica distintiva de las formas severas de la enfermedad. Establecer el tipo de influencia que tiene la nutrición sobre la infección por dengue, permitirá general estrategias de prevención y pronóstico que contribuyan a la reducción de la incidencia de casos y severidad de los mismos, disminuyendo el impacto del dengue sobre la población.

5. JUSTIFICACIÓN

El dengue continúa siendo una de las más frecuentes enfermedades transmitidas por artrópodos. Su incidencia ha aumentado 30 veces en los últimos cincuenta años, ya que se ha expandido geográficamente hasta haber puesto a aproximadamente un tercio de la población mundial en situación de riesgo de la enfermedad (1). Durante el año 2010, el virus dengue provocó 1.800.000 casos de la enfermedad en el continente Americano (44.656 graves). Países como Brasil, Colombia, Perú, Venezuela, Nicaragua, México, Puerto Rico, Honduras, y República Dominicana fueron algunos de los más afectados durante esta epidemia; donde 1.167 personas fallecieron por complicaciones de la enfermedad (2). Durante este año, Colombia reportó al sistema de vigilancia del Instituto Nacional de Salud 157.152 casos de dengue, 9.482 considerados casos severos, con 217 muertes atribuibles a la enfermedad (4.7 veces más que el año anterior), lo cual evidencia un aumento tanto en la frecuencia, como en el desarrollo de formas severas e incluso mortales del dengue, las cuales durante esta última epidemia se concentraron en la población colombiana menor a 15 años (3). Aunque el 75% del territorio nacional (620 municipios) registra transmisión endémica urbana de dengue, el 80% de la carga de la enfermedad se concentra en 100 municipios (4); la mayoría de estos pertenecientes a 8 departamentos del país (Antioquia, Huila, Norte de Santander, Santander, Tolima, Valle, Sucre, Meta). Así mismo, Santander se ubica entre los seis departamentos con mayor número de muertes reportadas (17 de las 217 reportadas) por complicaciones de la enfermedad (3, 5). En la actualidad, 23.000.362 personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad en Colombia.

La enfermedad por dengue en la mayoría de los casos (85%) se manifiesta como un cuadro febril leve, acompañado de cefalea, mialgias, artralgias y dolor retroocular, de tipo autolimitado, que tiene una duración de 7 a 10 días. Esta forma de la enfermedad aunque leve, resulta altamente incapacitante, ocasionando un alto porcentaje de ausentismo escolar y laboral. Un porcentaje considerable de los casos (15%) evoluciona hacia formas severas de la enfermedad, llegándose a presentar hasta un 2.5% de desenlaces fatales. La ausencia de una terapia antirretroviral específica, conlleva a que el tratamiento del dengue sea exclusivamente sintomático, mediante la administración de líquidos intravenosos, antipiréticos y un seguimiento clínico cercano; que buscan reducir la mortalidad en los pacientes complicados.

Hoy se conoce, que el estado nutricional es uno de los factores más influyentes en la incidencia y los desenlaces asociados a las enfermedades infecciosas. Se estima que la desnutrición puede ser responsable de hasta la mitad de las muertes asociadas a enfermedades infecciosas en niños menores de 5 años en los países en desarrollo (6). Aunque el dengue es una enfermedad infecciosa de altísima importancia en salud pública, se conoce relativamente poco sobre la influencia de factores nutricionales en aspectos relacionados con la infección por este virus.

Aun no se han llevado a cabo estudios que relacionen el estado de ácidos grasos (AG) con la infección por el virus del dengue; sin embargo, el creciente reconocimiento del papel que juegan los ácidos grasos (AG) como moduladores de la respuesta inflamatoria, ha despertado el interés en el estudio de sus efectos sobre la infección por virus dengue; pues se sabe que la intensidad de la respuesta inmune al virus del dengue es un factor clave en el desarrollo de la extravasación plasmática, característica distintiva de las formas severas de la enfermedad (7). Sin embargo, el papel de los AG en la infección por

dengue puede ser variable. En la respuesta primaria a la infección, es posible que el huésped requiera una respuesta inmune rápida y agresiva para controlar la infección, pero una vez que la infección se ha establecido, los AG podrían prevenir la progresión a una presentación grave a través de la supresión de las citoquinas y otros mediadores inflamatorios. Las vitaminas A y D también tienen un fuerte potencial inmunomodulador sobre células del sistema inmunitario (linfocitos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas); dichas células, juegan un rol importante en la respuesta a la infección por virus dengue, por lo cual el evaluar los niveles de vitamina A y D en los pacientes por dengue y su asociación con infección y severidad de la enfermedad resulta de gran importancia para el entendimiento fisiopatológico de esta enfermedad.

Pocas investigaciones se han realizado hasta el momento sobre la relación entre la nutrición y el dengue, estas se han centrado principalmente en la asociación de los indicadores antropométricos del estado nutricional y la severidad de la enfermedad por dengue en niños (8-20). Algunos reportes anecdóticos sugieren que las personas que presentan la enfermedad por dengue grave frecuentemente están desnutridos, y se ha hipotetizado que la desnutrición podría suprimir la respuesta inmune mediada por células que estaría asociada con enfermedad severa (8). Aunque la obesidad es un factor de riesgo para enfermedades cardiometabólicas, también se ha encontrado un efecto protector contra la mortalidad en pacientes con enfermedades crónicas, tales como el VIH/SIDA y la insuficiencia cardíaca crónica (21). Un meta-análisis reciente encontró una asociación inversa entre la obesidad en adultos gravemente enfermos y su mortalidad en las unidades de cuidado intensivo (22). Por otra parte, los estudios que han investigado la relación entre el estado nutricional y la enfermedad por virus del dengue en niños ofrecen resultados contradictorios. Algunos estudios sugieren una asociación entre el sobrepeso y la gravedad de la enfermedad, mientras otros han reportado lo contrario o una total falta de asociación (8). Las comparaciones entre estos estudios se ven limitadas por muchos factores, incluyendo diferencias en la metodología, el uso de diferentes medidas antropométricas y referencias de crecimiento, y definiciones inconsistentes de la desnutrición. Por otra parte, la validez de los resultados de muchos de estos estudios puede ser cuestionable, debido a limitaciones y sesgos incluyendo la falta de consideración de factores de confusión, posible sesgo de selección, bajo poder estadístico, y la imposibilidad de descartar infecciones asintomáticas pre-existentes en los controles sanos.

Así mismo, muy pocos trabajos evalúan el posible efecto del estado de micronutrientes sobre la incidencia y gravedad de la infección por virus dengue. En un estudio pequeño realizado entre casos adultos con dengue clásico y controles sanos en Guatemala, se encontró una concentración plasmática de retinol que era significativamente menor en los casos en comparación con los controles durante la infección aguda, aunque no hubo diferencias significativas en los niveles de retinol entre los dos grupos 7 días después de que los casos fueron dados de alta del hospital (23). No se encontró asociación entre niveles séricos de zinc y la gravedad de la enfermedad del dengue en un estudio transversal de 51 niños de Indonesia (24).

La creciente importancia global de la infección por dengue, junto con la falta de conocimiento sobre el posible efecto de factores nutricionales, a pesar de la evidencia que sugiere una relación significativa entre la nutrición y las enfermedades infecciosas, exigen la realización de un estudio prospectivo para determinar el impacto de los nutrientes y el

estado nutricional en el riesgo de infección por el virus del dengue y la gravedad de la enfermedad.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

Determinar la asociación entre el estado nutricional y la infección por el virus del dengue en niños y adolescentes de 2-16 años, procedentes de zonas endémicas de Dengue en Colombia.

6.2 Objetivos Específicos:

1. Examinar la asociación entre indicadores bioquímicos de nutrientes moduladores de la respuesta inflamatoria (AGPI n-6, vitamina A y D) y el riesgo de infección por el virus del dengue.
2. Examinar si los indicadores antropométricos del estado nutricional al inicio del estudio se asocian inversamente con la incidencia de la infección por el virus del dengue.
3. Examinar si la ingesta de hierro y/o zinc al inicio del estudio se asocian inversamente con la incidencia de la infección por dengue.
4. Evaluar la asociación entre indicadores bioquímicos de nutrientes moduladores de la respuesta inflamatoria (AGPI n-6, vitamina A y D) al momento de ingreso en la cohorte (línea de base) y la severidad de la infección por dengue en los niños que resulten infectados durante el seguimiento.
5. Evaluar si los indicadores antropométricos del estado nutricional al inicio del estudio se asocian inversamente con la severidad de la enfermedad por dengue.
6. Examinar si la ingesta de hierro y/o zinc al inicio del estudio se asocian inversamente con la severidad de la enfermedad por dengue.

7. MARCOS DE REFERENCIA

Estado nutricional e Infección:

La interacción entre el estado nutricional y las infecciones agudas se ha mencionado desde las últimas tres décadas (25). Esta interacción es bidireccional, el estado nutricional influye en la susceptibilidad de desarrollar infecciones, y en los procesos infecciosos se puede afectar negativamente la condición nutricional (26). En los seres humanos, la malnutrición moderada/severa se asocia con una disminución significativa de la respuesta inmune celular, los niveles de inmunoglobulina A (IgA) secretada, los niveles séricos del complemento, se deteriora la función fagocítica y se inhibe la producción de la interleuquina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral (TNF) (27).

Ácidos grasos y respuesta inflamatoria:

El creciente reconocimiento del importante papel que los ácidos grasos (AG) juegan como moduladores de la respuesta inflamatoria ha despertado el interés en el estudio de sus efectos sobre la infección. El consumo de ácido linoleico, un ácido graso poliinsaturado

(AGPI) n-6, proporciona un sustrato para la síntesis de mediadores pro-inflamatorios (28). Por el contrario, alguna evidencia sugiere que la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados n-3 podría tener efectos anti-inflamatorios en trastornos caracterizados por la inflamación crónica, tales como asma, enfermedad intestinal inflamatoria y artritis reumatoide (29). Las alteraciones de la respuesta inmuno-inflamatoria que se han asociado con AGPI n-3 incluyen reducción en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, disminución de la proliferación, activación y señalización de células T, e inhibición de la producción de óxido nítrico (30, 31). Aunque estos efectos pueden ser beneficiosos para la reducción de la inflamación, la supresión de la función inmune también podría afectar negativamente la resistencia del huésped a un agente infeccioso invasor. Algunos modelos animales sugieren que el aceite de pescado, rico en AGPI n-3, podría reducir la resistencia del huésped a la infección por varios patógenos, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, y *Pseudomonas aeruginosa* (32). Con relación a los virus, los pocos estudios experimentales disponibles han producido resultados inconsistentes. Mientras que algunos han demostrado que los ratones alimentados con aceite de pescado disminuyen su resistencia al virus de la influenza, otros han encontrado que una dieta de aceite de pescado no tiene efectos adversos en ratones infectados con Citomegalovirus (CMV) murino, o con el retrovirus de inmunodeficiencia murino (31, 33). Por otra parte, estudios in vitro han demostrado que los ácidos grasos insaturados pueden tener actividad virucida (34, 35). Evidencia reciente de estudios epidemiológicos sugiere que los niveles de ciertos AGPI n-3 y n-6 se asocian con un menor riesgo de transmisión materno-infantil del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y la progresión rápida de enfermedad por SIDA (36-38). Además, en un ensayo clínico aleatorizado, la suplementación con AGPI n-3 de cadena larga en aceite de pescado durante 6 meses se asoció de forma estadísticamente significativa con menos episodios de enfermedades infecciosas incluyendo el resfriado común, gripe, o episodios de diarrea y una menor duración de los episodios en escolares tailandeses (39). En otro estudio, lactantes que recibieron AGPI de cadena larga a través de leche complementaria durante 12 meses tuvieron una incidencia significativamente menor de bronquiolitis / bronquitis luego de 5-9 meses, en comparación con el grupo que no recibió la suplementación (40).

No se han llevado a cabo estudios que relacionen el estado de ácidos grasos (AG) con la infección por el virus del dengue. Aunque la patogenia de la enfermedad del dengue sigue siendo incierta, la intensidad de la respuesta inmune al virus del dengue se considera un factor clave en el desarrollo de extravasación de plasma, una característica distintiva de las formas hemorrágicas de la enfermedad del dengue (7). Los altos niveles de citoquinas proinflamatorias se han asociado con formas severas de la enfermedad del dengue (7). Es posible que el papel de los AG en la infección por el virus del dengue varíe. En la respuesta primaria a la infección con virus del dengue, es posible que el huésped requiera una respuesta inmune rápida y agresiva para controlar la infección, sin embargo, una vez que la infección se ha establecido, los AGPI podrían prevenir la progresión a una presentación grave a través de la supresión de las citoquinas y otros mediadores inflamatorios.

Vitamina A y D y su acción sobre el sistema inmune:

Además de los AG, las vitaminas A y D tienen también un fuerte potencial inmunomodulador. Varias células del sistema inmunitario, incluyendo linfocitos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas, expresan receptores de vitamina D (41-45). La vitamina D3 modula la respuesta del sistema inmunológico a través de varios

mecanismos, incluyendo la promoción de la actividad de los macrófagos, la producción de proteínas antimicrobianas, y la disminución de la respuesta pro-inflamatoria de tipo Th1 mediada por células T ayudadoras (46). Evidencia creciente sugiere que la insuficiencia de vitamina D es altamente prevalente en todo el mundo, incluyendo Colombia. En un estudio reciente en niños de Bogotá, se encontró que el 56% tenía insuficiencia de vitamina D. La preocupación por la insuficiencia de vitamina D generalizada combinada con el creciente reconocimiento de las acciones de la vitamina D en la respuesta inmune ha estimulado la investigación sobre su papel en la infección (47). La deficiencia de vitamina D se ha asociado con las infecciones respiratorias virales, tuberculosis, infección crónica por hepatitis C (48-50), y el riesgo de transmisión vertical del VIH (51). Algunos estudios de casos y controles han reportado una asociación inversa entre los niveles de vitamina D y el riesgo de infecciones respiratorias bajas severas en niños pequeños (52-56). En un ensayo clínico reciente en niños de edad escolar en el Japón, la suplementación con vitamina D redujo la incidencia de gripe A después de 4 meses de seguimiento (57). En otro ensayo clínico en niños ≤ 3 años en Kabul, Afganistán, suplementos de vitamina D en altas dosis redujeron el riesgo de episodios repetidos de neumonía (58).

El papel de la vitamina A en la modulación de la respuesta inmune ha sido ampliamente estudiado. La evidencia sugiere que la vitamina A y los retinoides relacionados pueden afectar a la inmunidad de varias maneras, incluyendo la apoptosis, la expresión de citoquinas, la producción linfocitaria de anticuerpos, y la función de muchas otras células de la inmunidad (59). La suplementación con vitamina A puede por un lado disminuir las respuestas inflamatorias mediadas por células T, y por otro aumentar la respuesta humoral (60). Un reciente meta-análisis de 43 ensayos clínicos controlados realizados en 18 países concluyó que la suplementación con vitamina A a niños menores de 5 años se asocia significativamente con una menor incidencia de sarampión y diarrea, aunque no tiene efecto en las infecciones respiratorias (61). El efecto de la vitamina A puede variar de acuerdo al tipo de agente infeccioso. En un estudio reciente en México se encontró que la infección por norovirus y la respuesta de las citoquinas durante la infección variaron según el tipo de virus (60, 62).

Otros micronutrientes y su papel en las Infecciones:

Además de los nutrientes mencionados anteriormente, el zinc juega un papel clave en el sistema inmunológico y en la resistencia del huésped a la infección. El zinc, necesario para la síntesis de ADN y el crecimiento y la diferenciación celular, es un nutriente esencial que debe ser suministrado a través de la dieta (63). La deficiencia de zinc inhibe la función del timo, que es fundamental en la maduración de las células T ayudadoras, y resulta en una disminución en el desarrollo y la función de los linfocitos T y B (63, 64). La deficiencia de zinc puede dar lugar a disfunción de la inmunidad celular, lo que puede alterar los procesos virucidas (64). Aunque no está claro cómo la disponibilidad de zinc afecta la replicación de agentes infecciosos, algunos microorganismos, tales como el VIH-1, dependen del zinc para su ensamblaje (65). Por otra parte, el zinc a altas concentraciones puede tener una función microbicida (65). Varios ensayos clínicos controlados en niños han demostrado que la suplementación con zinc reduce la incidencia y duración de la diarrea aguda y crónica; existe alguna evidencia también que sugiere un posible efecto protector en las infecciones respiratorias bajas (66-69). Una revisión sistemática reciente concluyó que la suplementación con zinc podría reducir la incidencia del resfriado común (70).

La deficiencia de hierro también podría disminuir la resistencia del huésped a la infección. El hierro y zinc comparten mecanismos de absorción y de transporte, de tal manera que la competencia entre los dos podría afectar su biodisponibilidad (71). Algunos ensayos clínicos controlados sugieren que suplementos de hierro y zinc combinados podrían resultar en una disminución de los episodios de diarrea en niños y un menor riesgo de diarrea grave en lactantes (72, 73).

8. ANÁLISIS SITUACIONAL DE LA TEMÁTICA DEL PROGRAMA

El dengue es la arbovirosis de mayor importancia mundial. En lo corrido del 2011 se han notificado al SIVIGILA 22.912 casos de dengue, de los cuales 21.898 han sido casos leves de la enfermedad (96%), y 1.014 dengues graves (4%), reportándose además un total de 155 muertes, lo cual equivale a una letalidad nacional por dengue del 3,75%; que evidencia un problema en el control de la transmisión, efectividad de las medidas de prevención, y calidad de la atención de los paciente con dengue (74).

El panorama actual del dengue en Colombia sin duda es favorecido por el fenómeno de transmisión endémica urbana que se presenta en gran parte del territorio nacional (620 municipios). Este fenómeno es favorecido condiciones de ambientales que favorecen el desarrollo y permanencia del vector (*Aedes aegypti*), la circulación simultánea de todos los serotipos virales que favorecen su transmisión, el comportamiento en ciclos epidémicos cada vez más cortos, y el aumento en la frecuencia de formas graves de la enfermedad. Así mismo, desde el punto de vista económico, el dengue genera una gran carga económica a la región, que se calcula en cerca de \$2.1 billones de dólares por año (75).

Sin embargo, a pesar de que el dengue es una enfermedad infecciosa de altísima importancia en salud pública, se conoce relativamente poco sobre la influencia de factores nutricionales en aspectos relacionados con la infección por este virus y la severidad de la enfermedad. Sin embargo, se sabe que la nutrición está involucrada en la modulación de la respuesta inflamatoria, y que esta tiene un rol importante durante el establecimiento de las infecciones. Además, se ha establecido que la intensidad de la respuesta inflamatoria es un factor clave en el desarrollo de la extravasación plasmática que se desarrolla en los pacientes con dengue, característica distintiva de las formas severas de la enfermedad.

9. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y/O ÁREA TERRITORIAL BENEFICIADA

Considerando que la transmisión endémica y epidémica del virus dengue se concentra en la población urbana, y que las áreas urbanas de Colombia con población entre los 250.000 y 100.000 habitantes no presentan heterogeneidad en términos de perfil epidemiológico del dengue; para la ejecución del presente estudio se seleccionará 3 municipios con características similares en condiciones de circulación viral, tamaño y distribución poblacional, e impacto de la enfermedad (Piedecuesta, Floridablanca y Dos Quebradas) a la mayoría de municipios endémicos para dengue en Colombia.

Los municipios seleccionados tienen características similares en términos de incidencia, niveles de complejidad de atención en salud, sistema de referencia y contra-referencia, tamaño poblacional (mediano: 50-200.000 habitantes) que además cuentan con un número básico y estable de técnicos involucrados en los procesos de prevención y control del dengue.

10. METODOLOGÍA

Diseño del estudio:

Se realizará un estudio de cohorte prospectivo.

Tamaño de muestra:

Se evaluarán 2000 niños y adolescentes de 2 a 16 años de edad.

Nota: Este estudio se conducirá en el mismo periodo de tiempo, población y grupos de edades similares a los del estudio de "Identificación de grupos de edad prioritarios a vacunar en la población infantil y adolescente". Puesto que se desarrollará en el mismo escenario, el personal del proyecto mencionado, apoyará las actividades de captación y vigilancia de los sujetos que se incluirán para el presente estudio. Sin embargo, se necesitará reforzar con esta propuesta el recurso humano del proyecto de "Identificación de grupos de edad prioritarios a vacunar en la población infantil y adolescente" con un equivalente a dos equipos de trabajo (4 profesionales) por un periodo de al menos un año y medio.

Criterios de Exclusión:

Historia de enfermedad que contraindique tomar muestras de sangre.

Periodo de Seguimiento:

Los participantes serán seguidos durante 2 años y medio y evaluados periódicamente para determinar seroconversión de IgG. A los niños que presenten infección por dengue durante el seguimiento, se les registrarán los datos clínicos y desenlaces relacionados con la severidad de la enfermedad. Se obtendrán muestras de sangre en todos los participantes al ingreso en la cohorte, después de un ayuno de 12-14 horas. La muestra de sangre será centrifugada para obtener tres alícuotas de aproximadamente 0.7 ml cada una, protegidas de la luz, y criopreservadas a -80 ° C.

Objetivo primario # 1 - nutrientes moduladores de las respuestas inflamatorias y desenlaces relacionados con el dengue.

Hipótesis:

Los niveles séricos de AGPI n-6, vitamina A y vitamina D se asocian inversamente con el riesgo de infección por el virus del dengue en los niños. Las concentraciones séricas de ácidos grasos monoinsaturados, AGPI n-3, grasas saturadas y grasas trans se asocian con un mayor riesgo de infección por el virus del dengue.

Desarrollo del objetivo:

Se realizará un estudio de casos y controles anidado dentro de la cohorte descrita previamente. Los casos serán todos los niños y adolescentes con infección por el virus del

dengue incidente durante el seguimiento y los controles serán una muestra aleatoria de los participantes que no se infecten con el virus del dengue durante los dos años y medio de seguimiento. Anticipamos que se presenten 500 casos incidentes y utilizaremos una razón de 1:1 en la selección de los controles. Los controles serán apareados con los casos de acuerdo al sexo y a la edad dentro de una ventana de 6 meses.

Muestras de suero obtenidas en la visita de línea de base, y que se encuentren debidamente criopreservadas, serán identificadas para los casos y los controles, y se transportarán a la Universidad de Michigan para la determinación de las concentraciones séricas de las vitaminas A y D, y de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, y trans). La vitamina A se determinará con cromatografía líquida de alto rendimiento. La vitamina D cuantificará con quimioluminiscencia. Los ácidos grasos se medirán con cromatografía de gases de isótopos estables y espectrometría de dilución de masas. Los análisis de vitaminas se llevarán a cabo en el Laboratorio de Patología y Química de la Universidad de Michigan. Los análisis de ácidos grasos se llevarán a cabo en el Centro de Investigación de Nutrición y Obesidad de Michigan. Una alícuota de suero se almacenará en crioviales etiquetados a -80° C, para estudiar preguntas de investigación futuras en relación con otros micronutrientes.

Definición de desenlaces primarios:

Los casos se definen como los niños con infección de dengue confirmada serológicamente incidente durante el período del estudio (dos años y medio). Los controles se definen como aquellos sujetos que no demuestren seroconversión para la IgG del dengue al final de los dos años y medio del período de seguimiento. Además, la severidad de la enfermedad del dengue entre los casos se considerará como un resultado secundario. Los casos confirmados de infección por dengue, se clasificarán de acuerdo a la sintomatología de la enfermedad en, fiebre del dengue (FD), dengue hemorrágico (DH) y síndrome de choque por dengue (DSS) de acuerdo con los criterios OMS del 97 (76). Donde las enfermedades graves por dengue se definen como dengue hemorrágico o DSS y las no graves como FD.

Análisis de Datos

Las características basales y las concentraciones medias de vitamina A, vitamina D, y cada uno de los ácidos grasos en forma de porcentaje de grasa total se compararán entre casos y controles con el test de McNemar para las variables categóricas y el test de rangos signados para las variables continuas. Análisis bivariado se realizarán para identificar las covariables que se asocien independientemente con la exposición y las variables de resultado. Odds ratios y 95% intervalo de confianza para el dengue incidente por cuartiles de la concentración de cada nutriente se calcularán mediante regresión logística condicional. Análisis multivariados de regresión logística condicional se llevarán a cabo para obtener estimaciones de odds ratio ajustado. En estos modelos, la variable de resultado será el caso-control de la situación, y los predictores incluirán las categorías ordinales que representen los cuartiles de la concentración de nutrientes, además de los factores de confusión potenciales, incluyendo aquellos que estén asociados con la exposición o los resultados del análisis de dos variables, así como las variables que se consideran relevantes desde un punto de vista mecanicista. Variables de ajuste se mantendrá en los modelos multivariados si se asocian significativamente con el resultado de $p < 0,05$, si su introducción modifica sustancialmente las estimaciones de la asociación entre estas y el resultado, o si se les considera de importancia biológica. Una prueba para la tendencia de la asociación entre la concentración de nutrientes y la incidencia de

dengue se llevará a cabo mediante la introducción de una variable ordinal que representa los cuartiles de distribución de nutrientes de forma continua en los modelos, y su significancia estadística se evaluará mediante la prueba de Wald. Además, se estudiarán las interacciones entre los indicadores de nutrientes y la posible modificación del efecto.

Un enfoque similar se seguirá para examinar las asociaciones entre cada biomarcador de nutrientes y la gravedad del dengue, un objetivo secundario. En estos análisis secundarios, los casos serán aquellos con infección por dengue grave (dengue hemorrágico y / o DSS) y los controles serán seleccionados de entre los niños que se infectaron, pero no desarrollaron las formas graves de dengue.

Objetivos primarios # 2 y # 3 - Antropometría e ingesta alimentaria

Hipótesis:

Indicadores antropométricos incluyendo el índice de masa corporal, la talla, y el perímetro braquial presentes al inicio del estudio se asocian con menor riesgo de infección por el virus del dengue. Indicadores de obesidad tales como la suma y la razón de pliegues cutáneos subescapular/tricipital, así como la circunferencia abdominal al inicio del estudio se asocian inversamente al riesgo de infección por el virus del dengue.

Las asociaciones de la antropometría y la ingesta de zinc y / o de hierro con los resultados relacionados con el dengue se examinará con toda la cohorte y siguiendo un diseño de estudio de cohortes.

Recolección de datos:

En la visita de estudio inicial, se obtendrán las medidas antropométricas de los niños y evaluará su la ingesta en la dieta a largo plazo con el uso de un cuestionario de frecuencia alimentaria (CFA). La evaluación antropométrica detallada incluirá el peso con una precisión de 10 g utilizando balanzas digitales, altura con una precisión de 1 mm con placas rígidas con el pie de muebles o piezas de la cabeza, la circunferencia del brazo (MUAC) y la circunferencia de la cintura con cintas inextensible, y el espesor del pliegue subescapular del tríceps con pinzas Holtain. Estas mediciones se obtendrán por personal capacitado con el uso de métodos estandarizados. Tres mediciones de la altura y el espesor de los pliegues se obtendrán, y la mediana de las tres serán utilizados en el análisis.

Los CFAs se adaptarán a partir de un cuestionario que fue desarrollado y validado específicamente para esta población (77). El cuestionario indaga sobre la frecuencia de consumo de los principales contribuyentes a la ingesta de nutrientes en la población, usando un tamaño estándar de las porciones. La ingesta de zinc y hierro se calcularán a partir de la FFQ con el uso de tablas de composición de alimentos adaptadas. Las mediciones antropométricas se repetirán en cada visita de seguimiento, las cuales se realizarán a intervalos de 6 meses, en donde se aplicarán nuevamente el CFA y se repetirá la medición de la ingesta de zinc y hierro.

Definición de los principales resultados:

Los resultados primarios de interés son la incidencia de la infección por dengue confirmada serológicamente. Además, la severidad de la enfermedad del dengue entre las personas que han sufrido una seroconversión se considerará como un resultado secundario. Los casos confirmados de infección por dengue, se clasificarán de acuerdo a

la sintomatología de la enfermedad en, fiebre del dengue (FD), dengue hemorrágico (DH) y síndrome de choque por dengue (DSS) de acuerdo con los criterios OMS del 97 (76). Donde las enfermedades graves por dengue se definen como dengue hemorrágico o DSS y las no graves como FD.

Análisis de Datos:

Estado antropométrico y la infección por dengue: El estado nutricional de los niños de ≤ 60 meses se caracteriza por múltiples índices antropométricos como retraso del crecimiento (talla para la edad puntuación $z < -2$), emaciación (peso para la talla puntuación $z < -2$), bajo peso (peso para la edad puntuación $z < -2$) de acuerdo con los Patrones de Crecimiento Infantil de la OMS (78), la delgadez, el sobrepeso o la obesidad basado en las clasificaciones de IMC para la edad de acuerdo a las recomendaciones de la International Obesity Task Force (79, 80); MUAC, la suma y la relación de pliegues cutáneos y subescapulares del tríceps como indicadores de adiposidad general y del tronco, respectivamente, y circunferencia de la cintura, como indicador de la adiposidad central. Entre los niños y adolescentes > 5 años de edad se tendrá en cuenta el retraso del crecimiento (de acuerdo con la OMS, 2007 de referencia) (81), así como la delgadez, sobrepeso / obesidad y los indicadores de distribución de la grasa como se describe más arriba para los niños más pequeños.

Un análisis bivariado se realizará para identificar las covariables que se asocien independientemente con la exposición y las variables de resultado. Adicionalmente, se estimará el riesgo relativo con intervalos de confianza del 95% para cada resultado (es decir, la infección del dengue y la enfermedad del dengue incidente grave) por los niveles de cada indicador antropométrico. Análisis multivariados de regresión binomial se llevarán a cabo para obtener estimaciones de riesgo relativo ajustado. En estos modelos, la variable de resultado será cada extremo del dengue relacionados, y los predictores incluirán variables de indicadores antropométricos para las exposiciones de interés, además de los factores de confusión potenciales, incluyendo aquellos que están asociados con la exposición o los resultados en el análisis de dos variables, así como las variables que se consideran relevantes desde un punto de vista mecanicista. Variables de ajuste se mantendrá en los modelos multivariados si siguen estando significativamente asociado con el resultado de $p < 0,05$, si su introducción modifica sustancialmente las estimaciones de la asociación entre los indicadores de nutrientes y el resultado, o si se les considera de importancia biológica. Una prueba para la tendencia de la asociación entre los predictores ordinales, como las categorías de IMC, y la incidencia de dengue se llevará a cabo mediante la introducción de una variable que represente las categorías continuas en los modelos y las pruebas de su significación estadística se evaluará con la prueba de Wald. Además, las interacciones entre los indicadores de nutrientes y la posible modificación del efecto se estudiarán. Estas interacciones serán evaluadas por la adición de productos cruzados entre los términos de una posible modificación e indicadores para el modelo multivariado, aquellas que se asocien significativamente con el resultado de $p < 0,05$ se mantendrán en el modelo.

La ingestión de hierro y zinc y la infección por dengue: El Hierro en la dieta y la ingesta de zinc se calculará a partir de la CFA. Obtendremos el consumo total de energía ajustando los valores con el uso del método residual, y estos se clasificaran en cuartiles para representar a la ingesta. Posteriormente, se estimaran los riesgos relativos y el 95% de

cada uno de los resultados de dengue relacionados con los cuartiles de exposición dietética y usando métodos análogos a los descritos anteriormente.

11. PRODUCTOS

1. Conocimiento de la interacción existente entre los indicadores bioquímicos e indicadores antropométricos del estado nutricional, y la ingesta de hierro y/o zinc con la incidencia de la infección por el virus del dengue.
2. Establecimiento del tipo de asociación existente entre los indicadores nutricionales evaluados (AGPI n-6, vitamina A y D, indicadores antropométricos, hierro y/o zinc) y la severidad de la infección por dengue en los niños que resulten infectados durante el seguimiento.
3. Creación de estrategias de prevención, y predicción encaminadas a reducir el impacto del dengue en la población Colombiana.
4. Fortalecimiento de la comunidad científica. La ejecución del proyecto conllevará la capacitación del personal de diferentes disciplinas en el manejo de nuevos procedimientos.
5. Formación de recurso humano al nivel de semilleros, jóvenes investigadores y maestría.

12. RESULTADOS

12.1 Fortalecimiento Comunidad Científica:

Formación	Descripción	Personas	Beneficiario
Formación Estudiante de postgrado	Elaboración de tesis estudiante de postgrado	2	Dos estudiantes de Maestría.
Jóvenes investigadores	Entrenamiento de profesionales con interés por desarrollar carrera en investigación	2	Comunidad científica nacional
Generación de Proyectos interinstitucionales	Consolidación de redes de investigación interinstitucionales	1	Comunidad Científica

12.2 Apropiación Social del Conocimiento:

Publicación	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Artículo	Artículo en revista internacional indexada	2	Comunidad Científica

Ponencia	Ponencia evento científico Nacional e internacional	2	Comunidad Científica
----------	---	---	----------------------

12.3 Generación de nuevo Conocimiento:

Resultado	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Fortalecimiento de la prevención de la enfermedad	Creación de estrategias de prevención, y predicción encaminadas a reducir el impacto del dengue en la población Colombiana	1	Comunidad en general

13. IMPACTOS

Impacto	Año	Descripción
Impactos científicos y tecnológicos del proyecto en las entidades participantes.	2013	Capacitación de los miembros de los grupos de investigación participantes en nuevas técnicas y procedimiento.
	2015	Formación intelectual de investigadores en estudios de maestría.
En la población/área territorial en términos epidemiológicos	2016	Diseño de una política nutricional para la población de niños y adolescentes que residen en áreas endémicas en dengue.

14. COBERTURA / LUGARES DE EJECUCIÓN

La ejecución del proyecto será en 3 municipios endémicos de dengue en Colombia: Piedecuesta, Floridablanca y Dos Quebradas.

15. CRONOGRAMA POR FASES

N° Actividad	Actividad	Inicio	Final	Ejecución en
1	Elaboración de Protocolos del estudio.	07/01	07/01	1 Mes
2	Capacitación de personal	07/01	07/01	1 Mes
3	Diseño y ejecución de estudio piloto.	08/01	09/01	2 Meses
4	Captación de la población del estudio.	10/01	02/02	5 Meses
5	Vigilancia y Seguimiento	03/02	07/04	28 Meses
6	Obtención y almacenamiento de muestras.	10/01	07/04	33 Meses

7	Pruebas de laboratorio	02/04	08/04	6 Meses
8	Análisis de la información	07/04	09/04	2 Meses
9	Elaboración de Informe	10/04	12/04	2 Meses
10	Elaboración de Artículos Científicos	07/04	12/04	6 Meses

16. POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES

Un riesgo del estudio son las posibles pérdidas de participantes que puedan presentarse durante el seguimiento de los sujetos que serán enrolados en la fase II del estudio Epidemiológico. Este potencial riesgo podría impactar el poder estadístico de las conclusiones resultantes.

17. REGULACIÓN A CONSIDERAR

"De acuerdo al artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio es de carácter observacional, sin intervención en pacientes. El riesgo para los pacientes incluidos será el derivado de la toma de muestras de Sangre, por razones de la investigación o como parte del manejo usual de estos pacientes. En consecuencia, el estudio califica en la categoría establecida por la resolución en mención como "Investigación de riesgo mínimo".

Para su ingreso al estudio, cada paciente deberá firmar el consentimiento informado. En los menores de 18 años, se le solicitará el consentimiento a uno de sus padres. En el consentimiento se especifica la confidencialidad de la información, los riesgos, los beneficios y los derechos del paciente (Anexo 1 a 3).

18. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition. 2009.
2. Organización Panamericana de la Salud. Alerta Epidemiológica: Actualización la situación de Dengue en las Américas. Publicado 11 de febrero de 2011. Visitado 17 junio de 2011. http://bvs.insp.mx/local/File/2011_02_febrero_brote_dengue.pdf
3. Organización Panamericana de la Salud. Vigilancia Epidemia por Dengue en Colombia Boletín de Vigilancia por Dengue en Colombia No. 48 Semana 52 de 2010. <http://190.27.195.165:8080/index.php?idcategoria=84140#> . Visitado 03 de abril de 2011.
4. Instituto Nacional de Salud. Organización Panamericana de la Salud OPS/OMS. *Guía de Atención Clínica Integral del Paciente con Dengue*. Bogotá, 2010
5. TDR/WHO. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Third edición. Geneva: WHO; 2009. p. 1-146. Visitada 17 de febrero 2011. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf
6. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005; 365:1147-52.
7. Noisakran S, Perng GC. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med* (Maywood) 2008;233:401-8.
8. Maron GM, Clara AW, Diddle JW, et al. Association between nutritional status and severity of dengue infection in children in El Salvador. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82:324-9.
9. Anto S, Sebodo T, Sutaryo, Suminta, Ismangoen. Nutritional status of Dengue haemorrhagic fever in children. *Paediatr Indones* 1983;23:15-24.
10. Arguelles JM, Hernandez M, Mazart I. [Nutritional evaluation of children and adolescents with a diagnosis of dengue]. *Bol Oficina Sanit Panam* 1987;103:245-51.
11. Chuansumrit A, Phimolthares V, Tardtong P, et al. Transfusion requirements in patients with dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000;31:10-4.
12. Kabra SK, Jain Y, Pandey RM, et al. Dengue haemorrhagic fever in children in the 1996 Delhi epidemic. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:294-8.
13. Kalayanarooj S, Nimmannitya S. Is dengue severity related to nutritional status? *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36:378-84.
14. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis* 1997; 176:313-21.
15. Libraty DH, Acosta LP, Tallo V, et al. A prospective nested case-control study of Dengue in infants: rethinking and refining the antibody-dependent enhancement dengue hemorrhagic fever model. *PLoS Med* 2009; 6:e1000171.
16. Malavige GN, Ranatunga PK, Velathanthiri VG, et al. Patterns of disease in Sri Lankan dengue patients. *Arch Dis Child* 2006; 91:396-400.
17. Nguyen TH, Nguyen TL, Lei HY, et al. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72:370-4.
18. Pichainarong N, Mongkalangoon N, Kalayanarooj S, Chaveepojnkamjorn W. Relationship between body size and severity of dengue hemorrhagic fever among children aged 0-14 years. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37:283-8.
19. Tantracheewathorn T, Tantracheewathorn S. Risk factors of dengue shock syndrome in children. *J Med Assoc Thai* 2007; 90:272-7.
20. Thisyakorn U, Nimmannitya S. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 1993; 16:295-7.

21. Chuansumrit A, Phimolthares V, Tardtong P, et al. Transfusion requirements in patients with dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000;31:10-4.
22. Kabra SK, Jain Y, Pandey RM, et al. Dengue haemorrhagic fever in children in the 1996 Delhi epidemic. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:294-8.
23. Klassen P, Biesalski HK, Mazariegos M, Solomons NW, Furst P. Classic dengue fever affects levels of circulating antioxidants. *Nutrition* 2004;20:542-7.
24. Widagdo. Blood zinc levels and clinical severity of dengue hemorrhagic fever in children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008;39:610-6.
25. Scrimshaw NS, Taylor CE, Gordon JE. Interactions of nutrition and infection. *World Health Organ Monogr Ser* 1968;57:3-329.
26. Keusch GT. Nutrition and immunity: from A to Z. *Nutr Rev* 1998;56:S3-4.
27. Nguyen TH and others. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. 2005. *Am J Trop Med Hyg* 72: 370-374.
28. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 2002;56 Suppl 3:S14-9.
29. Galli C, Calder PC. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann Nutr Metab* 2009; 55:123-39.
30. Stulnig TM. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;132:310-21.
31. Anderson M, Fritsche KL. (n-3) Fatty acids and infectious disease resistance. *J Nutr* 2002;132:3566-76.
32. Cruz-Chamorro L, Puertollano E, Alvarez de Cienfuegos G, Puertollano MA, de Pablo MA. Acquired resistance to *Listeria monocytogenes* during a secondary infection in a murine model fed dietary lipids. *Nutrition* 2011;27:1053-60.
33. Schwerbrock NM, Karlsson EA, Shi Q, Sheridan PA, Beck MA. Fish oil-fed mice have impaired resistance to influenza infection. *J Nutr* 2009;139:1588-94.
34. Horowitz B, Piet MP, Prince AM, Edwards CA, Lippin A, Walakovits LA. Inactivation of lipid-enveloped viruses in labile blood derivatives by unsaturated fatty acids. *Vox Sang* 1988;54:14-20.
35. Thormar H, Isaacs CE, Brown HR, Barshatzky MR, Pessolano T. Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:27-31.
36. Villamor E, Kouliniska IN, Furtado J, et al. Long-chain n-6 polyunsaturated fatty acids in breast milk decrease the risk of HIV transmission through breastfeeding. *Am J Clin Nutr* 2007;86:682-9.
37. Peck MD, Mantero-Atienza E, Miguez-Burbano MJ, et al. The esterified plasma fatty acid profile is altered in early HIV-1 infection. *Lipids* 1993;28:593-7.
38. Begin ME, Manku MS, Horrobin DF. Plasma fatty acid levels in patients with acquired immune deficiency syndrome and in controls. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1989;37:135-7.
39. Thienprasert A, Samuhaseneetoo S, Popplestone K, West AL, Miles EA, Calder PC. Fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids selectively affect plasma cytokines and decrease illness in Thai schoolchildren: a randomized, double-blind, placebo-controlled intervention trial. *J Pediatr* 2009;154:391-5.
40. Pastor N, Soler B, Mitmesser SH, Ferguson P, Lifschitz C. Infants fed docosahexaenoic acid- and arachidonic acid-supplemented formula have decreased incidence of bronchiolitis/bronchitis the first year of life. *Clin Pediatr (Phila)* 2006;45:850-5.
41. Morgan JW, Morgan DM, Lasky SR, Ford D, Koultab N, Maizel AL. Requirements for induction of vitamin D-mediated gene regulation in normal human B lymphocytes. *J Immunol* 1996;157:2900-8.
42. Baeke F, Korf H, Overbergh L, et al. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:221-7.
43. Takahashi K, Nakayama Y, Horiuchi H, et al. Human neutrophils express messenger RNA of vitamin D receptor and respond to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2002;24:335-47.

44. Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:1308-10.
45. Brennan A, Katz DR, Nunn JD, et al. Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology* 1987;61:457-61.
46. Van Belle TL, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D in autoimmune, infectious and allergic diseases: A vital player? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:617-32.
47. Villamor E, Marin C, Mora-Plazas M, Baylin A. Vitamin D deficiency and age at menarche: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 2011.
48. Hughes DA, Norton R. Vitamin D and respiratory health. *Clin Exp Immunol* 2009;158:20-5.
49. Nnoaham KE, Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2008;37:113-9.
50. Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol* 2011;54:887-93.
51. Mehta S, Hunter DJ, Mugusi FM, et al. Perinatal outcomes, including mother-to-child transmission of HIV, and child mortality and their association with maternal vitamin D status in Tanzania. *J Infect Dis* 2009;200:1022-30.
52. Roth DE, Shah R, Black RE, Baqui AH. Vitamin D status and acute lower respiratory infection in early childhood in Sylhet, Bangladesh. *Acta Paediatr* 2010;99:389-93.
53. Inamo Y, Hasegawa M, Saito K, et al. Serum vitamin D concentrations and associated severity of acute lower respiratory tract infections in Japanese hospitalized children. *Pediatr Int* 2011;53:199-201.
54. McNally JD, Leis K, Matheson LA, Karuananyake C, Sankaran K, Rosenberg AM. Vitamin D deficiency in young children with severe acute lower respiratory infection. *Pediatr Pulmonol* 2009;44:981-8.
55. Wayse V, Yousafzai A, Mogale K, Filteau S. Association of subclinical vitamin D deficiency with severe acute lower respiratory infection in Indian children under 5 y. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:563-7.
56. Roth DE, Jones AB, Prosser C, Robinson JL, Vohra S. Vitamin D status is not associated with the risk of hospitalization for acute bronchiolitis in early childhood. *Eur J Clin Nutr* 2009;63:297-9.
57. Urashima M, Segawa T, Okazaki M, Kurihara M, Wada Y, Ida H. Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1255-60.
58. Manaseki-Holland S, Qader G, Isaq Masher M, et al. Effects of vitamin D supplementation to children diagnosed with pneumonia in Kabul: a randomised controlled trial. *Trop Med Int Health* 2010;15:1148-55.
59. Semba RD. Vitamin A and immunity to viral, bacterial and protozoan infections. *Proc Nutr Soc* 1999;58:719-27.
60. Long KZ, Garcia C, Santos JI, et al. Vitamin A supplementation has divergent effects on norovirus infections and clinical symptoms among Mexican children. *J Infect Dis* 2007;196:978-85.
61. Mayo-Wilson E, Imdad A, Herzer K, Yakoob MY, Bhutta ZA. Vitamin A supplements for preventing mortality, illness, and blindness in children aged under 5: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2011;343:d5094.
62. Long KZ, Garcia C, Ko G, et al. Vitamin A modifies the intestinal chemokine and cytokine responses to norovirus infection in Mexican children. *J Nutr* 2011;141:957-63.
63. Fischer Walker C, Black RE. Zinc and the risk for infectious disease. *Annu Rev Nutr* 2004;24:255-75.
64. Prasad AS. Zinc: mechanisms of host defense. *J Nutr* 2007;137:1345-9.
65. Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* 1998;68:447S-63S.

66. Bhutta ZA, Black RE, Brown KH, et al. Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. Zinc Investigators' Collaborative Group. *J Pediatr* 1999;135:689-97.
67. Lukacik M, Thomas RL, Aranda JV. A meta-analysis of the effects of oral zinc in the treatment of acute and persistent diarrhea. *Pediatrics* 2008;121:326-36.
68. Sazawal S, Black RE, Jalla S, Mazumdar S, Sinha A, Bhan MK. Zinc supplementation reduces the incidence of acute lower respiratory infections in infants and preschool children: a double-blind, controlled trial. *Pediatrics* 1998;102:1-5.
69. Roth DE, Richard SA, Black RE. Zinc supplementation for the prevention of acute lower respiratory infection in children in developing countries: meta-analysis and meta-regression of randomized trials. *Int J Epidemiol* 2010;39:795-808.
70. Singh M, Das RR. Zinc for the common cold. *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD001364.
71. Sandstrom B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br J Nutr* 2001;85 Suppl 2:S181-5.
72. Rosado JL, Lopez P, Munoz E, Martinez H, Allen LH. Zinc supplementation reduced morbidity, but neither zinc nor iron supplementation affected growth or body composition of Mexican preschoolers. *Am J Clin Nutr* 1997;65:13-9.
73. Baqui AH, Zaman K, Persson LA, et al. Simultaneous weekly supplementation of iron and zinc is associated with lower morbidity due to diarrhea and acute lower respiratory infection in Bangladeshi infants. *J Nutr* 2003;133:4150-7.
74. Instituto Nacional de Salud, Sistema de Vigilancia Salud Pública (SIVIGILA). Boletín de Vigilancia Epidemia por Dengue en Colombia. Boletín 34: Agosto 21 a 27 de 2011.
75. Shepard D, Coudeville L, Halasa YA., Zambrano B, and Dayan GH. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2011;84(2):200-7.
76. WHO. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Second Edition. 1997.
77. Bautista LE, Herran OF, Pryer JA. Development and simulated validation of a food-frequency questionnaire for the Colombian population. *Public Health Nutr* 2005; 8:181-8.
78. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl* 2006; 450:76-85.
79. Cole TJ, Flegal KM, Nicholls D, Jackson AA. Body mass index cut offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ* 2007; 335:194.
80. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320:1240-3.
81. Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ* 2007; 85:660-7.